

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

# Calcium-Imaging und funktionelle Charakterisierung von Interdentalzellen in der sich entwickelnden Cochlea der Maus

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

Vorgelegt von: Thore Schade-Mann  
geb. am: 26.02.1992 in Recklinghausen

Tag der Promotion: 29.10.2019

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstattende: Prof. Dr. J. Engel  
Prof. Dr. B. Schick  
PD Dr. D. Basta

**„This offers some hope that one day we can unshroud the elusive nature of the tectorial membrane and its relationship to the organ of Corti“**

- David Lim, 1936 - 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Die Anatomie des auditorischen Systems des Säugetiers . . . . .	7
2.1.1	Überblick über das Außen- und Mittelohr . . . . .	7
2.1.2	Das Innenohr . . . . .	8
2.1.3	Die Innervation der Haarzellen . . . . .	12
2.2	Die Interdentalzellen und die Membrana tectoria . . . . .	13
2.2.1	Die Membrana tectoria . . . . .	14
2.2.2	Der Limbus spiralis und die Interdentalzellen . . . . .	16
2.2.3	Die Rolle der Interdentalzellen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Membrana tectoria . . . . .	17
2.3	Die Physiologie des Hörens . . . . .	18
2.3.1	Schalleitung durch die Auris externa et media . . . . .	19
2.3.2	Generierung eines Rezeptorpotentials und Modulation des auditorischen Eindrucks . . . . .	20
2.4	Purinnukleotide als Signalstoffe . . . . .	22
2.5	Entwicklungsbiologisches Modell . . . . .	24
2.6	Fragestellungen . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Mauslinien . . . . .	25
3.1.1	NMRI-Mäuse . . . . .	25
3.1.2	TRP-M3-GFP Knock-In-Mäuse . . . . .	25
3.1.3	Konditional $P2Y_1$ -Rezeptor-defiziente Mäuse . . . . .	25
3.2	Geräte und Materialien . . . . .	26
3.3	Chemikalien und Lösungen . . . . .	26
3.3.1	Badlösungen . . . . .	26
3.4	Antikörper und Fluorochrome . . . . .	27

3.4.1	Der $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-8 <sup>®</sup> AM . . . . .	32
3.5	Methoden . . . . .	33
3.5.1	Whole-mount-Präparate . . . . .	33
3.5.2	$Ca^{2+}$ -Imaging . . . . .	34
3.5.3	Immunhistochemie . . . . .	36
3.5.4	Cochlea-Kryoschnitte . . . . .	38
3.5.5	Mikroskopische Aufnahmen . . . . .	38
3.5.6	Offline-Analyse der Fluoreszenzaufnahmen . . . . .	38
3.5.6.1	Auswertung der Immunfärbungen . . . . .	38
3.5.6.2	Auswertung der $Ca^{2+}$ -Imaging-Versuche . . . . .	40
3.5.6.3	Die graphische Auswertung der gemessenen Daten . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>44</b>
4.1	Anatomie des Limbus spiralis . . . . .	44
4.2	Immunhistochemische Untersuchung von Pannexin-1 und Pannexin-2 . . . . .	44
4.2.1	Expression von Pannexin-1 in der neonatalen Cochlea . . . . .	45
4.2.2	Expression von Pannexin-2 in der neonatalen Cochlea . . . . .	45
4.3	Live Cell Imaging von Interdentalzellen . . . . .	45
4.3.1	Membran-Imaging an P4 . . . . .	45
4.3.2	Membran-Imaging an P18 . . . . .	45
4.4	Spontane und evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten in IDCs . . . . .	54
4.4.1	Explorative Datenanalyse und statistische Auswertung . . . . .	54
4.4.2	Spontane $Ca^{2+}$ -Transienten . . . . .	56
4.4.2.1	Die Amplitude der spontanen $Ca^{2+}$ -Transienten . . . . .	57
4.4.2.2	Zeit bis zur halbmaximalen Aktivierung der spontanen Transienten . . . . .	58
4.4.2.3	Time to peak der spontanen Transienten . . . . .	58
4.4.2.4	Die Peakdauer der spontanen Transienten . . . . .	58
4.4.2.5	Die Abklingzeit der spontanen Transienten . . . . .	59

4.4.3	In IDCs lassen sich durch verschiedene Agonisten $Ca^{2+}$ -Transienten evozieren . . . . .	59
4.4.3.1	Qualitative Beschreibung der evozierten $Ca^{2+}$ -Transienten	61
4.4.3.2	Nach Hörbeginn ändert sich für ATP die Charakteristik der Transienten . . . . .	62
4.4.3.3	Folgen des $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout für die $Ca^{2+}$ -Transienten	62
4.4.3.4	Stimulation mit Adenosin-5'- $\gamma$ -thiotriphosphat) (ATP $\gamma$ S) an P4/5 . . . . .	71
4.4.3.5	Quantitative Beschreibung der evozierten $Ca^{2+}$ -Transienten an den verschiedenen Altersgruppen . . . . .	71
<b>5 Diskussion</b>		<b>93</b>
5.1	Expressionsanalyse . . . . .	95
5.2	Weitere Schritte / Grenzen und Ausblick . . . . .	95
5.3	Mechanismus der $Ca^{2+}$ -Transienten . . . . .	98
<b>Literatur</b>		<b>101</b>
<b>Anhang</b>		<b>110</b>
	Explorative Datenanalyse der spontanen Amplituden an P0/1 . . . . .	110
	Teststatistiken . . . . .	112
<b>Danksagung</b>		<b>120</b>
<b>Publikationen</b>		<b>121</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über das periphere auditorische System . . . . .	8
2	Die Auris media als Bindeglied zwischen Auris externa und interna . . . . .	9
3	Anatomie der Cochlea . . . . .	10
4	Schematische Darstellung des Corti-Organs . . . . .	12
5	Stereozilien der Haarzellen . . . . .	13
6	Afferente und efferente Innervation der Haarzellen . . . . .	14
7	Gegenüberstellung zweier IDC-Schemata im Tangentialschnitt . . . . .	18
8	Dezellularisierter Ductus cochleasis . . . . .	19
9	Signalgebung über purinerge Rezeptoren . . . . .	23
10	Schematische Darstellung der Exon-1-Deletion im $P2Y_1$ -Gen . . . . .	26
11	Übersicht der Fluoreszenzprofile verschiedener $Ca^{2+}$ -Indikatoren . . . . .	33
12	Beispielpräparation eines whole-mounts an P6 . . . . .	35
13	Fixierung und Messbedingungen der Präparate . . . . .	36
14	Übersicht über die Messbedingungen beim $Ca^{2+}$ -Imaging . . . . .	37
15	Funktion des Extremwertalgorithmus . . . . .	43
16	Schema und LiveImaging mit dem Membranfarbstoff FM 4-64 von Membranen des Limbus spiralis der Maus an P18 . . . . .	47
17	IDC-Säulen an P4 . . . . .	48
18	Mehrere Interdentalzellen bilden einen Gang . . . . .	49
19	Pannexin-1-Expression in der Cochlea an postnataler Tag (P)4 . . . . .	50
20	Pannexin-2-Expression in der Cochlea an P4 . . . . .	51
21	IDC zeigen vesikuläre Inhomogenitäten in ihrem Zytosol an P4 . . . . .	52
22	IDCs zeigten an P18, nach Hörbeginn, mobile intrazelluläre Vesikel . . . . .	53
23	Fiktives Signal zur Verdeutlichung der in der Auswertung gebrauchten Terminologie . . . . .	55
24	Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung spontaner $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters . . . . .	57
25	Zeit zur halbmaximalen Aktivierung $t_{1/2}$ der spontanen $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters . . . . .	58

26	Time to peak der spontanen $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters . . .	59
27	Peakdauer spontaner $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters . . . . .	60
28	Abklingzeit spontaner $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters . . . . .	60
29	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P18 ( $1 \mu M$ ) . . . . .	63
30	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P18 ( $10 \mu M$ ) . . . . .	64
31	Histogramme der evozierten Amplituden an P18 . . . . .	65
32	Histogramme der Abklingzeiten evozierter Transienten an P18 . . . . .	66
33	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P0/1 ( $1 \mu M$ ) . . . . .	67
34	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P0/1 ( $10 \mu M$ ) . . . . .	68
35	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5 ( $1 \mu M$ ) . . . . .	69
36	Nukleotid-evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5 ( $10 \mu M$ ) . . . . .	70
37	ATP-Stimulation ( $1 \mu M$ ) rief an P4/5 in IDCs mit $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout heterogene $Ca^{2+}$ -Transienten hervor . . . . .	72
38	ATP-Stimulation ( $10 \mu M$ ) rief an P4/5 in IDCs mit $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout heterogene $Ca^{2+}$ -Transienten hervor . . . . .	73
39	ATP- und UTP-Stimulation ( $10 \mu M$ ) riefen an P18 in IDCs mit $P2Y_1$ - Rezeptor-Knockout Wildtyp-ähnliche $Ca^{2+}$ -Transienten hervor . . . . .	74
40	Amplituden der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	75
41	Amplituden der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	76
42	Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	77
43	Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	78
44	ATP $\gamma$ S evoziert Transienten in IDCs an P4/5 . . . . .	79
45	ATP $\gamma$ S evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5 . . . . .	80
46	Histogramme der Peakdauer an P4/5 im Agonistenvergleich . . . . .	81
47	Time to peak der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	82

48	Time to peak der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	83
49	Peakdauer der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	84
50	Peakdauer der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	85
51	Abklingzeit der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	86
52	Abklingzeit der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	87
53	Interspike Interval der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	88
54	Interspike Interval der $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP . . . . .	89
55	Schemazeichnung spontaner $Ca^{2+}$ -Transienten im Altersvergleich . . . . .	93
56	Die Elimination des intrazellulären $Ca^{2+}$ . . . . .	94
57	Halbwertsbreite des z-Signals in Abhängigkeit der Konfokalblendenöffnung .	97
58	Explorative Analyse spontaner Amplituden an P0/1 . . . . .	111

## Tabellenverzeichnis

1	Ionenkonzentrationen in den Lymphen . . . . .	11
2	Verwendete Laborgeräte und Materialien . . . . .	28
3	Übersicht über das Verbrauchsmaterial . . . . .	29
4	Verwendete Chemikalien . . . . .	30
5	Zusammensetzung der verwendeten Badlösungen . . . . .	31
6	Antikörper, Fluochrome und Indikatoren . . . . .	32
7	Pufferlösungen für Immunfärbungen . . . . .	39
8	Eingesetzte Software . . . . .	40
9	Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere je Analysegruppe . . . . .	56
10	Medianvergleich der spontanen Transienten . . . . .	61
11	Evozierte Transienten - Medianvergleich Altersstufen . . . . .	90
12	Evozierte Transienten - Medianvergleich Agonistenabhängigkeit . . . . .	92
13	Die Expression der P2ry-Rezeptoren in den IDCs . . . . .	99
14	Überblick über die Affinitäten der in den IDCs exprimierten Rezeptoren zu verschiedenen Purinnukleotiden . . . . .	99
15	Deskriptive Statistik - spontane Amplitude an P0/1 . . . . .	110
16	Teststatistiken - Spontane Transienten . . . . .	112
17	Teststatistiken - Altersgruppen . . . . .	113
18	Teststatistiken - Agonisten . . . . .	116

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATP<math>\gamma</math>S</b>	Adenosin-5'-(3-thiotriphosphat)
<b>B33</b>	Badlösung Nr. 33
<b>B49</b>	Badlösung Nr. 49
<b>BSA</b>	bovine serum albumin (Rinder-Serumalbumin)
<b>CEACAM</b>	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
<b>CIPMM</b>	Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin
<b>DAG</b>	1,2-Diacylglycerin
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FACIT</b>	fibril associated collagens with interrupted triple helices
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>Ggll.</b>	Ganglia
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>IDCs</b>	Interdentalzellen
<b>IHC</b>	innere Haarzelle
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
<b>IQR</b>	Interquartilabstand
<b>M.</b>	Musculus
<b>MET</b>	mechanoelektrischen Transduktionskanal
<b>N.</b>	Nervus
<b>Ncl.</b>	Nucleus
<b>NMRI</b>	Naval Medical Research Institute

<b>OHC</b>	äußere Haarzelle
<b>P</b>	postnataler Tag
<b>P2ry1-KO</b>	<i>P2Y<sub>1</sub></i> -Rezeptor-Kockout
<b>PAK</b>	Primärantikörper
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>Proc.</b>	Processus
<b>ROI</b>	region of interest
<b>SAK</b>	Sekundärantikörper
<b>SERCA</b>	Sarcoplasmic / Endoplasmic reticulum calcium ATPase
<b>SGN</b>	Spiralganglion-Neurone
<b>SNARE</b>	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
<b>TM</b>	Membrana tectoria
<b>TMC</b>	transmembrane channel-like
<b>THRC</b>	Tübingen Hearing Research Centre
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat

Hinweis:

Eigene Darstellungen/Abbildungen werden im Folgenden mit „TSM“ kenntlich gemacht.

## 1 Zusammenfassung

Für eine physiologische Funktion des Innenohrs des Säugetiers sind neben den Sinnes- und Stützzellen auch eine Reihe von azellulären, membranösen Strukturen notwendig. Hierzu gehört auch die Membrana tectoria. Diese wird in der sich entwickelnden Cochlea u. a. von den Interdentalzellen des Limbus spiralis gebildet, welche in der adulten Cochlea auch die Verankerung der ansonsten frei flottierenden Membran bilden.

Für sekretorische Prozesse dienen häufig Calcium-Ionen als second messenger. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob Interdentalzellen altersabhängig spontane Calcium-Signale generieren und ob diese pharmakologisch beeinflusst werden können. Humane *in vivo* Studien zu den Interdentalzellen sind nicht möglich, daher wurden die Untersuchungen am Mausmodell durchgeführt.

Methodisch kamen das Calcium-Imaging mit dem fluoreszierenden Calcium-Indikator Fluo-8 AM sowie das live cell membrane imaging mit den Membranmarkern FM 4-64 und CellMask Deep Red zum Einsatz. Für diese Experimente und für immunhistochemische Untersuchungen wurden cochleäre Häutchenpräparate (whole-mounts) verwendet; anatomische Studien wurden auch an cochleären Kryoschnitten durchgeführt. Alle mikroskopischen Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen.

Mit Hilfe des live cell membrane imaging konnte die in der Literatur beschriebene, komplexe Anatomie der Interdentalzellen auf dem Limbus spiralis nachvollzogen werden. Die Interdentalzellen waren in säulenartigen Zellreihen angeordnet, welche von aus der Tiefe des Limbus spiralis heraufreichende extrazelluläre Finger („Huschkes Gehörzähne“) unterbrochen wurden. In Richtung des Modiolus nahm diese Ordnung ab. Am postnatalen Tag 4 (P4) zeigten sich kannalikuläre Inhomogenitäten des Zytosols der Interdentalzellen. An P18, also nach dem Hörbeginn der Maus an P12, konnten *in vitro* erstmalig mobile vesikuläre Strukturen in Interdentalzellen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnten die ATP-leitenden Proteine Pannexin-1 und Pannexin-2 in Interdentalzellen gezeigt werden.

Den Hauptteil der Arbeit bildete die Messung und Charakterisierung von bis dahin unbekanntem Calcium-Signalen in Interdentalzellen in der Phase der cochleären Differenzierung. Interdentalzellen generierten zu allen beobachteten Zeitpunkten (P0, P1, P4, P5 und P18) spontane intrazelluläre Calcium-Transienten. Deren relative Häufigkeit war am Tag 0/1 am geringsten, nahm zum Tag 4/5 auf das 12,5fache zu und sank zu P18 auf das Doppelte des Ausgangswertes ab. Bei allen Altersstufen führte die Stimulation der Interdentalzellen mit den Trinukleotiden ATP und UTP zu Calcium-Transienten unterschiedlicher Amplitude und Form. Vor dem Hörbeginn kam es zu robusten Oszillationen. Am Tag 18, also nach Hörbeginn, kam es zu einer differenziellen Antwort auf ATP-Stimulation. Es wurden entweder oszillierende Calcium-Transienten oder ein initialer Calcium-Peak, welcher von einer Plateauphase gefolgt wurde, beobachtet. Die UTP-Antwort unterschied sich an P18 phänomenologisch nicht von der vor dem Hörbeginn.

Interdentalzellen zeigten im Laufe der cochleären Entwicklung deutliche Veränderungen

im Hinblick auf die Häufigkeit, die Amplitude und die kinetischen Eigenschaften spontaner Calcium-Transienten, sowie auf die Antwortmuster bei Stimulation mit ATP und UTP. Ob die spontanen Calcium-Transienten für die Bildung und Aufrechterhaltung der Tektorialmembran nötig sind, können nur weiterführende Untersuchungen klären.

## Summary

### Calcium imaging and functional characterization of interdental cells in the developing cochlea of the mouse

For the physiological function of the mammalian inner ear not only sensory and supporting cells but also a number of acellular, membranous structures are necessary, which includes the tectorial membrane. In the developing cochlea, interdental cells of the spiral limbus secrete material and thereby contribute to formation of the tectorial membrane. Interdental cells also anchor the otherwise free-floating membrane in the mature cochlea.

Calcium ions serve as second messengers in various secretory processes. This led to the question if interdental cells generate age-dependent spontaneous calcium signals and whether these can be pharmacologically modulated. Because these experiments cannot be performed in humans, mice were used as animal model.

Calcium imaging was performed using the fluorescent calcium indicator Fluo-8 AM; for live cell membrane imaging the membrane markers FM 4-64 and CellMask Deep Red were used. For imaging and immunohistochemical experiments cochlear whole-mounts were used; anatomical studies were also performed on cochlear cryosections. Images were acquired with a confocal laser scanning microscope.

Using live cell membrane imaging, the complex anatomy of the interdental cells on top of the spiral limbus was confirmed, which has been described before in histological studies. Interdental cells were arranged in columnar-like rows, which were interrupted by interdigitations of extracellular matrix („teeth of Huschke“) reaching up from the depth of the limbus spiralis. This orderly arrangement decreased towards the modiolus. On postnatal day 4 (P4), cannicular-shaped structures within the cytosol of the interdental cells were observed. At P18, after the start of hearing of the mouse at P12, mobile vesicular structures in interdental cells could be detected for the first time in *in vitro* experiments. Using immunofluorescence, expression of the ATP-conducting proteins pannexin-1 and pannexin-2 was shown in interdental cells.

The main part of this thesis focuses on the measurement and characterization of previously unknown calcium signals in interdental cells during cochlear differentiation. Interdental cells generated spontaneous intracellular calcium transients at all observed ages (P0, P1, P4, P5 and P18). Their relative frequency was lowest on P0/1, increased by a factor of 12.5 on day 4/5 and decreased to twice the initial value on day P18. At all ages, stimulation of interdental cells with the trinucleotides ATP and UTP elicited calcium transients of varying amplitude and shape. Before the onset of hearing, interdental cells responded with robust oscillations. At P18, after the onset of hearing, ATP stimulation caused a differential response with either oscillating calcium transients or an initial calcium peak followed by a plateau phase. The UTP response at P18 was however not different from that before the onset of hearing.

During cochlear development, interdental cells showed significant changes in the frequency,

amplitude, and kinetic properties of spontaneous calcium transients, as well as in the response patterns to stimulation with ATP and UTP. Whether the spontaneous calcium transients are necessary for the formation and maintenance of the tectorial membrane needs to be elucidated in further investigations.

## 2 Einleitung

Das Hören spielt eine essentielle Rolle in der Kommunikation des Menschen. Als Sinnesorgan zur Schallwahrnehmung ist das Ohr als peripherer Teil des auditorischen Systems eine hochspezialisierte Struktur, die einen Frequenzbereich von 16 bis 20.000 Hz und einen Lautstärkebereich von 4 bis 130 Phon abzubilden vermag (Geisler, 1998; Zenner, 2011). Wie wichtig die auditorische Wahrnehmung für den Menschen ist, wird auch darin deutlich, dass Schwerhörigkeit im Alter mit dem Entstehen von Depressionen und Demenz assoziiert ist (Huh, 2018).

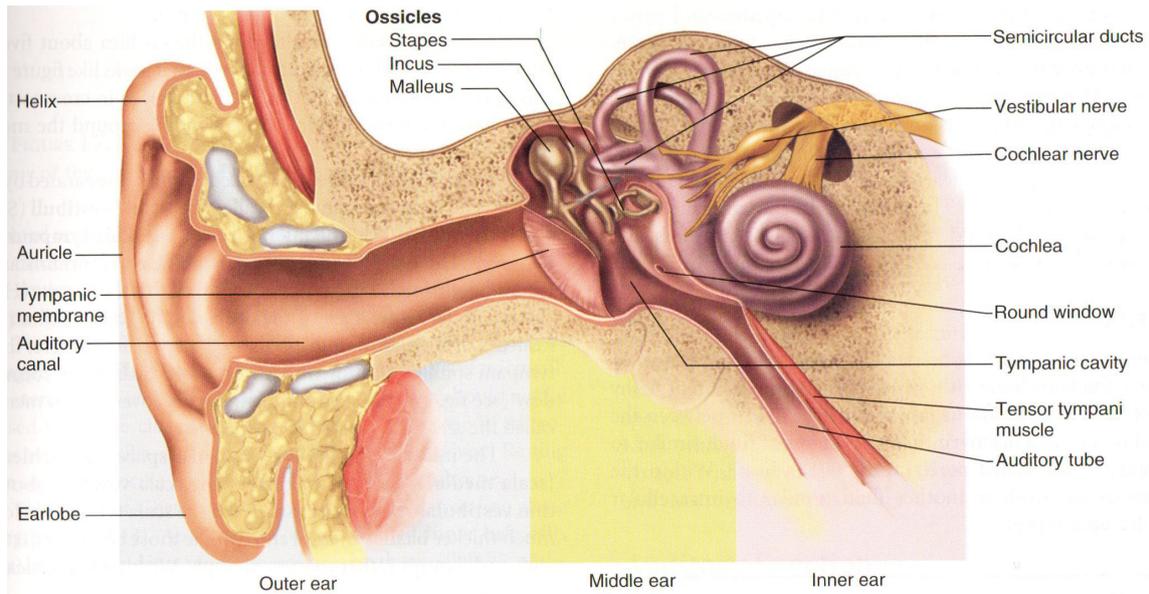
Die Aufgabe des Ohrs besteht darin, einen ankommenden Schallreiz in elektrische Signale zu übersetzen, welche über den Hörnerv zum Gehirn gelangen. Dies ist ein komplexer, vielschrittiger Prozess. Zuerst wird der Schall von der Ohrmuschel in den äußeren Gehörgang kanalisiert, wo er auf das Trommelfell trifft. Hieran schließt sich das Mittelohr mit den Gehörknöchelchen an, deren Aufgabe die Weiterleitung des Schalls an das Innenohr ist. Im Innenohr findet die eigentliche Umwandlung in die elektrischen Signale statt. Als eine wichtige Struktur im Innenohr findet sich die Membrana tectoria (TM), welche von den Interdentalzellen (IDCs) ausgeht und die Haarsinneszellen überspannt (Raphael und Altschuler, 2003).

### 2.1 Die Anatomie des auditorischen Systems des Säugetiers

Das auditorische System des Säugetiers kann in einen peripheren und einen zentralen Abschnitt untergliedert werden. Zu dem peripheren Teil gehören erstens das äußere Ohr mit der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang, zweitens das durch die Paukenhöhle des Felsenbeins (Cavitas tympani) gebildete Mittelohr inklusive der Gehörknöchelchen und drittens der cochleäre Anteil des Innenohres mit dem eigentlichen sensorischen Epithel (Corti-Organ). Der zentrale Abschnitt wird durch die afferente Hörbahn mit dem Hörnerv und der Hörbahn bis zur primären Hörrinde dargestellt (Abb. 1; Schiebler und Korf, 2007).

#### 2.1.1 Überblick über das Außen- und Mittelohr

Das äußere Ohr (Auris externa) und das Mittelohr (Auris media) dienen als schalleitender Apparat. Die durch elastischen Knorpel stabilisierte Ohrmuschel (Auricula) gehört zur Auris externa. Von hier aus wird der afferente Schall in den blind endenden, äußeren Gehörgang (Meatus acusticus externus) geleitet. Das am Ende des Meatus acusticus externus liegende Trommelfell (Membrana tympanica) stellt den Übergang zwischen der Auris externa und der Auris media dar. Mittelohrseitig schließen sich die Gehörknöchelchen (Ossicula auditoria) an. Diese sind der Hammer (Malleus), der Amboss (Incus) und der Steigbügel (Stapes; Abb. 2). Durch ihre gelenkige Verbindung wird eine knöcherne Brücke zwischen der Membrana tympanica und dem ovalen Fenster des Innenohrs (Fenestra vestibuli), welches von der Fußplatte des Stapes (Basis stapedis) kontaktiert wird, gebildet. Das runde Fenster (Fenestra cochleae) an der medialen Wand der Paukenhöhle stellt



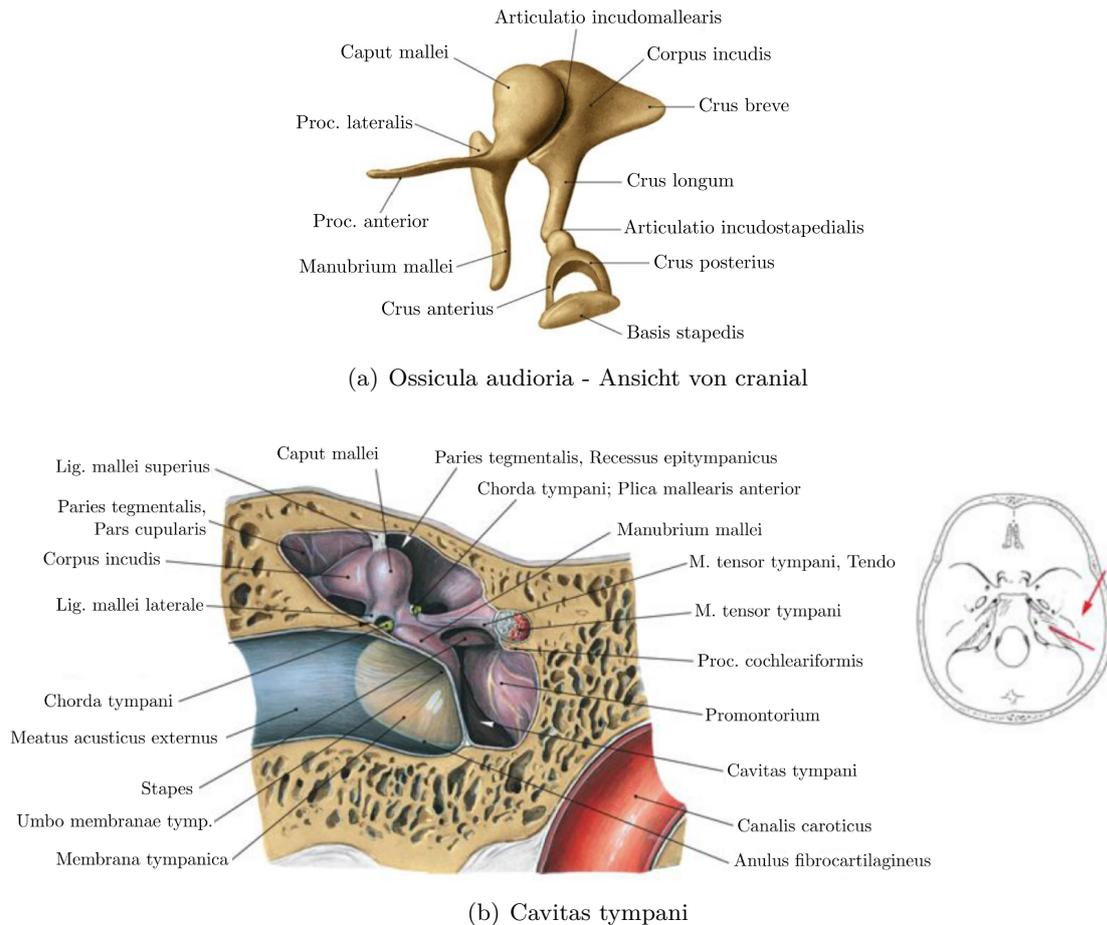
**Abbildung 1: Übersicht über das periphere auditorische System.** Das periphere auditorische System des Säugetiers kann in drei Abschnitte untergliedert werden. An die peripher liegenden, den Schall leitenden Anteile mit dem Außenohr und äußerem Gehörgang, schließt sich das in der Paukenhöhle gelegene Mittelohr an. Den eigentlichen sensorischen Anteil bildet die Cochlea mit dem sensorischen Epithel im Corti-Organ. Quelle: Saladin (2014).

einen weiteren häutigen Zugang zum Innenohr dar. Neben den knöchernen Strukturen gehören zur *Auris media* noch zwei Muskeln: Der durch den Nervus (N.) *tensoris tympani* (Ast des N. *mandibularis*) innervierte *Musculus (M.) tensor tympani* und der durch den N. *stapedius* (Ast des N. *facialis*) innervierte *M. stapedius*. Ersterer kommt aus dem *Canalis musculotubarius* an der ventralen Wand der *Cavitas tympani* und zieht um den *Processus (Proc.) cochleariformis* zum Hals des *Malleus (Collum mallei)*. Der *M. stapedius* entspringt an der dorsalen Paukenhöhle und inseriert mit seiner Sehne an der *Basis stapedis*. Durch das Angreifen dieser Muskeln können die Übertragungseigenschaften des Mittelohres an die Umgebungsbedürfnisse angepasst werden (Zenner, 2011; Schiebler und Korf, 2007).

### 2.1.2 Das Innenohr

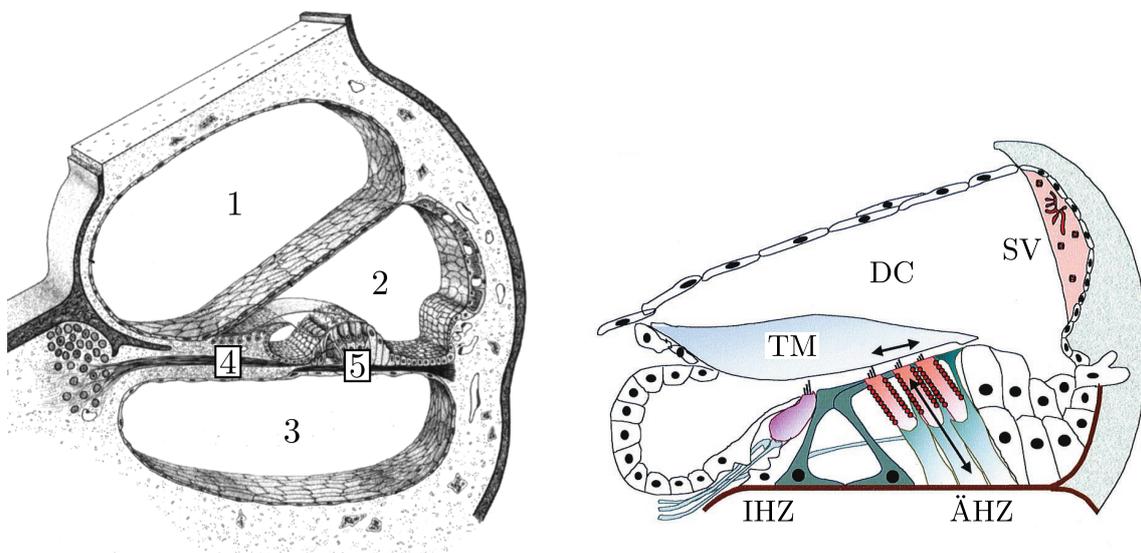
Das Innenohr (*Auris interna*) ist in der *Pars petrosa ossis temporalis* gelegen und vereinigt mit der Hörschnecke (*Cochlea*) und dem Vestibularorgan zwei Sinnesorgane. Das Vestibularorgan dient als Sensor für Linear- und Winkelbeschleunigungen (Schiebler und Korf, 2007; Zenner, 2011). Der Fokus liegt im Folgenden auf den zur Schallrezeption notwendigen cochleären Strukturen.

Die Cochlea ist eine gewundene, tubuläre Struktur, welche entlang ihrer Longitudinalachse in drei flüssigkeitsgefüllte Gänge geteilt ist. Zwei dieser Gänge, der Vorhofgang (*Scala vestibuli*) und der Paukengang (*Scala tympani*), bilden ein über ein enges Spitzenloch (*Helicotrema*) kommunizierendes, kontinuierliches System, welches an der *Fenestra vestibuli* beginnt und an der *Fenestra cochleae* endet (Abschnitt 2.1.1; Held, 1926). Hiervon in der Mitte eingeschlossen, liegt der Schneckengang (*Ductus cochlearis*). In situ bilden die drei Gänge beim Menschen eine um eine zentrale Achse (*Modiolus*) gewundene Schnecke mit  $2\frac{1}{2}$



**Abbildung 2: Die Auris media als Bindeglied zwischen Auris externa und interna.**  
**a,** Die Ossicula auditoria sind gelenkig miteinander verbunden und bilden die knöcherne Brücke zwischen dem häutigen Trommelfell und dem ovalen Fenster als Zugang zur Auris interna.  
**b,** Ansicht der Paukenhöhle von ventral. Quelle: Nach Putz und Pabst (2007).

Windungen (Trepel, 2012, vgl. auch Abb. 12). In der adulten Cochlea ist der Modiolus ein knöcherner Hohlkegel, welcher die Ganglia (Ggl.) spiralia und die Fasern des Hörnerven (N. cochlearis) enthält. Das den Ductus cochlearis auskleidende Epithel ist an seiner Oberfläche durch ein dichtes Netzwerk von Zonulae occludentes gegenüber der Umgebung abgedichtet. In der Scala vestibuli und der Scala tympani fehlt dieses dichte Epithel (Nadol, 1979; Raphael und Altschuler, 2003; Kitajiri et al., 2004). Diese Diffusionsbarriere zwischen den verschiedenen Kompartimenten ist wichtig, weil sich die ionische Zusammensetzung ihrer Flüssigkeiten erheblich unterscheidet. So kann ein elektrisches Potential aufgebaut werden, welches für das Hören unerlässlich ist (Abschnitt 2.3). Ein Ionenaustausch kann folglich nur über kontrollierte Wege stattfinden (Kitajiri et al., 2004). Ein äußeres Flüssigkeitssystem besteht aus der Scala vestibuli und der Scala tympani. Hierin befindet sich die Perilymphe, welche als Filtrat des Liquor cerebrospinalis zu betrachten ist und in ihrer Zusammensetzung dem Blutplasma ähnelt. Im Ductus cochlearis befindet sich die Endolymphe. Der wichtigste Unterschied zwischen Endo- und Perilymphe ist der sehr hohe Kaliumgehalt der Endolymphe, welcher durch die Stria vascularis der lateralen Wand aktiv aufgebaut wird. Hinzu kommt das positive Potential von  $+85\text{ mV}$  gegenüber der Perilymphe in den Scalae vestibuli et tympani und der Perilymphe im sensorischen Epithel ( $0\text{ mV}$ ) (Abb. 3



(a) Schematischer Querschnitt einer maturen Cochlea (b) Schematischer Querschnitt durch den maturen Ductus cochlearis

**Abbildung 3: Anatomie der Cochlea.** **a**, Schematischer Querschnitt durch eine adulte Cochlea mit Scala vestibuli (1), Ductus cochlearis (2), Scala tympani (3), Limbus spiralis mit den IDCs (4) und dem Cortischen Organ mit den Haarzellen (5). Quelle: Nach Geisler (1998). **b**, Schematische Zeichnung des Ductus cochlearis. DC = Ductus cochlearis, TM = Membrana tectoria, SV = Stria vascularis, IHZ = innere Haarzelle, ÄHZ = äußere Haarzellen. Quelle: Nach Ashmore et al. (2000).

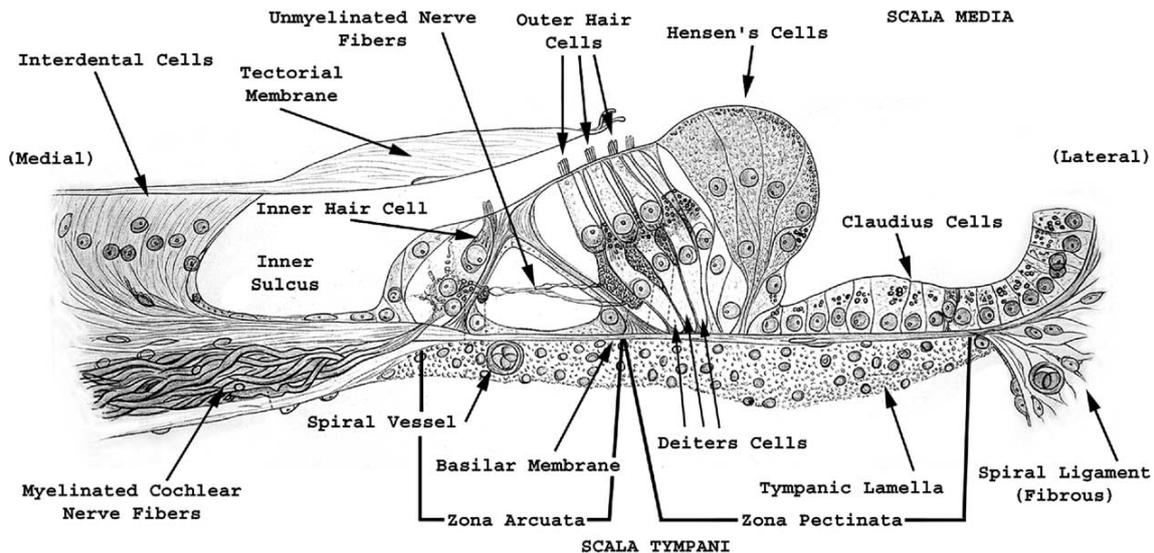
**Tabelle 1: Ionenkonzentrationen in den Lymphen.** Die Endolymphe weist im Vergleich zur Perilymphe eine sehr hohe  $K^+$ -Konzentration auf. Das  $Na^+/K^+$ -Verhältnis kehrt sich zwischen den Lymphen annähernd um. Quelle: TSM in Anlehnung an Sellick und Johnstone (1975); Wangemann (2006). ATP-Konzentration in  $[nM]$ , gemessen mit dem Luciferin-Luciferase-System (Muñoz et al., 1995).

ION	PERILYMPHE	ENDOLYMPHE
$K^+$ $[mM]$	5	150
$Na^+$ $[mM]$	150	1
$Cl^-$ $[mM]$	110	110
$Ca^{2+}$ $[mM]$	1,3	0,023
ATP $[nM]$	$10,5 \pm 3,9$	$12,9 \pm 2,4$

und Tab. 1; Raphael und Altschuler, 2003).

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die feingeweblichen Strukturen des Ductus cochlearis von Interesse. Dieser hat einen annähernd dreieckigen Querschnitt, welcher mit seinem spitzen Winkel in Richtung des Modiolus weist. Den Boden bildet die Basilarmembran, welche den Ductus cochlearis zur Scala tympani hin abgrenzt. Die Decke wird von der aus nur zwei Zellschichten bestehenden Reissner-Membran gebildet. Diese grenzt den Ductus cochlearis zur Scala vestibuli hin ab. Die laterale Wand mit der Stria vascularis grenzt den Ductus cochlearis zur knöchernen Hülle hin ab. Im auf der Basilarmembran gelegenen Corti-Organ befindet sich das eigentliche sensorische Epithel, welches aus äußeren und inneren Haarzellen sowie strukturell und funktionell einzigartigen Stützzellen besteht. Äußere und innere Haarzellen werden durch verschiedene Stützzellen strukturell und metabolisch in ihrer Funktion unterstützt (Abb. 4). Unmittelbar unterhalb der äußeren Haarzellen liegen drei Reihen der Deiters-Zellen, welche mit Fortsätzen bis an den apikalen Pol der Haarzellen heranreichen. Beim Corti-Organ beginnend, folgt in Richtung des Modiolus, in der adulten Cochlea der innere Sulcus (Sulcus spiralis internus), welcher aufsteigend in den Limbus spiralis übergeht. Das Deckepithel des Limbus spiralis wird durch die IDCs gebildet. Von hier ausgehend, überspannt die TM das Corti-Organ in radialer Richtung auf der gesamten Länge der Cochlea (Abschnitt 2.2). Während der Entwicklung der Cochlea ist der innere Sulcus noch nicht angelegt (Held, 1926; Raphael und Altschuler, 2003; Lüllmann-Rauch, 2009). An seiner Stelle befindet sich das Kölliker-Organ, welches kurz vor Beginn der Hörfunktion wahrscheinlich durch Apoptose zurückgebildet wird (Dayaratne et al., 2014).

Die sensorischen Zellen sind in insgesamt vier Reihen Haarzellen angeordnet. Von der lateralen Wand aus betrachtet, liegen zuerst drei Reihen äußerer Haarzellen, gefolgt von einer Reihe innerer Haarzellen. Die Haarzellen haben an ihrem apikalen Pol mehrere Reihen von Stereozilien, welche diesen Zellen ihren Namen verleihen. Sie sind anatomisch vergleichbar mit Mikrovilli. Diese Ausstülpungen der Zellmembran haben ein sehr steifes Stützskelett aus Aktin und mit Aktin assoziierten Proteinen (im Gegensatz zu Kinozilien, welche ein Skelett aus Mikrotubuli und entsprechenden Motorproteinen haben). An der Wurzel sind die Zilien

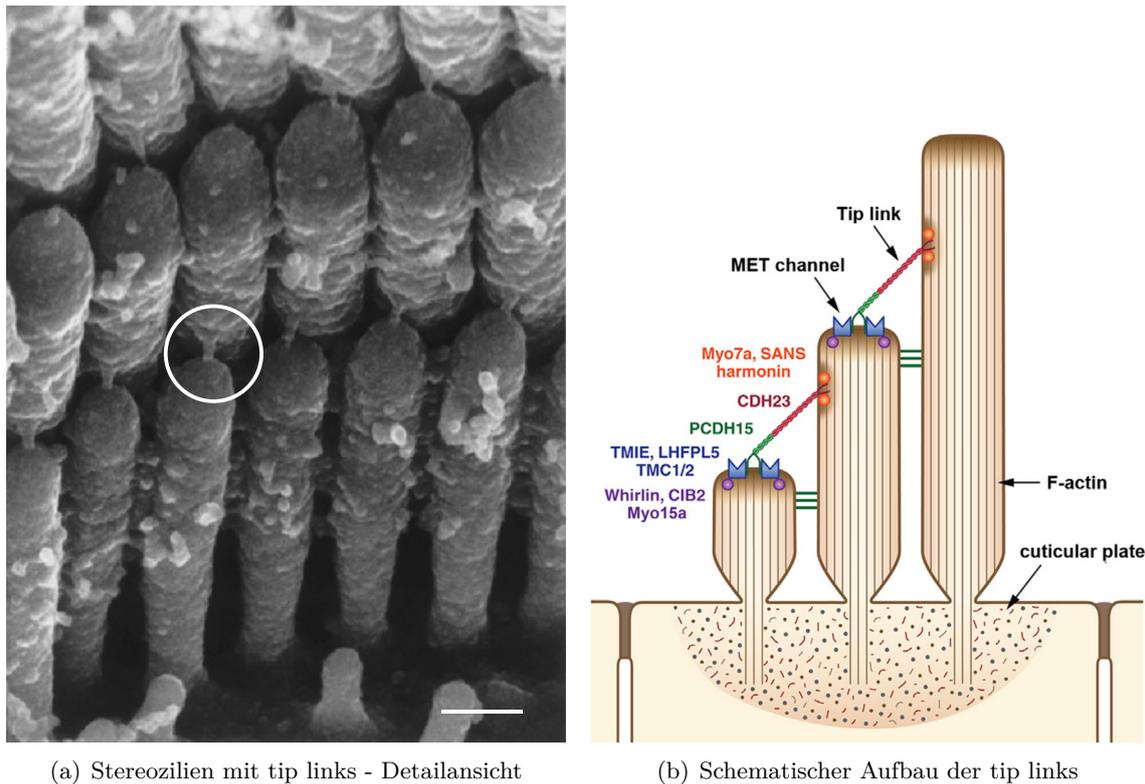


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Corti-Organs.** Die inneren und äußeren Haarzellen sind in verschiedene, jeweils in Morphologie und Funktion einzigartige Stützstrukturen eingebettet. Quelle: Raphael und Altschuler (2003).

verjüngt, so dass sie an dieser Stelle gegenüber der Haarzelle artikulieren können. Das Aktinskelett der 4 – 8  $\mu\text{m}$  langen und 200 – 500  $\text{nm}$  Durchmesser messenden Stereozilien geht an der Basis in die Kutikularplatte der Haarzelle über und ist hier verankert (Lüllmann-Rauch, 2009). Innere Haarzellen tragen typischerweise zwischen 20 und 50 Stereozilien, abhängig von der Spezies und der Position in der Cochlea. Diese sind in zwei bis drei Reihen anwachsender Höhe angeordnet. Die kürzeste Reihe liegt zum Modiolus, und die längste Reihe ist zur lateralen Wand hin gewandt (Raphael und Altschuler, 2003). Bei den äußeren Haarzellen ist die Situation grundsätzlich ähnlich. Im Gegensatz zu den inneren Haarzellen sind die Stereozilien bei den äußeren Haarzellen in drei bis sechs Reihen in Form eines „V“ oder eines „W“ konfiguriert, deren Höhe von modiolar nach lateral zunimmt. Eine äußere Haarzelle trägt 120 bis 150 Stereozilien (Lim und Brichta, 2016). Sowohl bei den inneren als auch bei den äußeren Haarzellen sind die Stereozilien der unterschiedlich langen Reihen mit Proteinfäden, den so genannten Spitzenfäden (heute bekannt als tip links; Sziklai et al., 2003), miteinander verbunden. Diese bestehen zu einem großen Teil aus dem Protein Cadherin-23 und Protocadherin-15 (Abb. 5; Raphael und Altschuler, 2003; Lüllmann-Rauch, 2009).

### 2.1.3 Die Innervation der Haarzellen

Die afferente Innervation der Haarzellen erfolgt durch die Neurone der Ggl. spiralia im Modiolus. Auf Grund ihres Innervationsmusters, der Myelinisierung und der Proteinexpression können die Spiralganglion-Neurone (SGN) in zwei Typen unterteilt werden. Die Typ I SGN kontaktieren jeweils eine innere Haarzelle, während Typ II SGN mehrere äußere Haarzellen afferent innervieren. Eine innere Haarzelle hat Kontakt zu 10 bis 30 Typ I SGN, welche das auditorische Signal nach zentral übermitteln. Dies erklärt auch, warum dieser Typ 90 – 95 % aller SGN ausmacht. An der Synapse der inneren Haarzelle wurden Glutamatrezeptoren (GluR) vom NMDA- und AMPA- Typ nachgewiesen, wobei NMDA

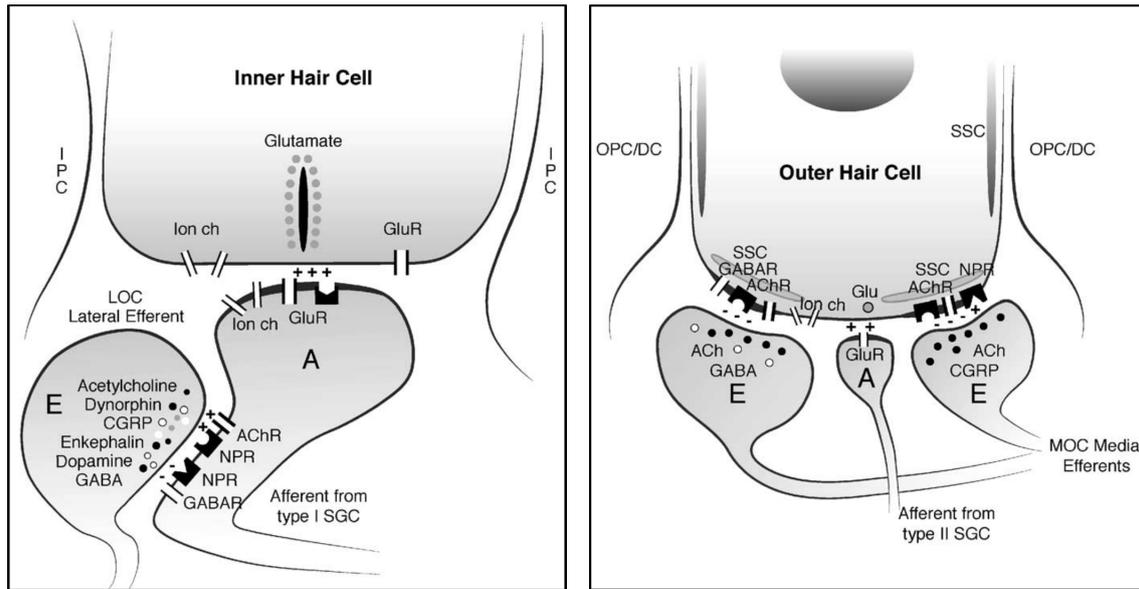


**Abbildung 5: Stereozilien der Haarzellen.** **a**, Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Stereozilien der Haarzellen. Gut zu erkennen ist die ansteigende Höhe der Zilien und die verbindenden Spitzenfäden (weißer Kreis). Maßstab = 200 nm. Quelle: Nach Klinke et al. (2010). **b**, Schematische Darstellung der Stereozilien mit den Spitzenfäden. Molekularer Aufbau. Cadherin-23 (CDH23), Protocadherin-15 (PCDH15), Myosin (Myo), Transmembrane inner ear expressed protein (TIMIE). Quelle: Fettiplace (2016).

nur unter pathologischen Bedingungen eine Rolle zu spielen scheint (Goutman et al., 2015). Viel eher scheinen GluR2/3 und GluR4 die entscheidenden Rezeptoren zu sein. In der ausgereiften Cochlea gibt es keine direkten Efferenzen zu den inneren Haarzellen. Die Postsynapse der Typ I SGN empfängt jedoch eine efferente Innervation aus dem im Hirnstamm gelegenen lateralen Nucleus (Ncl.) olivaris superior. Ganz anders ist die Situation an den äußeren Haarzellen. Diese werden direkt von Efferenzen des medialen Ncl. olivaris superior kontaktiert (Abb. 6; Raphael und Altschuler, 2003; Goutman et al., 2015). Die Fasern sowohl der Afferenzen als auch der Efferenzen vereinigen sich zum N. cochlearis und ziehen durch den Meatus acusticus internus nach zentral. Die Rolle der Typ-II-Afferenzen ist noch nicht bekannt.

## 2.2 Die Interdentalzellen des Limbus spiralis und die Membrana tectoria

Der Limbus spiralis stellt die modiolare Grenze des Ductus cochlearis dar und kann in der adulten Cochlea in verschiedene Bereiche aufgeteilt werden: Eine tiefe Zone aus vornehmlich Bündeln radiär ausgerichteter Fasern, eine zentrale Zone aus kleineren Bündeln und sternförmigen Zellen mit omnidirektionalen Fortsätzen, des weiteren eine Grenzzone zum Sulcus spiralis internus und die oberflächliche Zone. Hier liegen die Interdentalzellen. Auf der oberflächlichen Zone inseriert auch die Reißner-Membran. Zwischen ihr und dem



(a) Die Innervation der inneren Haarzelle

(b) Die Innervation der äußeren Haarzelle

**Abbildung 6: Afferente und efferente Innervation der Haarzellen.** **a**, Die Afferenzen (A) der inneren Haarzellen werden durch die Typ I SGN realisiert. Sie machen etwa 95 % der Fasern des N. cochlearis aus. Die afferente Postsynapse ist mit Glutamaterezeptoren (GluR) vom ionotropen AMPA-Typ, evtl. auch metabotropen Anteilen sowie weiteren Ionenkanälen (Ion ch) ausgestattet. Die innere Haarzelle empfängt selbst keine efferente Innervation (E), lediglich die Postsynapse der Typ I SGN hat Kontakt zu efferenten Fasern aus dem lateralen Ncl. olivaris superior (LOC Lateral Efferent). Diese besitzen ein breites Spektrum an Neurotransmittern (Liste in Grafik) mit exzitatorischen (+) oder inhibitorischen (-) Eigenschaften. Die IHC ist von den inneren Phalangenzellen (IPC) umgeben. **b**, Die OHC sind von den outer phalangeal cells (OPC) oder den Deiters-Zellen (DC, Synonima) umgeben. Im postsynaptischen Bereich gegenüber den efferenten Axonterminalen weisen die OHC subsuperfizielle Zisternen auf (SSC) auf. Im Gegensatz zu den IHC sind die OHC sowohl afferent (A) als auch efferent (E) innerviert. Der Neurotransmitter für die Afferenz ist Glutamat (Glu), welches von den Rezeptoren der Typ II SGN in elektrische Signale umgewandelt wird. Der Reflexbogen für die OHC läuft über den medialen Ncl. olivaris superior (MOC Medial Efferents). Als Neurotransmitter für die Efferenz kommen sowohl Acetylcholin (ACh) mit inhibitorischen Rezeptoren (AChR) vom ionotropen, nikotinergen Typ mit  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  Untereinheiten sowie ggf. metabotrope Rezeptoren als auch GABA und Glycin mit entsprechenden Rezeptoren (GABAR, GlyR) zum Einsatz (Buerbank et al., 2011). Quelle: Raphael und Altschuler (2003).

Modiolus befindet sich Borghesans vasculo-epitheliale Zone. Ferner wird der Limbus spiralis von zahlreichen Kapillaren durchzogen (Iurato, 1962). An der zum Ductus cochlearis weisenden Oberfläche des Limbus spiralis, dem Labium vestibulae (Held, 1926), ist die Membrana tectoria verankert (Bargmann, 1977). Wie wichtig die Membrana tectoria für eine optimale Hörfunktion ist, zeigt sich in Pathologien, die mit Strukturdefekten der TM einhergehen. Hierbei kommt es regelhaft zu einem deutlichen Hörverlust (McGuirt et al., 1999; Knipper et al., 2001; Zwaenepoel et al., 2002; Richardson et al., 2008).

### 2.2.1 Die Membrana tectoria

In der adulten Cochlea stellt die TM eine azelluläre Membran dar, welche vom Limbus spiralis ausgehend, das sensorische Epithel überspannt und sich über die ganze Länge der Cochlea erstreckt. In radialer Richtung kann sie in drei Abschnitte untergliedert

werden: (i) die Innenzone im Bereich des Limbus spiralis, (ii) die Mittelzone, welche den Hauptteil der TM darstellt und im Bereich des inneren Sulcus liegt und (iii) die Randzone im Bereich radial der äußeren Haarzellen (Held, 1926). Die Innenzone bedeckt die IDCs und ist mit zapfenartigen Fortsätzen, die zwischen den IDCs interdigitieren, am Limbus verankert (Voldrich, 1967; Bargmann, 1977; Thorn et al., 1979). Der Hauptteil der Membran flottiert frei über dem Sulcus spiralis internus und den inneren Haarzellen. Den Abschluss über den OHC bildet der Randkomplex. Dieser setzt sich aus der Randleiste sowie dem Löwenbergschen Randfasernetz zusammen (Held, 1926; Iurato, 1960; Lim, 1972). Die TM ist mit dem Randfasernetz meist an der äußersten Reihe der Deiters-Zellen, in einigen Fällen auch an den Hensen-Zellen, verankert (Iurato, 1960; Lim, 1972). Durch Öffnungen im Randnetz wird ein freier Strom der Endolymphe in radialer Richtung ermöglicht. Der Randkomplex geht auf der Membranunterseite in eine homogene Grenzschicht über (sog. Hardestys Membran; Hardesty, 1908; Lim, 1972). Im elektronenmikroskopischen Präparat ist diese häufig etwas von dem Membranhauptkörper abgelöst sowie in Richtung der inneren Haarzellen unterbrochen. Auf der TM-Unterseite, unmittelbar gegenüber den inneren Haarzellen, findet sich auf der gesamten Länge der Membran eine leistenförmige Wulst, welche als Hensen-Streifen bezeichnet wird. Hier ist die TM auch mit kleinen Trabekeln an den die inneren Haarzellen umgebenden Stützzellen verankert (Lim, 1972). Ein weiteres Strukturmerkmal der TM ist das aus schräg verlaufenden Faserbündeln bestehende Decknetz an der Membranoberseite (Held, 1926; Lim, 1972; Hayashi et al., 2015).

Lediglich die äußeren Haarsinneszellen haben direkten Kontakt zu der TM. Jeweils die längste Reihe der Stereocilien reicht bis in Hardestys Membran hinein und ist dort verankert (Kimura, 1966). An der isolierten Membran, lassen sich auf der Unterseite die Abdrücke der Zilien erkennen. Als Anker zwischen der TM und den Stereocilien ist das Protein Stereocilin identifiziert worden (Verpy et al., 2011). Die inneren Haarzellen haben in der adulten Cochlea keinen Kontakt zur TM (Lim, 1972; Hayashi et al., 2015).

Nach Kronester-Frei (1978) lassen sich in der TM grundsätzlich zwei verschiedene Typen von Protofibrillen unterscheiden: Ein Typ A, welcher aus ca. 110 Å Durchmesser messenden, unverzweigten Fibrillen besteht, und ein Typ B, dessen verzweigte Fibrillen ca. 150 – 200 Å Durchmesser haben. Die Typ B-Fibrillen unterscheiden sich ferner in dem Grad ihrer Hydratisierung. Auch zeigen die Fibrillentypen eine unterschiedliche Verteilung in der TM. Während im Bereich der Innenzone die ca. 3  $\mu\text{m}$  Durchmesser messende, unmittelbare Grenzfläche zwischen den IDCs und der TM aus dicht gepackten Typ B-Fibrillen besteht, ist der vestibulär orientierte Anteil aus Typ A-Fibrillen aufgebaut. Die sich radial anschließende Mittelzone zeigt in ihrer ca. 1  $\mu\text{m}$  dicken Basalschicht sehr eng zusammengelagerte Typ A-Fibrillen. Aus dieser Schicht erwachsen 0,3  $\mu\text{m}$  starke Fibrillenbündel, welche schräg in Richtung der vestibulären Oberfläche aufsteigen und von Typ B-Fibrillen umgeben sind. Eine äußere Umhüllung konnte nicht nachgewiesen werden. Der Randleistenkomplex und das Decknetz sind hauptsächlich aus Typ B-Fibrillen aufgebaut (Kronester-Frei, 1978). Es konnte gezeigt werden, dass für die Aufrechterhaltung der natürlichen Form der TM die ionische Zusammensetzung der umgebenden Lösung essentiell ist. Wird die Endolymphe

mit  $Na^+$  in Form des Einbruchs von Perilymphe kontaminiert, kommt es zu einer massiven Schrumpfung der TM. Dieser Vorgang scheint irreversibel zu sein. Der entgegengesetzte Effekt tritt ein, wenn der Endolympe  $Ca^{2+}$  entzogen wird (z. B. durch Zugabe des  $Ca^{2+}$ -Chelators EDTA). Dadurch kommt es zu einer deutlichen Schwellung der TM; wird das komplexierte  $Ca^{2+}$  substituiert, ist die Schwellung jedoch reversibel (Kronester-Frei, 1979a,b).

Die Membran besteht aus verschiedenen Fibrillen bildenden und Fibrillen assoziierten Kollagenen (Typ II, V, IX, XI), den fibril associated collagens with interrupted triple helices (FACIT), den Polysacchariden Uronsäure und Keratansulfat und den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin, Otogelin, Otogelin-like, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM)-16, Otoanchorin und Otolin. Von diesen Proteinen sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin, welche ca. 50 % der Masse der TM ausmachen, Otogelin und Otoanchorin spezifisch für die Auris interna (Kimura, 1966; Lim, 1972; Richardson et al., 1987; Zwaenepoel et al., 2002; Raphael und Altschuler, 2003; Deutzmann und Bruckner, 2014; Andrade et al., 2016; Cohen-Salmon et al., 1997; Richardson et al., 2008). Den größten Anteil der TM bildet die Mittelzone. Dieser besteht hauptsächlich aus streng parallel angeordneten Fasern, welche durch Quervernetzungen miteinander verbunden sind (Held, 1926; Lim, 1972; Andrade et al., 2016).

### 2.2.2 Der Limbus spiralis und die Interdentalzellen

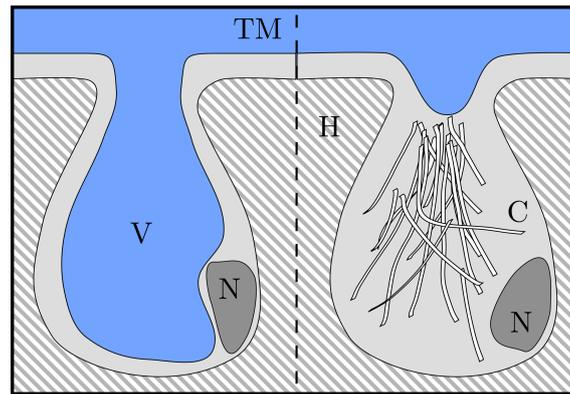
Die bindegewebige Oberfläche des Limbus spiralis ist durch radiäre Falten aufgeworfen, deren Berge als Huschkes Gehörzähne bezeichnet werden. Die zwischen ihnen liegenden Furchen (Interdentalfurchen) bilden das Bett, auf dem die Interdentalzellen ruhen (Abb. 8; Voldrich, 1967; Santi et al., 2016). Diese haben einen  $18 - 20 \mu m$  hohen, zylindrischen Zellkörper, der sich im apikalen Bereich zu einem bis zu  $1 \mu m$  schmalen Hals verjüngt, welcher im Kopfbereich der Zelle in einer breiten, nur  $0,2 - 1 \mu m$  dicken, in der Aufsicht polygonalen Platte mündet. Die Weite der Zellen im basalen Bereich wird mit  $4 - 8 \mu m$  angegeben (Iurato, 1962; Voldrich, 1967). Die IDCs sind an den Deckplatten mit Zonulae occludentes eng miteinander verbunden und bilden so an ihrer Oberfläche ein dichtes Epithel, welches auch Huschkes Gehörzähne überspannt (Iurato, 1962; Ilberg, 1968; Nadol, 1979; Kitajiri et al., 2004). In der adulten Cochlea reichen die Fortsätze der Fibrozyten von der zentralen Zone des Limbus spiralis bis an das apikale Ende der Huschke-Zähne heran (Iurato, 1962). Die fetale Entwicklung der Cochlea beginnt in den basalen Windungen der Cochlea und schreitet nach apikal hin fort (Held, 1926; Lim und Anniko, 1985; Lim und Brichta, 2016). Während der frühen fetalen Entwicklung besitzen IDCs Microvilli an ihrer apikalen Membran, und das Zytoplasma ist dicht mit Zellorganellen beladen. Besonders bemerkenswert ist der sehr prominente Golgi-Apparat. Ferner zeigen sich Vesikel zwischen dem Golgi-Apparat und der apikalen Zellmembran (Lim, 1987; Prieto et al., 1990). Das anfangs sehr eng gepackte Epithel lockert sich im Verlauf der Entwicklung auf, und der Interzellularraum (die späteren Huschke-Gehörzähne) zeigt Bündel aus Kollagenfasern. Des weiteren nimmt die Dichte der Organellen in den Zellen ab. In der adulten Cochlea weisen

einige IDCs an ihrer apikalen Seite zentale Vakuolen auf (Thorn et al., 1979; Lim, 1970). Die Ausprägung der Vakuolen ist sehr variabel und reicht von kleinen Ausstülpungen bis hin zu tiefen Gängen, welche bis an die basolaterale Membran reichen. Im Interzellularräum wurden keine Gänge beobachtet. Die zum Ductus cochlearis weisende Wand der Gänge ist mit Microvilli ausgestattet. In manchen der Gänge konnte Material nachgewiesen werden, welches in seinen Eigenschaften in der Elektronenmikroskopie (Massendichtekontrast) dem der TM entspricht (Lim, 1970). Neuere Veröffentlichungen beschreiben anstatt der tiefen Vakuolen, multiple, feine Kanälchen im Zytoplasma, welche in einer wenig ausgeprägten Vakuole an der apikalen Membran münden. Hier zeigten sich auch Gänge, die sich durch mehrere Zellen zogen (Abb. 7 und 18; Spicer et al., 2000).

### 2.2.3 Die Rolle der Interdentalzellen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Membrana tectoria

Erste Nachweise von TM-Material findet man bei Mäusen am Tag 14,5 der embryonalen Entwicklung als amorphes Material im Bereich des entstehenden Limbus spiralis (Thorn et al., 1979; Lim, 1987). Hierbei handelt es sich um die Membranproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin (Goodyear et al., 2017), deren mRNA bereits am Tag 12,5 der embryonalen Entwicklung der Maus vorhanden ist (Rau et al., 1999). Von hier aus entwickelt sich die Membran rasch in Richtung des Corti-Organs. Durch die Deiters- und Pfeilerzellen entsteht eine weitere Keimzelle der TM, die mit dem medialen Anteil verschmelzen wird und den Ursprung des Randleistenkomplexes bildet. Während im Bereich der IDCs hauptsächlich amorphes Material nachgewiesen werden kann, entsteht im Bereich des Kölliker-Organs ein gemischt amorph-fibrilläres Material (Lim, 1987).

Die bisherigen Untersuchungen zur Bildung der TM erstrecken sich fast ausschließlich auf das histologische Studium der verschiedenen Entwicklungsalter. Im Bereich des Limbus spiralis sind die Interdentalzellen von besonderer Bedeutung, da sie das Deckepithel des Limbus repräsentieren und eine äußerst auffällige Anatomie haben (Abschnitt 2.2.2). Im Bereich der IDCs werden schon früh in der Entwicklung  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin exprimiert (s. o.), welche eine Leitmatrix für die Kollagene der TM bilden (Goodyear et al., 2017). Obwohl die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin-mRNA nur transient in der Entwicklung nachweisbar sind (Rau et al., 1999), lässt sich der Nachweis für eine Tectorin-Expression im subtectorialen Raum des Limbus spiralis noch in der adulten Cochlea führen (Andrade et al., 2016). Hier findet sich auch eine Otoancorin-Expression (Andrade et al., 2016), die zum ersten Mal am embryonalen Tag 16,5 in Erscheinung tritt (Zwaenepoel et al., 2002). Ferner gibt die Entwicklung der IDCs selbst Hinweise auf ihre Beteiligung an der TM-Bildung. Die in den frühen Entwicklungsstadien reichlich vorhandenen Zellorganellen der IDCs (v. a. Golgi-Apparat und Mitochondrien) nehmen bei adulten Tieren deutlich ab (Thorn et al., 1979). Des Weiteren konnten an verschiedenen Stellen Vesikel in den IDCs nachgewiesen werden. In der immaturren Cochlea zeigen sich Vesikel zwischen dem Golgi-Apparat und der apikalen Zellmembran (Thorn et al., 1979) sowie Vesikel an der Basis der Mikrovilli an der apikalen Membran der IDCs (Lim, 1987). Nach der Reifung der Cochlea persistieren



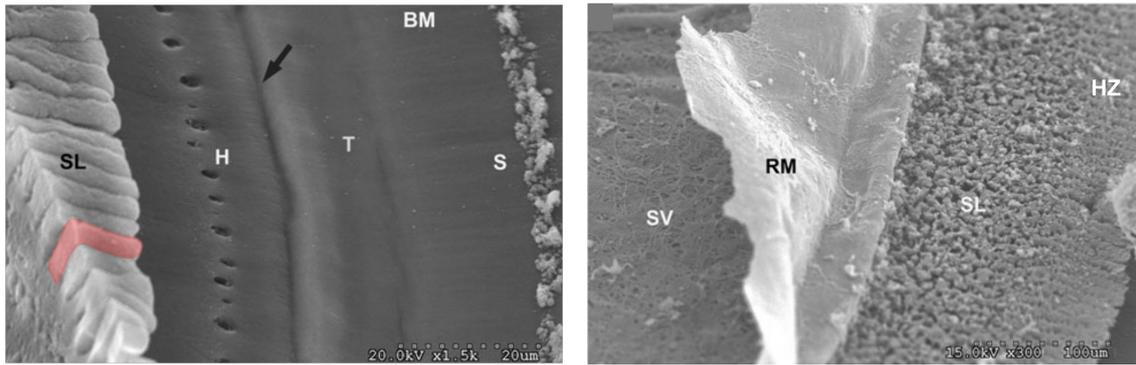
**Abbildung 7: Gegenüberstellung zweier IDC-Schemata im Tangentialschnitt.** Die grundsätzliche Anordnung der Zellen in von den Huscke-Zähnen (H) unterteilten Reihen mit einem bullösen Zellkörper, welcher sich nach apikal verjüngt und in einer dünn ausgezogenen Deckplatte mündet, wird von allen Autoren geteilt; über die Morphologie der einzelnen IDCs besteht jedoch kein Konsens. Die unter anderem von Lim (1970) favorisierte Vorstellung einer großen apikalen Vakuole (V) in einigen IDCs, ist in der linken Schemahälfte dargestellt. Dem gegenüber stehen die Beobachtungen von Spicer et al. (2000), die an Stelle der großen Vakuole multiple, feine Cannaliculi (C) im Zytoplasma der Zellen zeigen (rechts). Quelle: TSM in Anlehnung an Lim (1970); Spicer et al. (2000).

diese Vesikel, und pinozytotische Vesikel werden auch an der basolateralen Membran beobachtet (Held, 1926; Iurato, 1962; Ilberg, 1968; Lim, 1970; Prieto et al., 1990; Spicer und Schulte, 1998). Prieto et al. (1990) haben die bis dato vorliegenden, hauptsächlich elektronenmikroskopischen Studien mit ihren eigenen Ergebnissen zusammengefasst und diskutieren zwei unterschiedliche Mechanismen für die Beteiligung der IDCs an der Bildung der TM. Einerseits zeigten sich Hinweise auf einen pinozytotischen Weg von TM-Material aus der Tiefe des Limbus spiralis durch die IDCs. Die Autoren haben an der Basis auch erstmals einen breiten Gang nachgewiesen, welcher ihrer Auffassung nach der Ursprung der Pinozytose ist. Andererseits diskutieren sie einen Weg über den Interzellularraum. Frühe autoradiographische Messungen zeigen, dass während der cochleären Entwicklung systemisch appliziertes  $^{35}\text{S}$  in die TM inkorporiert wird (Bélanger, 1953).

Zusammenfassend kann in der frühen Entwicklung vor Funktionsbeginn der Cochlea die mRNA wichtiger Membranproteine in den IDCs nachgewiesen werden, und es wurden exozytotische Vesikel in den Zellen gezeigt. Die bis heute vorliegenden Untersuchungen sind mit großer Mehrheit elektronenmikroskopische Studien an stark bearbeitetem Gewebe. Es wurden nur wenige physiologische Untersuchungen durchgeführt (Bélanger, 1953, 1956; Voldrich, 1967; Ilberg, 1968), welche allesamt kein lebendes Gewebe genutzt haben.

### 2.3 Die Physiologie des Hörens

Nach abgeschlossener Organogenese und entsprechender Differenzierung der in Abschnitt 2.1 dargestellten Strukturen, nimmt das Corti-Organ seine Funktion auf. Dies geschieht beim Menschen ab der 24 Gestationswoche; bei weiter fortgeschrittener Schwangerschaft kann von einem funktionierenden Gehör ausgegangen werden (Lim und Brichta, 2016).



(a) Dezellularisierter Ductus cochlearis - Maus

(b) Dezellularisierter Ductus cochlearis - Mensch

**Abbildung 8: Dezellularisierter Ductus cochlearis.** **a**, Rasterelektromikroskopische Aufnahme des Ductus cochlearis der Maus nach Entfernung der Zellen. Am linken Bildrand erkennt man die radiär gestellten Huschke-Zähne (exemplarisch wurde ein Zahn rot eingefärbt) mit den Interdentalfurchen auf dem Limbus spiralis (SL). Radial davon befinden sich die Habenulae perforatae (H) als Durchtrittsstellen der Nervenfasern von und zu den Haarzellen. Der Beginn der Basilar membran (BM) ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. T bezeichnet den Bereich, der den Corti-Tunnel bildenden Zellen sowie S eine noch nicht zuordenbare Substanz. **b**, Rasterelektromikroskopische Aufnahme der Grenzregion zwischen Scala vestibuli (SV; linker Bildrand) und Ductus cochlearis (rechts im Bild) des Menschen nach Entfernung der Zellen. Die Huschke-Zähne (HZ) sind hier weniger deutlich ausgeprägt, jedoch prinzipiell ähnlich organisiert. Am linken Bildrand liegt Borghensans vasculo-epitheliale Zone. In der Bildmitte zu erkennen ist der azelluläre Rest der Reißner Membran (RM). Quelle: Nach Santi et al. (2016).

### 2.3.1 Schalleitung durch die Auris externa et media

Die Aufgabe des peripheren auditorischen Systems besteht darin, den ankommenden Schall in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Der Schall trifft zuerst auf die Auris externa und wird von dort aus, über die Auris media, bis hin zum Sinnesepithel geleitet. Der ankommende Luftschall ist eine periodische Schwankung des Luftdrucks. Trifft eine Schallwelle auf die Auricula der Auris externa, so wird sie über den Meatus acusticus externus auf die Membrana tympanica geleitet und versetzt diese in Schwingung. Die sich hinter der Membrana tympanica anschließende Auris media hat die Aufgabe der Impedanzanpassung zwischen der Luft und dem wässrigen Milieu in der Auris interna. Ohne diesen Mechanismus würde ein Großteil der ankommenden Schallenergie an der Grenzfläche reflektiert, so dass nur 2 % der Schallenergie das Sinnesepithel erreichen könnte. Durch zwei Mechanismen wird die Effizienz der Übertragung auf 60 % der ursprünglichen Energie gesteigert: Zum einen vermag die Auris media den Schalldruck zu vergrößern. Formel (1) beschreibt den Druck ( $\vec{p}$ ) als Quotienten aus der Kraft ( $\vec{F}$ ) und der Fläche ( $A$ ).

$$\vec{p} = \frac{\vec{F}}{A} \quad (1)$$

Da die Fläche der Membrana tympanica viel größer als die der Fenestra vestibuli ist, wird hier eine erste Druckerhöhung erreicht. Ein weiterer Effekt wird durch die gelenkige Verbindung zwischen den Ossicula auditoria erreicht. Diese wirken als Hebel und führen zu einem weiteren Druckanstieg. In der Summe wird so ein bis ca. 22-facher Druckanstieg

erreicht (Schiebler und Korf, 2007). Zum anderen wird als weiterer Mechanismus die Oszillationsgeschwindigkeit gesenkt: Die Übertragung über die Ossicula auditoria geht mit einer Reduktion der Schwingungsamplitude einher; die Basis stapedis schwingt mit geringerer maximalen Geschwindigkeit (Schnelle  $\vec{u}$ ) als die Membrana tympanica.

$$Z = \frac{\hat{p}}{\vec{u}} = \rho \vec{c} \quad (2)$$

$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \quad (3)$$

Wie aus Formel (2) hervorgeht, besteht ein erheblicher Unterschied im Wellenwiderstand (Impedanz  $Z$ ) zwischen der Luft und dem wässrigen Medium in der Auris interna ( $c_{Luft} = ca. 340 \text{ m s}^{-1}$ ;  $c_{Wasser} = ca. 1500 \text{ m s}^{-1}$ ;  $R \approx 0,989$ ). Ohne eine entsprechende Anpassung durch das Mittelohr, welches die Schnelle reduziert (Membrana tympanica vs. Basis stapedis), kommt es zu einer bedeutend größeren Reflexion  $R$  (Formel 3) bei gleichbleibender effektiver Druckamplitude  $\hat{p}$ .  $\rho$  beschreibt die Dichte des akustischen Mediums. Durch diese Mechanismen steigert die Auris media in Summe somit die übertragene Schallenergie an der Fenestra vestibuli bis um das ca. 30-fache im Vergleich zu einer Situation ohne Mittelohr (Zenner, 2011). Eine aktive Verstärkung findet jedoch nicht statt. Die Basis stapedis versetzt nun an der Fenestra vestibuli die Perilymphe in Schwingung.

### 2.3.2 Generierung eines Rezeptorpotentials und Modulation des auditorischen Eindrucks

Die von der Auris media durch die Basis stapedis auf die Fenestra vestibuli der Auris interna übertragene Druckoszillation („Wasserschall“) läuft in der Perilymphe entlang der Scala vestibuli bis nach apikal zum Helicotrema und gelangt dort in die Scala tympani. An deren Ende, am runden Fenster (Fenestra cochleae), findet ein Druckausgleich mit der Auris media statt. Durch die Schwingungen in den perilymphatischen Gängen wird der von ihnen eingefasste Ductus cochlearis in Schwingung orthogonal zur Basilarmembran versetzt und induziert so Strömungen in der Endolymphe. Da die Basilarmembran einen Steifigkeitsgradienten von basal nach apikal, mit der größten Steifigkeit bei ganz basal, hat sowie einen Gradienten in der Geometrie von einer schmalen Basis zu einem breiten Apex aufweist, kann eine Wanderwelle auf ihr entstehen. Diese entsteht an der Position, an der die Resonanzbedingungen für die Stimulusfrequenz erfüllt sind. Durch den Einfluss der OHC wird die Oszillation der Basilarmembran scharf auf die entsprechende Frequenz gestimmt und ca. um den Faktor 1000 verstärkt (siehe unten; Encke et al., 2016). Die Stereozilien der IHC werden durch die strömende Endolymphe abwechselnd in Richtung des Modiolus und der lateralen Wand deflektiert. Diese Artikulation findet am Übergang zwischen der Haarzelle und dem Zilium statt (Abschnitt 2.1.2). Da benachbarte Zilien einer Reihe untereinander gekoppelt sind, bewegen sich die Zilienreihen immer synchron. Eine Deflektion hin zum längsten Stereozilium (in Richtung der lateralen Wand) führt dazu, dass

die „tip links“ zwischen den Stereozilienreihen der jeweiligen Haarzellen gespannt werden. Durch den Zug an den „tip links“ wird die Offen-Wahrscheinlichkeit für einen an der Spitze der Stereozilien gelegenen Ionenkanal, den mechanoelektrischen Transduktionskanal (MET), vergrößert. Dieser weist eine große unspezifische Leitfähigkeit (Siemens  $S$ ) für Kationen auf (50 – 300  $pS$ ). In der Ruheposition liegt die Offen-Wahrscheinlichkeit für den MET zwischen 20 – 40 % (leak-Strom). Aus welchen Komponenten dieser Kanal besteht, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Familie der transmembrane channel-like (TMC) Proteine wird zur Zeit als porenbildende Einheit des MET favorisiert, insbesondere TMC1 und TMC2 (Kawashima et al., 2011; Fettiplace und Kim, 2014; Goutman et al., 2015; Fettiplace, 2016). Die Endolymphe weist einen sehr hohen Anteil an  $K^+$ -Ionen auf (Tab. 1). Da der Ductus cochlearis über ein dichtes Epithel verfügt (Abschnitt 2.1.2), ist ein direkter Stoffaustausch zwischen ihm und den anderen Kompartimenten nicht möglich. Als Konsequenz kann die Stria vascularis, als eine gut kontrollierte Durchtrittsstelle, den Endolymphraum gegenüber der Perilymphe um +80  $mV$  aufladen (endocochleäres Potential). Das Ruhemembranpotential von Haarzellen beträgt ca. –60  $mV$ , so dass sich eine Potentialdifferenz von +140  $mV$  zwischen dem Zellinneren und dem Ductus cochlearis einstellt (Klinke et al., 2010; Goutman et al., 2015). Ist der MET geöffnet, strömen Kationen (v. a.  $K^+$  und  $Ca^{2+}$ ) in die innere Haarzelle ein und depolarisieren diese (Rezeptorpotential). Über die Konfiguration des so entstehenden Potentials entscheiden an der basolateralen Haarzellseite lokalisierte  $K^+$ -Kanäle, unter anderem auch der  $Ca^{2+}$ -aktivierte BK-Kanal, über welche  $K^+$  die Zelle verlässt, und es somit zur Repolarisation kommt. Auf Grund der leak-Ströme in der Ruheposition der Stereocilien kommt es bei einer Deflektion der Stereocilien nach modiolar zu einer Hyperpolarisation der Haarzellen (Fuchs, 2010).

Wie an anderen Synapsen üblich, ist auch in der Haarzelle  $Ca^{2+}$  für die Exozytose des Neurotransmitters notwendig. Dieses gelangt über spannungsgesteuerte L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $Ca_v1.3$ ) in die Zelle (Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003). Der von den Haarzellen verwendete Transmitter ist Glutamat. Hierfür spricht zum einen die Rezeptorausstattung der Postsynapse (NMDA / AMPA - Rezeptoren, Abschnitt 2.1.3) und die Proteine der exozytotischen Vesikel, unter anderem der Glutamattransporter VGLUT3 (Puel, 1995; Raphael und Altschuler, 2003; Fuchs, 2010). In der Präsynapse erscheint eine elektronendichte Struktur, um die sich die 35  $nm$  durchmessenden Vesikel formieren. Auf Grund seiner Morphe wird dieser spezielle Synapsentyp als Ribbon-Synapse bezeichnet. Er findet sich unter anderem auch an den Photorezeptoren der Retina und retinalen Bipolarzellen sowie an vestibulären Haarzellen (Fuchs, 2010). Als wesentlicher Bestandteil des elektronendichten Kerns konnte das Protein RIBEYE identifiziert werden (Schmitz et al., 2000). Die  $Ca_v1.3$ -Kanäle sind in unmittelbarer räumlicher Nähe der Ribbons lokalisiert. Somit führt eine Depolarisation der Haarzelle zu einer lokalen Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Hierdurch wird die Exozytose-Maschinerie aktiviert und Glutamat in den synaptischen Spalt entlassen. Allerdings spielen die klassischen soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNARE)-Proteine bei Ribbon-Synapsen keine Rolle. Der genaue Mechanismus der Exozytose bleibt jedoch bis heute noch ungeklärt (Fuchs, 2010; Goutman et al., 2015). In RIBEYE-defizienten Mäusen konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Protein für die zeitlich hoch präzise Vesikelfusion und das Auffüllen des Membran

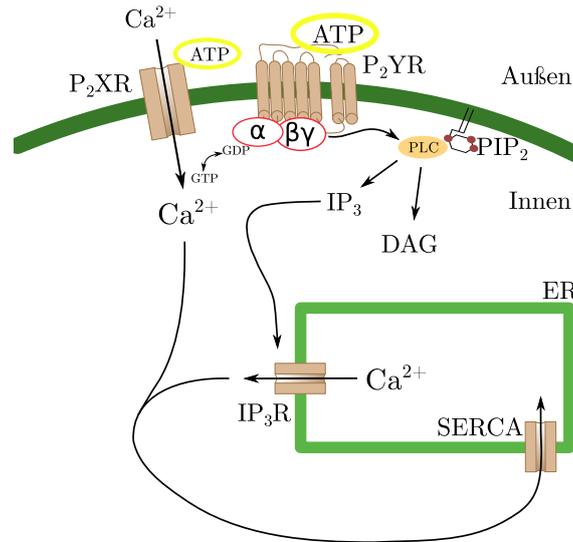
nahen Vesikelpools eine unerlässliche Rolle zu spielen scheint (Becker et al., 2018; Jean et al., 2018).

Auch abseits der Haarzellen sind  $Ca^{2+}$ -Signale für die Exozytose von Vesikeln unerlässlich, wie Heckmann und Dudel (2010) am Beispiel von synaptischer Exozytose zeigen.  $Ca^{2+}$  stellt über die Interaktion mit z. B. Synaptotagmin letztlich den molekularen Schalter für die Exozytose dar. Der Komplex aus den v-SNARE und t-SNARE kann mit fusionieren und den Vesikelinhalt in den Extrazellulärraum abgeben (Messenger et al., 2014).

Neben den inneren Haarzellen, welche für die eigentliche Transduktion des Signals verantwortlich sind, spielen die äußeren Haarzellen eine unverzichtbare Rolle im Hörvorgang. So reicht ein akustisches Signal mit einem Pegel bis zu 40 – 50 dB SPL ohne die äußeren Haarzellen nicht aus, um die inneren Haarzellen zu stimulieren. Davis (1983) hat einen aktiven Verstärkermechanismus postuliert, von dem inzwischen viele Details bekannt sind. Der Druck der Basis stapedis auf die Perilymphe in der Scala vestibuli induziert eine Wanderwelle auf der Basilarmembran. Dies führt zu einer Parallelverschiebung zwischen ihr und der TM (Zenner, 2011). Da die längsten Stereozilien der äußeren Haarzellen, im Gegensatz zu den inneren Haarzellen, in der TM verankert sind, führt diese Verschiebung zu einer direkten Deflektion (Raphael und Altschuler, 2003; Andrade et al., 2016). Über den gleichen Mechanismus wie in den inneren Haarzellen, kommt es bei einer lateralen Deflektion zu einer Depolarisation der äußeren Haarzellen. Auch diese setzen daraufhin an ihrer basolateralen Seite Neurotransmitter frei. Viel entscheidender jedoch ist die Funktion der äußeren Haarzellen als Verstärker, die auf einer durch die Depolarisation verbundenen Verkürzung der äußeren Haarzellen entlang ihrer longitudinalen Achse beruht. Zheng et al. (2000) konnten das Protein Prestin, welches exklusiv in den äußeren Haarzellen vorkommt, als molekularen Motor identifizieren. Dieser Mechanismus verstärkt Signale  $\leq 50$  dB SPL und kann, da die äußeren Haarzellen auch efferent innerviert sind (Anschnitt 2.1.3), moduliert werden (Ashmore et al., 2000; Zheng et al., 2000; Raphael und Altschuler, 2003; Zenner, 2011).

## 2.4 Purinnukleotide als Signalstoffe

Adenosintriphosphat (ATP) ist nicht nur ein Energieträger, sondern das Nukleotidtriphosphat wirkt an vielen, wenn nicht allen Zellen (Dosch et al., 2018). Zuerst von Burnstock (1972) postuliert, konnte später gezeigt werden, dass ATP unter anderem als (Co-)Transmitter im zentralen und autonomen Nervensystem oder auch bei der Regulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse eine Rolle spielt (Abbraccio und Burnstock, 1998; Housley, 2000). Schon unter physiologischen Bedingungen ist ATP in der Peri- und Endolymphe enthalten (Tab. 1; Muñoz et al., 1995). Seine Konzentration wird unter anderem über die im Gewebe exprimierte Ektonukleotidasen kontrolliert (Majumder et al., 2010). Verschiedene Stressoren, wie mechanische Belastung oder cochleäre Gewebshypoxie, führen zu erhöhten ATP-Konzentrationen in den Lymphen (Muñoz et al., 1995; Chen et al., 2015). Die ATP-Freisetzung erfolgt durch Membranporen, die von Pannexinen gebildet werden; denkbar wären auch Connexine. Diese sind jedoch unter physiologischen Bedingungen geschlossen



**Abbildung 9: Signalgebung über purinerge Rezeptoren:** Links im Bild dargestellt ist der Signalweg über die ionotropen P<sub>2</sub>X-Rezeptoren, welche als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle funktionieren. Die Bindung des Liganden (hier ATP) führt über eine Konformationsänderung zur Öffnung des Kanals.  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  können direkt in die Zelle strömen. Rechts im Bild ist die Signalkaskade über metabotrope P<sub>2</sub>Y-Rezeptoren dargestellt. Diese sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und intrazellulär an heterotrimäre G-Proteine gekoppelt (in diesem Fall an ein  $G_q$ -Protein). Die Bindung des Liganden führt zu einem Austausch von an das G-Protein gebundenem GDP gegen GTP. Das G-Protein dissoziiert und die  $\beta - \gamma$ - Untereinheit diffundiert zur PLC. Diese setzt das membranständige PIP<sub>2</sub> zu DAG und IP<sub>3</sub> um. IP<sub>3</sub> kann seinerseits entsprechende Rezeptoren am ER aktivieren, worauf hin  $Ca^{2+}$  das ER als intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher verlassen und im Zellinneren wirken kann. Die SERCA füllt das ER wieder mit  $Ca^{2+}$ . Quelle: TSM.

(Chen et al., 2015; Zhao, 2016). Die Pannexin-1-Expression in den IDCs konnte von Wang et al. (2009) gezeigt werden. Dass Connexine, vor allem Connexin-26, eine wichtige Rolle in der Cochlea spielen, wird bei Mutationen im Connexin-26-Gen deutlich, die zu nicht-syndromalen Hörverlusten führen. Eine wichtige Aufgabe des Connexin-Netzwerks in der reifen Cochlea ist das Recycling des  $K^+$  über einen medialen und einen lateralen Weg (Kikuchi et al., 2000).

ATP, welches durch Pannexine in den Extrazellulärraum gelangt, wird von verschiedenen Klassen purinerge Rezeptoren dedektiert (Burnstock und Kennedy, 1985). Von besonderem Interesse ist die Klasse der P<sub>2</sub>-Rezeptoren, die sich in ionotrope P<sub>2</sub>X- und metabotrope P<sub>2</sub>Y-Rezeptoren gliedert (Burnstock und Kennedy, 1985; Surprenant und North, 2009; von Kügelgen und Hoffmann, 2015). Die Expression von P<sub>2</sub>Y-Rezeptoren ist in der Cochlea und den Zellen des Limbus spiralis belegt worden (Huang et al., 2010). Abb. 9 gibt einen Überblick über die Signalwege der zwei Rezeptorklassen.

Die herausragende Rolle des ATP-Signaling in der Cochlea wird auch dadurch verdeutlicht, dass spontane, ATP-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signale für die Aufrechterhaltung und Maturation der neuronalen Afferenzen essentiell sind (Wang und Bergles, 2015). So werden durch ATP hervorgerufene Schrumpfung in den Stützzellen (die s. g. crenation waves) während der Entwicklung der TM-Formation zugeschrieben (Tritsch et al., 2010).

## 2.5 Entwicklungsbiologisches Modell

Da Zellen, die an der Bildung der TM beteiligt sind, während der Entwicklung massiv Material in den Endolymphraum abgeben müssen, ist zu vermuten, dass diese in der kritischen Phase der Entwicklung, also vor dem Hörbeginn, sehr aktiv sind. Wegen der guten Verfügbarkeit, der relativ einfachen Möglichkeit der genetischen Modifikation und dem späten Hörbeginn (Tag 10 – 12 nach der Geburt; Mikaelian und Ruben, 1965) stellen Mäuse ein gutes Modell dar, um die Entwicklung der *Auris interna* zu studieren.

## 2.6 Fragestellungen

Wie oben dargestellt, ist die TM ein integraler Bestandteil des Gehörs des Säugetiers. Mutationen in den Bestandteilen der TM führen zu teils gravierendem Hörverlust (z. B. Mutationen in den Tectorinen, Winter et al., 2009). Bis zum heutigen Tag ist jedoch wenig über die Bildung der TM bekannt. Da aus morphologischen Studien der Cochlea bekannt ist, dass die IDCs eine enge Beziehung zu der TM haben, sind sie ein naheliegender Ansatzpunkt bei der Suche nach Hauptakteuren der Bildung Held (1926). Ferner bestehen Hinweise auf eine sekretorische Aktivität der IDCs in Form von Vesikelexozytose Lim (1987). Ziel dieser Arbeit ist es, den Wissensfundus zu den IDCs um physiologische Untersuchungen zu ergänzen. Aus persönlicher Information (Tobias Eckrich) war bereits im Vorfeld der vorliegenden Studie bekannt, dass IDCs spontane  $Ca^{2+}$ -Transienten zu generieren scheinen. Da  $Ca^{2+}$  bei der Exozytose ein wichtiger second-messenger ist, wurden  $Ca^{2+}$ -Signale über den Verlauf der postnatalen Entwicklung, beginnend am ersten postnatalen Tag (P0) bis hin zur reifen Cochlea (P18), gemessen. In der vorliegenden Arbeit ging es um folgende Fragestellungen:

1. Wie ist die Morphologie der IDCs in unfixierten / leicht fixierten Cochleae?
2. Lassen sich die in der Literatur beschriebenen Vesikel (Lim, 1970, 1987) in lebenden IDCs nachvollziehen?
3. Können die  $Ca^{2+}$ -Transienten in den IDCs bestätigt werden?
4. Gibt es eine Abhängigkeit der Eigenschaften der Transienten vom Entwicklungsalter?
5. Lassen sich die Transienten pharmakologisch auslösen bzw. beeinflussen?

## 3 Material und Methoden

Im Folgenden werden Materialien und Methoden dargestellt, die für die experimentelle Arbeit und Auswertung der Ergebnisse verwendet wurden.

### 3.1 Mauslinien

Für das Studium der Anatomie und Physiologie der IDCs wurde die Maus als ein in der Hörforschung etabliertes Modell genutzt. So fern nicht anders vermerkt, wurden die Tiere gemäß den saarländischen Tierschutzbestimmungen des Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) in einem 12 h Tag- / Nachtrhythmus gehalten. Es wurden Tiere beider Geschlechter untersucht. Die Fütterung erfolgte ad libidum. Folgende Maus-Linien kamen zum Einsatz:

#### 3.1.1 NMRI-Mäuse

Um eine gewisse genetische Diversität mit reduziertem Risiko für hereditäre Defekte sicher zu stellen, wurde auf eine Mauslinie zurückgegriffen, welche in Auszucht geführt wird. Die albino Naval Medical Research Institute (NMRI)-Mäuse sind hierfür ein etabliertes Modell. Die Tiere wurden über Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen.

#### 3.1.2 TRP-M3-GFP Knock-In-Mäuse

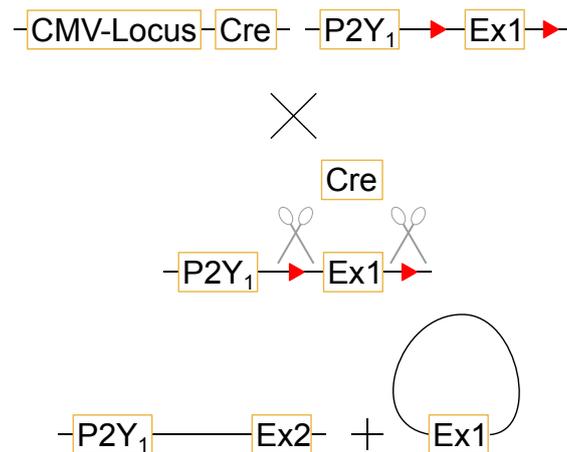
Diese Mauslinie wurde von Vriens et al. (2011) veröffentlicht und freundlicherweise von PD Dr. Stephan Philipp aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Die Zucht fand in der dortigen Tierhaltung statt.

#### 3.1.3 Konditional $P2Y_1$ -Rezeptor-defiziente Mäuse

Die  $P2Y$ -Rezeptorfamilie gehört zu den G-Protein-gekoppelten, metabotropen Rezeptoren für Nukleotide (von Kügelgen und Hoffmann, 2015). In einem von Christian Gachet in Straßburg, Frankreich, erzeugten konditionalen Knockout-Modell<sup>1</sup> wurde im  $P2Y_1$ -Gen zu beiden Seiten des Exons 1 eine loxP-recognition site hineinkloniert. Das Modell wurde freundlicherweise von Prof. Dr. F. Kirchhoff (CIPMM) zur Verfügung gestellt und ist bisher unveröffentlicht. Eine konstitutiv oder konditional exprimierte Cre-Rekombinase kann diese loxP-sites erkennen (Nagy, 2000). Um eine konstitutive Deletion des Rezeptors zu erreichen, wurden die Tiere mit einer Linie gekreuzt, die ubiquitär Cre exprimiert. Bei dieser Linie steht die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CMV-Promoters (Schwenk et al., 1995). In

---

<sup>1</sup>TgH( $P2Y_1^{fl/fl}$ ) $P2Y_1^{fl}$



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Exon-1-Deletion im  $P2Y_1$ -Gen.** Deletion des Exon 1 des  $P2Y_1$ -Rezeptorgens durch eine unter dem CMV-Promoter exprimierende Cre-Rekombinase. Quelle: TSM in Anlehnung an Nagy (2000).

Gegenwart einer aktiven Cre-Rekombinase wird das Exon 1 des  $P2Y_1$ -Rezeptors deletiert, und es entsteht ein funktionsunfähiges Protein (Abb. 10; Nagy, 2000).

### 3.2 Geräte und Materialien

Verwendete Laborgeräte sind in Tabelle 2 aufgeführt. Den allgemeinen Laborbedarf stellt Tabelle 3 dar.

### 3.3 Chemikalien und Lösungen

In Tabelle 4 aufgeführte Chemikalien wurden zum Ansetzen der Badlösungen, Pufferlösungen und für allgemeine Laborabläufe verwendet.

#### 3.3.1 Badlösungen

Physiologische Badlösungen wurden gemäß der in Tabelle 5 dargestellten Zusammensetzungen hergestellt, steril filtriert, in Zellkulturflaschen abgefüllt und bei 4 °C bis zum Versuch gelagert. Für Jungtiere, bis P12 (Hörbeginn der Maus), wurde Badlösung Nr. 49 (B49) verwendet. Danach kam Badlösung Nr. 33 (B33) zur Anwendung. Der wesentliche Unterschied ist, dass in B33 ein Teil des  $NaCl$  durch  $Na$ -Lactobionat ersetzt wurde, welches verschiedene  $Cl^-$ -Kanäle kompetitiv hemmt und so ein osmotisches Schwellen der Zellen verhindert (Knirsch et al., 2007).

### **3.4 Antikörper und Fluorochrome**

Die verwendeten Antikörper, Fluochrome und Indikatoren sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte und Materialien.** Quelle: TSM.

PRODUKT	FABRIKANT
3-Linien Graviationsapplikationssystem	Eigenfertigung
Analysewaage AW-224	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Badkammern	Eigenfertigung
Eppendorf research plus Pipetten, diverse Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Forma -86 °C Ultratiefkühlschrank 906	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ismatec IP, ISM940E Peristaltikpumpe	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
iQ500 Kühl-Gefrier-Kombination KG49EBI40	SEG Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott AG, Mainz, Deutschland
Laserscanning Mikroskop LSM 710	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
nip electronic TC-20 Temperature Control System	Scientifica Ltd., East Sussex, UK
Objektiv EC Plan-Neofluar 10x/0,3 420340-9901	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 420650-9901	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC 420782-9900	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Objektiv W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC 421452-9800	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
PatchStar Micromanipulator	Scientifica Ltd., East Sussex, UK
Pipettierhelfer accu-jet <sup>®</sup> pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präparationsinstrumentarium (Pinzetten verschiedener Ausführungen & Größen)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schüttler KS 260 basic	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG
Schüttelwasserbad	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stahlring mit Nylon-Fixiergitter	Eigenfertigung
Ultraschallbad Sonorex RK31	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex-Genie 1, Touch Mixer	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zoom-Stereomikroskop SZX 16 mit Objektiv SDF PLANO 1XPF	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 3: Übersicht über das Verbrauchsmaterial.** Quelle: TSM.

PRODUKT	FABRIKANT
Deckgläser, Durchmesser 15 <i>mm</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, Biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Konische Röhrchen aus Polypropylen, diverse Größen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse Größen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisions-Deckgläschen für Mikroskopie, eckig	Carls Zeiss AG, Jena, Deutschland
Serologische Pipetten, diverse Größen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 <i>cm</i> <sup>2</sup>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.** Zusätzliche Angaben: Reinheit, Artikelnummer, Chargennummer. Quelle: TSM.

STOFF	LIEFERANT
bovine serum albumin (Rinder-Serumalbumin) (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat; $\geq 99$ %; 208291; D00073408	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cell-Tak <sup>TM</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO); $\geq 99,9$ %; D8418; SHBD9284V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glucose-Monohydrat; $\geq 99$ %; A1349; 9W003221	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES); $\geq 99,5$ %; 1.10110.1000; K46842810	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Immersionsöl Immersol 518 F; fluoreszenzfrei	Carls Zeiss AG, Jena, Deutschland
ImmunoPen <sup>TM</sup>	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran (2-Chlor-2-difluormethoxy-1,1,1-trifluorethan)	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Kaliumchlorid; 99,5 – 101,0 %; 26764.260; 13C25002	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lactobionic acid 97 %; J66368.22; -	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat; $\geq 99$ %; 442611; 2733502	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid; $\geq 99,5$ %; 1.06404.1000; K28042004 031	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat; 99,0 – 102,0 %; 1063461000; A995646938	Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pluronic <sup>TM</sup> F-127, low UV absorbance	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Triton <sup>TM</sup> X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Vectashield <sup>®</sup>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

**Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Badlösungen.** Konzentrationen in  $[mM]$ .  $305\text{ mOsmolL}^{-1}$  Quelle: TSM.

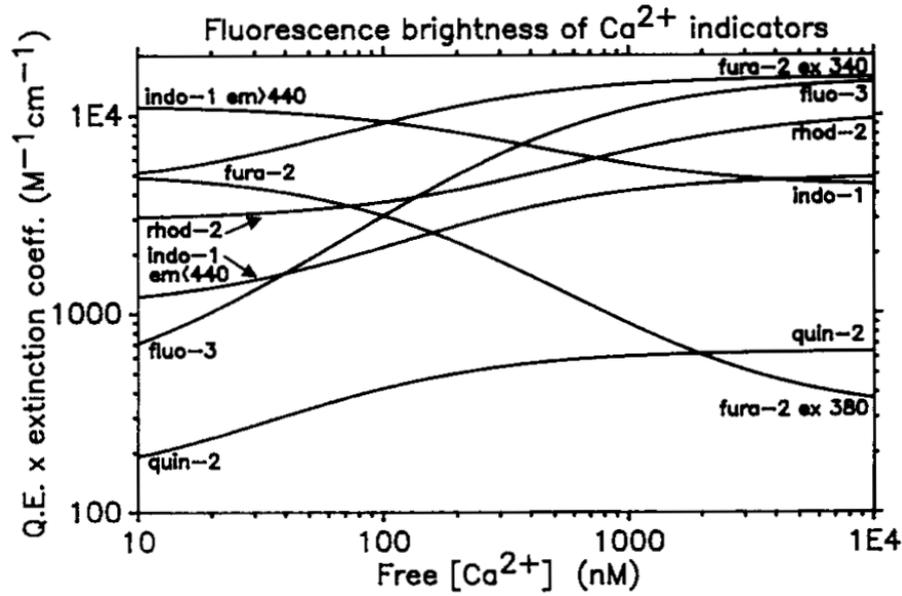
SUBSTANZ	B33 [AB P12]	B49 [BIS P12]
<i>Lactobionat · Na</i>	70,00	0
<i>NaCl</i>	83,00	143,00
<i>KCl</i>	5,80	5,80
<i>CaCl</i>	1,30	1,30
<i>MgCl</i>	0,90	0,90
<i>Glucose</i>	5,60	5,60
HEPES	10,00	10,00
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0,70	0,90

**Tabelle 6: Antikörper, Fluochrome und Indikatoren.** Die Epitope für den Panx1- und Panx2-PAK sind proprietär. Die Aminosäuresequenzen sind geheim und daher nicht zugänglich (Singh, 2018). Quelle: TSM.

ANTIKÖRPER/ FLUOCHROM/ INDIKATOR	ART	EPITOP	ERZEUGER- SPEZIES/ KLONALITÄT	ARTIKEL- NUMMER/ CHARGEN- NUMMER	HERSTELLER
Acti-stain 670 phalloidin	Aktin- marker	Aktin	-	027PHDN1-A/ -	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	SAK	Donkey Anti- Rabbit IgG H&L	Esel/ polyklonal	ab150073/ GR13176-2	Abcam plc., Cambridge, UK
Anti-Pannexin 1	PAK	s. Kom- mentar	Kaninchen/ monoklonal	ab124969/ GR9196	Abcam plc., Cambridge, UK
Anti-Pannexin 2	PAK	s. Kom- mentar	Kaninchen/ polyklonal	ab55917/ GR13176-2	Abcam plc., Cambridge, UK
CellMask <sup>™</sup> Deep Red	Mem- bran- marker	-	-	C10046/ 1754714	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
4',6-Diamidin-2- phenylindol (DAPI)	DNA- Marker	-	-	A4099.0010/ 7P013666	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fluo-8 <sup>®</sup> , AM	Calcium- indikator	-	-	-	AAT Bioquest Inc., Sunnyvale, CA, USA
FM 4-64	Mem- bran- marker	-	-	T13320/ 998494	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

### 3.4.1 Der $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-8<sup>®</sup> AM

Fluo-8<sup>®</sup> AM ist eine auf Fluo-3 basierende Substanz. Es handelt sich um einen nicht ratiometrischen, fluoreszierenden  $Ca^{2+}$ -sensitiven Indikator. Die Beziehung zwischen der Konzentrationsänderung des freien intrazellulären Calciums und der Fluoreszenzänderung ist nichtlinear (Abb. 11). Fluo-8<sup>®</sup> AM trägt eine durch eine Ester-Bindung angehängte Acetoxymethyl-Gruppe (AM). Erst durch die Estergruppe wird das Molekül lipophil genug, um die Lipiddoppelschichtmembran der Zellen penetrieren zu können. Im Zytosol erfolgt rasch die Hydrolyse des Esters durch ubiquitäre, unspezifische Esterasen. Erst nach der



**Abbildung 11: Übersicht der Fluoreszenzprofile verschiedener  $Ca^{2+}$ -Indikatoren.** Gezeigt wird die nicht-lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz verschiedener  $Ca^{2+}$ -Indikatoren bei verschiedenen Konzentrationen an freiem Calcium. Besonderes Augenmerk ist auf die Kurve von Fluo-3 zu legen, da das verwendete Fluo-8<sup>®</sup> auf dieser Substanz basiert. Quelle: Minta et al. (1989).

Hydrolyse liegt der Indikator in seiner aktiven Form mit vier freien Säuregruppen vor, die ein  $Ca^{2+}$ -Ion mit hoher Affinität komplexieren können ( $K_d = 0,38 \pm 0,045 \mu M$ ; McMahon und Jackson, 2014). Auf  $Ca^{2+}$ -Komplexierung reagiert der Indikator mit einem Anstieg der Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmaximum bei 508 nm (Eberhard und Erne, 1989; Minta et al., 1989).

Wie vom Hersteller empfohlen, wurden die lyophilisierten Aliquots des Indikators in DMSO in einer Konzentration von  $10 \mu M$  gelöst. Um den Indikator mit der Badlösung in Lösung zu bringen, wurde eine Pluronic<sup>TM</sup> F-127-DMSO-Lösung verwendet. Hierfür wurde Pluronic<sup>TM</sup> mit DMSO bei  $37 \text{ }^\circ C$  in Lösung gebracht ( $c = 200 \text{ mg/mL}$ ). Bei Pluronic<sup>TM</sup> handelt es sich um einen amphiphilen Makromolekül (12,6 kDa), welches als Lösungsvermittler dient (Alexandridis und Hatton, 1995; Bodratti und Alexandridis, 2018). Die fertige Indikatorlösung wurde in drei Verdünnungsschritten auf eine Endkonzentration von  $10 \mu M$  Fluo-8<sup>®</sup> AM und  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  Pluronic<sup>TM</sup> eingestellt. Zwischen den Verdünnungsschritten wurde die Lösung im Ultraschallbad für jeweils 5 min beschallt, um eine homogene Lösung herzustellen.

### 3.5 Methoden

Die bei dieser Arbeit angewendeten Methoden, werden im Folgenden dargestellt.

#### 3.5.1 Whole-mount-Präparate

Für die  $Ca^{2+}$ -Bildgebung und für die Immunfärbungen kamen sogenannte akute whole-mount-Präparate zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um  $1/2$  bis  $3/4$  cochleäre Windungen,

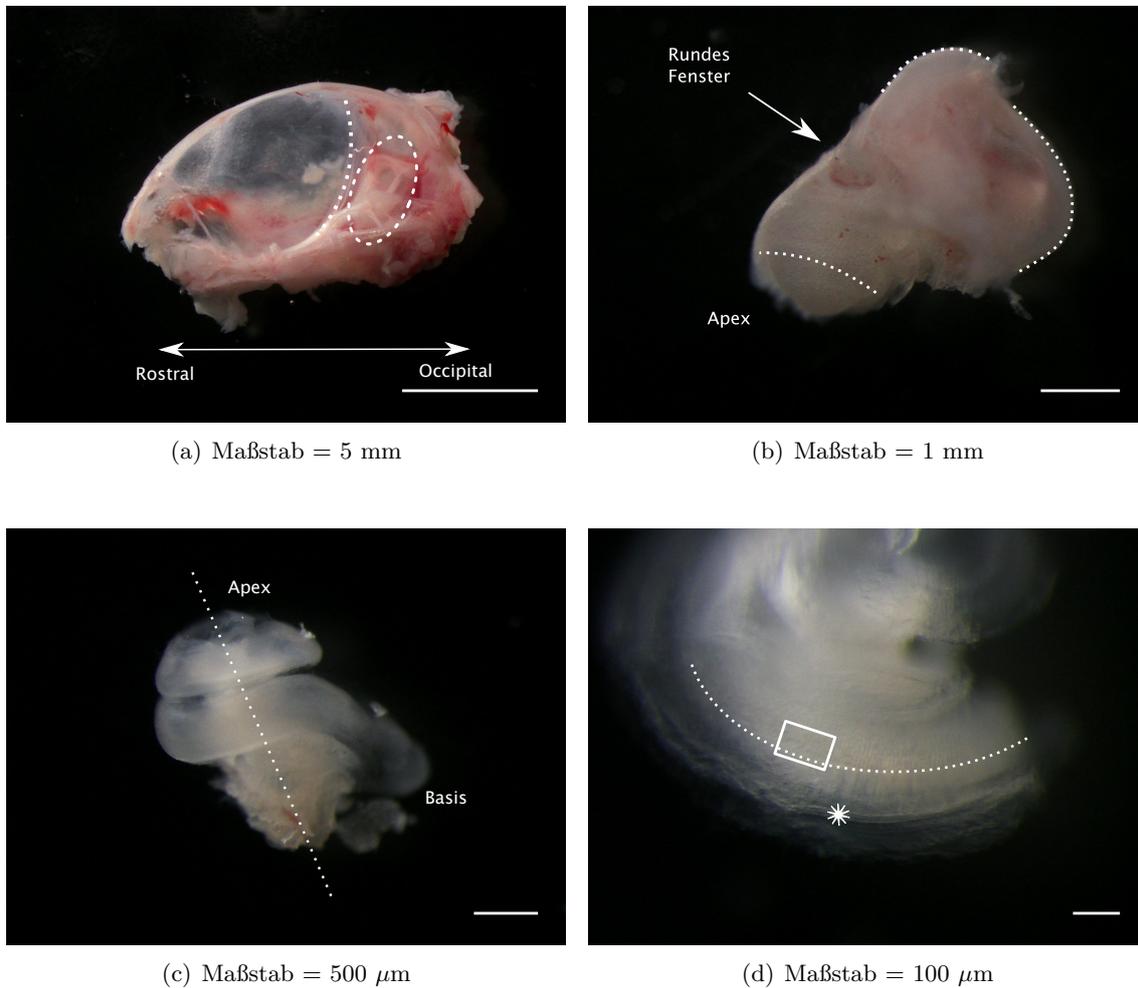
die unmittelbar vor dem Versuch präpariert wurden. Die Präparation und Inkubation der whole-mounts fand in Badlösungen, welche der physiologischen Extrazellulärlösung nachempfunden wurde, statt (Abschnitt 3.3.1).

Jungtiere bis etwa P10 wurden unmittelbar durch einen scharfen Scherenschnitt dekapitiert. Ältere Tiere wurde vor der Dekapitation durch 2-Chlor-2-difluormethoxy-1,1,1-trifluorethan (Isofluran) anästhesiert und anschließend überstreckt. Nach der Dekapitation wurde der Schädel makroskopisch in der Sagittalebene median durchtrennt und von medial das Gehirn bis auf die Konvexität entfernt (supra- und infratentorielle Anteile). Anschließend wurden die Schädelhälften in eiskalte Badlösung überführt. In dieser Lösung erfolgte die sich anschließende mikroskopische Präparation der Cochlea. Hierzu kam ein Zoom-Stereomikroskop mit externer Kaltlichtquelle zum Einsatz. Mit Präparationspinzetten wurde das umliegende Gewebe vorsichtig abpräpariert, bis das (teil-)verknöcherte Felsenbein frei lag. An diesem Punkt wurde ein Wechsel in frische Badlösung vorgenommen. Es erfolgte die Öffnung der knöchernen Strukturen des Innenohrs mit Freilegung der Cochlea aus dem knöchernen Labyrinth unter Schonung des häutigen Labyrinths. Aus der freigelegten Cochlea wurde ein Gewebestück aus dem apikalen bis zu dem mittleren helikalen Bereich entnommen. Der Modiolus sowie die Strukturen der Scala tympani wurden abpräpariert (Abb. 12).

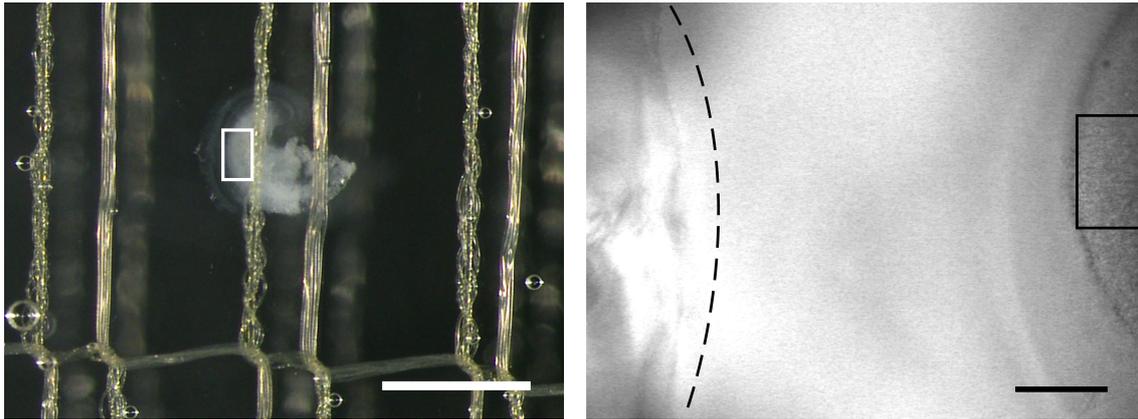
### 3.5.2 $Ca^{2+}$ -Imaging

Ein whole-mount Präparat wurde behutsam in eine mit entsprechender Badlösung gefüllte Badkammer überführt (Tab. 5). Hier erfolgte die Fixierung des Präparats entweder durch Cell-Tak™ oder durch ein Nylon-Gitter. Das Nylongitter war zuvor durch Nylongewebe, welches um einen Stahlring gespannt wurde, hergestellt worden. Der Ring wurde passgenau für die Badkammern gefertigt. Das Gewebestück wurde mit zwei weichen Gitterfäden auf dem Boden der Versuchskammer befestigt (Abb. 13). Die Reissner-Membran wurde durchtrennt und weitestgehend entfernt, ebenso die TM. Die nun frei flottierende laterale Wand mit der Stria vascularis wurde nach peripher abgeklappt und entweder am Boden der Badkammer mit Cell-Tak™ festgeklebt oder bei Benutzung des Gitters entfernt. Nach Austauschen der Badlösung gegen die Indikatorlösung (Abschnitt 3.4.1) wurde das Präparat für 40 Minuten in einer dunklen Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Um während der Versuche verschiedene Lösungen applizieren zu können, kam ein selbstgebautes Applikationssystem zum Einsatz. Dieses verfügte über 3 Linien, aus welchen drei verschiedene Lösungen über das Präparat superfundiert werden konnten. 10 *mL*-Spritzen bildeten ein Reservoir, welches über einen 3-Wege-Hahn zum einen mit einer 5 *mL*-Spritze als Lösungsspeicher und zum anderen mit einem zur Badkammer führenden Schlauch verbunden waren. Die Schläuche der verschiedenen Linien wurden in der Applikationsspitze zusammengeführt (Abb. 14). Diese konnte durch einen Mikromanipulator gesteuert werden. Bevor das Applikationssystem in die Badkammer eingebracht wurde, wurde sichergestellt, dass alle drei Applikationslinien einwandfrei funktionieren. Anschließend wurde die Applikationsspitze unter mikroskopischer Sicht mit dem Mikromanipulator und bei laufender



**Abbildung 12: Beispielpräparation eines whole-mounts an P6.** **a**, Median durchtrennter Schädel nach Entfernung des Gehirns. Im occipitalen Drittel ist deutlich das Innenohr mit den Bogengängen zu erkennen (gepunktetes Oval). Die gepunktete Linie markiert die Incisura tentorii. **b**, Isoliertes knöchernes Labyrinth. Links unten im Bild die knöcherne Hülle der Cochlea. Durchscheinend ist die beginnend verknöcherte Lamina spiralis ossea zu erkennen (gepunktete Linie am Apex, siehe auch c). Die gepunkteten Linien an der Basis markieren die vestibulären Bogengänge. **c**, Isoliertes häutiges Labyrinth. Die gepunktete Linie markiert die Achse des Modiolus. **d**, Fertige Präparation einer cochleären Windung. Die gepunktete Linie markiert den Übergang zwischen dem Limbus spiralis mit den IDCs (oberer Bildrand) und dem Kölliker-Organ und den Haarzellen (unterer Bildrand). Der Rahmen stellt beispielhaft einen Messbereich dar. Der weißer Stern markiert die Haarzellregion. Quelle: TSM.



(a) Präparat unter dem Nylon-Grid

(b) Präparat unter dem LSM

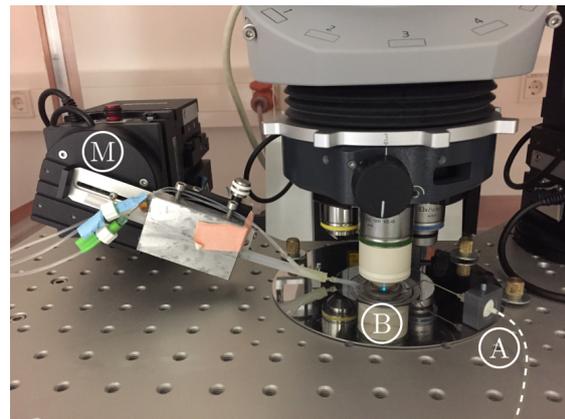
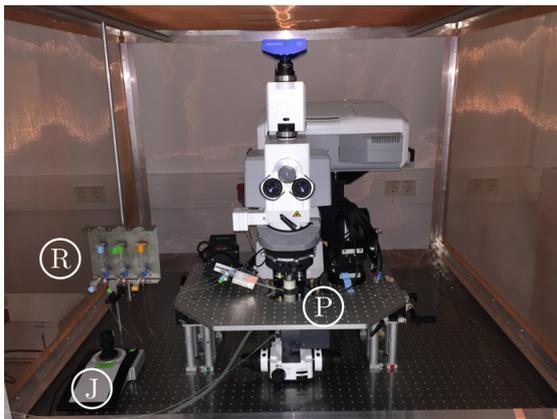
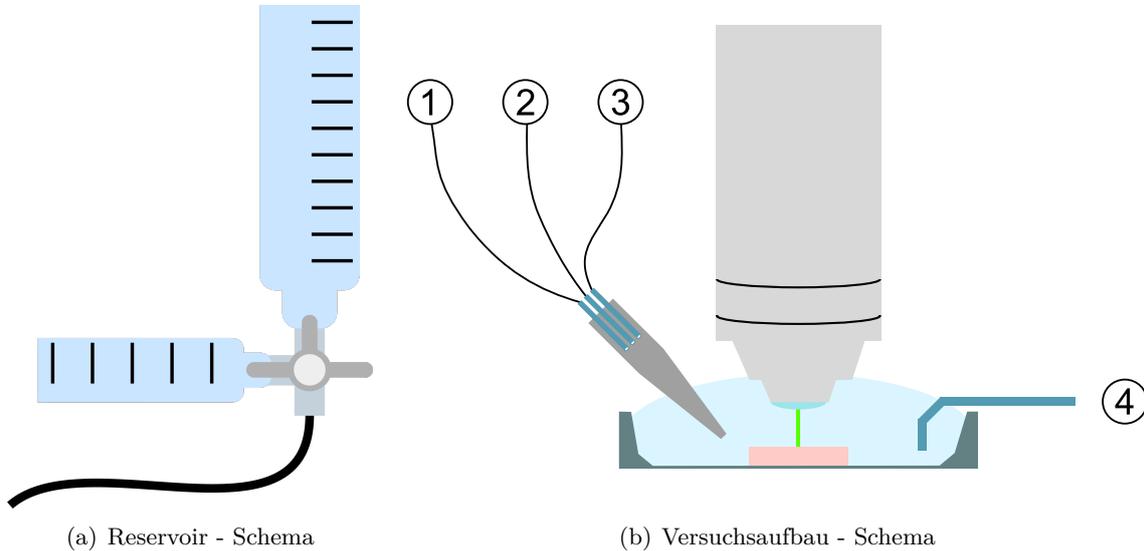
**Abbildung 13: Fixierung und Messbedingungen der Präparate.** **a**, Präparate, hier P18, wurden behutsam mit einem Löffel in die Badkammer überführt, so dass sie immer von Badlösung umgeben waren. Anschließend wurden sie zwischen dem Nylongitter und dem Boden der Badkammer fixiert. Das Imaging erfolgte im Bereich des weißen Rahmens. Maßstab = 1 mm. **b**, Unter dem LSM wurde die Applikationsspitze (links neben der schwarz-gestrichelten Linie) an die Präparate, hier P0, herangefahren. Der Messbereich ist durch das schwarze Rechteck angedeutet. Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ . Quelle: TSM.

Badlösung an das Präparat herangefahren. Die eigentlichen Messungen fanden alle in der B49 statt. Während der gesamten Messung herrschte ein konstanter Flüssigkeitsstrom über dem Präparat. Über eine Peristaltikpumpe wurde ein konstanter Flüssigkeitspegel sichergestellt. Während der Messung wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten abwechselnd appliziert, wobei Kanal 1 des Applikationssystems ausschließlich für neutrale Badlösungen vorbehalten war.

Die Anregung von Fluo-8<sup>®</sup> AM erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm. Das Messfeld war 210,6  $\mu\text{m}$  x 76,5  $\mu\text{m}$  groß; die Pixelgröße betrug 0,45  $\mu\text{m}$  x 0,45  $\mu\text{m}$ . Die Bildrate betrug zwischen 2 - 5 Hz (204 - 478 ms pro Bild).

### 3.5.3 Immunhistochemie

Für Immunfärbungen erfolgte, abweichend zu dem in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Prozedere, eine Fixierung der Cochlea für eine Stunde in eiskalter 4%-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung oder in Zambonis Fixans auf Eis (Somogyi und Takagi, 1982). Cochleäre Kryoschnitte wurden für 2 h fixiert. Zu Beginn des Versuches wurden die verschiedenen Puffer gemäß Tabelle 7 angesetzt. Die Inkubationen des Gewebes fanden in einer dunklen Feuchtkammer bei Raumtemperatur von ca. 18 – 24 °C auf einer Rüttelplatte bei 50 Rotationen pro Minute statt. Auf einem Glasobjektträger wurde mit einem ImmunoPen<sup>™</sup> eine kreisrunde hydrophobe Flüssigkeitsbarriere aufgebracht. In die Mitte des Feldes wurde 1  $\mu\text{L}$  Cell-Tak<sup>™</sup> pipettiert. Nach Abtrocknen des Klebers wurde die Badlösung aufgetragen, in welcher das Präparat festgeklebt wurde. Kryoschnitte (Abschnitt 3.5.4) wurden für 15 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurden Präparate (whole-mounts und Kryoschnitte) für 10 min mit dem Permeabilisierungspuffer inkubiert, um die Penetration von Antikörpern in das Gewebe zu ermöglichen. Der nächste, 30-min Schritt diente dem Blockieren unspezi-



(c) LSM-Übersicht

(d) LSM-Applikation

**Abbildung 14: Übersicht über die Messbedingungen beim  $Ca^{2+}$ -Imaging.** **a**, Schematische Darstellung des Applikationsreservoirs. **b**, Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Das mit einem Nylon-Netz oder Cell-Tak™ fixierte Präparat (Block in der Mitte der Kammer) wurde von Badlösung umspült. 1 bis 3 Schläuche des Applikationssystems. Linie 1 war für neutrale Badlösung vorbehalten. Linie 2 - 3 wurden für Antagonisten und Agonisten verwendet. 4 Absaugung zur Peristaltikpumpe. **c**, Übersicht über den Messaufbau. An das Präparat (P) wurde unter Sichtkontrolle die Applikationsspitze mit dem Joystick (J) herangefahren. Links im Bild sind die Reservoirs (R) des Applikationssystems. **d**, Detailaufnahme der Badkammer (B), des Objektivs und des Applikationssystems. Über den Mikromanipulator (M) wurde die Applikationsspitze an der Präparat herangefahren. Über den Auslauf (A) wurde der Flüssigkeitspegel in der Badkammer konstant gehalten. Quelle: Aufbau Institut für Biophysik CIPMM, Schemata und Fotos TSM.

fischer Epitope. Hierbei kam der Blockierungspuffer zum Einsatz. In dieser Zeit wurden die PAK in der jeweiligen Verdünnung in Reaktionspuffer gelöst. Im Anschluss wurde der PAK für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Präparat zwei Mal für 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Währenddessen wurden die Sekundärantikörper in der gewünschten Verdünnung in Reaktionspuffer angesetzt. Die fertige Lösung wurde für 3 min bei 6000 *g* zentrifugiert. Der Sekundärantikörper (SAK) inkubierte für 70 min. Im Anschluss wurde das Präparat zwei Mal für 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Um Rückstände der Pufferlösungen zu entfernen, wurde ein Waschschrift mit PBS für 6 min durchgeführt. Es folgte eine Zellkernfärbung mit DAPI für 6 min, welches zuvor 1:333 mit PBS verdünnt worden war. Nach Waschschriften mit PBS wurden die Rückstände des ImmunoPen<sup>TM</sup> entfernt und 8  $\mu$ L Vectashield<sup>®</sup> aufpipettiert. Das Präparat wurde mit einem Deckglas bedeckt und bis zum Mikroskopieren für 24 h bis max. 48 h im Kühlschrank gelagert.

#### 3.5.4 Cochlea-Kryoschnitte

Die benutzten cochleären Kryoschnitte (Dicke ca. 13  $\mu$ m) wurden freundlicherweise von der AG der Frau Prof. Knipper, Tübingen Hearing Research Centre (THRC), zur Verfügung gestellt.

#### 3.5.5 Mikroskopische Aufnahmen

Alle Fluoreszenzbilder und das  $Ca^{2+}$ -Imaging wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Tab. 2) aufgenommen. Die grobe Einstellung des Bildausschnitts erfolgte über das Okular des Mikroskops. Die Feinjustierung der Fokusebene und der Lasereinstellungen erfolgten online mit der Software Zen (Tab. 8). Für jedes neue Präparat wurde vorab eine Köhlersche Beleuchtung sicher gestellt.

#### 3.5.6 Offline-Analyse der Fluoreszenzaufnahmen

Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte grundsätzlich offline. Hierzu kamen die in Tabelle 8 aufgeführten Computerprogramme zum Einsatz.

##### 3.5.6.1 Auswertung der Immunfärbungen

Die qualitative Auswertung der Immunfärbungen erfolgte in Fiji.

**Tabelle 7: Pufferlösungen für Immunfärbungen.** Quelle: Zusammenstellung TSM.

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG
Blockierungspuffer	1 % BSA in PBS
Permeabilisierungspuffer	0.5 % Triton <sup>TM</sup> X-100 in PBS
Reaktionspuffer	0,5 % BSA, 0,2 % Triton <sup>TM</sup> X-100 in PBS
Waschpuffer	0,1 % Triton <sup>TM</sup> X-100 in PBS

**Tabelle 8: Eingesetzte Software.** Quelle: TSM.

NAME	VERSION	HERSTELLER
Fiji	2.0.0	Schindelin et al. (2012)
IGOR Pro	6.37	WaveMetrics Inc., Portland, OR, USA
Inkscape	0.91	www.inkscape.org
SPSS Statistics	23.0.0.0 & 25.0.0.1	International Business Machines Corp., Armonk, NY, USA
ZEN	10	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

### 3.5.6.2 Auswertung der $Ca^{2+}$ -Imaging-Versuche

Die aufgenommenen Rohdaten wurden mit der open-source Software Fiji weiterverarbeitet. Die relative Fluoreszenzänderung wurde pixelweise wie folgt berechnet (Formel 4):

$$F(t) = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_R(t) - F_0}{F_0} \quad (4)$$

$$F_0 = \frac{1}{10} \sum_{t=1}^{10} F_R(t) \quad (5)$$

Hierbei ist  $F(t)$  die relative Fluoreszenzänderung zum Zeitpunkt  $t$  und  $\Delta F$  die Differenz zwischen der Rohfluoreszenz  $F_R(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  und der über die ersten 10 Bilder gemittelten Rohfluoreszenzen  $F_0$  (Formel 5). Anschließend wurden manuell Aktivität zeigende Bereiche passgenau als region of interest (ROI) markiert. Alternativ wurden bei Verwendung von CellMask™ Deep Red die abgrenzbaren Zellen als ROI ausgewählt. Für jede ROI wurde die mittlere Helligkeit in jedem aufgenommenen Bild ausgelesen. Diese Messwerte wurden in IGOR Pro überführt. Hier wurden die Messwerte als Graph mit der relativen Fluoreszenzänderung  $F(t)$  auf der Ordinate gegen die Zeit  $t$  auf der Abszisse aufgetragen. Über einen eigens hierfür entwickelten Algorithmus wurden lokale Maximalwerte automatisiert gefunden und in einer Tabelle zusammengefasst.

Die Daten der relativen Fluoreszenzänderung  $F(t)$  enthalten nur sogenannte univariate Peaks, d. h. alle gesuchten Maxima sind positiver als die relativ niedrigen Basiswerte (s. u.) zwischen den Bereichen in denen die Peaks auftreten. Außerdem sind große Abweichungen von den Werten um die Basislinie zu Zeitpunkten ohne Aktivität selten; am häufigsten sind Werte an oder nah um die Basislinie zu finden.

Der Algorithmus identifiziert über eine Schwellwertsuche zunächst Bereiche, die ausreichend weit über der Basislinie liegen. Innerhalb dieser Bereiche wird dann über die Bildung der ersten und zweiten Ableitung einer stark geglätteten Version der Daten identifiziert, in

welchen Intervallen sich Maxima und gegebenenfalls Minima finden lassen. Danach wird mit einer einfachen Maximum- bzw. Minimumsuche innerhalb der so identifizierten Intervalle der jeweilige Extremwert in den *ungeglätteten* Daten bestimmt.

Existiert nur *ein* Maximum, so wird als Peakende das Unterschreiten des Schwellenwerts angenommen. Existieren mehrere Maxima, so werden die Minima zwischen den Maxima einerseits als Ende des vorhergehenden Peaks und gleichzeitig als Beginn des folgenden Peaks betrachtet. Peaks, die kürzer als eine Mindestdauer sind oder Minima, die nicht weit genug unter dem vorhergehenden Maximum liegen, werden verworfen. Außerdem werden Bereiche verworfen, die am Ende der Signale liegen und *nicht* mehr den Schwellenwert unterschreiten, da über die Länge des letzten Peaks keine sichere Angabe gemacht werden kann.

Weil die Daten inhärent unterschiedlich starkes Hintergrundrauschen aufwiesen, erschien es sinnvoll, die verwendeten Schwellenwerte nicht als absolute Werte, sondern jeweils als Basiswert plus ein Vielfaches der Standardabweichung des Hintergrundrauschens anzunehmen.

In einem ersten Schritt wurden zunächst der Basiswert der Daten und vor allem die Standardabweichung des Hintergrundrauschens möglichst genau bestimmt. Dazu wurde zuerst eine geglättete Version des Signals gewonnen, wobei ein in IGOR Pro vorhandenes Binomial Glättungsfilter (Marchand und Marmet, 1983) verwendet wurde. Über die Datenwerte des geglätteten Signals wurde ein Histogramm gebildet und der am häufigsten auftretende Histogrammwert als Basiswert verwendet.

Zur Bestimmung der Standardabweichung wurde das geglättete Signal von den Originaldaten abgezogen. Das resultierende Signal bestand damit im Wesentlichen aus dem Hintergrundrauschen mit einigen wenigen Ausreißern. Als erste Schätzung wurden Mittelwert und Standardabweichung dieses Rauschsignals berechnet. Anschließend wurde ein Histogramm der Werte des Rauschsignals erstellt und an dieses eine Gausskurve automatisch angepasst, wobei die Startwerte aus Mittelwert und Standardabweichung des Rauschsignals abgeleitet wurden.

Der Basiswert plus ein Vielfaches der so gewonnenen Standardabweichung bildeten den Schwellenwert, um die Bereiche zu identifizieren, innerhalb derer nach Peaks gesucht wurde.

Zum Finden der Maxima und Minima wurde das Originalsignal  $F_R(t)$  zunächst über eine Faltung stark geglättet  $F_g(t)$  und anschließend die erste ( $F'_g(t)$ ) und zweite Ableitung  $F''_g(t)$  des geglätteten Signals berechnet. Innerhalb eines Suchbereichs (ein Bereich in dem die Datenwerte *alle* oberhalb des Schwellenwertes lagen) wurde nach Nullstellen ( $t_{0''}$ ) der zweiten Ableitung gesucht. Wenn Nullstellen der zweiten Ableitung einer Funktion auftreten, dann können nur *zwischen* den Nullstellen Extremwerte liegen.

Wurde keine oder nur eine Nullstelle der zweiten Ableitung gefunden, wurde der Maximalwert im Suchbereich als Peakwert und der zugehörige Zeitpunkt als Peakzeitpunkt angenommen. Beginn und Ende des Peaks waren dann gleich Beginn und Ende des Suchbereichs.

Wurden mehr als zwei Nullstellen der zweiten Ableitung gefunden, wurde zwischen den Nullstellen der zweiten Ableitung nach einer Nullstelle der ersten Ableitung ( $t_{0'}$ ) gesucht, und über die zweite Ableitung geprüft, ob nach einem Maximum ( $F_g''(t_{0'}) < 0$ ) oder einem Minimum ( $F_g''(t_{0'}) > 0$ ) in den Originaldaten gesucht werden sollte. Danach wurde im Originalsignal  $F_R(t)$  im betreffenden Intervall nach dem entsprechenden Extremwert gesucht.

Der Algorithmus hatte folgende benutzerdefinierte Parameter (in Klammern die verwendeten Werte):

- einen Parameter zur Glättung der Daten bei der Bestimmung von Basiswert und Standardabweichung des Hintergrundrauschens (20),
- einen Faktor für die Standardabweichung, um die Schwellenwerte für die Suchbereiche zu berechnen (5),
- eine Grenzfrequenz für die Glättung der Daten zur Berechnung der Ableitung (0,1 – 0,2 Hz),
- eine absolute Minimaldauer für die Dauer der Peaks (1 s),
- einen Faktor für die Standardabweichung, um die Schwelle zu berechnen, um die ein Minimum mindestens unterhalb eines Peaks liegen muss.

Als Ergebnis lieferte der Algorithmus folgende Werte, bezogen auf die Peaks:

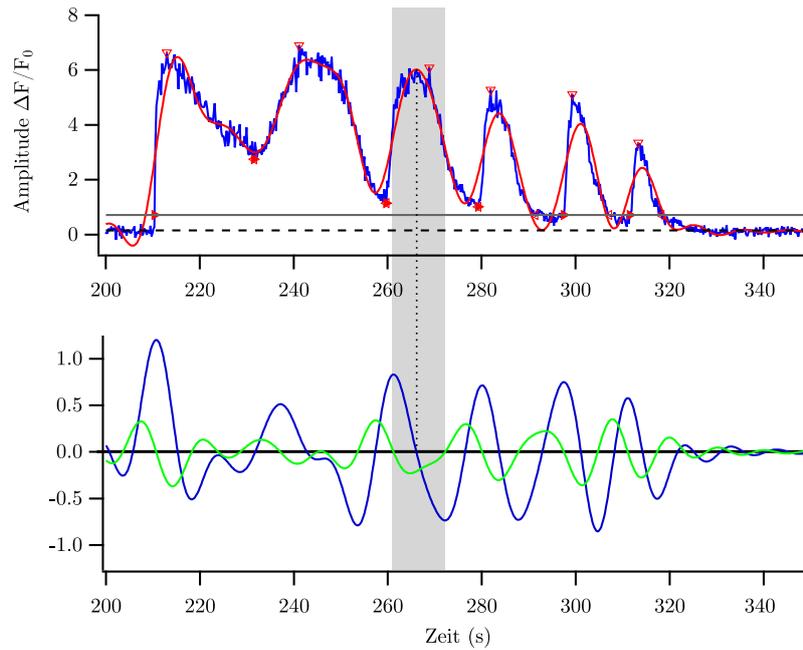
- Zeitpunkt des Startknotenpunkts,
- Zeitpunkt des Endknotenpunkts,
- Peakzeitpunkt (Zeitpunkt des lokalen Maximums),
- Peakdauer,
- zeitlicher Abstand zum vorhergehenden Peak, wenn mehr als ein Peak im Signal vorhanden,
- Differenz zwischen Peakhöhe und Basiswert.

Dieser Algorithmus ist durch intensive Diskussion zwischen Dr. rer. nat. Stefan Münkner und mir entwickelt und durch Dr. Münkner programmiert worden. Hier für gilt mein herzlichster Dank.

Die statistische Auswertung erfolgte in dem Programm SPSS Statistics.

### 3.5.6.3 Die graphische Auswertung der gemessenen Daten

Diagramme wurden in SPSS Statistics generiert und als \*.pdf-Datei exportiert. In Inkscape wurden die Diagramme zur besseren Übersicht in gruppierten Anordnungen in Zusammenhang gebracht und um weitere Merkmale, wie Signifikanz anzeigende Balken, ergänzt.



**Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Funktionsweise des Extremwertalgorithmus.** Der obere Graph zeigt in blau das Originalsignal  $F_R(t)$ , welches über eine Faltung zu  $F_g(t)$  geglättet wurde (rote Kurve). Die horizontal gestrichelte Linie zeigt die Lage der Baseline, und die darüber liegende durchgezogene Linie zeigt den Peak-Schwellenwert an. Das untere Diagramm stellt die erste (dunkelblau,  $F'_g(t)$ ) und zweite (grün,  $F''_g(t)$ ) Ableitung von  $F_g(t)$  dar. Zwischen den Nullstellen von  $F'_g(t)$  (grauer Balken, entspricht Wendepunkten von  $F_g(t)$ ) wurde nach Nullstellen von  $F''_g(t)$  gesucht (vertikale gepunktete Linie). Über die Lage von  $F''_g(t)$  im Bezug auf 0 wurde überprüft, ob es sich um ein lokales Maximum ( $F''_g(t) < 0$ ) oder Minimum ( $F''_g(t) > 0$ ) handelt. Quelle: TSM.

Im Falle von Box-Whisker-Plots umfassten die Boxen den Wertebereich vom 1. Quartil  $Q_1$  bis zum 3. Quartil  $Q_3$ . Werte galten als Ausreißer für  $Q_3 + 1,5 \text{ IQR} \leq y_i$  oder  $y_i \leq Q_1 - 1,5 \text{ IQR}$  (mit Interquartilabstand ( $\text{IQR} = Q_3 - Q_1$ ; zur besseren Übersicht nicht mit in die Graphen aufgenommen). Die Anzahl der Sterne über den Signifikanz anzeigenden Balken geben das Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau an ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ;  $*p_K \leq 0,05$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r$ ) und gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke an ( $0,5 \leq r$ ; Formel 6 auf Seite 56 als  $r = |Z(\sqrt{n-1})|$ ).

## 4 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk dieses Projekts lag auf dem Verhalten der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration der Interdentalzellen (IDCs). Zum besseren Verständnis der Morphologie und zur Verifikation der in der Literatur beschriebenen Proteinexpression wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden für jedes Alter getrennt dargestellt und anschließend in der Diskussion (Abschnitt 5) zusammengefasst.

### 4.1 Anatomie des Limbus spiralis

Mit Hilfe des fluoreszierenden Membranfarbstoffs FM4-64 wurde durch konfokale Stapelaufnahmen von *in vitro*-Präparaten die zelluläre Anatomie des Limbus spiralis eingehend untersucht (Abb. 16). In der reifen Cochlea waren die Interdentalzellen (IDCs) anisotrop aufgebaut. An ihrer apikalen, zum Ductus cochlearis weisenden Seite, bildeten sie je eine polygonale, wenige Mikrometer dicke Deckplatte. Diese verzüngte sich in der Tangentialebene (Abb. 16, Schnittebene 4 in a) rasch zu einem schlanken Hals, welcher in eine bullöse Zellbasis überging. In dieser war auch der Zellkern gelegen. Der Grad der Organisation nahm von modiolär nach radial stark zu. Während im Insertionsbereich der Reissner-Membran (modiolär) die IDCs willkürlich angeordnet scheinen, lagen sie weiter radial in streng organisierten Reihen, welche von bindegewebigen Leisten, den Huschke-Zähnen, unterbrochen waren (Abb. 17). Zwischen diesen Leisten lagen die Interdentalzellularfurchen, in welchen die Zellkörper der IDCs lagen. Die Huschke-Zähne waren im Bereich der Interdentalzellbasis eher schmal und wirkten komprimiert, während sie im Halsbereich der IDCs den Zwischenzellbereich raumgreifend ausfüllten. Dieser Bereich war von FM 4-64-affinen Strukturen durchzogen; die Vermutung, dass Zellausläufe die Huschke-Zähne durchziehen, liegt nahe. Die polygonalen Deckplatten bildeten in der Aufsicht ein pflastersteinartiges Relief, welches die gesamte Oberfläche des Limbus spiralis bedeckte und auch die Huschke-Zähne unter sich verbarg. Im Laufe der cochleären Entwicklung nahmen die Huschke-Zähne an Breite zu. Während sie an P0 noch kaum erkennbar waren, nahmen sie an P18 einen bedeutenden Teil des Zwischenzellraums ein.

Auf Kryoschnitten von Cochleae hörender Mäuse ( $\geq$  P12) ließen sich ausführungsgangartige Zusammenschlüsse von IDCs beobachten. Diese waren mit einem inhomogenen Material gefüllt, welches in seinen optischen Eigenschaften dem der TM entsprach. Andere Zellen wiesen in der Deckplatte oberhalb des Halses eine zentrale mit TM gefüllte Invagination auf (Abb. 18).

### 4.2 Immunhistochemische Untersuchung von Pannexin-1 und Pannexin-2

Immunfärbungen wurden zu Beginn der Arbeit anfertigt, um (i) mit der Präparation des Gewebes vertraut zu werden und (ii) mögliche Marker für die IDCs zu finden.

#### 4.2.1 Expression von Pannexin-1 in der neonatalen Cochlea

An P4 zeigten IDCs eine deutliche, v. a. perinukleäre Pannexin-1-Färbung. In der Übergangszone zwischen dem Kölliger-Organ und IDCs sowie auch in der TM, deutete eine massive Färbung auf unspezifisch gebundene Antikörper in der Extrazellulärmatix hin (Abb. 19). Im radialen Anteil des Limbus spiralis zeigten sich in diesem Alter eine streng säulenförmige Anordnung der IDCs, welche von sehr dezent ausgeprägten Huschke-Zähnen untergliedert war. Nach modiolar löste sich die strenge Anordnung auf.

#### 4.2.2 Expression von Pannexin-2 in der neonatalen Cochlea

Abbildung 20 zeigt exemplarisch eine Immunfärbung gegen das Membranprotein Pannexin-2, welches wie Pannexin-1 zu der Familie der Hemi-Kanäle gehört, an P4. Der verwendete Antikörper führte an vielen Stellen des nicht-sensorischen Epithels der Cochlea zu einer Färbung, so auch im Bereich des Limbus spiralis in den Interdentalzellen. Hier scheint das Protein hauptsächlich in der den Huschke-Zähnen zugewandten Membran exprimiert zu sein.

### 4.3 Live Cell Imaging von Interdentalzellen

Beim Live Cell Imaging wurden die in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen whole-mount Präparate unfixiert in physiologische Badlösung überführt und vital gehalten, um am lebenden Gewebe *in vitro* (i) die Anatomie ohne Fixierungsartefakte beschreiben und (ii) die Zellphysiologie der IDCs beobachten zu können.

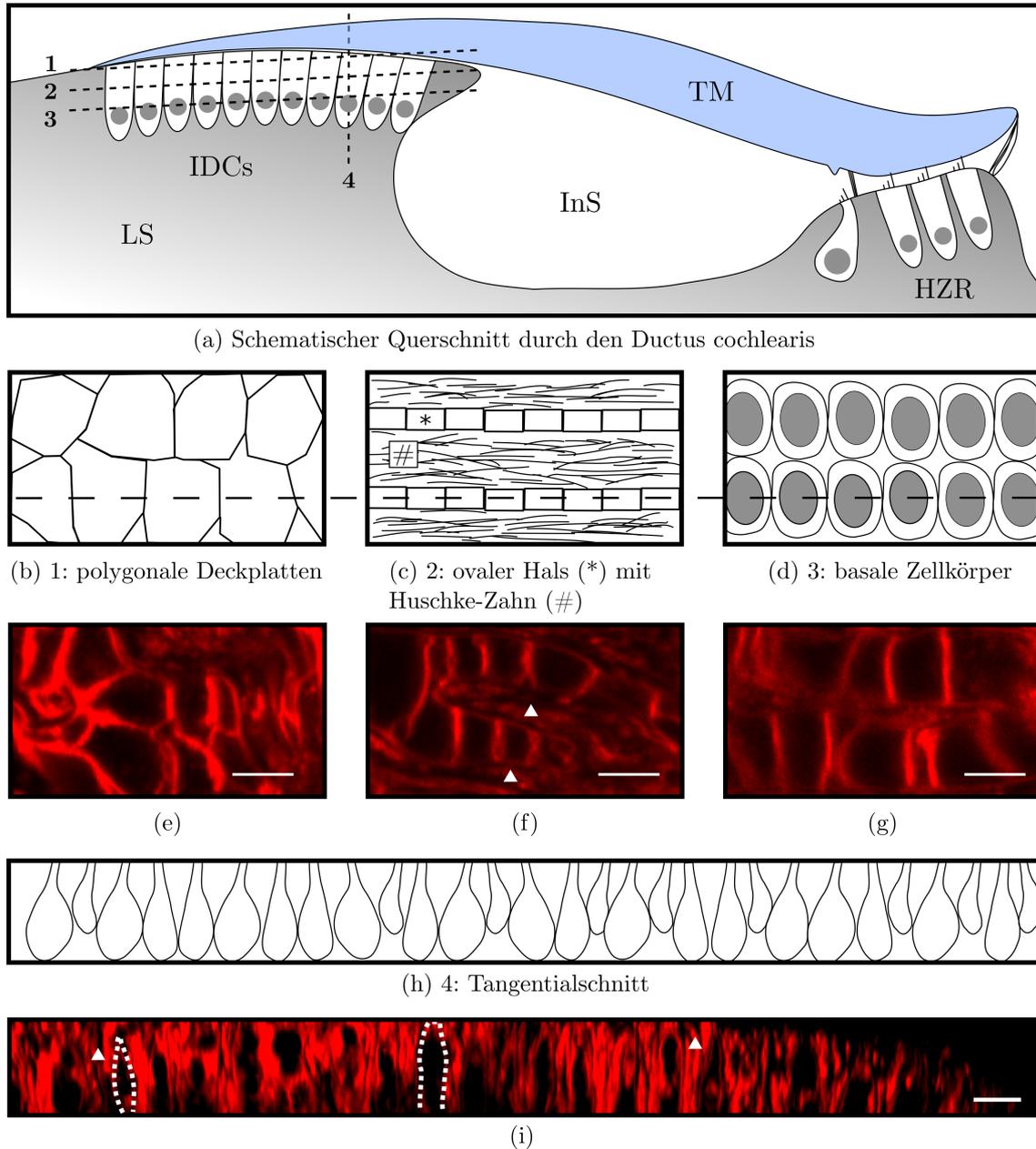
#### 4.3.1 Membran-Imaging an P4

Durchlichtbilder von an P4 aufgenommenen Stapelaufnahmen zeigten reichlich ca. 0,8 – 1,2  $\mu\text{m}$  große, vesikuläre Inhomogenitäten im Zytosol der IDCs. Diese erstreckten sich von der basolateralen Seite der Zelle bis an die apikale Membran. Das exakte Ausmaß der Zelle konnte mit dieser Methode nicht bestimmt werden, weshalb auch die Frage nicht eindeutig zu beantworten war, ob diese Beobachtung auf das gesamte Ausmaß der Zelle zutraf. Einige dieser Inhomogenitäten erstreckten sich über etliche Schnittebenen und schienen kanalikuläre Strukturen zu bilden. Es konnten grundsätzlich drei Erscheinungsbilder differenziert werden: (i) schwarze Anteile, (ii) gräulich erscheinende Strukturen, welche dem Zytosol ähnelten und von einem schwarzen Randsaum umgeben waren sowie (iii) weißliche Makulae im Zytosol.

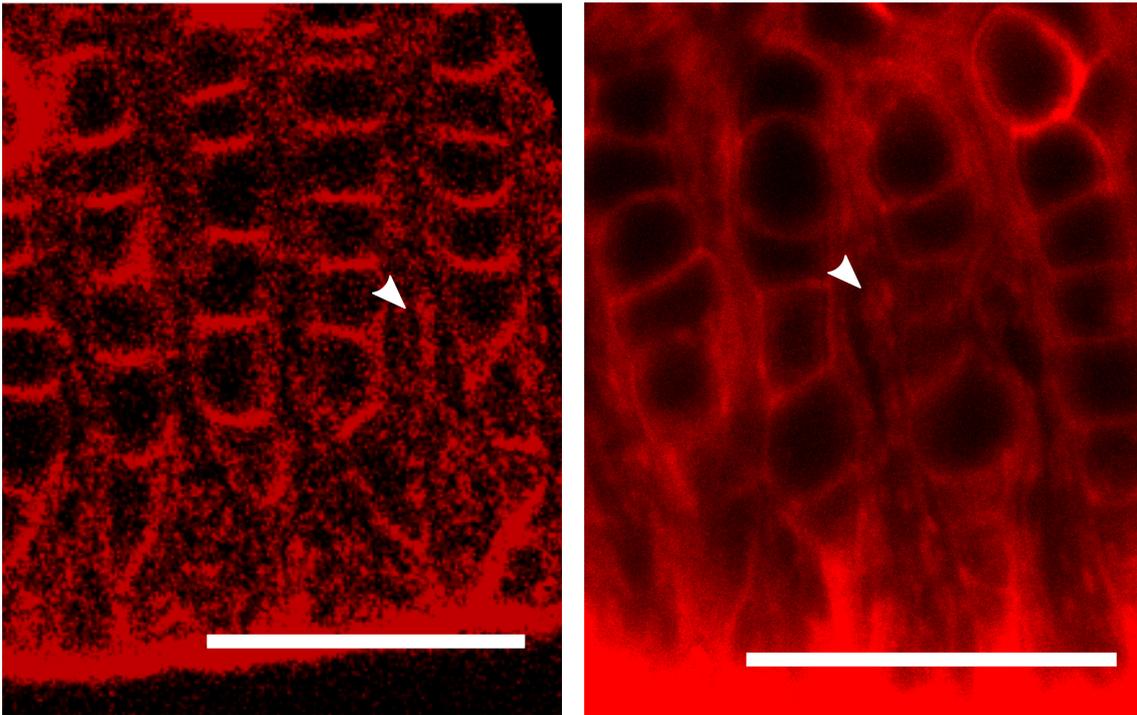
#### 4.3.2 Membran-Imaging an P18

An P18 wurden an whole-mount Präparaten (4 Präparate von 3 Tieren aus 2 Würfen) Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen in verschiedenen Fokusebenen (Schichtdicke ca. 200 nm;

Präparatdicke ca.  $200 \mu m$ ) durchgeführt nachdem die Präparate mit dem Membranmarker FM 4-64 für bis zu 15 min auf Eis (Tab. 6, Abschnitt 3) inkubiert worden waren. FM 4-64 wurde mit DMSO in Lösung gebracht und markiert nur lipophile Strukturen. Die Aufnahmen erbrachten erstmalig den physiologischen Nachweis von mobilen vesikulären Strukturen, sowohl in basolateralen Anteilen der Zellen, als auch in den Deckplatten. Der Durchmesser der darstellbaren Strukturen lag zwischen  $\sim 200 nm$  (Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops) und ca.  $1 \mu m$  (Abb. 22), wobei Vesikel, deren Außendurchmesser  $\geq 1 \mu m$  war, meistens einen nicht markierten Binnenraum hatten. Es konnten verschiedene Bewegungs- und Verhaltensmuster beobachtet werden: Innerhalb der Fokusebene kamen gerichtete Bewegung und chaotisch erscheinende Bewegungsmuster vor. Gelegentlich schienen Vesikel mit der Zellmembran zu verschmelzen. Die Mehrheit der Vesikel hatte einen Bewegungsvektor, welcher die Fokusebene schnitt, so dass sie die Bildebene verließen oder in diese hineintraten.



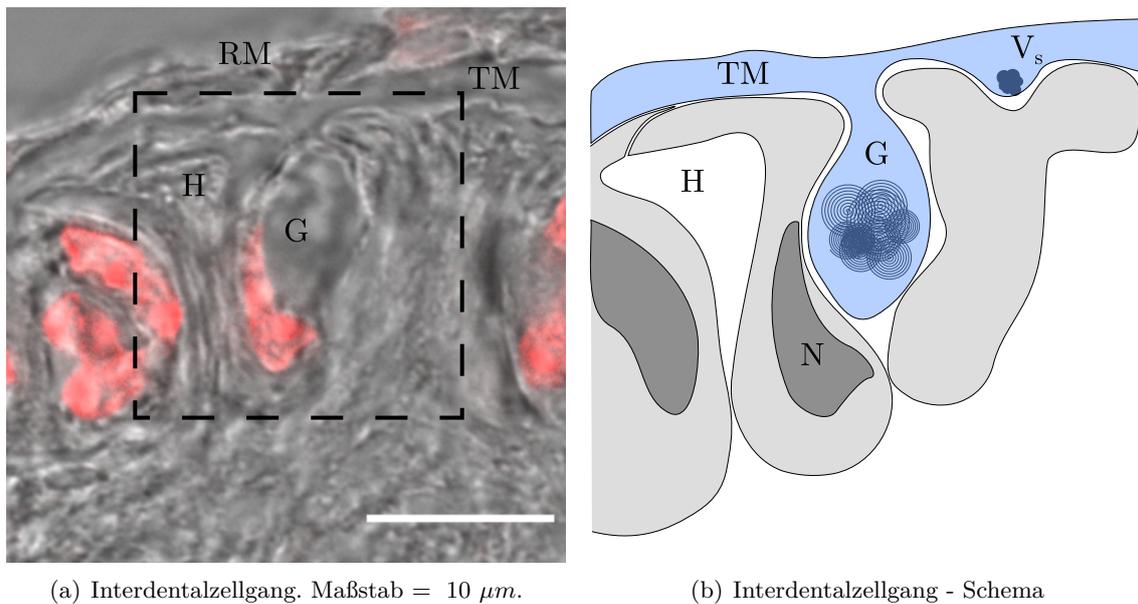
**Abbildung 16: Schema und LiveImaging mit dem Membranfarbstoff FM 4-64 von Membranen des Limbus spiralis der Maus an P18.** **a**, Schema eines mittlmodiolaren Querschnitts durch die Cochlea. Die TM überspannt den inneren Sulcus (InS) bis über die äußeren Haarzellen (HZR - Haarzellregion). Phalanxartig sind die IDCs in den Limbus (LS) eingelassen. 1 - 4 verdeutlicht die Schnittebenen von b - d & h. Schnittebene von a in b - d angedeutet (gestrichelte Linie). **b**, - **d**, Schematische Darstellung der Zellstrukturen in den Schnittebenen 1-3. **b**, Aufsicht auf den Limbus spiralis (Schnittebene 1 in a). Die IDCs bildeten polygonale Deckplatten, welche die Huschke-Zähne (nicht abgebildet) überspannten. **c**, Aufsicht auf Ebene 2 in a. Im apikalen, subsuperfiziellen Anteil hatten die IDCs schmale Hälse (\*), welche von den Huschke-Zähnen (#) getrennt wurden. **d**, Schnitt durch den basalen Zellkörper der IDCs (Ebene 3 in a). Die Zellen lagen dicht gepackt; die Huschke-Zähne waren nicht nachweisbar. **e** - **g**, Fluoreszenz-Stapelaufnahme vom lebenden Limbus spiralis (LiveImage). Die Abbildungen repräsentieren Vorlagen für die Schemata in b - d. Weiße Dreiecke markieren Huschke-Zähne. Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ . **h**, Schematischer Tangentialschnitt durch den radialen Teil des Limbus spiralis (Ebene 4 in a). Im apikalen Teil waren die IDCs durch die Huschke-Zähne getrennt. **i**, Z-Rekonstruktion im Tangentialschnitt der Live-Stapelaufnahme. Exemplarisch sind Huschke-Zähne (weiße Dreiecke) & Umrisse zweier IDCs dargestellt (weiße gepunktete Linie). Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ . Quelle: TSM.



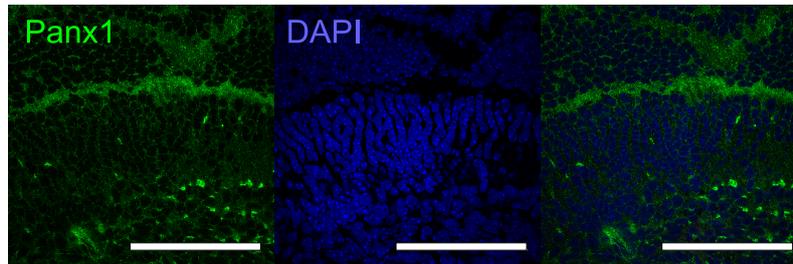
(a) IDC-Säulen an P4 mit FM4-64 markiert. Maßstab = 25  $\mu m$ .

(b) IDC-Säulen an P4 mit CellMask™ Deep Red markiert. Maßstab = 25  $\mu m$ .

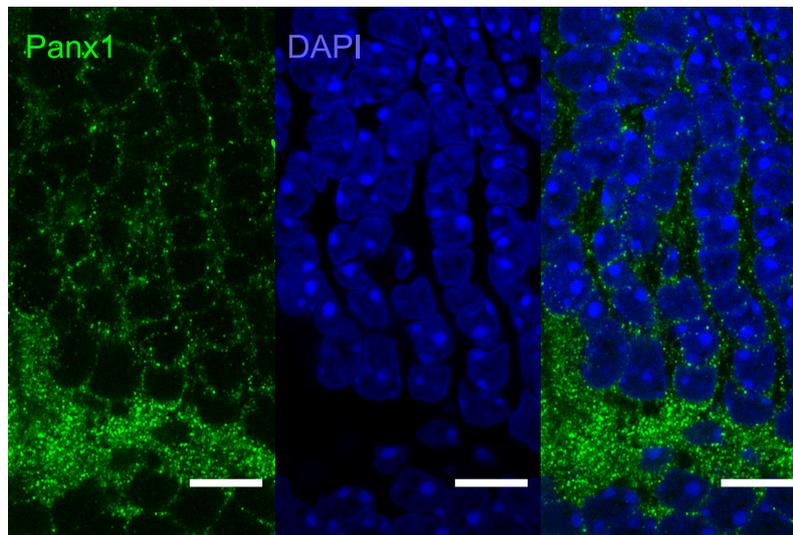
**Abbildung 17: IDC-Säulen an P4.** Fluoreszenz-Membrandarstellung lebender Interdentaltzellen. Diese waren an P4 im Bereich des Labium vestibulare (unten) streng säulenförmig angeordnet und bilden radiär gestellte Leisten, welche von den Huschke-Zähnen unterbrochen waren. Hier dargestellt ist eine vergleichende Gegenüberstellung von Membranfärbungen mit FM 4-64 (a) und CellMask™ Deep Red (b). Ferner zu erkennen sind angefärbte Membranen im Bereich der Huschke-Zähne (weiße Pfeilköpfe) zwischen den Interdentalleisten. Maßstäbe = 25  $\mu m$ . Quelle: TSM.



**Abbildung 18: Mehrere Interdentalzellen bilden einen Gang.** **a**, Einzelne Schicht aus einer kombinierten Durchlicht-Fluoreszenz-Stapelaufnahme eines Querschnitts durch den Limbus spiralis der Maus an P16 (Kryoschnitt, optische Schichtdicke ca. 200 nm; Gesamtdicke ca. 13  $\mu m$ ). Über der Membrana tectoria (TM) ist die beim Schneiden der Cochlea herunter geklappte Reissner-Membran (RM) zu erkennen. Mehrere IDCs bildeten einen Gang (G). Zwischen zwei IDCs ist ein Huschke-Zahn (H) angeschnitten. Die Zellkerne (N) sind rot angefärbt. Der Rahmen markiert den Ausschnitt des Schemas in b. Maßstab = 10  $\mu m$ . **b**, Schema von a. Mehrere IDCs bilden eine Art Ausführungsgang (G). Dieser ist mit einer Substanz gefüllt, die in ihren optischen Eigenschaften der TM gleicht. Angedeutet zu sehen ist eine apikale Invagination ( $V_s$ ). Zwischen den IDCs liegen die Huschke-Zähne (H). Nukleus (N). Quelle: TSM.

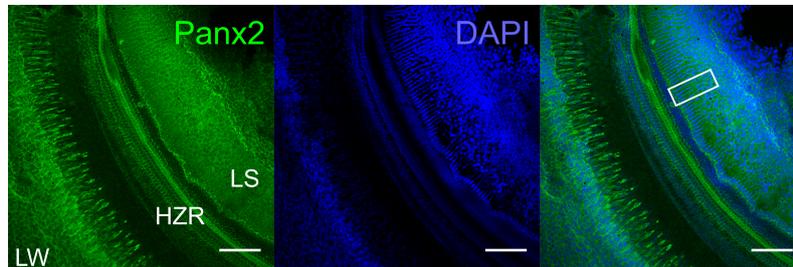


(a) Pannexin-1-Expression in der Übersicht. Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .

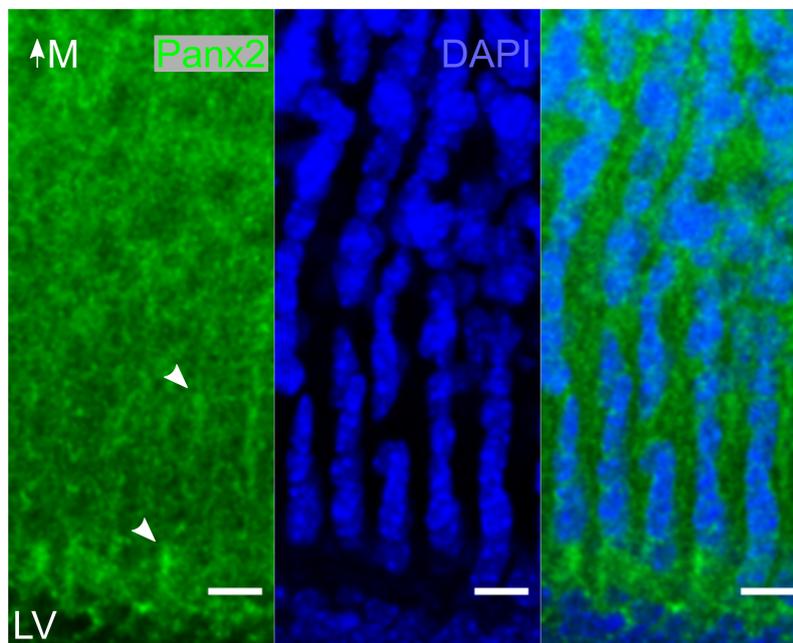


(b) Pannexin-1-Expression des Limbus spiralis. Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

**Abbildung 19: Pannexin-1-Expression in der Cochlea an P4.** **a**, Übersicht über den Übergangsbereich zwischen Kölliker-Organ (oberer Bildbereich) und Limbus spiralis (unterer Bildbereich). Pannexin-1 (grün, linke Teilabbildung) war sowohl im Kölliker-Organ als auch in den IDCs exprimiert. Die Kernfärbung mit DAPI (blau, mittlere Teilabbildung) diente zur Orientierung. Fusionierte Ansicht (rechts). Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ . **b**, Detailaufnahme des Limbus spiralis. Am Übergang zwischen Kölliker Organ und Limbus spiralis (unterer Bildrand) zeigten sich unspezifisch in TM-Material gebundene Pannexin-1-Antikörper (linke Teilabbildung). In den IDCs selbst zeigte sich ein deutliches Pannexin-1-Signal. Kernfärbung mit DAPI (blau, mittleres Bild). Fusionierte Ansicht (rechts). Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ . Quelle: TSM.

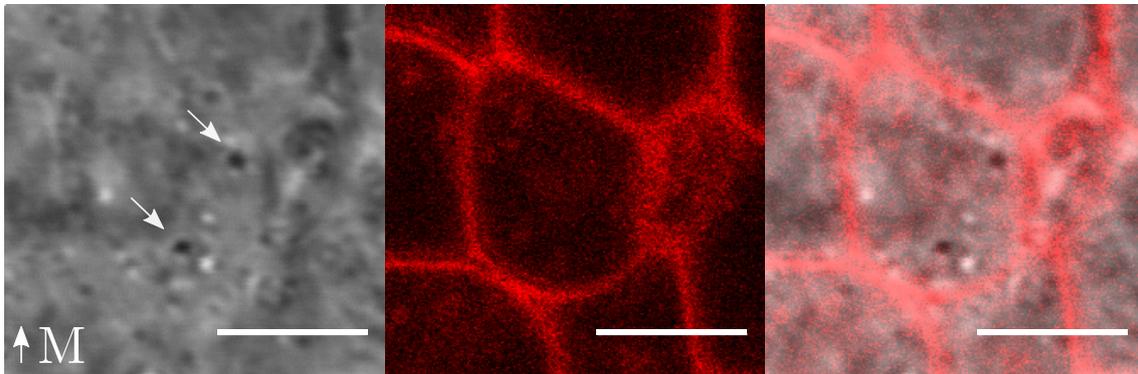


(a) Panx2-Expression - Übersicht. Maßstab = 100  $\mu m$ .

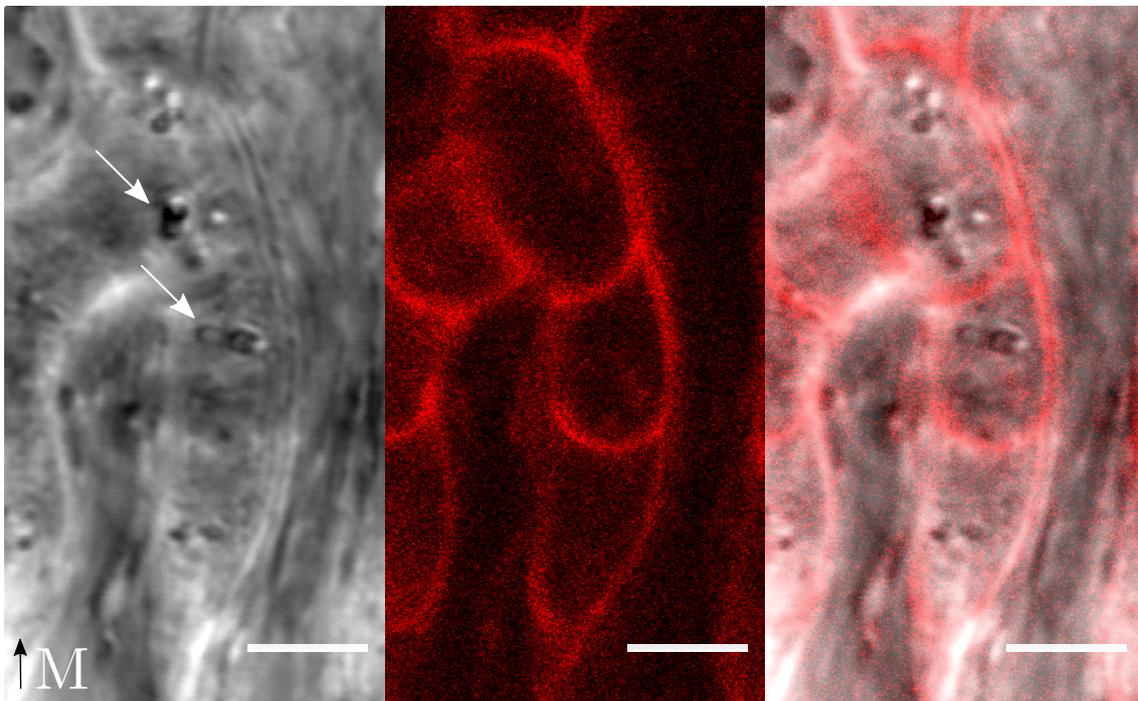


(b) Ausschnittsvergrößerung von a. Maßstab = 10  $\mu m$ .

**Abbildung 20: Pannexin-2-Expression in der Cochlea an P4.** **a**, Übersicht über eine apikale cochleäre Windung mit anti-Pannexin-2-Färbung (grün, linke Teilabbildung). Zu erkennen ist ein starkes Signal unklarer Spezifität in allen abgebildeten Bereichen von der lateralen Wand (LW, links unten) über die Haarzellregion (HZR) bis zum Limbus spiralis (LS). In der mittleren Teilabbildung ist die DAPI-Kernfärbung und rechts die Fusion aus ersten zwei Teilabbildungen dargestellt. Maßstab = 100  $\mu m$ . **b**, Ausschnittsvergrößerung von a im Bereich der IDCs. Sowohl im Zytosol, als auch an den Membranen der IDCs, ist anti-Pannexin-2-Signal erkennbar. An Zell-Zell-Grenzen im Bereich der Huschke-Zähne und des Labium vestibulare (LV) war die Färbung betont (weiße Pfeilköpfe). Teilabbildungen wie in a. Der Pfeil zeigt in Richtung des Modiolus (M). Maßstab = 10  $\mu m$ . Quelle: TSM.



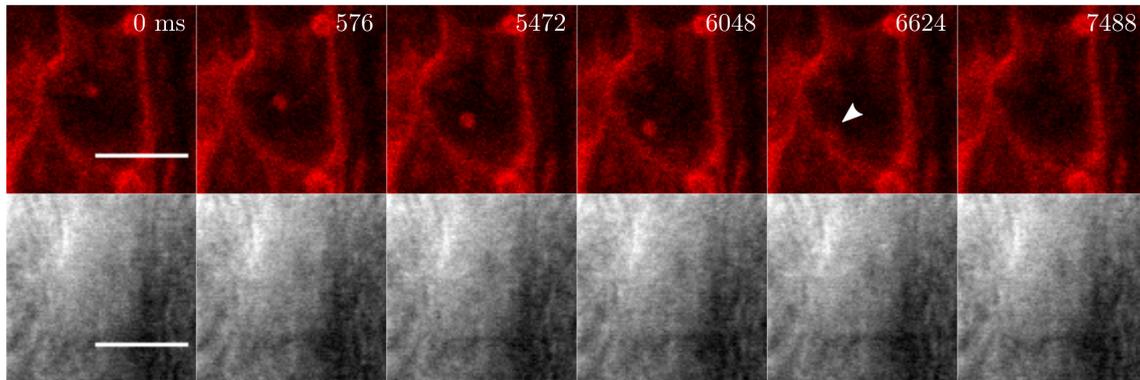
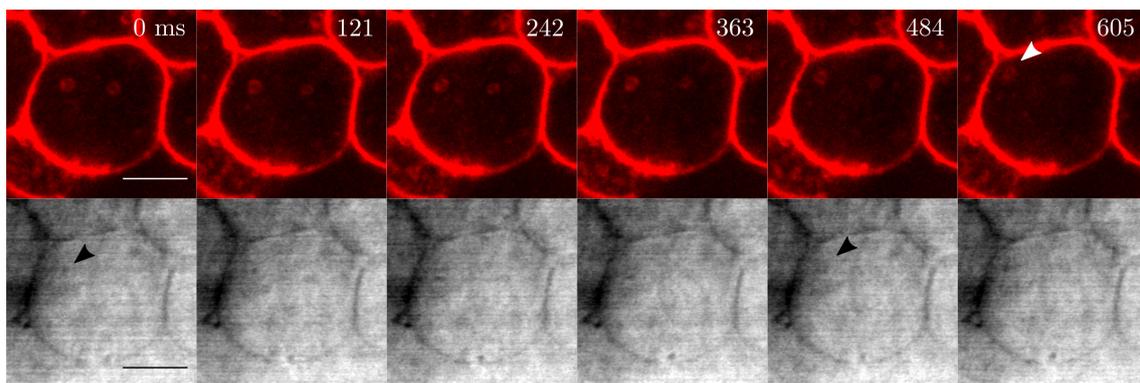
(a) Apikale Inhomogenität im modiolaren Bereich. Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ .



(b) Mittbasale Inhomogenität im labialen Bereich. Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ .

**Abbildung 21: IDC zeigen vesikuläre Inhomogenitäten in ihrem Zytosol an P4.**

**a**, Fluoreszenz-Stapelaufnahme lebender IDCs im modiolaren Bereich des Limbus spiralis (Schichtdicke ca. 200 nm; Pärparatdicke ca. 200  $\mu\text{m}$ ). Durchlichtbild (links) und CellMask<sup>TM</sup> Deep Red-Fluoreszenz (mitte) in apikaler Fokusebene mit mehreren Zellen (vgl. mit Schnittebene 1 in Abb. 16 a). Weiße Pfeile zeigen auf vesikuläre Inhomogenitäten. Modiolus (M). Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ . **b**, Es zeigten sich vesikuläre Strukturen auch in weiter basalen Schnittebenen (hier vergleichbar mit Schnittebene zwischen 2 & 3 in Abb. 16 a). Die dargestellten Zellen lagen im Bereich des Labium verstitulare. Die vesikulären Strukturen unterschieden sich in ihren optischen Eigenschaften (weiße Pfeile in linker Box). Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ . Quelle: TSM.

(a) Maßstab =  $5 \mu\text{m}$ .(b) Maßstab =  $5 \mu\text{m}$ .

**Abbildung 22: IDCs zeigten an P18, nach Hörbeginn, mobile intrazelluläre Vesikel.** **a**, Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahme einer IDC im Bereich des Zellhalses (Schnittebene 2 in Abb. 16 a;  $\Delta t = 288 \text{ ms}$ ). Nach kurzer Inkubation mit dem Membranfarbstoff FM 4-64 (obere Reihe) auf Eis ( $t_{\text{Inkubation}} \leq 15 \text{ min}$ ) sind im Zellinneren der IDCs mehrere Vesikel verschiedener Größe (Durchmesser von optischer Auflösungsgrenze [ $\sim 200 \text{ nm}$ ] bis ca.  $1 \mu\text{m}$ ) nachweisbar. Exemplarisch ist ein Vesikel dargestellt. Im vorletzten Teilbild scheint das Vesikel mit der Membran zu fusionieren (weißer Pfeilkopf). Die untere Reihe zeigt das Durchlichtbild zu den korrespondierenden Zeitpunkten, auf denen das Vesikel nicht zu erkennen ist. Maßstab =  $5 \mu\text{m}$ . **b**, Deckplatte einer IDC aus einem anderen Präparat (Schnittebene 1 in Abb. 16 a;  $\Delta t = 121 \text{ ms}$ ). Die Bewegung der Vesikel ist hier weniger gerichtet und eher chaotisch. Sie haben keinen eindeutigen Bewegungsvektor. Im letzten Teilbild gerät das Vesikel aus der Bildebene (weißer Pfeilkopf, exemplarisch). Bei dieser Aufnahme lassen sich die mit FM 4-64 markierten Vesikel mit dem Durchlichtbild (untere Reihe) korrelieren. Exemplarisch ist das linke Vesikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten markiert (schwarze Pfeilköpfe). Maßstab =  $5 \mu\text{m}$ . Quelle: TSM.

#### 4.4 Spontane und evozierte $Ca^{2+}$ -Transienten in IDCs

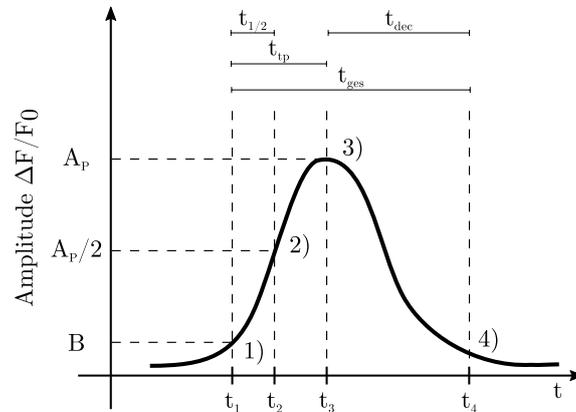
Mit dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Interdentalzellen (IDCs) während der cochleären Entwicklung unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen an allen beobachteten Altersstufen sowohl spontane als auch durch Adenosintriphosphat (ATP), Uridintriphosphat (UTP) und Adenosin-5'- $\gamma$ -thiotriphosphat ( $ATP\gamma S$ ) evozierbare  $Ca^{2+}$ -Transienten generieren. Diese wurden entsprechend dem in Abschnitt 3.5.6.2 beschriebenen Procedere analysiert. Hierbei kam folgende Terminologie zum Einsatz (Abb. 23):

- Amplitude ( $A_P; \Delta F/F_0$ ) war die Basislinien bereinigte, maximale relative Fluoreszenzänderung,
- Zeit zur halbmaximalen Aktivierung ( $t_{1/2}; s$ ) war die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude ( $A_P/2$ ),
- Time to peak ( $t_{tp}; s$ ) war die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude,
- Peakdauer ( $t_{ges}; s$ ) war die Gesamtdauer des Signals vom Start- bis zum Endknotenpunkt,
- Abklingzeit ( $t_{dec}; s$ ) war die Zeit vom Zeitpunkt der maximalen Amplitude ( $A_P$ ) bis zum Endknotenpunkt,
- Interspike Interval ( $s$ ), war die Zeit von einem Peakzentrum zum nächsten.

##### 4.4.1 Explorative Datenanalyse und statistische Auswertung

Vor der statistischen Auswertung des Effekts der Einflussfaktoren „Altersgruppe“ (P0/1, P4/5 und P18) und „Agonist“ (ATP, UTP und  $ATP\gamma S$ ) wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt, um einen Eindruck von der Verteilung der Messwerte für die verschiedenen Parameter zu bekommen. Im Vordergrund stand die Frage zur Normalverteilung, da dies wichtige Implikationen für die spätere statistische Auswertung hat. Die Gesamtheit der Daten wurde getrennt nach den Subgruppen (i) Altersstufen, (ii) Agonisten und (iii) Agonistenkonzentrationen analysiert. In allen Fällen lehnte der Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung ab (für alle Parameter  $p \leq 0,001$ ;  $H_0$ : Die Daten sind normalverteilt). Die Analyse der Histogramme, der Schiefe und Kurtosis der Daten sowie der Q-Q-Diagramme und der trendbereinigten Q-Q-Diagramme, untermauerten das Testergebnis. Im Anhang ist die Analyse exemplarisch für die Amplitude spontaner Signale an P0/1 dargestellt (Abb. 58). Insgesamt wurden 92.986 Signale aus 41 Mäusen in die Auswertung eingeschlossen. Tab. 9 stellt die Aufschlüsselung der Versuchstiere auf die Analysesubgruppen dar.

Da die gemessenen Daten nicht einer Normalverteilung unterlagen, wurde der Mann-Whitney-U-Test (auch U-Test) als nicht-parametrische Alternative zum t-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Rangsummentest, welcher keine konkreten Mittelwerte vergleicht, sondern prüft, ob die vorliegenden Analysegruppen derselben Grundgesamtheit entstammen; er beurteilt folglich die zentrale Tendenz eines Parameters (Mann und Whitney,



**Abbildung 23: Fiktives Signal zur Verdeutlichung der in der Auswertung gebrauchten Terminologie.** Die vom Auswertungsalgorithmus (Abschnitt 3.5.6.2) erkannten Signale beginnen am Startknotenpunkt (Zeitpunkt  $t_1$ ) und enden am Endknotenpunkt (Zeitpunkt  $t_4$ ). Die Peakdauer wurde aus den Zeitpunkten für Start- und Endknoten berechnet ( $t_{ges} = t_4 - t_1$ ). Das Signal war bei 3) (Zeitpunkt  $t_3$ ) maximal. Die Amplitude  $A_P$  wurde definiert als die maximale, relative Fluoreszenzänderung  $F(t_3)$  abzüglich der Baseline (B). Als time to peak ( $t_{tp}$ ) wurde die Zeit vom Startknotenpunkt bis zur maximalen Amplitude, 3) verstanden. Als Zeit zur halbmaximalen Aktivierung ( $t_{1/2}$ ; Zeitpunkt  $t_2$ ) wurde die Zeit bis zum Erreichen von  $A_P/2$  definiert. Unter Abklingzeit wurde die Differenz aus Endknoten und Zeitpunkt des Peakmaximums verstanden ( $t_{dec} = t_4 - t_3$ ). Quelle: TSM.

**Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere je Analysegruppe.** Die Tabelle stellt die Anzahl der gemessenen Versuchstiere je Subgruppe dar. Quelle: TSM.

AGONIST	[c]	ALTERSGRUPPEN		
		P0/1	P4/5	P18
Spontan		13	18	10
ATP	1 $\mu M$	7	6	5
	10 $\mu M$	5	4	4
UTP	1 $\mu M$	5	5	3
	10 $\mu M$	5	4	4
ATP $\gamma$ S	10 $\mu M$		2	
P2Y1R-KO	10 $\mu M$		1	1

1947). Alle statistischen Tests wurden auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  durchgeführt. Bei der hier vorliegenden sehr großen Stichprobe ( $n_{ges} = 92.986$ ) wurden auch schon sehr kleine Unterschiede durch den U-Test als signifikant verschieden eingestuft. Um ein Maß für die Relevanz eines signifikanten Testergebnisses zu erhalten, wurde die Effektstärke  $r$  herangezogen. Die Effektstärke wurde berechnet nach

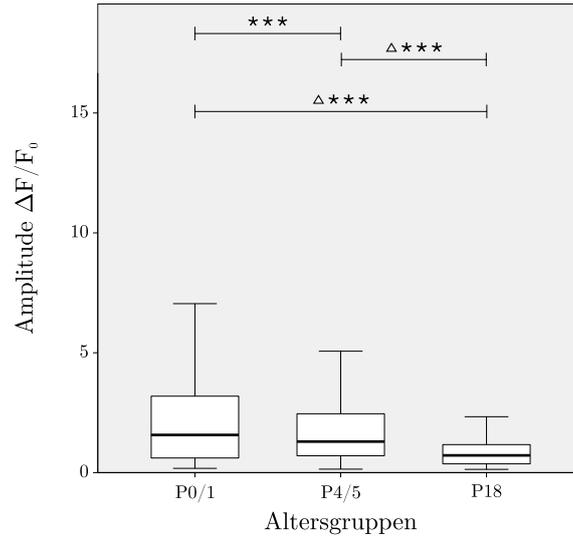
$$r = \left| \frac{Z}{\sqrt{n}} \right| \quad (6)$$

mit der Teststatistik des U-Tests  $Z$  sowie der Größe der getesteten Stichprobe  $n$ .  $r$  wurde nach Cohen (1992) als geringe Effektstärke für  $r < 0,3$ , als mittlere Effektstärke für  $0,3 \leq r < 0,5$  und als große Effektstärke für  $r \geq 0,5$  interpretiert. Unterschiede mit einer mittleren Effektstärke wurden als relevant, Unterschiede mit einer großen Effektstärke als hoch relevant betrachtet. Bei Mehrfachtests wurden p-Werte nach Bonferroni korrigiert ( $p_K$ ).

#### 4.4.2 Spontane $Ca^{2+}$ -Transienten

IDCs generierten über den Verlauf der beobachteten Entwicklungsstufen spontane Transienten der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Da die spontanen Signale im Vergleich zu den evozierten Transienten (Abschnitt 4.4.3) ein seltenes Ereignis waren, wurde hier nicht das Interspike Interval als Maß für die Häufigkeit verwendet, sondern die relative Häufigkeit der Signale je ROI und Zeit (wobei angenommen werden kann, dass eine ROI einer IDC entspricht). An P4/5 waren die spontanen Transienten am häufigsten zu beobachten. Über alle analysierten Messungen konnten folgende Signalhäufigkeiten beobachtet werden:

- P0/1:  $0,88 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Signale}}{\text{ROI s}}$ ; mediane ROI-Größe an P0/1:  $\tilde{x}_{ROI \text{ P0/1}} = 28,26 \mu m^2$



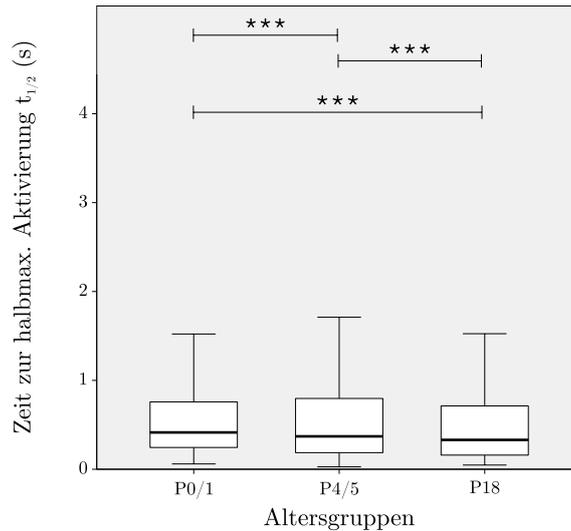
**Abbildung 24: Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung spontaner  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters.** Der Box-Whisker-Plot der Amplitude  $A_P$  zeigt Boxen für den Wertebereich vom 1. Quartil  $Q_1$  bis zum 3. Quartil  $Q_3$ . Für  $Q_3 + 1,5 \text{ IQR} \leq y_i$  oder  $y_i \leq Q_1 - 1,5 \text{ IQR}$  (mit  $\text{IQR} = Q_3 - Q_1$ ) galten Werte als Ausreißer (nicht dargestellt). Die Anzahl der Sterne über den horizontalen Linien gibt das Bonferroni-korrigierte Signifikanzniveau an ( $***p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r \geq 0,3$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen. Zwischen P0/1 und P4/5 gab es keine relevante Veränderung der Amplitude. Nach Hörbeginn sank die Amplitude signifikant und relevant ab. Quelle: TSM.

- P4/5:  $11 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Signale}}{\text{ROI s}}$ ; mediane ROI-Größe an P4/5:  $\tilde{x}_{ROI \text{ P4/5}} = 32,38 \mu\text{m}^2$
- P18:  $1,82 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Signale}}{\text{ROI s}}$ ; mediane ROI-Größe an P18:  $\tilde{x}_{ROI \text{ P18}} = 29,50 \mu\text{m}^2$

Im U-Test konnte kein relevanter Unterschied zwischen den Medianen der einzelnen Altersstufen festgestellt werden. Da die Mediane sich jedoch signifikant unterscheiden ( $p$  für alle Tests  $\leq 0,05$ ), wurde zur Berechnung der relativen Häufigkeit der jeweils individuellen Median herangezogen.

#### 4.4.2.1 Die Amplitude der spontanen $Ca^{2+}$ -Transienten

Im Laufe der gemessenen Entwicklungsstufen vor dem Hörbeginn verringerte sich die Amplitude signifikant (Median von 1,573 an P0/1 auf 1,296 an P4/5; 82 % des Ausgangswertes). Mit einer Effektstärke von  $r < 0,3$  war dieses Absinken als statistisch nicht relevant zu beurteilen. Erst mit Ausreifung der Cochlea nach ca. P12 gab es eine relevante Reduktion des maximalen spontanen Anstiegs der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration auf das im Median 0,72-fache der Basisline (46 % des Wertes an P0/1). Die Reduktion war auch gegenüber der an P4/5 gemessenen Amplitude relevant geringer (Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen). Abb. 24 zeigt die Box-Whisker-Plots der gemessenen Amplituden der spontanen Transienten und verdeutlicht den Abfall im Laufe der Entwicklung.



**Abbildung 25: Zeit zur halbmaximalen Aktivierung  $t_{1/2}$  der spontanen  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters.** Der Box-Whisker-Plot zeigt die Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Transienten sowie die Ergebnisse der U-Tests ( $***p_K \leq 0,001$ ). Die zentrale Tendenz der Altersstufen unterschied sich signifikant. Keiner der Unterschiede war relevant ( $r < 0,3$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen. Quelle: TSM.

#### 4.4.2.2 Zeit bis zur halbmaximalen Aktivierung der spontanen Transienten

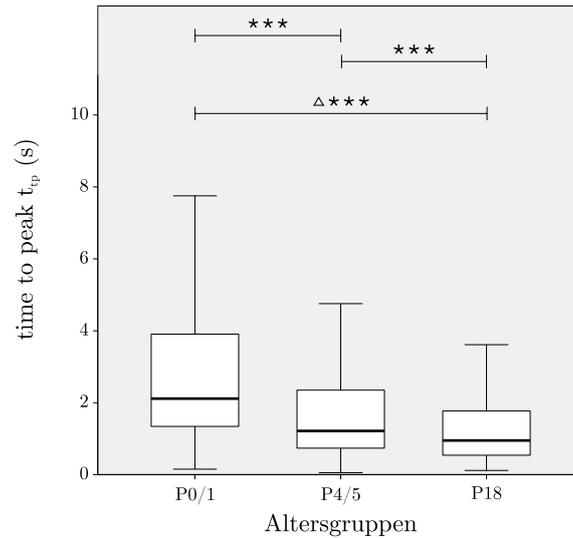
Die Zeiten bis zur halbmaximalen Aktivierung  $t_{1/2}$  aller Altersgruppen unterschieden sich signifikant voneinander (Median an P0/1: 0,414; an P4/5: 0,370; an P18: 0,330; in allen Fällen  $p_K \leq 0,001$ ). Wie Abb. 25 nahelegt und auch durch die Effektstärken untermauert wurde, waren die Zeiten jedoch als im Wesentlichen gleich zu beurteilen ( $r$  für alle Tests  $< 0,3$ ; Teststatistiken können Tab. 16 entnommen werden). Damit war die Kinetik des  $Ca^{2+}$ -Anstiegs in allen Altersstufen in der gleichen Größenordnung, was ähnliche Aktivierungsprozesse suggeriert.

#### 4.4.2.3 Time to peak der spontanen Transienten

Die time to peak  $t_{tp}$  zeigte sich nur im Vergleich zwischen P0/1 und P18 als relevant langsamer (Reduktion auf 45 % der Zeit an P0/1; Teststatistik in Tab. 16). In der Zusammenschau mit der Zeit zur halbmaximalen Aktivierung (Abschnitt 4.4.2.2) wurden die spontanen  $Ca^{2+}$ -Transienten im Laufe der cochleären Entwicklung in der zweiten Hälfte der Aktivierungsphase relevant schneller, was z. B. durch eine geringere Deaktivierung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms oder eine verzögerte  $Ca^{2+}$ -Elimination erklärbar wäre. Eine andere Erklärung wäre ein stärkerer Efflux von  $Ca^{2+}$  aus der Zelle oder effizientere Puffersysteme in den Zellen. Abb. 26 fasst die Entwicklung der  $t_{tp}$  zusammen.

#### 4.4.2.4 Die Peakdauer der spontanen Transienten

Für die Peakdauer  $t_{ges}$  ließ sich im Laufe der cochleären Entwicklung ein abfallender Trend beobachten. Ein erster relevanter Abfall von einer medianen Dauer von 8,3 s auf 3,7 s



**Abbildung 26: Time to peak der spontanen  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters.** Der Box-Whisker-Plot zeigt die time to peak  $t_{tp}$  über die drei Altersgruppen ( $** *p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r \geq 0,3$ ). Einzig von P0/1 zum Messpunkt an P18 konnte eine relevante Verkürzung der time to peak festgestellt werden. Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen. Quelle: TSM.

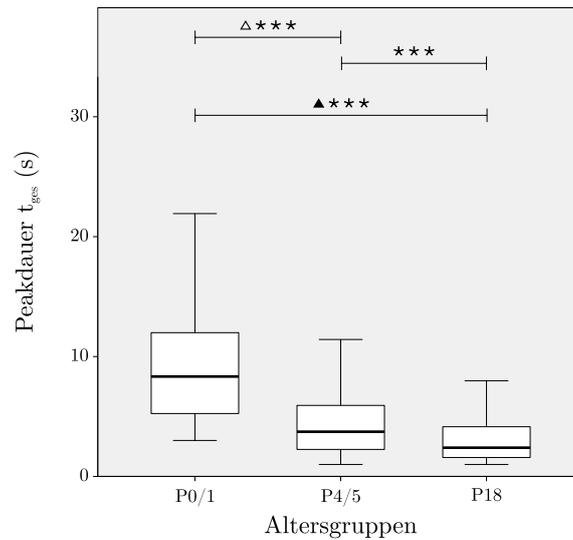
(45 % des Ausgangswertes) war zwischen P0/1 und P4/5 zu verzeichnen. Der Sprung von P0/1 nach P18 führte zu einer hoch-relevanten Reduktion von  $t_{ges}$  auf 29 % (2,4 s) der ursprünglichen Dauer. Die von P4/5 nach P18 gemessene Reduktion hingegen war nicht relevant. Abb. 26 stellt die  $t_{tp}$  als Funktion des Alters dar. Die Teststatistiken können Tab. 16 entnommen werden.

#### 4.4.2.5 Die Abklingzeit der spontanen Transienten

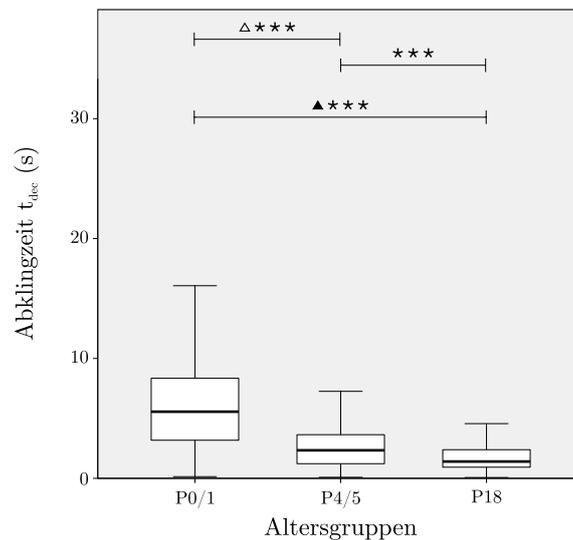
Die Abklingzeit  $t_{dec}$  zeigte ein ähnliches Verhalten wie  $t_{ges}$ . An P0/1 brauchte es im Median 5,6 s, bis das Signal vollständig abgeklungen war. Die Reifung der Cochlea führte zu einer relevanten Verkürzung von  $t_{dec}$  an P4/5 auf 2,3 s und einer hoch relevanten Verkürzung an P18 auf 1,4 s (42 %, bzw. 25 % der  $t_{dec}$  an P0/1). Abb. 28 auf der nächsten Seite fasst die Entwicklung von  $t_{dec}$  zusammen; die exakten Teststatistiken können Tab. 16 entnommen werden. Diese Ergebnisse sind z. B. durch eine effizientere  $Ca^{2+}$ -Elimination oder schnellere Deaktivierungsprozesse des  $Ca^{2+}$ -Einstroms erklärbar.

#### 4.4.3 In IDCs lassen sich durch verschiedene Agonisten $Ca^{2+}$ -Transienten evozieren

Die beiden Nukleotide ATP und UTP werden von Rezeptoren der P2-Klasse erkannt und in ein entsprechendes intrazelluläres Signal umgesetzt (Details s. Abschnitt 2.4 auf Seite 22). Die verschiedenen Rezeptoren haben unterschiedliche Affinitäten zu den Nukleotiden ATP und UTP. Über Antwortmuster, die sich für ATP und UTP unterscheiden, können Rückschlüsse auf die Rezeptorexpression in den IDCs gewonnen werden. Bei dem Nukleotid-



**Abbildung 27: Peakdauer spontaner  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters.** Der Box-Whisker-Plot der Peakdauer  $t_{ges}$  stellt eine relevante Verkürzung der spontanen Transienten von P0/1 nach P4/5 dar ( $***p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r \geq 0,3$ ), gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die  $Ca^{2+}$ -Transienten waren nach dem Hörbeginn an P18 hoch-relevant kürzer als an P0/1. Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen.



**Abbildung 28: Abklingzeit spontaner  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters.** Der Box-Whisker-Plot der Abklingzeit  $t_{dec}$  zeigt eine signifikante und relevante bis hoch relevante Verkürzung der Abklingzeit spontaner Transienten im Laufe der Entwicklung und Maturation der Cochlea ( $***p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r \geq 0,3$ ), gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 16 zu entnehmen. Quelle: TSM.

**Tabelle 10: Medianvergleich der spontanen Transienten.** Die Tabelle stellt die Mediane der gemessenen Merkmale zu jeweiligen Altersgruppe dar. Diese wurden auf den Median an P0/1 gemäß  $\tilde{x}_{normiert} = \frac{\tilde{x}}{\tilde{x}_{P0/1}}$  normiert. Quelle: TSM.

MERKMAL	ALTERSGRUPPEN		
	P0/1	P4/5	P18
Amplitude $\Delta F/F_0$	1,573	1,296	0,720
Amplitude normiert	1	0,82	0,46
Zeit zur halbmax. Akt. (s)	0,414	0,370	0,330
Zeit zur halbmax. Akt. normiert	1	0,89	0,80
time to peak (s)	2,114	1,215	0,950
time to peak normiert	1	0,57	0,45
Peakdauer (s)	8,334	3,730	2,396
Peakdauer normiert	1	0,45	0,29
Abklingzeit (s)	5,560	2,338	1,403
Abklingzeit normiert	1	0,42	0,25

triphosphat ATP $\gamma$ S ist die randständige Phosphatgruppe durch eine Thiophosphatgruppe ersetzt worden, um es vor der Hydrolyse durch die im Gewebe exprimierten Ektonukleotidasen zu schützen. Durch ATP $\gamma$ S evozierte Reaktionen sind folglich „echte“ ATP-Reaktionen und werden nicht durch Hydrolyseprodukte, wie z. B. Adenosindiphosphat (ADP), hervorgerufen. Weil die verschiedenen P2-Rezeptoren unterschiedliche EC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen Nukleotide haben, wurden verschiedene Agonistenkonzentrationen gewählt; 10  $\mu$ M ATP ist als supramaximal zu betrachten (Coddou et al., 2011).

Für die unter Agonistenstimulation gemessenen Signale wurden zum einen die Signalveränderung im Verlauf der Innenohrreifung betrachtet und zum anderen für die einzelnen Altersgruppen separat die Abhängigkeit vom Agonisten und der Agonistenkonzentration analysiert. Bis auf wenige Ausnahmen waren alle betrachteten Wertepaar signifikant verschieden, weshalb auch hier die oben beschriebene Beurteilung der Effektstärke (Abschnitt 4.4.1 und Formel 6) zur Anwendung kam.

#### 4.4.3.1 Qualitative Beschreibung der evozierten $Ca^{2+}$ -Transienten

Die qualitative Betrachtung der  $Ca^{2+}$ -Antworten auf Stimulation in IDCs zeigt zwei grundsätzlich verschiedene Muster: (i) Robuste Oszillationen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Abb. 33-36) und (ii) einen initialen Peak, gefolgt von einer Plateauphase (Abschnitt 4.4.3.2, Abb. 29, 30). Die Reaktion auf die Stimulation erfolgte in allen responsiven Zellen prompt und hielt für die gesamte Dauer der Stimulation an.

Vor dem Hörbeginn waren die Oszillationen das dominierende Muster der  $Ca^{2+}$ -Antwort

und unterschieden sich zwischen ATP und UTP rein phänomenologisch nicht. Die  $Ca^{2+}$ -Signale waren sehr regelmäßig; Signalüberlagerungen innerhalb einer Zelle und für einen Agonisten konnten nicht beobachtet werden (Abb. 33-36).

#### 4.4.3.2 Nach Hörbeginn ändert sich für ATP die Charakteristik der Transienten

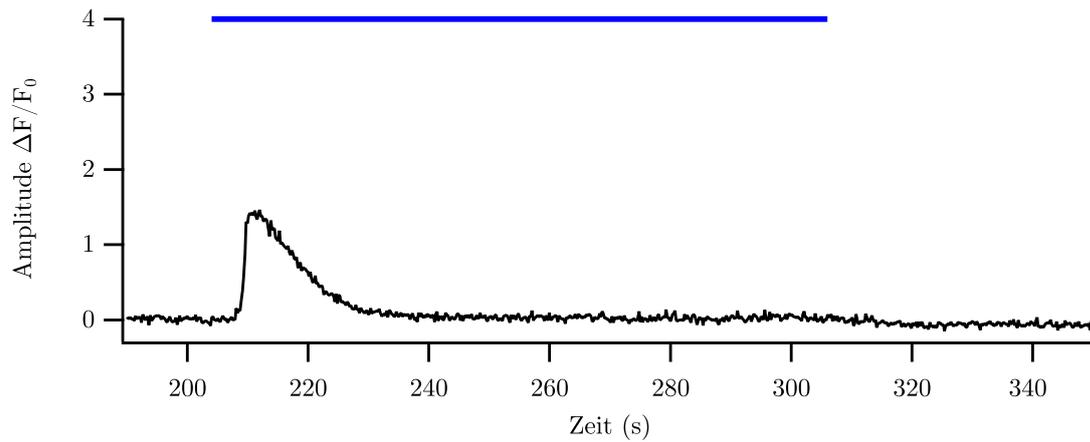
Während zu den Messpunkten vor dem Hörbeginn durch ATP-Applikation robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen evoziert werden konnten, änderte sich das Bild an P18, d. h. deutlich nach dem Hörbeginn, grundlegend. Die IDCs teilten sich in zwei Populationen auf: (i) Zellen mit regelmäßigen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, welche aus einem längeren, initialen Peak hervorgingen (Abb. 29 b und Abb. 30 b) und (ii) IDCs, die nur einen isolierten Initialpeak aufwiesen, welcher von einer aktivitätsfreien Plateauphase gefolgt wurde (Abb. 29 a und Abb. 30 a). Das Plateau hielt für die gesamte ATP-Applikationsdauer an. Ein Verzehnfachung der ATP-Konzentration von  $1 \mu M$  auf  $10 \mu M$  hatte im Hinblick auf alle beobachteten Parameter statistisch keinen relevanten Effekt. Die beobachtete Zunahme der Amplitude des Initialpeaks konnte in der Statistik nicht abgebildet werden, da es sich je Zelle um ein singuläres Ereignis handelte, welches in der großen Zahl der Peaks unterging.

Die Reaktion auf UTP-Stimulation ist im Grundsatz zu der vor dem Hörbeginn ähnlich. Während die  $1 \mu M$  Lösung in wenigen Zellen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zu evozieren vermochte (Abb. 29 c), war der Effekt mit der 10-fach höheren Konzentration deutlich ausgeprägter und mehr Zellen wurden aktiv (Abb. 30 c). Die Oszillationen waren das einzige unter UTP-Einfluss beobachtete Antwortmuster.

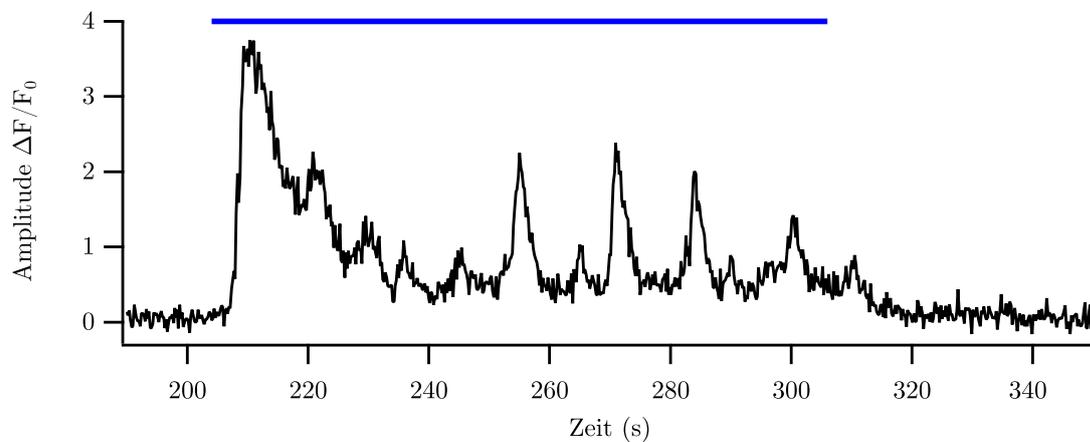
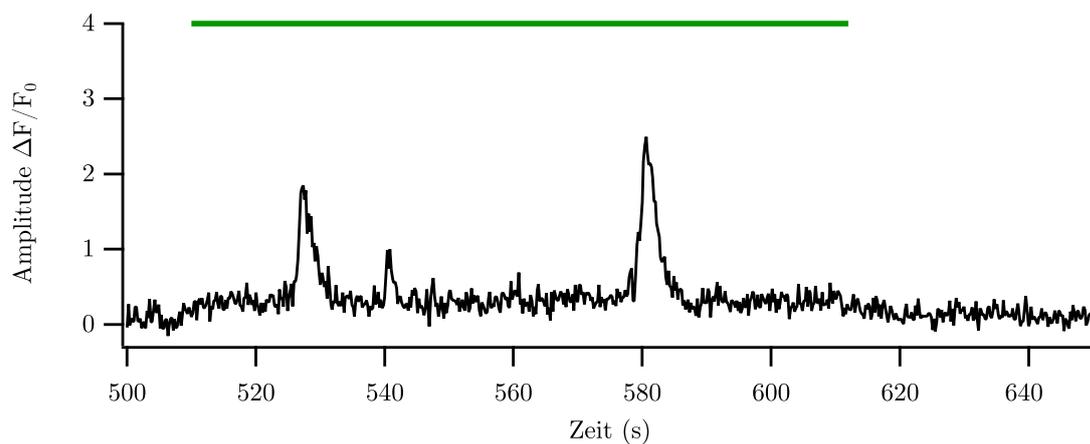
#### 4.4.3.3 Folgen des $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout für die $Ca^{2+}$ -Transienten

Das genetische Konstrukt dieser Mäuse ist in Abschnitt 3.1.3 auf Seite 25 beschrieben. Den Muttertieren wurde erst kurz vor dem errechneten Wurfdatum Tamoxifen appliziert und so die Gendelektion von  $P2ry1$  ausgelöst. Da vorhandenes Protein und vorhandene mRNA abgebaut werden mussten, war der frühest mögliche Messpunkt an P4/5. Bei unbekannter Proteinumsatzrate ist auch an P4/5 nicht auszuschließen, dass noch  $P2Y_1$ -Rezeptoren exprimiert waren. Je Altersgruppe konnte nur jeweils ein Tier mit  $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout ( $P2ry1$ -KO) gemessen werden. Bei der geringen Anzahl der Messungen (Tab. 9) wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet.

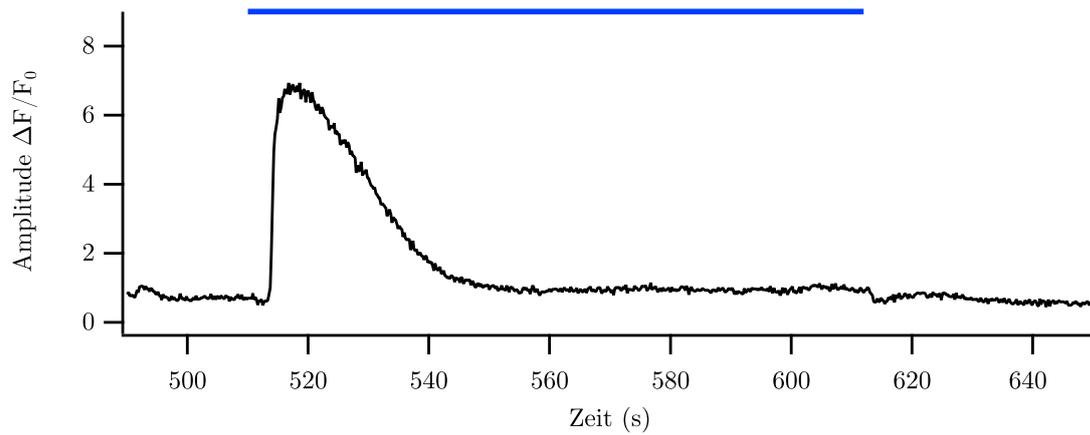
An P4/5 konnten sehr heterogene  $Ca^{2+}$ -Transienten beobachtet werden, deren Ausgestaltung eine Konzentrationsabhängigkeit aufwies (Abb. 37 & 38). Das Spektrum reichte von morphologisch wildtypähnlichen Transienten (Abb. 37 a, b) bis zu dysmorphen Transienten (Abb. 37 c). Die höhere  $10 \mu M$  Konzentration führte in der Mehrheit der gemessenen Zellen zu einem vom Wildtyp bekannten Bild, mit der Einschränkung, dass die Amplitude im Vergleich zum Wildtyp größer schien (Abb. 38 a, b). Im Gegensatz zum Wildtyp wurden in den transgenen Zellen auch überlagerte Signale beobachtet, so dass sich der Eindruck einer insgesamt dysregulierten  $Ca^{2+}$ -Antwort verstärkt (Abb. 37 b und Abb. 38 b, c). Die



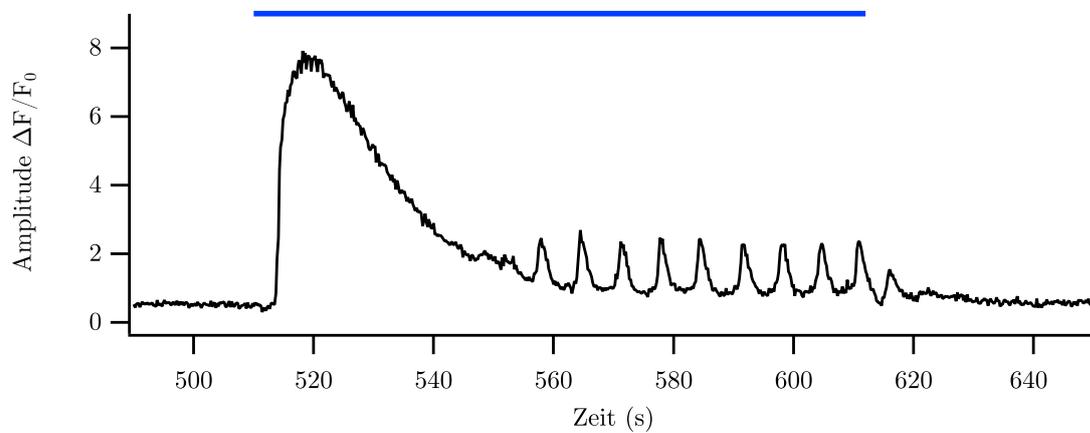
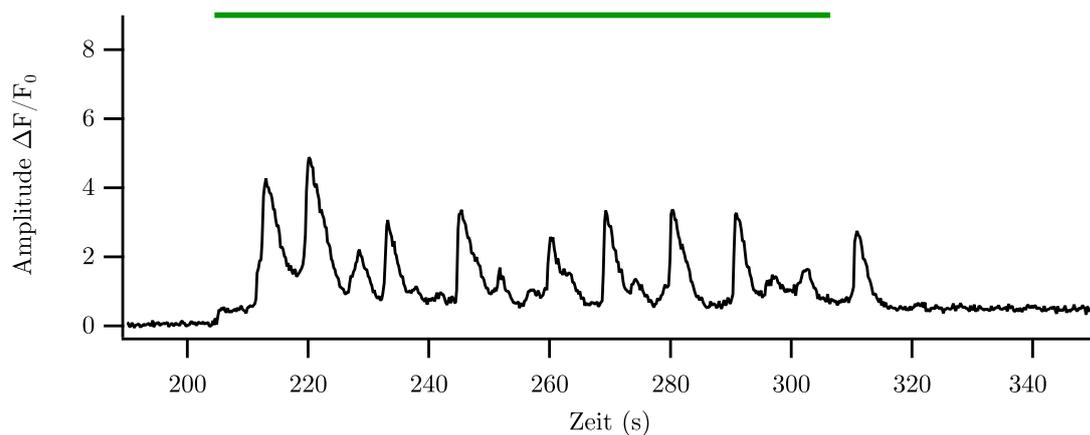
(a) Singulärer Peak mit anschließender Plateauphase

(b)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen an P18(c)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen an P18

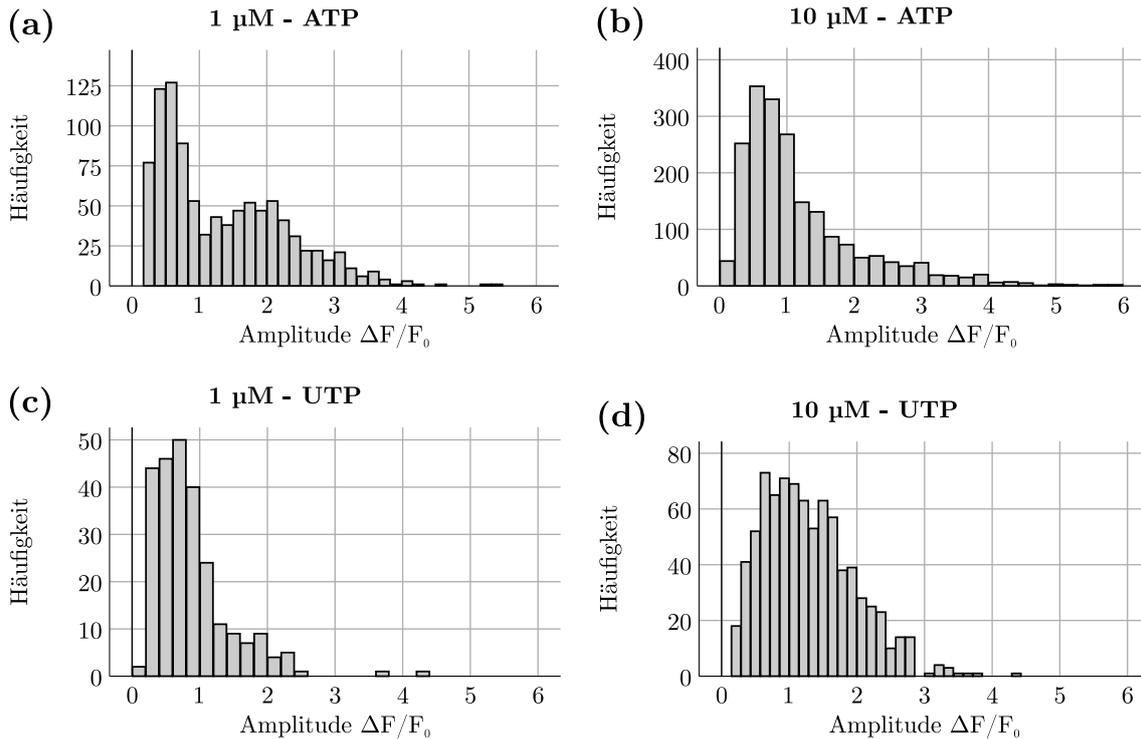
**Abbildung 29: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P18 ( $1 \mu M$ ).** Nach dem Hörbeginn konnten zwei verschiedene Reaktionen auf ATP-Stimulation beobachtet werden (hier  $1 \mu M$ ). Die blauen Balken deuten die Zeit der Stimulation an. **a**, Ein singulärer Peak zu Beginn der Stimulation, welcher von einer, die gesamte Stimulationszeit andauernden, Plateauphase gefolgt wurde, im Gegensatz zu **b**, einem größerer Peak zu Beginn der Stimulation, gefolgt von  $Ca^{2+}$ -Oszillationen über die Zeit der Stimulation. **c**, Wenige Zellen reagieren auf Stimulation mit  $1 \mu M$  UTP. Das Muster der Reagierenden ähnelt dem von vor dem Hörbeginn. Quelle: TSM.



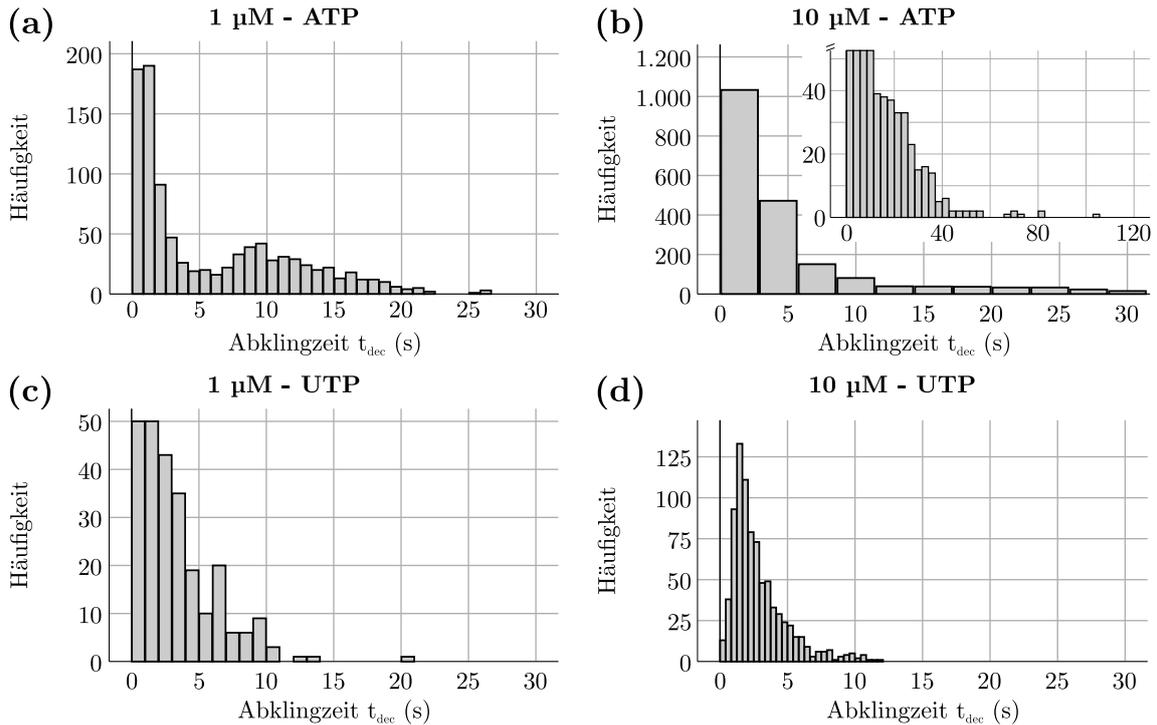
(a) Singulärer Peak mit anschließender Plateauphase

(b)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen an P18(c)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen an P18

**Abbildung 30: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P18 ( $10 \mu M$ ).** Nach dem Hörbeginn konnten zwei verschiedene Reaktionen auf ATP-Stimulation beobachtet werden (hier  $10 \mu M$ ). Die blauen Balken deuten die Zeit der Stimulation an. **a**, Ein singulärer Peak zu Beginn der Stimulation, welcher von einer, die gesamte Stimulationszeit andauernden, Plateauphase gefolgt wurde, im Gegensatz zu **b**, einem größerer Peak zu Beginn der Stimulation gefolgt von  $Ca^{2+}$ -Oszillationen über die Zeit der Stimulation. **c**, Wenige Zellen reagieren auf Stimulation mit  $1 \mu M$  UTP. Das Muster der Reagierenden ähnelt dem von vor dem Hörbeginn. Quelle: TSM.

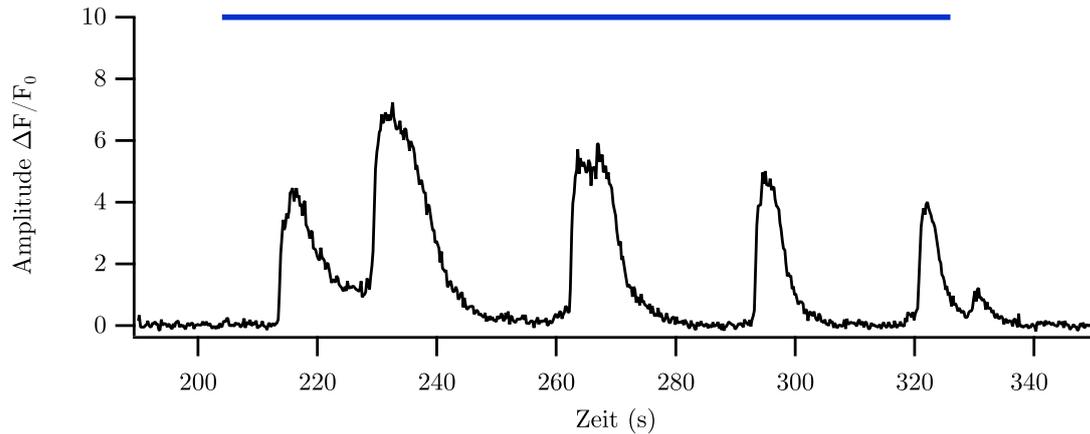
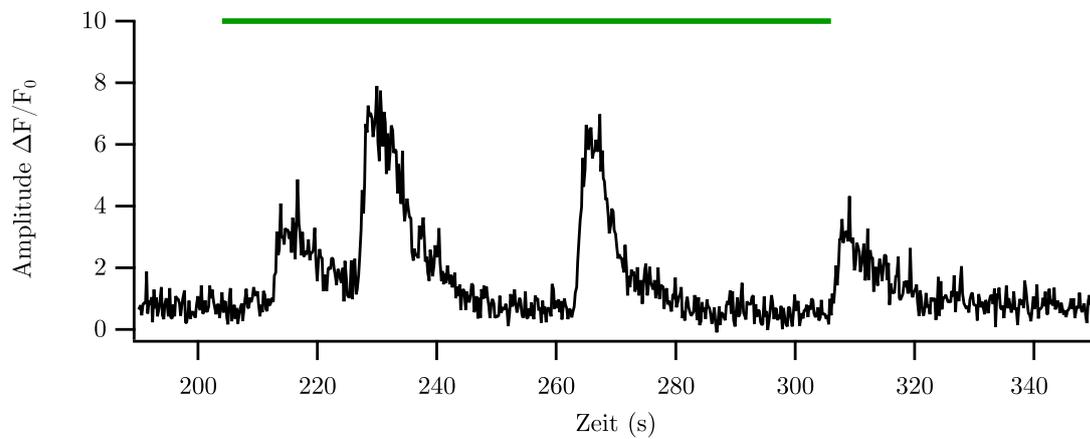


**Abbildung 31: Histogramme der evozierten Amplituden an P18.** **a**, Stimulation der IDCs an P18 mit  $1 \mu\text{M}$  ATP führte zu  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, deren Amplituden sich in zwei Häufigkeitsmaxima untergliederten. Deutlich häufiger kamen kleine Amplituden vor, deren scharf abgrenzbares Häufigkeitsmaximum bei einem  $\Delta F/F_0$  von ca. 0,5 lag. Das zweite, nicht so scharf abgrenzbare Häufigkeitsmaximum lag bei einem  $\Delta F/F_0$  von ca. 2. **b**, Bei der zehnfach höhere ATP-Konzentration konnten deutlich mehr Peaks mit niedriger Amplitude beobachtet werden. Ein zweites Maximum lässt sich nicht mehr erkennen. **c**, Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  UTP führte zu einem scharf abgrenzbaren Häufigkeitsmaximum bei einem  $\Delta F/F_0$  von ca. 0,5. Ein zweites Häufigkeitsmaximum lag bei einem  $\Delta F/F_0$  von 2. Dieses ist nur durch ein Bin abgrenzbar, weshalb dessen Interpretation mit Vorsicht erfolgen muss. **d**, Die Verzehnfachung der UTP-Konzentration verbreiterte das Histogramm. Der Häufigkeitsmaximum liegt bei einem  $\Delta F/F_0$  von 1. Quelle: TSM.

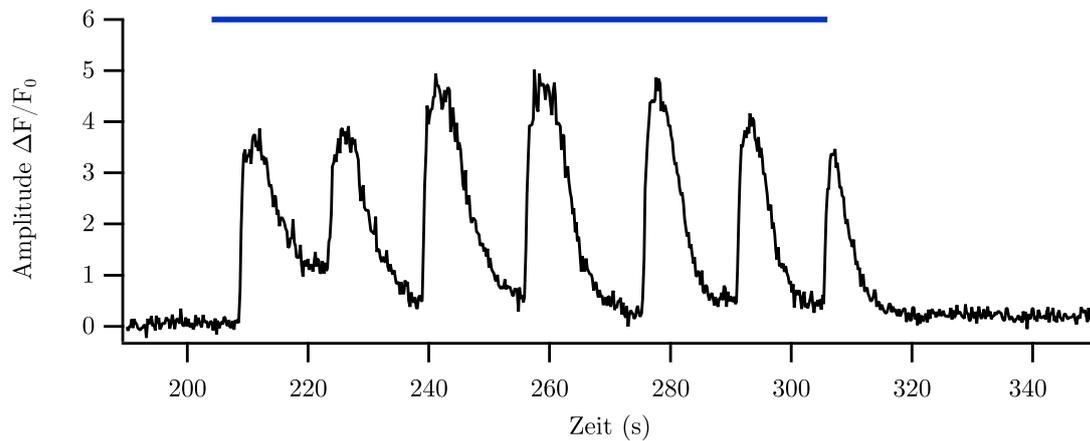
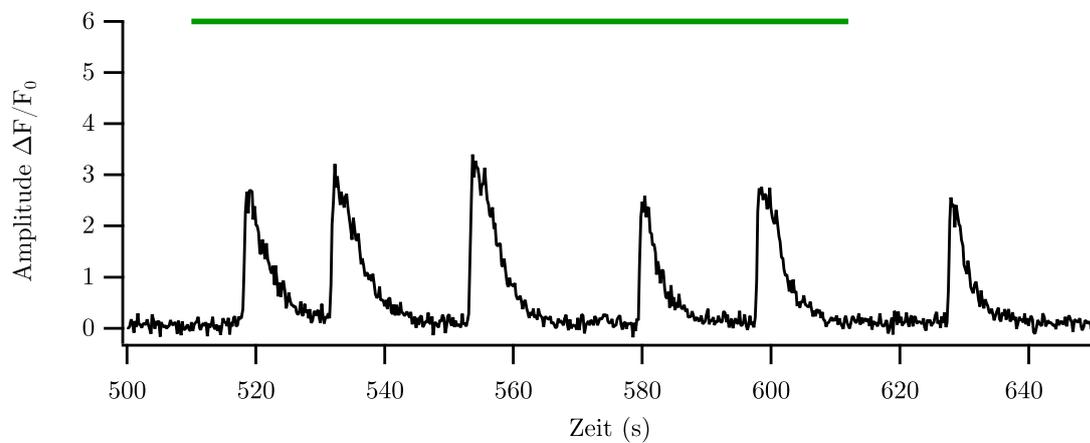


**Abbildung 32: Histogramme der Abklingzeiten evozierter Transienten an P18.**

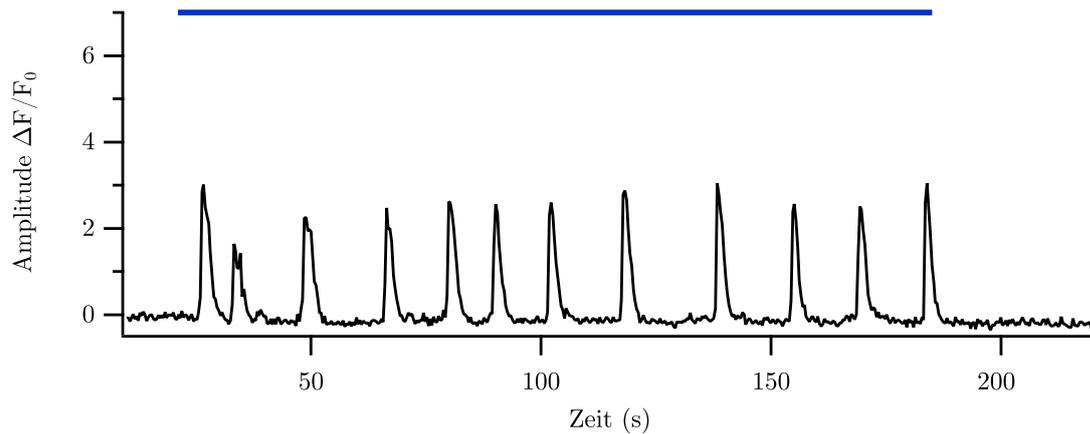
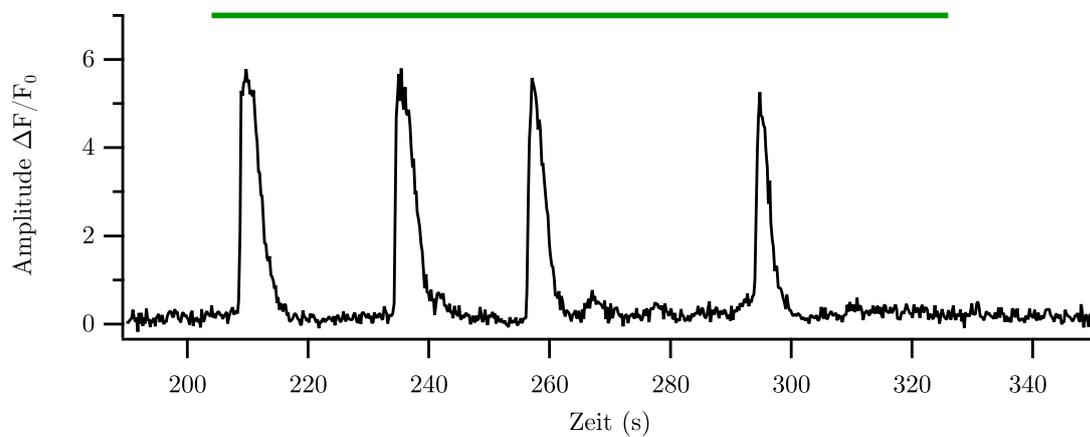
**a**, Deutlich erkennbar sind zwei verschiedene Gruppen von Signalen: (i) Solche, die eine kurze  $t_{dec}$  von ca. 1,5 s aufwiesen, und (ii) solche, die erst ca. 10 s nach ihrem Peak abgeklungen waren. **b**, Bei Stimulation mit 10  $\mu M$  ATP ist diese Einteilung der Signale anhand des Histogramms nicht mehr möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Abszisse bei 30 s abgeschnitten. Deutlich mehr Signale hatten ein  $t_{dec}$  in der Größenordnung von 1,5 s, die Streuung der Signale war jedoch auch erheblich (Maximum bei 103,8 s). Im Inset wurde die Abszisse bis zum Wertemaximum geführt und die Ordinate bei 50 abgeschnitten, um die große Streuung der Messwerte zu verdeutlichen. **c**, Die Stimulation mit 1  $\mu M$  UTP führte zu Signalen, welche in der Mehrheit nach etwa 1,75 s abgeklungen waren. Die Verteilung der Messwerte war sehr schief. **d**, Die Verzehnfachung der UTP-Konzentration führte zu insgesamt mehr Signalen. Diese konzentrierten sich bei einer  $t_{dec}$  von ca. 1,75 s. Quelle: TSM.

(a) P0/1 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $1 \mu M$ )(b) P0/1 - UTP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $1 \mu M$ )

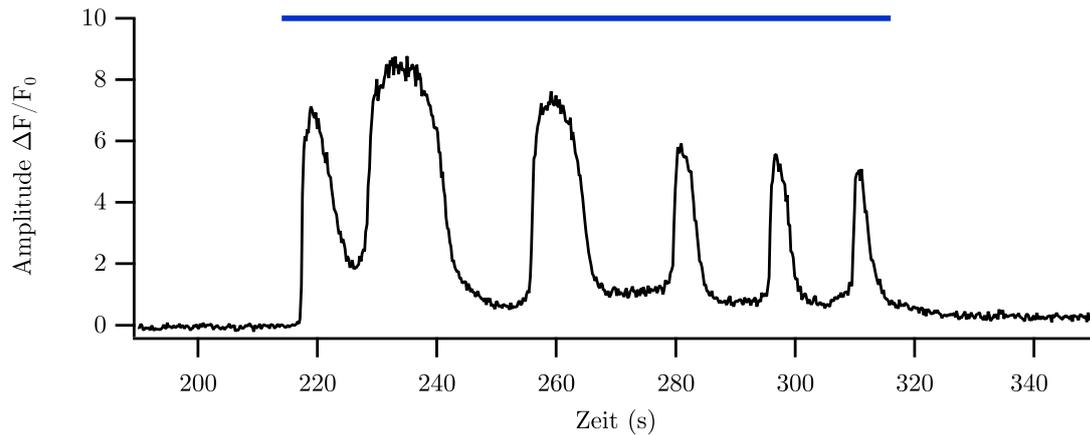
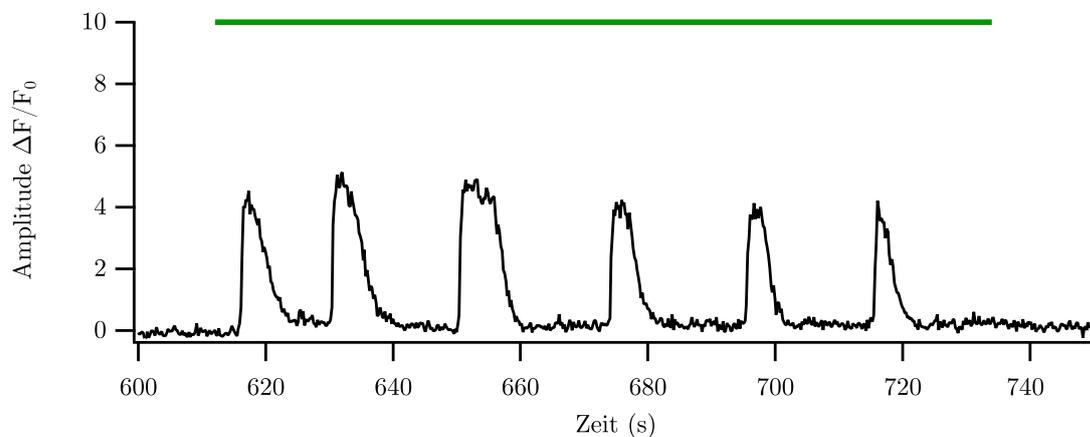
**Abbildung 33: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P0/1 ( $1 \mu M$ ).** Stimulation mit  $1 \mu M$  Nukleotidlösung rief robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in IDCs hervor. **a**, Stimulation einer IDC mit ATP, blauer Balken. **b**, Stimulation einer anderen IDC mit UTP, grüner Balken. Oszillationen sind bei UTP-Stimulation weniger distinkt ausgeprägt. Quelle: TSM.

(a) P0/1 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )(b) P0/1 - UTP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )

**Abbildung 34: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P0/1 ( $10 \mu M$ ).** Stimulation mit  $10 \mu M$  Nukleotidlösung evozierte robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in IDCs. **a**, Stimulation einer IDC mit ATP, blauer Balken. **b**, Stimulation derselben IDC mit UTP, grüner Balken. Quelle: TSM.

(a) P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $1 \mu M$ )(b) P4/5 - UTP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $1 \mu M$ )

**Abbildung 35: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5 ( $1 \mu M$ ).** Stimulation mit  $1 \mu M$  Nukleotidlösung evozierte robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in IDCs. **a**, Stimulation einer IDC mit ATP, blauer Balken. **b**, Stimulation einer anderen IDC mit UTP, grüner Balken. Quelle: TSM.

(a) P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )(b) P4/5 - UTP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )

**Abbildung 36: Nukleotid-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5 ( $10 \mu M$ ).** Stimulation mit  $10 \mu M$  Nukleotidlösung evozierte robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in IDCs. **a**, Stimulation einer IDC mit ATP, blauer Balken. **b**, Stimulation einer anderen IDC mit UTP, grüner Balken. Quelle: TSM.

Reaktion auf UTP-Stimulation konnte nicht getestet werden.

An P18 wurde ausschließlich die Reaktion auf  $10 \mu M$  ATP- und UTP-Lösung als supramaximale Konzentration gemessen (Coddou et al., 2011, Abb. 39). Phänomenologisch gab es keine Unterschiede zum Wildtyp, obgleich die UTP-Oszillationen in mehr Zellen ausgelöst worden zu sein schienen (Abb. 39 c).

Da spontane und evozierbare Transienten beobachtet werden konnten, besteht Grund zur Annahme, dass eine  $P2Y_1$ -Rezeptor-Expression nicht allein verantwortlich für das Zustandekommen der  $Ca^{2+}$ -Transienten ist. Die muss jedoch vor dem Hintergrund fraglicher  $P2Y_1R$ -Restexpression betrachtet werden.

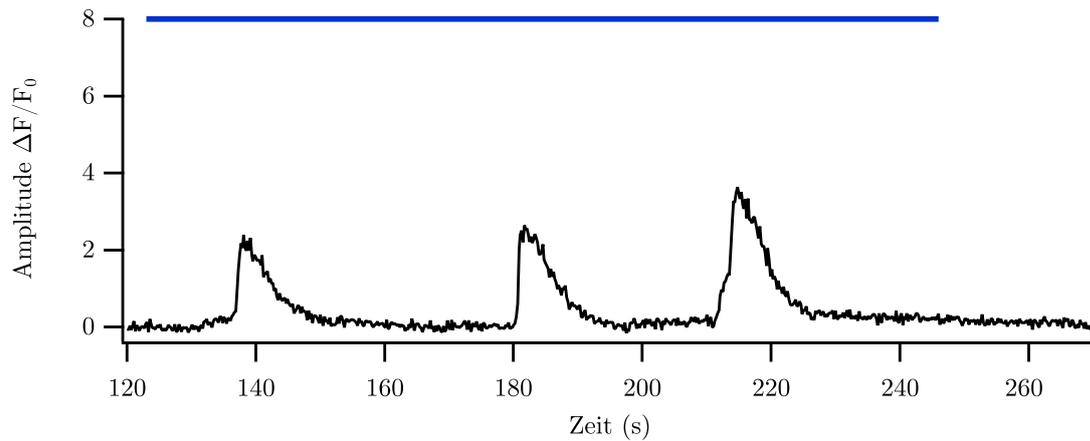
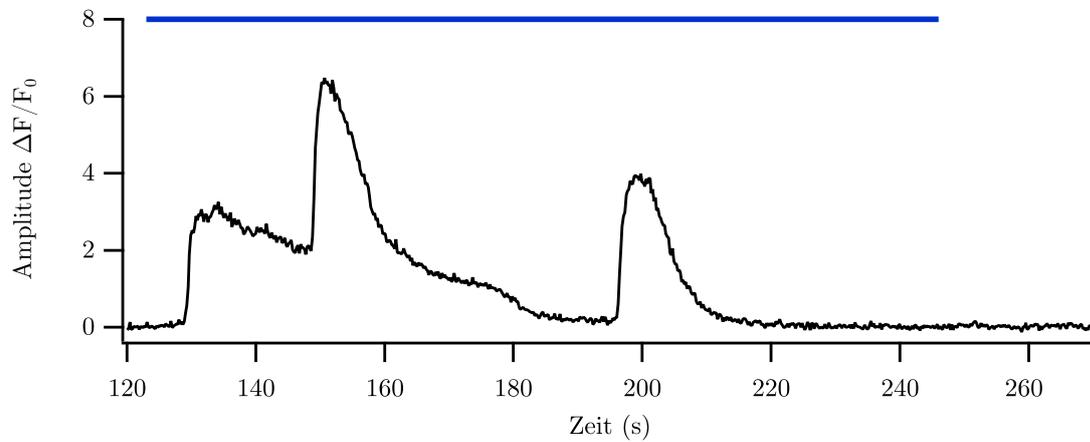
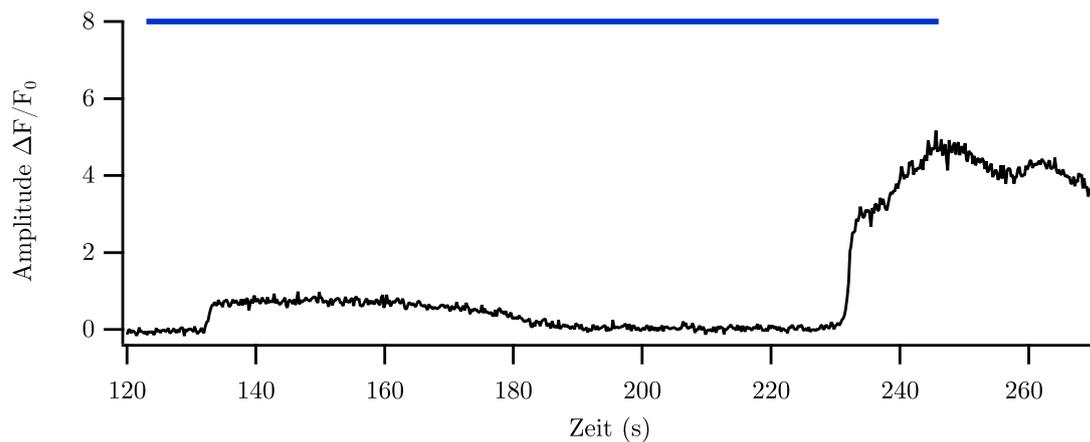
#### 4.4.3.4 Stimulation mit ATP $\gamma$ S an P4/5

In einem Pilotexperiment wurden IDCs mit ATP $\gamma$ S superfundiert. Die präsentierten Daten beruhen auf Messungen aus lediglich zwei Tieren, weshalb die Interpretation mit erhöhter Vorsicht erfolgen muss. Ein weiterer kritischer Punkt war, dass das verwendete ATP $\gamma$ S als Lithium-Salz vorlag. Lithium vermag in therapeutischen Dosen (0,5 – 1,0 mM) den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des ER zu inhibieren (Danoff und Ross, 1994). Die in den dargestellten Versuchen zum Einsatz gebrachte Lösung war 50-fach geringer konzentriert, und die Kontaktzeit war minimal (400 s oder kürzer), so dass der Effekt des Lithiums als vernachlässigbar zu beurteilen scheint. Die Stimulation führte an P4/5 zu zwei grundsätzlich verschiedenen Antwortmustern: (i)  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, wie sie auch durch ATP ohne die Thiophosphatgruppe hervorgerufen wurden und (ii) einem Muster, welches sonst *ausschließlich* an P18 durch ATP evoziert wurde (Abb. 45). Das Histogramm der Peakdauer (Abb. 46) untermauert das Vorhandensein zweier Zellpopulationen, da unter ATP $\gamma$ S-Stimulation zwei Häufigkeitsmaxima hervorgehen, deren Lage in etwa denen durch ATP oder UTP evozierten Signale entspricht. Leichte Verschiebungen in der Lage der Maxima sind gut durch Überlagerungsartefakte erklärbar. Die Verschiedenheit von ATP $\gamma$ S und ATP wird auch im direkten Vergleich deutlich. Hier ist die ATP $\gamma$ S-Amplitude hoch relevant geringer, und die ATP $\gamma$ S-Peakdauer ist relevant kürzer (Abb. 44 auf Seite 79).

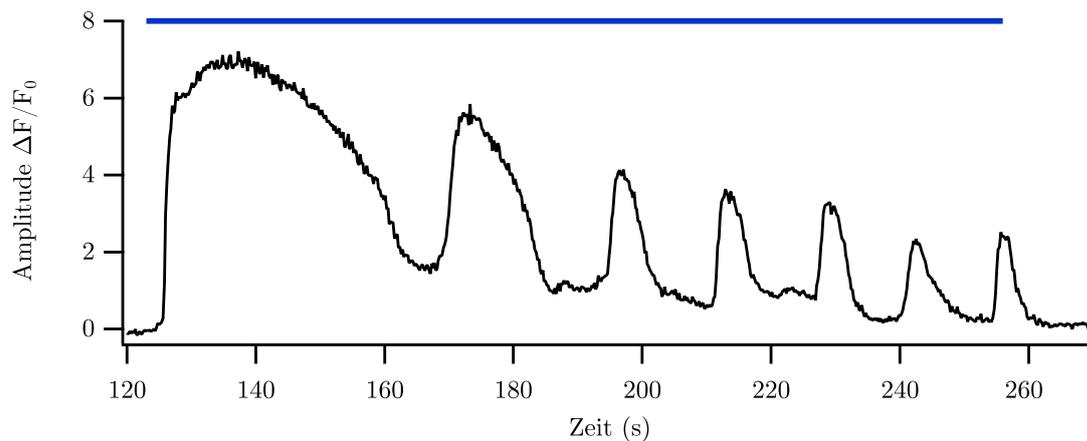
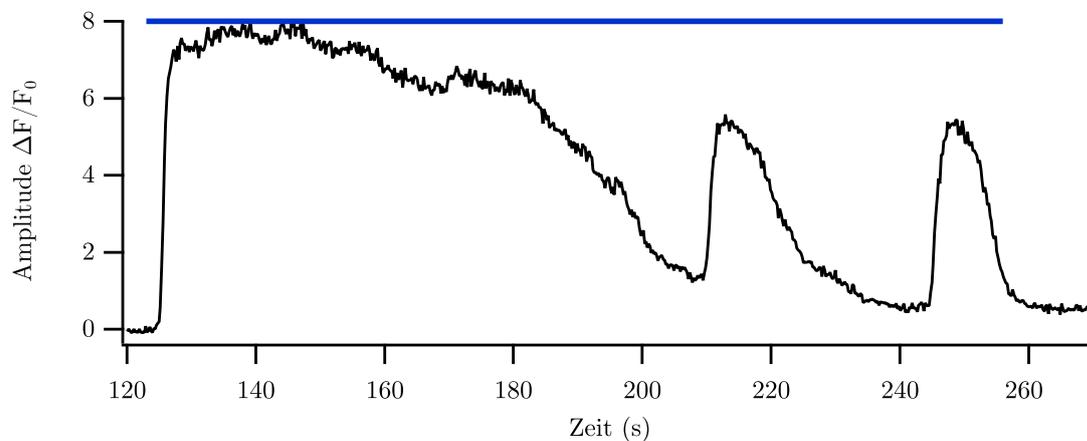
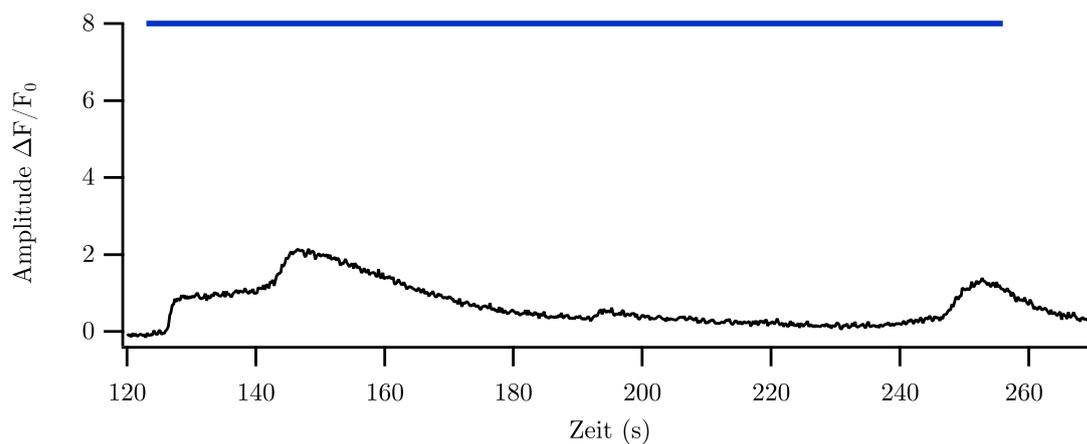
#### 4.4.3.5 Quantitative Beschreibung der evozierten $Ca^{2+}$ -Transienten an den verschiedenen Altersgruppen

Relevante Unterschiede im Laufe der cochleären Entwicklung zeigten sich vor allem bei der Amplitude  $A_P$  der evozierten  $Ca^{2+}$ -Transienten (Abb. 40). Insgesamt lässt sich eine klare Abnahme der Amplituden zwischen P0/1 und P18 erkennen (alle Wertepaare unterscheiden sich signifikant,  $p_K$  war in jedem Fall  $\leq 0,001$ ). Zwischen den Altersgruppen P0/1 und P4/5 ergab sich nur für die 10  $\mu$ M UTP-Stimulation ein relevanter Unterschied in der Amplitude. Beim Schritt von P0/1 bzw. P4/5 zu P18 waren bis auf die 10  $\mu$ M UTP-Amplituden alle Subgruppen relevant verschieden. Ein anderes Bild ergab sich für die Analyse innerhalb der einzelnen Altersgruppen (Abb. 41). Zwar unterschieden sich auch hier alle verglichenen Subgruppen signifikant voneinander, jedoch führte nur die Verzehnfachung der UTP-Konzentration an P0/1 und P18 zu einem relevanten Unterschied in der Amplitude. Zusammenfassend lässt sich eine Abnahme der Amplituden während der Reifung festhalten. Für die Agonistenabhängigkeit innerhalb der jeweiligen Altersgruppen ist kein klarer Trend erkennbar (Tab. 11 & 12).

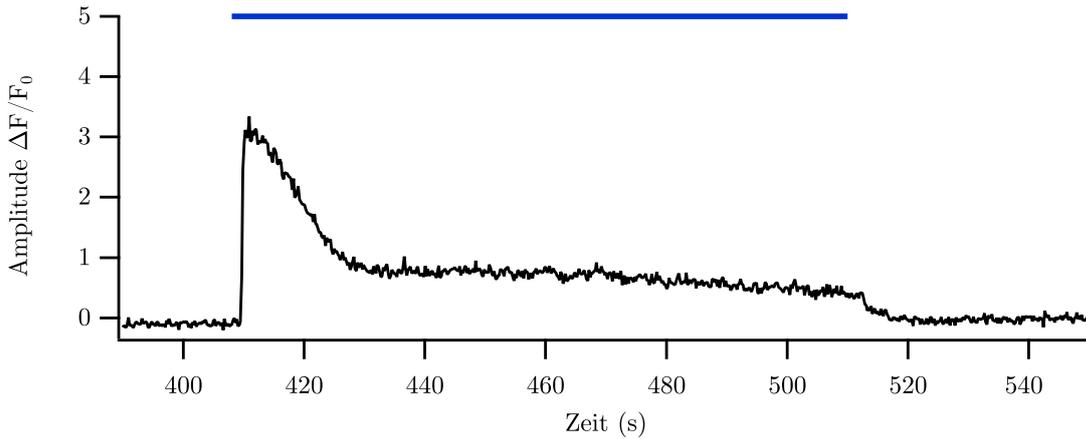
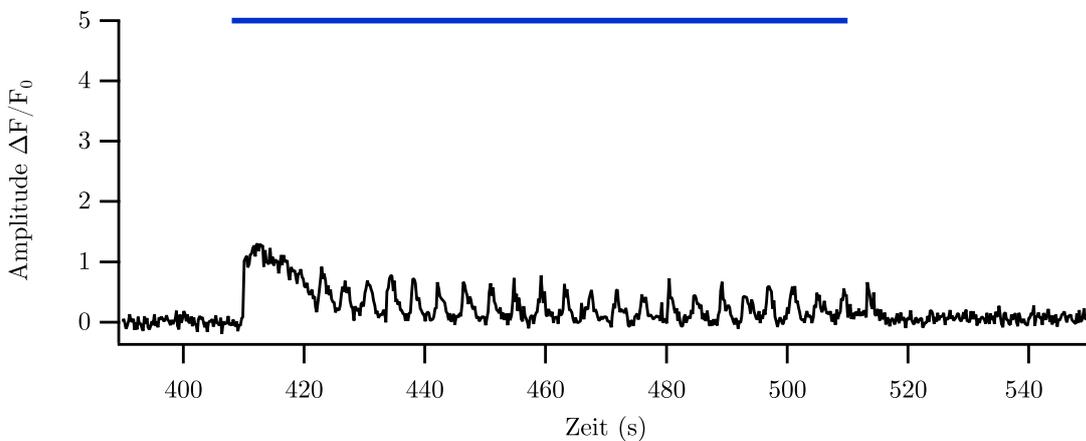
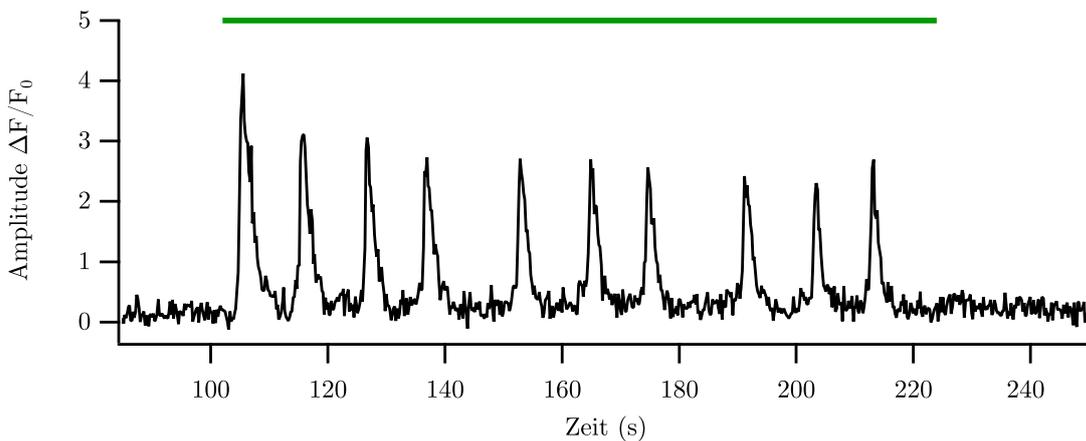
Als Maß für die Aktivierungskinetik der evozierten  $Ca^{2+}$ -Transienten wurde die Zeit bis zur halbmaximalen Aktivierung  $t_{1/2}$  herangezogen (Abb. 23 auf Seite 55). Das Kriterium der Effektstärke anlegend, konnte für dieses Merkmal zu keinem Zeitpunkt ein relevanter Unterschied gefunden werden. Die gemessenen Differenzen waren zum Teil so ähnlich, dass der U-Test zu keinem signifikanten Ergebnis führte (P0/1 vs. P4/5 für 10  $\mu$ M ATP; Abb. 42). Auch blieben ein Wechsel des Agonisten oder eine Konzentrationserhöhung ohne relevante Folgen (Abb. 43).

(a)  $P2Y_1R$ -KO an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $1 \mu M$ )(b)  $P2Y_1R$ -KO an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $1 \mu M$ )(c)  $P2Y_1R$ -KO an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $1 \mu M$ )

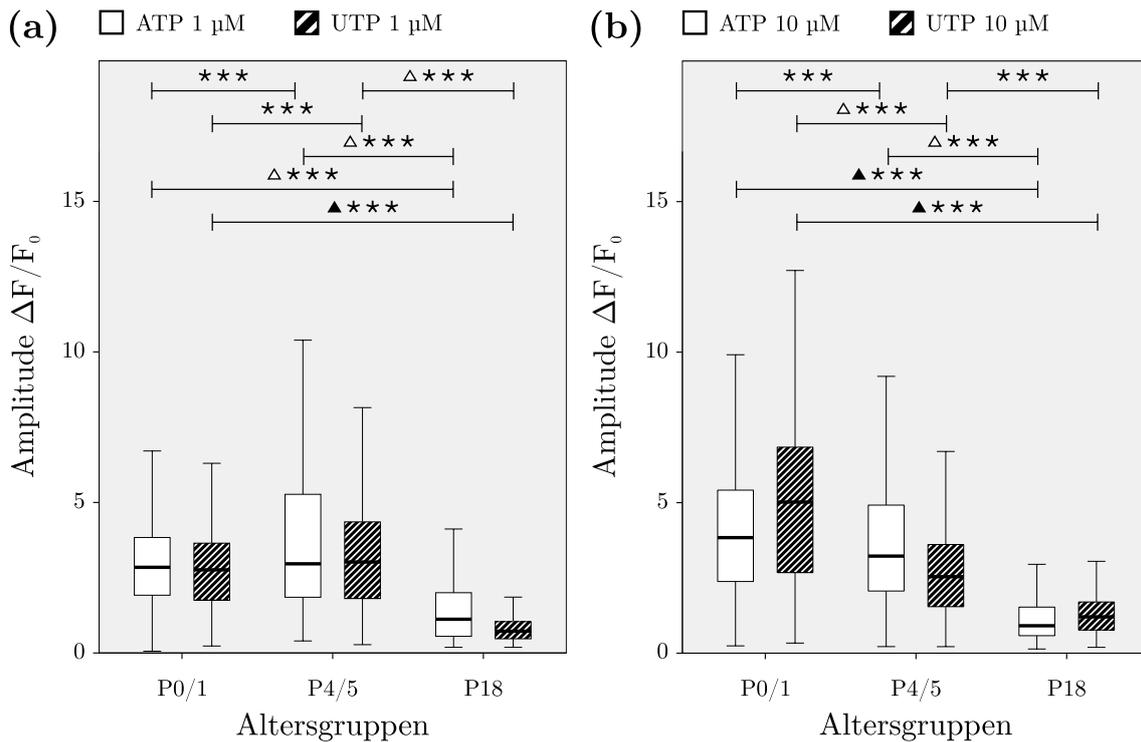
**Abbildung 37: ATP-Stimulation ( $1 \mu M$ ) rief an P4/5 in IDCs mit  $P2Y_1$ -Rezeptor-Knockout heterogene  $Ca^{2+}$ -Transienten hervor.** a, Die Bandbreite der beobachteten Signale reichte von morphologisch mit Wildtyptransienten vergleichbaren  $Ca^{2+}$ -Oszillationen über b, Überlagert wirkende Prozesse mit langsamen Komponenten (erster Peak), auf welche sich schnellere Prozesse auflagerten bis zu c, Plateausignale mit geringer Amplitude. Im gezeigten Beispiel war erst in der Endphase der ATP-Stimulation eine erhebliche Aktivierung zu verzeichnen. Quelle: TSM.

(a) *P2Y<sub>1</sub>R-KO* an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )(b) *P2Y<sub>1</sub>R-KO* an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )(c) *P2Y<sub>1</sub>R-KO* an P4/5 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ )

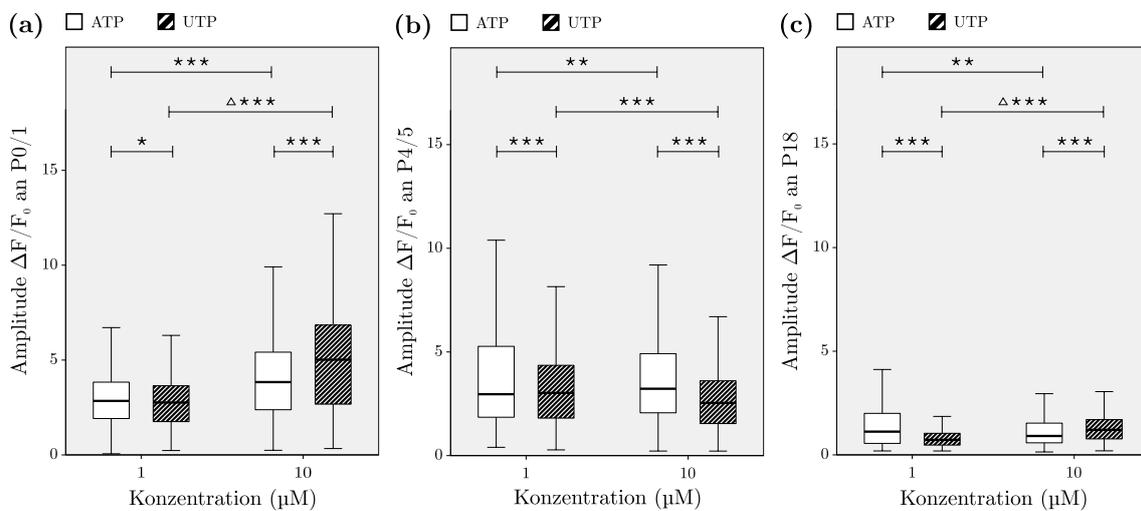
**Abbildung 38: ATP-Stimulation ( $10 \mu M$ ) rief an P4/5 in IDCs mit *P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Knockout* heterogene  $Ca^{2+}$ -Transienten hervor.** Die Stimulation der *P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor* defizienten IDCs mit einer verzehnfachten ATP-Konzentration führte zu  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, welche phänomenologisch und morphologisch im Wesentlichen denen des Wildtyps ähnelten. **a**,  $Ca^{2+}$ -Oszillationen mit prominentem Initialpeak. **b**, In wenigen Fällen war der initiale Peak verlängert. **c**, Selten waren bei Stimulation mit  $10 \mu M$  Lösung schwache, dysmorphe Signale zu beobachten. Quelle: TSM.

(a) P2Y1R-KO an P18 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $10 \mu M$ )(b) P2Y1R-KO an P18 - ATP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $10 \mu M$ )(c) P2Y1R-KO an P18 - UTP-evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $10 \mu M$ )

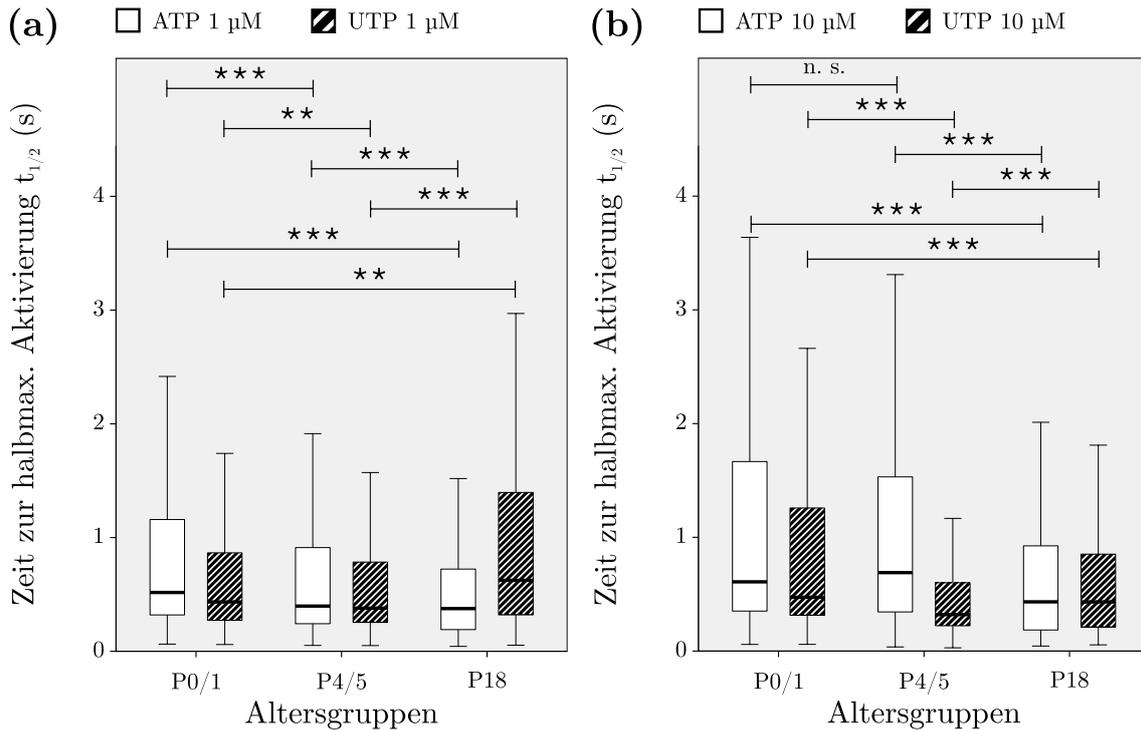
**Abbildung 39: ATP- und UTP-Stimulation ( $10 \mu M$ ) riefen an P18 in IDCs mit P2Y1-Rezeptor-Knockout Wildtyp-ähnliche  $Ca^{2+}$ -Transienten hervor. a,** Auch in P2Y1-Rezeptor-defizienten Tieren löste ATP ( $10 \mu M$ ) in IDCs einen initialen Peak aus, welcher von einer Plateauphase gefolgt wurde. Der Peak schien in der Mehrheit der Signale weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp. **b,** Wie auch beim Wildtypen wurden in der Mutante nach einem prominenten ersten Peak  $Ca^{2+}$ -Oszillationen beobachtet, deren Amplitude in der Gesamtheit kleiner war als beim Wildtyp. **c,** UTP rief beim P2ry1-KO  $Ca^{2+}$ -Oszillationen hervor. Diese Beobachtung ließ sich prozentual in mehr Zellen als beim Wildtyp machen. Quelle: TSM.



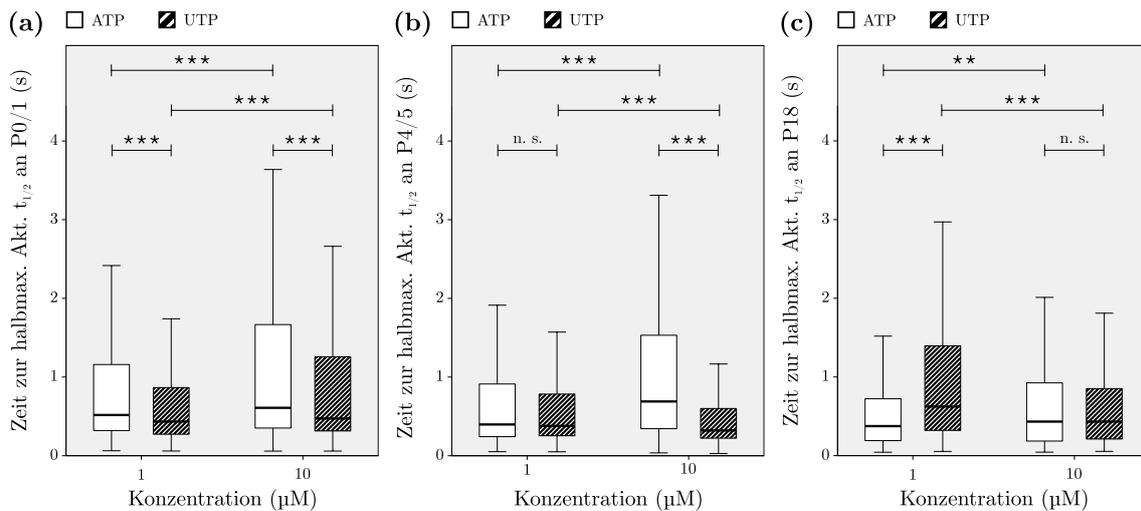
**Abbildung 40: Amplituden der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Amplituden  $A_P$  im Altersvergleich bei Stimulation mit ATP oder UTP-Lösung (ATP, weiße Boxen; UTP, gestreifte Boxen) zeigen für alle Wertepaare signifikante Unterschiede ( $***p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $r \geq 0,3$ ), gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Bei Stimulation mit 1  $\mu$ M-Nukleotidlösung zeigten sich relevante Unterschiede nur im Vergleich zu der (fast) maturen Cochlea an P18. **b**, Eine Erhöhung der Konzentration auf 10  $\mu$ M führte zu einem annähernd kontinuierlichen Abfall der Amplitude, wobei der Vergleich der UTP-Transienten zwischen P4/5 und P18 zu keinem relevanten Ergebnis mehr führte. Quelle: TSM.



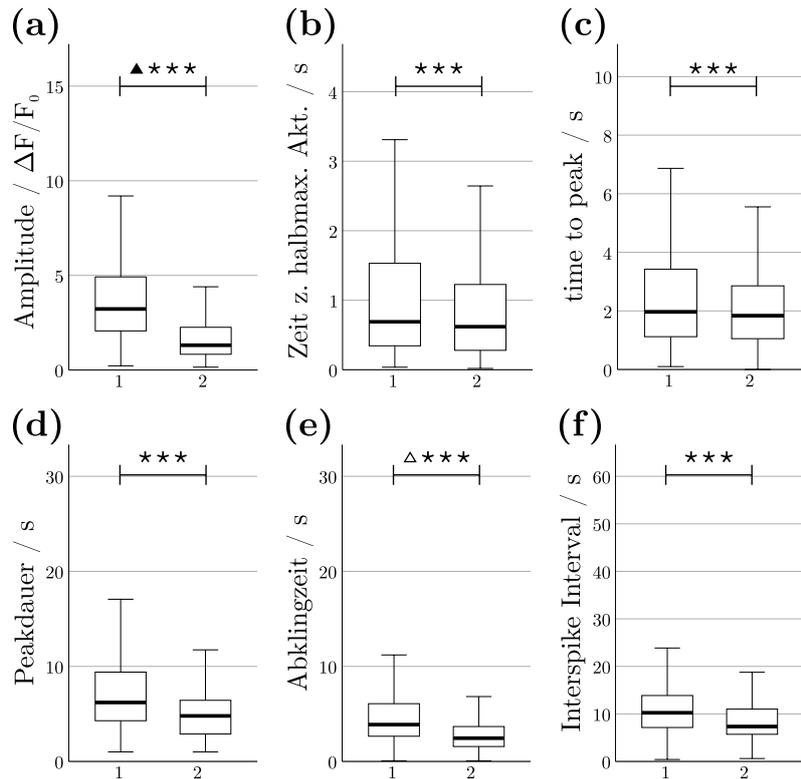
**Abbildung 41: Amplituden der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Amplituden  $A_P$  im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen signifikante Testergebnisse für alle Wertepaare ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $*p_K \leq 0,01$ ;  $*p_K \leq 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, An P0/1 führte einzig die Erhöhung der UTP-Konzentration zu einem relevanten Anstieg der Amplitude. **b**, Beim Vergleich der Amplituden an P4/5 waren alle getesteten Parameter signifikant unterschiedlich; die Effektstärke blieb jedoch in allen Fällen  $< 0,3$ . **c**, Wie an P0/1 ergab sich an P18 ein relevanter Unterschied nur für den Vergleich der UTP-Konzentrationen. Quelle: TSM.



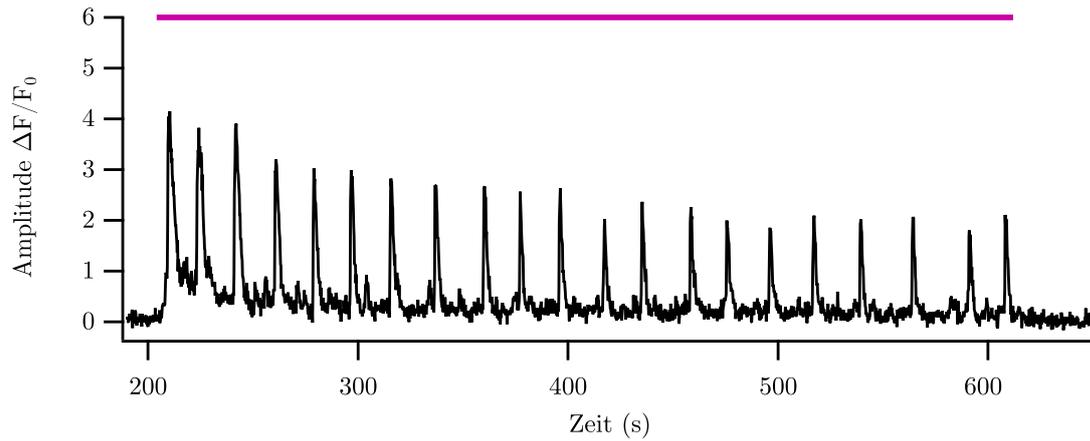
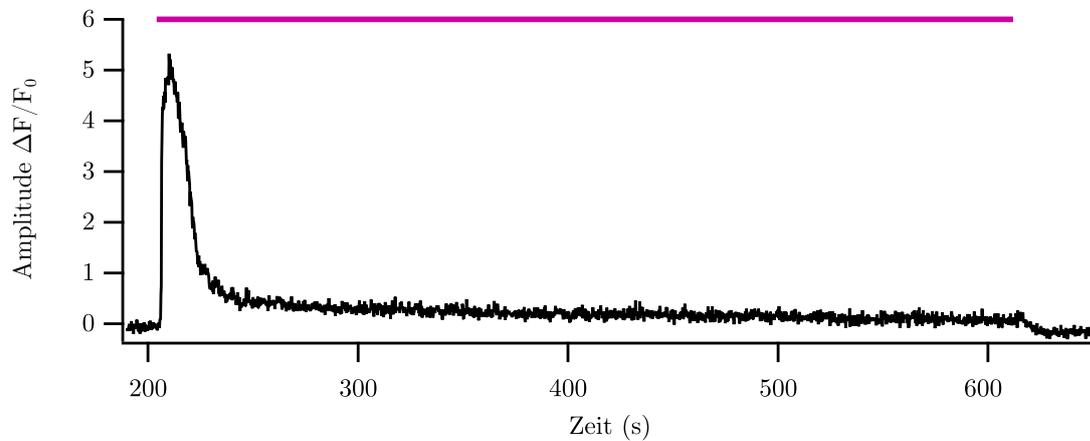
**Abbildung 42: Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Zeit zur halbmax. Aktivierung  $t_{1/2}$  bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen für alle Altersgruppen und Agonisten im Laufe der cochleären Entwicklung eine im Wesentlichen gleichbleibende Zeit zur halbmax. Aktivierung ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Bei Stimulation mit 1  $\mu$ M-Nukleotidlösung waren zwar alle getesteten Wertepaare signifikant verschieden, jedoch waren die Effekte in allen Fällen nur schwach ( $r < 0,3$ ). **b**, Bei Stimulation mit ATP (10  $\mu$ M) war die halbmaximale Amplitude ( $A_{P/2}$ ) an P0/1 nach der gleichen Zeit wie an P4/5 erreicht. Die anderen Wertepaare unterschieden sich signifikant. Keines wies eine relevante Effektstärke ( $r < 0,3$ ) auf. Quelle: TSM.



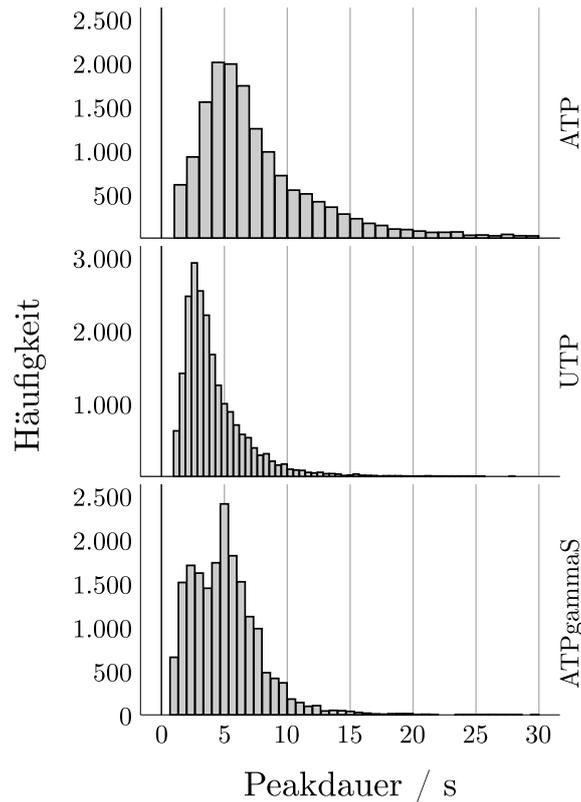
**Abbildung 43: Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Zeit zur halbmaximalen Aktivierung  $t_{1/2}$  im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen keine relevanten oder sogar nicht signifikante Unterschiede zwischen den Agonisten ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, Der Vergleich der Zeit zur halbmaximalen Aktivierung an P0/1 zeigte signifikante Unterschiede für die Stimulation mit ATP und UTP. Diese waren jedoch nicht relevant ( $r$  für alle Wertepaare  $< 0,3$ ). **b**, An P4/5 führte die Stimulation mit ATP oder UTP (jeweils 1  $\mu M$ ) in etwa der gleichen Zeit zur halbmaximalen Aktivierung. Die restlichen Wertepaare waren signifikant verschieden, zeigten keine relevante Effektstärke (vgl. a). **c**, Die Stimulation mit ATP oder UTP (jeweils 10  $\mu M$ ) führte nach der gleichen Zeit zur halbmaximalen Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Transienten. Die restlichen Wertepaare zeigten keinen relevanten Unterschied (vgl. a). Quelle: TSM.



**Abbildung 44: ATP $\gamma$ S evoziert Transienten in IDCs an P4/5.** Box-Whisker-Plots für verschiedene Parameter bei der Stimulation mit ATP (1) und ATP- $\gamma$ -S (2); jeweils 10  $\mu M$ -Lösung. \*\*\* $p_K \leq 0,001$ ; \*\* $p_K \leq 0,01$ ; \* $p_K \leq 0,05$ ; n. s.  $p_K > 0,05$ . Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, Vergleich der Amplituden zeigte einen hoch relevanten Unterschied zwischen ATP und ATP $\gamma$ S mit deutlich geringeren Werten für ATP $\gamma$ S. **b - d**, Keine relevanten Unterschiede zeigten sich für die Zeit bis zur halbmax. Aktivierung, die time to peak und die Peakdauer. **e**, Die unter ATP $\gamma$ S-Einfluss gemessenen Signale fielen relevant langsamer ab. Quelle: TSM.

(a) P4/5 - ATP $\gamma$ S-evozierte  $Ca^{2+}$ -Oszillationen ( $10 \mu M$ ).(b) P4/5 - ATP $\gamma$ S-evoziertes  $Ca^{2+}$ -Signal ( $10 \mu M$ ).

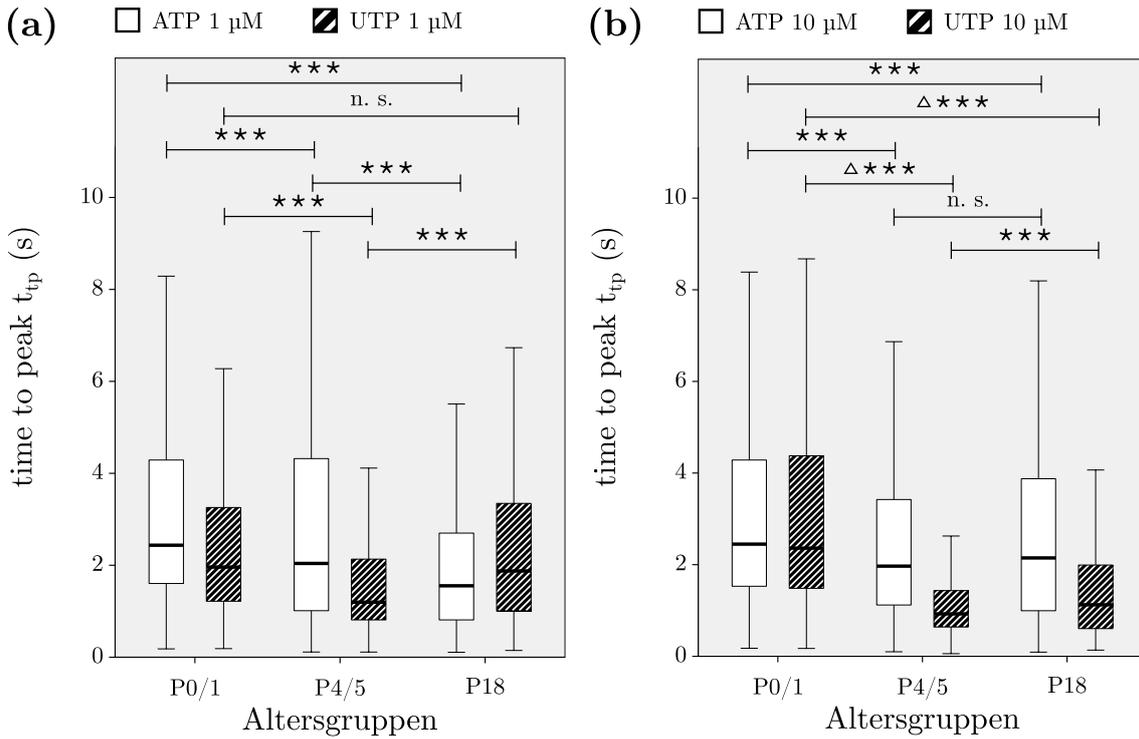
**Abbildung 45: ATP $\gamma$ S evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten an P4/5.** Stimulation mit  $10 \mu M$  ATP $\gamma$ S-Lösung (malvenfarbener Balken) evoziert an P4/5 **a**,  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in IDCs und **b**, ein Reaktionsbild, welches an das von ATP an P18 erinnert. Quelle: TSM.



**Abbildung 46: Histogramme der Peakdauer an P4/5 im Agonistenvergleich.** Die Histogramme stellen die Peakdauer der an P4/5 unter ATP-, UTP- und ATP $\gamma$ S-Stimulation gemessenen Signale dar. Auffällig sind die zwei Häufigkeitsmaxima der unter ATP $\gamma$ S beobachteten Peaks. Die Lage der Maxima entspricht in etwa jener unter ATP und UTP gemessenen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ATP $\gamma$ S Prozesse anstößt, welche sonst hauptsächlich entweder durch ATP oder UTP ausgelöst werden. Quelle: TSM.

Wie oben diskutiert, konnte die  $t_{1/2}$  für alle Altersgruppen und über die cochleäre Entwicklung hinweg als in etwa gleich angenommen werden. Somit stellten Änderungen in der time to peak  $t_{tp}$  Änderungen während der zweiten Hälfte der Aktivierung dar. Auch die  $t_{tp}$ -Werte veränderte sich für die Stimulation mit den  $1 \mu M$  konzentrierten Agonistenlösungen für die gemessenen Altersgruppen nicht relevant. UTP-evozierte Peaks brauchten an P18 nicht signifikant länger oder kürzer, um ihr Maximum ( $A_P$ ) zu erreichen. Bei Verzehnfachung der Agonistenkonzentration ergab sich eine relevante Verkürzung für dieses Wertepaar. Die UTP- $t_{tp}$  verkürzte sich bereits in dem Schritt von P0/1 zu P4/5 relevant und verblieb auf diesem Niveau. Für die ATP-evozierten Signale ergaben sich keine relevanten Unterschiede. Bei der Betrachtung der Agonistenabhängigkeit zeigt sich nur ein relevanter Unterschied zwischen  $10 \mu M$  ATP- und UTP-Lösung an P4/5 (Abb. 48). Tendenziell wurde die  $t_{tp}$  für ATP mit zunehmendem Alter kürzer, während sie unter UTP-Einfluss bei P4/5 minimal war (Tab. 11 & 12).

Auch bei Betrachtung der Peakdauer  $t_{ges}$  zeigte sich insgesamt ein Trend zu kürzeren Signalen bei steigendem Alter (Tab. 11 & 12). Die Abnahme der Peakdauer für ATP-evozierte Signale war jedoch nur für den Schritt von P0/1 zu P18 relevant ( $1 \mu M$  &  $10 \mu M$ ). Die mit UTP-Stimulation ausgelösten  $Ca^{2+}$ -Transienten nahmen in ihrer Dauer von P0/1 zu P4/5 relevant ( $1 \mu M$ ) bzw. hoch relevant ( $10 \mu M$ ) ab.  $t_{ges}$  konnte im Folgenden als

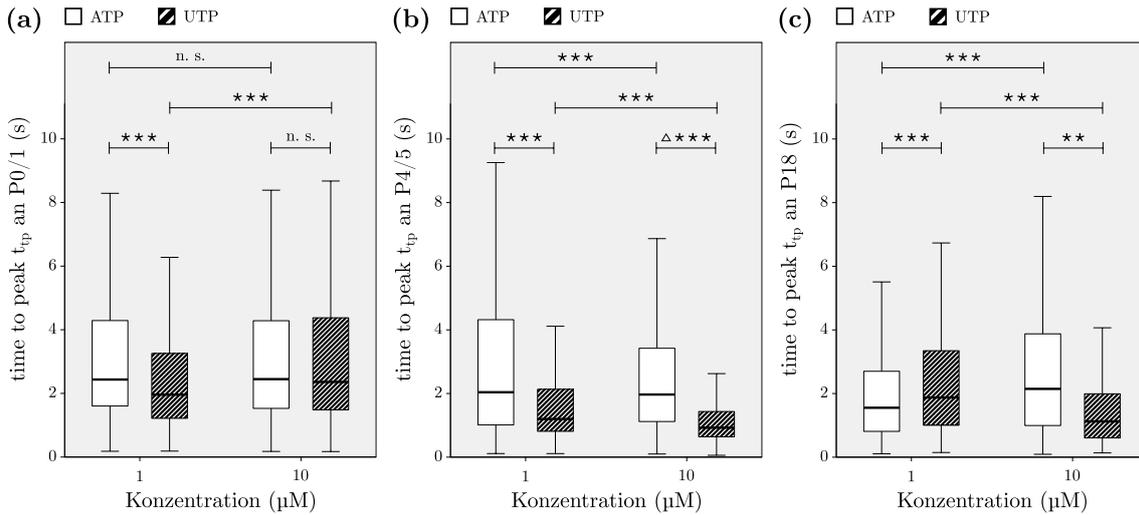


**Abbildung 47: Time to peak der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der time to peak  $t_{tp}$  im Altersvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen nicht signifikante bis relevante Unterschiede ( $***p_K \leq 0,001$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Die time to peak bei Stimulation mit  $1 \mu M$ -Nukleotidlösung blieb im Laufe der cochleären Entwicklung im Wesentlichen gleich. **b**, Unter Stimulation mit  $10 \mu M$  UTP war das Peakmaximum an P4/5 und P18 relevant schneller erreicht als an P0/1. Quelle: TSM.

im Wesentlichen gleichbleibend betrachtet werden (Abb. 49). Im direkten Vergleich der Agonisten war nur an P4/5 unter Stimulation mit  $10 \mu M$ -Lösung eine relevante Differenz zwischen ATP und UTP zu beobachten (Abb. 50).

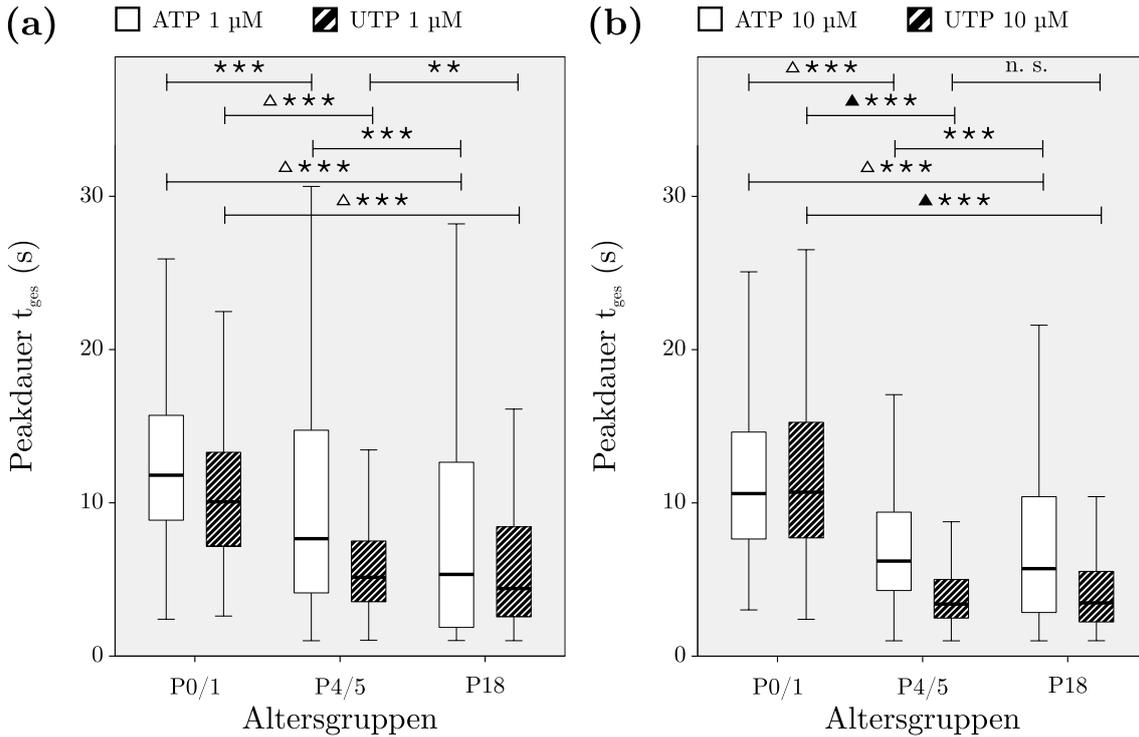
Der abnehmende Trend bestätigte sich auch bei der Abklingzeit  $t_{dec}$  (Tab. 11). Im Agonistenvergleich zeigte sich, dass die ATP-Signale tendenziell länger brauchten, um wieder auf die Basislinie zurückzukommen, als die UTP-evozierten Signale. Zu dem ersten untersuchten Altersgruppensprung (P0/1 zu P4/5) lieferte die Prüfung der Effektstärke für ATP-Signale nur im  $10 \mu M$ -Bereich ein relevant abweichendes Ergebnis. Die UTP-Signale für dieses Wertepaar waren relevant ( $1 \mu M$ ) bzw. hoch-relevant ( $10 \mu M$ ) abweichend. Da im Vergleich zwischen P4/5 und P18 keines der getesteten Wertepaare relevant wurde, und erst die Werte für den Schritt von P0/1 nach P18 relevant (ATP) bzw. hoch relevant (UTP) abweichend waren, lässt sich schlussfolgern, dass sich die  $t_{dec}$  im Wesentlichen an den ersten vier Tagen nach der Geburt verkürzte (Abb. 51). Die Wahl des Agonisten hatte für den Großteil der Beobachtungen keinen relevanten Effekt, nur an P4/5 waren Signale unter  $10 \mu M$  UTP-Einfluss relevant schneller wieder auf der Basislinie als unter ATP (Abb. 52).

Auch für das Interspike Interval bestätigte sich der Trend zu schnelleren Abläufen bei steigendem Alter (Tab. 11). Dies bestätigte sich auch in der quantitativen Analyse: Bei

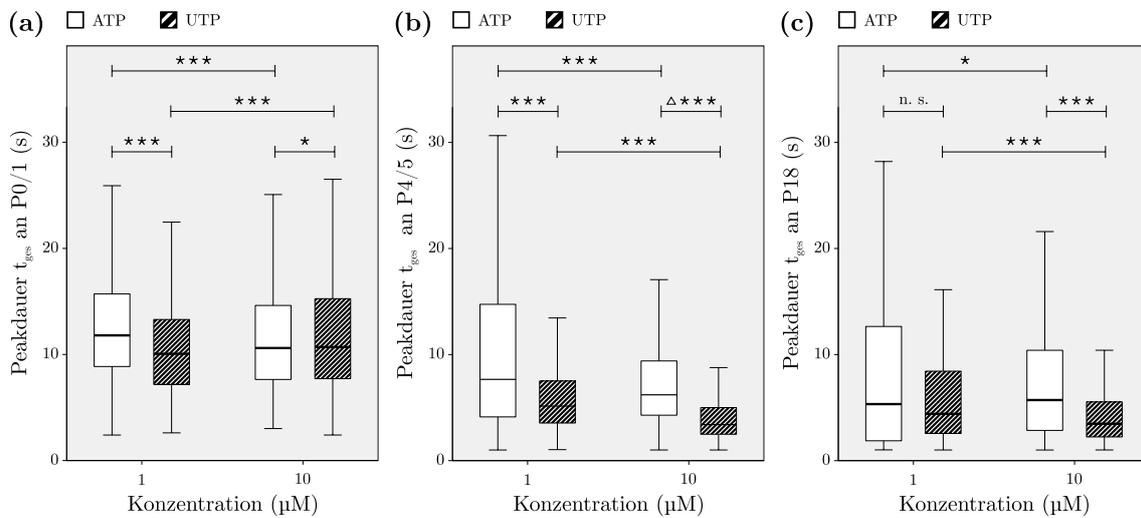


**Abbildung 48: Time to peak der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der time to peak  $t_{tp}$  im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen nur für ein Wertepaar wesentliche Unterschiede auf ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, An P0/1 führte der Agonistenwechsel oder die Konzentrationserhöhung zu keinem wesentlichen Unterschied. **b**, An P4/5 vermochte lediglich der Wechsel von  $10 \mu M$  ATP auf UTP eine relevante Verkürzung der time to peak herbeizuführen. **c**, ATP und UTP hatten in beiden Konzentrationen an P18 einen nicht relevant abweichenden Effekt auf die time to peak. Quelle: TSM.

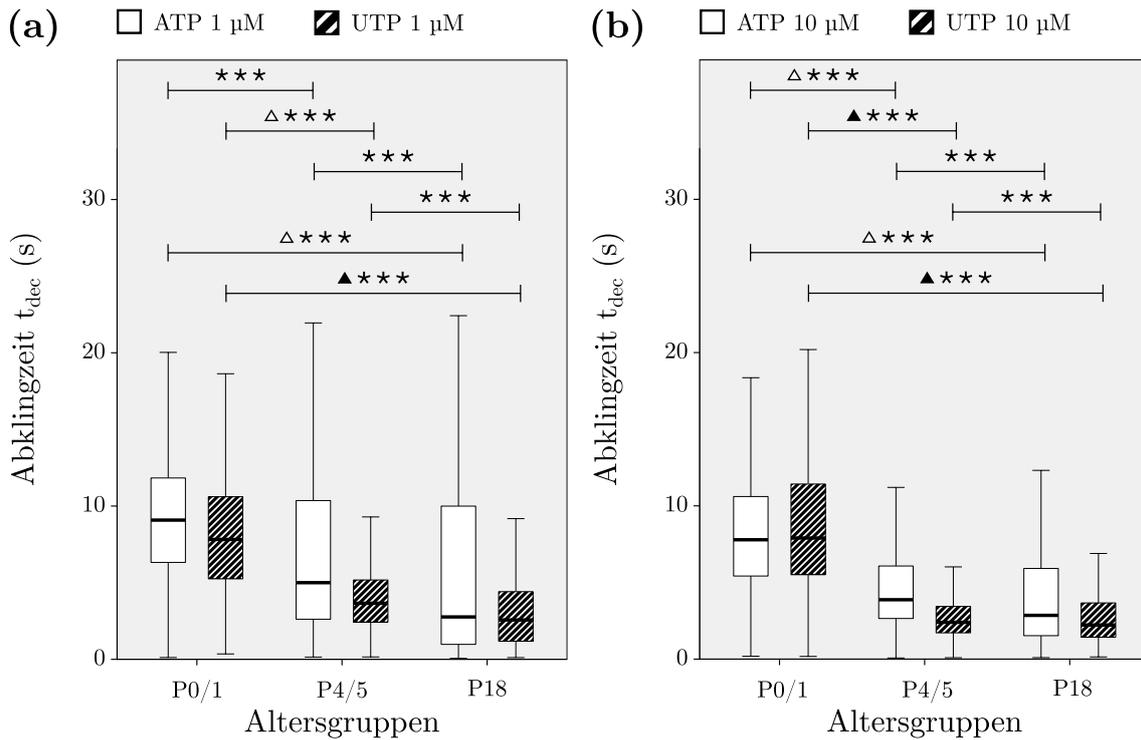
Stimulation mit  $10 \mu M$  ATP oder UTP wurden an P4/5  $Ca^{2+}$ -Transienten in kürzeren Abständen beobachtet als noch an P0/1. Auch für den Sprung von P0/1 zu der hörenden Cochlea an P18 ergaben sich relevant höhere Frequenzen (Abb. 53). Für den Vergleich des Agonisteneinflusses zeigten sich bei  $1 \mu M$  Lösungen für UTP durchweg kürzere Intervalle als für ATP. Bei der 10-fach höheren Konzentration kehrte sich dieses Verhältnis um (Tab. 12). Die quantitative Auswertung zeigte jedoch, außer für die ATP-Konzentrationserhöhung an P4/5, keine relevanten Unterschiede (Abb. 54).



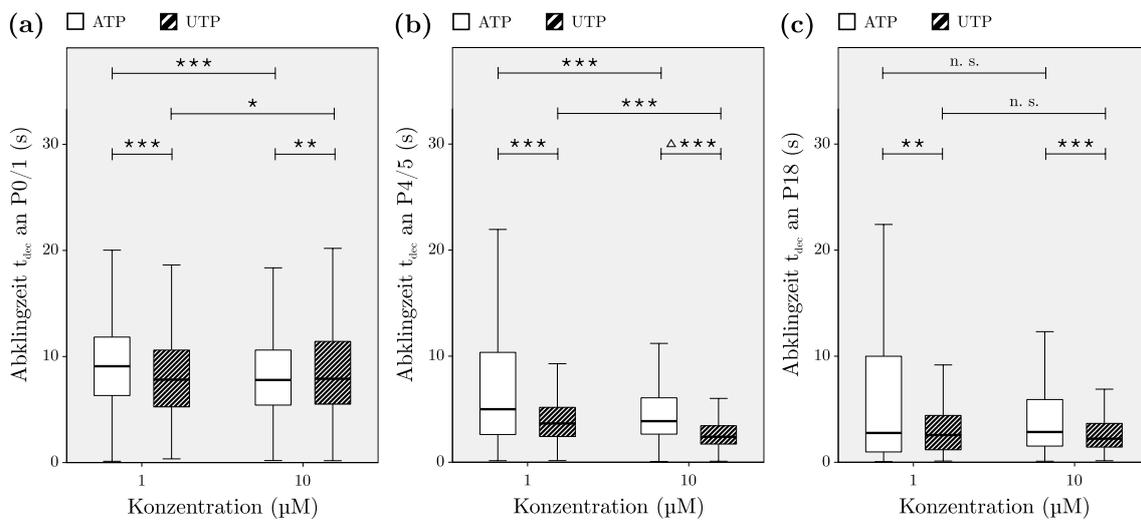
**Abbildung 49: Peakdauer der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Peakdauer  $t_{ges}$  im Altersvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) machen relevante Unterschiede im Laufe der cochleären Entwicklung deutlich ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ), gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Bei Einsatz von 1  $\mu$ M-Lösungen waren die  $Ca^{2+}$ -Transienten an P0/1 relevant länger als an P18. Im Vergleich der beiden immaturren Altersgruppen vermochte lediglich UTP einen relevanten Unterschied aufzuzeigen. **b**, Die Verzehnfachung der Agonistenkonzentration trennte die Altersgruppen P0/1 und P4/5 weiter auf, so dass ein relevantes Absinken der Peakdauer an P4/5 zu verzeichnen war. Quelle: TSM.



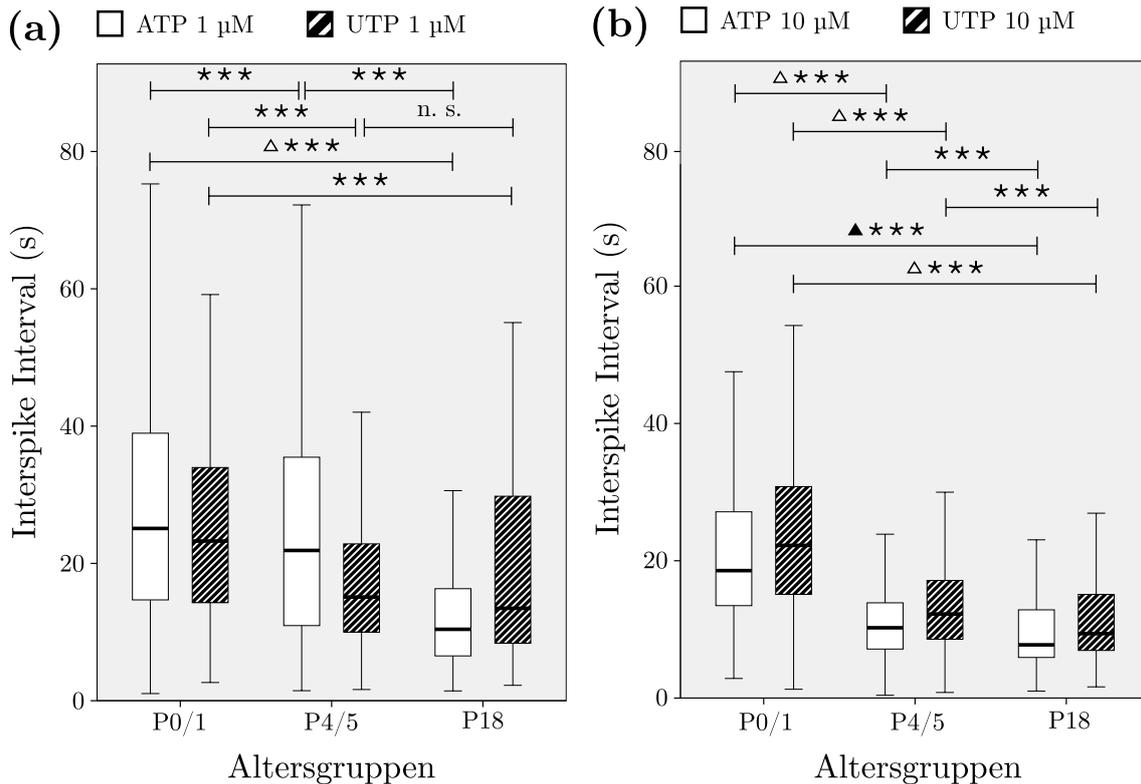
**Abbildung 50: Peakdauer der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Peakdauer  $t_{ges}$  im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen nur für ein Wertepaar einen relevanten Unterschied auf ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $*p_K \leq 0,05$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, Bezüglich der Peakdauer gab es an P0/1 für ATP und UTP in beiden Verdünnungen keine relevanten Unterschiede. **b**, Bei  $10 \mu M$ -Lösungen führte an P4/5 der Wechsel des Nucleotids zu einem relevanten Effekt hinsichtlich der Peakdauer. **c**, Wie an P0/1 waren zwischen ATP und UTP in beiden Verdünnungen an P18 keine relevanten Unterschiede zu beobachten. Quelle: TSM.



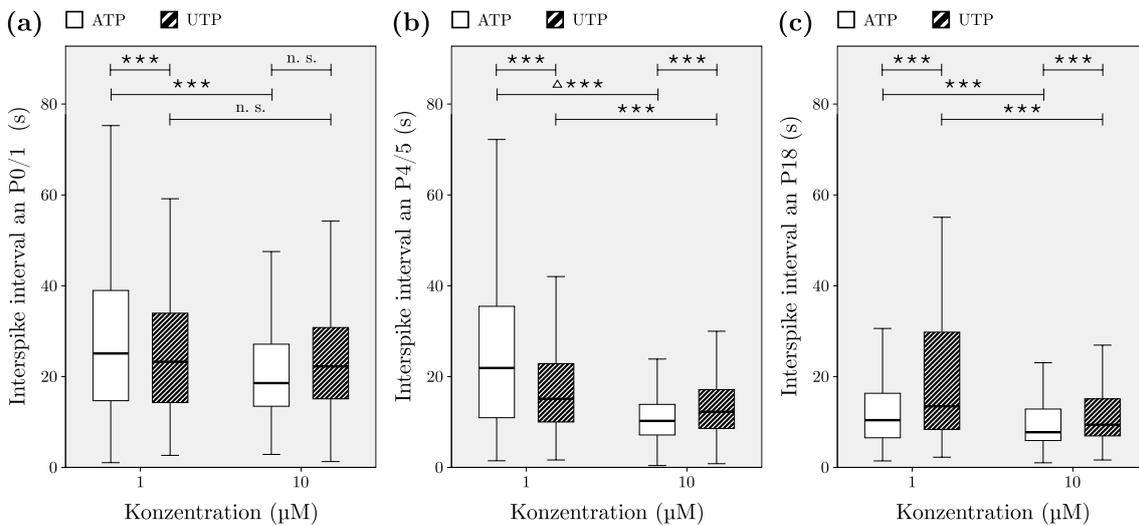
**Abbildung 51: Abklingzeit der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Abklingzeit  $t_{dec}$  im Altersvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen eine wesentliche Reduktion der Abklingzeit nur in dem Schritt von P/1 nach P4/5 ( $***p_K \leq 0,001$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Für 1  $\mu$ M Verdünnungen der Agonistenlösung zeigte sich insgesamt eine Verkürzung des Signalabfalls. Für ATP erfolgte dies wesentlich zwischen P0/1 und P18, während für UTP die relevante Reduktion schon an P4/5 zu verzeichnen war. **b**, Bei 10  $\mu$ M-Nukleotidlösungen vollzog sich die relevante Reduktion sowohl für ATP als auch UTP zwischen P0/1 und P4/5. Quelle: TSM.



**Abbildung 52: Abklingzeit der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Abklingzeit  $t_{dec}$  im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen lediglich für den Vergleich ATP gegen UTP (10  $\mu M$ ) an P4/5 einen relevanten Unterschied ( $***p_K \leq 0,001$ ;  $**p_K \leq 0,01$ ;  $*p_K \leq 0,05$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, An P0/1 hatte ein Agonistenwechsel im Hinblick auf die Abklingzeit keinen relevanten Effekt. **b**, Nur der Wechsel von 10  $\mu M$  ATP zu UTP reduzierte die Abklingzeit relevant. **c**, Wie an P0/1 hatte ein Agonistenwechsel an P18 im Hinblick auf die Abklingzeit keinen relevanten Effekt. Die Verzehnfachung der Agonistenlösung zeigte sogar keinen signifikanten Unterschied. Quelle: TSM.



**Abbildung 53: Interspike Interval der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Alters bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Interspike Intervals im Altersvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen relevante Effekte hauptsächlich mit 10  $\mu$ M Lösung ( $***p_K \leq 0,001$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ ). Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Gefüllte Dreiecke zeigen Unterschiede mit großer Effektstärke ( $r \geq 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 17 zu entnehmen. **a**, Eine relevante Reduktion der Interspike Intervals mit 1  $\mu$ M Agonistenlösungen zeigte sich nur für ATP zwischen P0/1 und P18. **b**, Bei Verwendung von 10  $\mu$ M Lösungen reduziert sich das Interspike Intervall für ATP und UTP wesentlich von P0/1 auf P4/5. Quelle: TSM.



**Abbildung 54: Interspike Interval der  $Ca^{2+}$ -Transienten als Funktion des Agonisten und der Agonistenkonzentration bei Stimulation mit ATP oder UTP.** Die Box-Whisker-Plots der Interspike Intervals im Agonistenvergleich bei Stimulation mit ATP-Lösung (weiße Boxen) oder UTP-Lösung (gestreifte Boxen) zeigen nur an P4/5 einen relevanten Effekt ( $***p_K \leq 0,001$ ; n. s.,  $p_K > 0,05$ .) Leere Dreiecke zeigen Unterschiede mit mittlerer Effektstärke ( $0,3 \leq r < 0,5$ ). Die genauen Ergebnisse der Teststatistiken sind Tab. 18 zu entnehmen. **a**, Die Interspike Intervals waren an P0/1 im Vergleich der verschiedenen Agonisten und Konzentrationen im Wesentlichen gleich. Eine Erhöhung der UTP-Konzentration sowie der Wechsel von 10  $\mu M$  ATP auf UTP waren nicht signifikant. **b**, Eine Erhöhung der ATP-Konzentration ging an P4/5 mit einem relevanten Effekt einher. **c**, An P18 waren die Effekte der verschiedenen Agonisten im Wesentlichen gleich. Quelle: TSM.

**Tabelle 11: Medianvergleich der evozierten Transienten über die verschiedenen Altersstufen.** Die Tabelle stellt die Mediane der jeweiligen Altersgruppe dar. Diese wurden auf den Median an P0/1 gemäß  $X_{normiert} = \frac{X}{X_{P0/1}}$  normiert. Werte wurden auf 3 Dezimalstellen gerundet. Quelle: TSM.

AGONIST	[c]	MERKMAL	ALTERSGRUPPEN		
			P0/1	P4/5	P18
ATP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	2,846	2,962	1,121
		Amplitude normiert	1	1,04	0,39
		Zeit z. halbmax. Aktivierung (s)	0,517	0,398	0,376
		Z. z. halbmax. Aktivierung normiert	1	0,77	0,73
		time to peak (s)	2,436	2,040	1,554
		time to peak normiert	1	0,84	0,64
		Peakdauer (s)	11,802	7,661	5,330
		Peakdauer normiert	1	0,65	0,45
		Abklingzeit (s)	9,048	5,002	2,765
		Abklingzeit normiert	1	0,55	0,30
		Interspike Interval (s)	25,092	21,888	13,464
		Interspike Interval normiert	1	0,87	0,54
		ATP	10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	3,838
Amplitude normiert	1			0,84	0,24
Zeit z. halbmax. Aktivierung (s)	0,609			0,690	0,433
Z. z. halbmax. Aktivierung normiert	1			1,13	0,71
time to peak (s)	2,448			1,968	2,147
time to peak normiert	1			0,80	0,88
Peakdauer (s)	10,608			6,205	5,712
Peakdauer normiert	1			0,58	0,54
Abklingzeit (s)	7,789			3,876	2,856
Abklingzeit normiert	1			0,50	0,37
Interspike Interval (s)	18,564			10,240	7,752
Interspike Interval normiert	1			0,55	0,42

Mediane evozierter Transienten - Fortsetzung. Quelle: TSM.

Agonist	[c]	Merkmal	Altersgruppen		
			P0/1	P4/5	P18
UTP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	2,761	3,022	0,723
		Amplitude normiert	1	1,09	0,26
		Zeit z. halbmax. Aktivierung (s)	0,434	0,379	0,624
		Z. z. halbmax. Aktivierung normiert	1	0,87	1,44
		time to peak (s)	1,961	1,197	1,876
		time to peak normiert	1	0,61	0,96
		Peakdauer (s)	10,064	5,140	4,409
		Peakdauer normiert	1	0,51	0,44
		Abklingzeit (s)	7,821	3,658	2,569
		Abklingzeit normiert	1	0,47	0,33
		Interspike Interval (s)	23,256	15,096	13,464
		Interspike Interval normiert	1	0,65	0,58
UTP	10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	5,019	2,540	1,207
		Amplitude normiert	1	0,51	0,24
		Zeit z. halbmax. Aktivierung (s)	0,473	0,321	0,432
		Z. z. halbmax. Aktivierung normiert	1	0,68	0,91
		time to peak (s)	2,361	0,926	1,125
		time to peak normiert	1	0,39	0,48
		Peakdauer (s)	10,699	3,399	3,477
		Peakdauer normiert	1	0,32	0,32
		Abklingzeit (s)	7,901	2,402	2,226
		Abklingzeit normiert	1	0,30	0,28
		Interspike Interval (s)	22,236	12,240	9,384
		Interspike Interval normiert	1	0,55	0,42

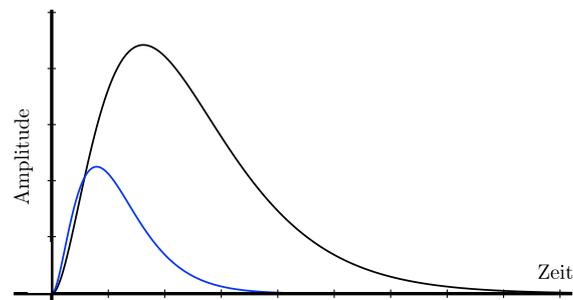
**Tabelle 12: Medianvergleich der evozierten Transienten im Vergleich der verschiedenen Agonisten und Konzentrationen.** Die Tabelle stellt die nach der unten stehenden Formel normalisierten Mediane für die jeweiligen Agonisten dar. Die Normierung erfolgte gemäß  $X_{normiert} = \frac{X}{X_{ATP}}$  auf den jeweiligen Median von ATP. Für die Absolutwerte s. Tab. 11. Quelle: TSM.

ALTERSSTUFE	MERKMAL	AGONIST			
		1 $\mu M$		10 $\mu M$	
		ATP	UTP	ATP	UTP
P0/1	Amplitude	1	0,97	1	1,30
	Zeit z. halbmax. Aktivierung (s)	1	0,84	1	0,78
	time to peak (s)	1	0,80	1	0,94
	Peakdauer (s)	1	0,85	1	1,01
	Abklingzeit (s)	1	0,86	1	1,01
	Interspike Interval (s)	1	0,93	1	1,20
P4/5	Amplitude	1	1,02	1	0,86
	Z. z. halbmax. Aktivierung (s)	1	0,95	1	0,81
	time to peak (s)	1	0,59	1	0,45
	Peakdauer (s)	1	0,67	1	0,44
	Abklingzeit (s)	1	0,73	1	0,48
	Interspike Interval (s)	1	0,69	1	1,20
P18	Amplitude	1	0,65	1	0,99
	Z. z. halbmax. Aktivierung (s)	1	1,66	1	1,15
	time to peak (s)	1	1,21	1	0,72
	Peakdauer (s)	1	0,83	1	0,65
	Abklingzeit (s)	1	0,93	1	0,80
	Interspike Interval (s)	1	1,29	1	1,21

## 5 Diskussion

Neben dem sensorischen Epithel bedarf es zur Entstehung eines Höreindrucks zahlreicher weiterer Strukturen, ohne welche die Haarzellen nicht adäquat arbeiten können. Hierzu zählt die Membrana tectoria (TM). Obgleich viele Autoren den Interdentalzellen (IDCs) eine elementare Funktion bei der Bildung der TM zusprechen, gibt es bis heute nur wenige physiologische Studien über die IDCs. Erstmals wurden in dieser Studie lebende IDCs *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Interdentalzellen (IDCs) sowohl spontane als auch evozierte  $Ca^{2+}$ -Transienten generieren. Neben diesen zum Teil oszillierenden Signalen wurde auch die Zellmorphologie näher charakterisiert und im Live Imaging von Membranen ein reger intrazellulärer Vesikelverkehr gezeigt. Vesikel konnten bisher nur in fixierten Präparaten von IDCs dokumentiert werden (u. a. Lim, 1970, 1987).

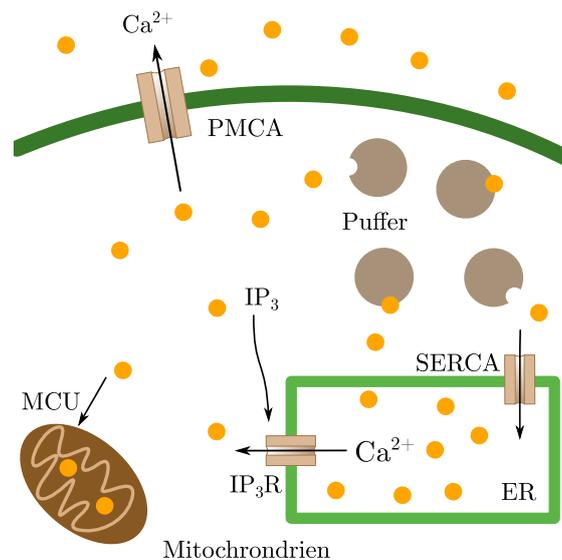
Die Entwicklung der spontanen  $Ca^{2+}$ -Transienten kann sehr gut im Sinne der cochleären Reifung gedeutet werden. Grundsätzlich handelt es sich bei den spontanen Signalen um ein seltenes Ereignis. In der Regel konnten pro Zelle und Messung nur wenige Transienten (i. d. R.  $\leq 3$ ) gemessen werden. Eine auf Grundlage des Interspike Intervalls berechnete Frequenz hätte somit nur eine geringe Datengrundlage, weshalb auf die Frequenzberechnung verzichtet wurde. Eine Aussage über die relative Häufigkeit erscheint valider. In dieser Betrachtung wird deutlich, dass die relative Signalfrequenz im Laufe der Innenohrentwicklung abnimmt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass spontane  $Ca^{2+}$ -Transienten im Laufe der Innenohrreifung kleinere Amplituden haben, die Signallänge abnimmt, und der Signalabfall schneller erfolgt (Abb. 55). Da die  $t_{1/2}$  für die spontanen Signale keinen relevanten Unterschied aufweist, kann von gleichen Aktivierungsprozessen ausgegangen werden. Als wahrscheinlichster Mechanismus ist die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) über  $IP_3$  anzunehmen. Um die beobachteten Effekte zu erreichen, müssen somit zwangsläufig die Deaktivierungsprozesse effektiver, d. h. schneller werden. Hierfür kommen v. a. die SERCA, Mitochondrien, membranständige  $Ca^{2+}$ -ATPasen und intrazelluläre Puffer in Frage. Die spontanen Signale waren an P4/5 am häufigsten zu beobachten. Dies deckt sich mit den übrigen Beobachtungen der cochleären Spontanaktivität, welche ebenfalls in diesem Entwicklungsalter ihr Maximum hat (Johnson et al., 2013; Sendin et al., 2014).



**Abbildung 55: Schemazeichnung spontaner  $Ca^{2+}$ -Transienten im Altersvergleich.** Nach dem Hörbeginn (P18, blau) werden die Amplitude ( $A_P$ ) der spontanen Signale kleiner und die time to peak ( $t_{tp}$ ) und die Dauer ( $t_{ges}$ ) kürzer als an P0/1 (schwarz). Quelle: TSM.

In unreifen Cochleae kommt es bei Stimulation mit ATP oder UTP in verschiedenen

Konzentrationen zu robusten und anhaltenden Oszillationen. Damit gliedern sich die IDCs in die Reihe vieler elektrisch nicht erregbarer Zellen ein, welche auf anhaltende Stimulation mit Oszillationen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) reagieren. Bei der großen Anzahl der gemessenen Signale ( $n_{ges} = 92.986$ ) wurden auch schon kleine Unterschiede zwischen den Messwerten durch die statistische Testung als signifikant verschieden eingestuft. Ein signifikantes Testergebnis ist jedoch nicht in allen Fällen mit einer praktischen Relevanz assoziiert. Um einen validen Schätzer für die Relevanz eines Unterschiedes zu bekommen, wurde die Effektstärke  $r$  (Formel 6 auf Seite 56) eingeführt, welche wiederum dreistufig gewichtet ist. Als relevant wurden nur die mittlere und große Effektstärke betrachtet.



**Abbildung 56: Die Elimination des intrazellulären  $Ca^{2+}$ .** Nach der Freisetzung aus intrazellulären Speichern wird  $Ca^{2+}$  hauptsächlich über vier Wege eliminiert: (i) Das ER als intrazellulärer Speicher wird über die SERCA wieder aufgefüllt, (ii)  $Ca^{2+}$  gelangt über mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Uniporter (MCU) in die Mitochondrien, (iii)  $Ca^{2+}$  wird aktiv über plasmamembranständige  $Ca^{2+}$ -ATPasen (PMCA) aus der Zelle in den Extrazellulärraum gepumpt und (iv) über intrazelluläre Puffer gebunden. Quelle: TSM.

Wie in dieser Beobachtungsvorgabe üblich, liegen sowohl den spontanen, als auch den evozierten Transienten der Signalweg über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu Grunde (Thomas et al., 1996). Wie in Abschnitt 2.4 dargestellt, können die verwendeten Agonisten über metabotrope, G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren Wirkung an den IDCs entfalten.

In der von Thomas et al. (1996) veröffentlichten Übersichtsarbeit werden zwei verschiedene Arten von oszillatorischen  $Ca^{2+}$ -Signalen beschrieben: (i) Grundlinien-basierte, periodische Maxima, welche stets auf die ursprüngliche  $[Ca^{2+}]_i$  abfallen und (ii) sinusoidale Oszillationen, welche von einem Plateau ausgehend eher einer „echten Sinusoszillation“ gleichen. Die an P0/1 und P4/5 beobachteten Oszillationen sind eher den Grundlinien-basierten Peaks zuzuschreiben, während die oszillatorischen ATP-Antworten an P18 den sinusoidalen Oszillationen zuzuschreiben sind.

Sowohl die spontanen als auch die evozierten Transienten zeigen keine relevante Variabilität in der initialen Aufstrichphase; die Signale unterscheiden sich v. a. im Signalabfall. Diese

Beobachtung ist im guten Einklang mit der Literatur. Hier wird die größte Variabilität der  $Ca^{2+}$ -Signale in der Abklingphase beschrieben. Dies bezieht sich nicht nur auf interzelluläre Unterschiede, sondern insbesondere auch auf durch verschiedene Agonisten evozierte Signale innerhalb einer Zelle (Thomas et al., 1996). Um diesen Prozess weiter zu charakterisieren, sollte in künftigen Studien auch der Parameter der halbmaximalen Abklingzeit (Zeit von der max. Amplitude  $A_P$  bis zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude  $A_P/2$ ) Berücksichtigung finden.

## 5.1 Expressionsanalyse

Die Glykoproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tectorin sind die ersten nachweisbaren Elemente der TM (mRNA ab dem embryonalen Tag 12,5 (Rau et al., 1999), Protein ab dem embryonalen Tag 14,5 (Goodyear et al., 2017)) und bilden eine Matrix, an der sich unter anderem die Kollagene ausrichten können (Goodyear et al., 2017). Somit spielen die Tectorine während der initialen Entwicklung eine essentielle Rolle. In der Literatur wird von einer nur transienten mRNA-Expression der Tectorine berichtet (Rau et al., 1999). Die Transkripte sind jedoch auch in der adulten Cochlea im subtectorialen Raum in der limbischen Zone der TM nachweisbar (Goodyear und Richardson, 2002; Richardson et al., 2008; Hayashi et al., 2015). Unter der Annahme, dass die IDCs die TM über die Lebenszeit aufrechterhalten („turnover“), müsste auch die mRNA der Tectorine in der adulten Cochlea nachweisbar sein. Die bisherigen in situ Verfahren für den RNA-Nachweis zeichnen sich durch eine zu geringe Sensitivität aus, welche mit RNAscope-Verfahren deutlich auf einzelne RNA-Moleküle verbessert wird (Wang et al., 2012). Eine erneute Analyse der adulten Cochlea im Hinblick auf die Expression der Glykoproteine der TM könnte zum besseren Verständnis der adulten TM-Homöostase beitragen.

Weiterhin unklar ist der genaue Mechanismus der  $Ca^{2+}$ -Signale in den IDCs (Abschnitt 5.3). Um ein besseres Verständnis hierüber zu bekommen, scheint es unerlässlich, die Expression der Schlüsselproteine zu untersuchen. Einer Alternative zu immunotechnischen Verfahren zur Expressionsanalyse im Gewebe (z. B. immunhistochemische Bildgebung oder in-situ Hybridisierung) könnte das Single Cell Sequencing, eine Variante des Next Generation Sequencing, bieten.

Die pharmakologische Manipulation der IDCs ist prinzipiell eingeschränkt, da sie ein dichtes Epithel bilden (Abschnitt 2.1.2 auf Seite 8), und somit hydrophile Pharmaka in der Regel nur die apikale Zellmembran erreichen können.

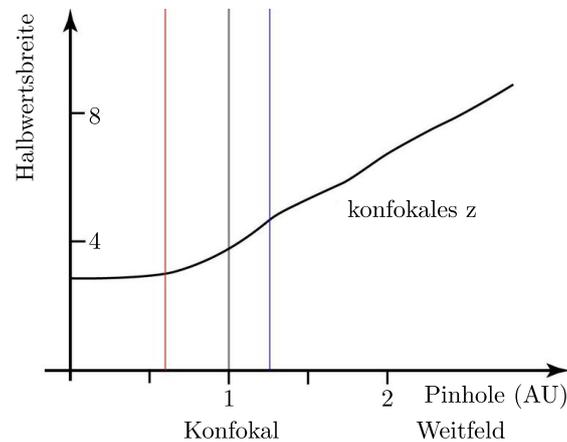
## 5.2 Weitere Schritte / Grenzen und Ausblick

Diese Studie bietet eine rein phänomenologische Beschreibung der  $Ca^{2+}$ -Signale in den IDCs, und es kann nur indirekt auf den zu Grunde liegenden Mechanismus geschlossen werden. Des Weiteren ist die whole-mount Präparation (Abschnitt 3.5.1 auf Seite 33) mit den löslichen  $Ca^{2+}$ -Indikatoren ein zwar weithin etabliertes Verfahren, welches jedoch schon relativ weit von einer physiologischen Situation entfernt ist. Wie erst jüngst gezeigt wurde, greifen

fluoreszierende  $Ca^{2+}$ -Indikatoren zum Teil erheblich in den zellulären Metabolismus ein. So werden grundlegende zelluläre Regulatoren, wie die Na-K-ATPase, durch lösliche  $Ca^{2+}$ -Indikatoren dosisabhängig in ihrer Funktion beeinflusst. Im Falle von Fluo-4, einem Fluo-8<sup>®</sup> Vorgänger, kommt es bei den in der hier vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen ( $5 \mu M$  Extrazellulärkonzentration, was zu einer etwa  $0,6 \text{ mM}$  Intrazellulärkonzentration führt) zu einer bis zu 60%igen Reduktion des  $K^+$ -Imports über die Na-K-ATPase (Smith et al., 2018). Die Relevanz der Messungen von Smith et al. (2018) für die vorliegende Studie bleibt jedoch strittig, da Fluo-4 keinen signifikanten Effekt auf die Na-K-ATPase-vermittelte Hydrolyse von ATP hatte. Um diese Effekte als Einflussfaktor ausschließen zu können, sollten die hier gewonnenen Ergebnisse mit anderen Verfahren validiert werden. Eine mögliche Alternative hierfür wären genetisch encodierte  $Ca^{2+}$ -Indikatoren (z. B. GCaMP), für welche gezeigt wurde, dass deren Einfluss zu kaum unerwünschten Wirkungen auf zelluläre Grundfunktionen führt (Smith et al., 2018). Diese Indikatoren bringen zudem den Vorteil, dass sie bereits in den Zellen vorhanden sind und nicht erst mühsam in die Zellen gelangen müssen. Dies brächte zwei weitere Vorteile mit sich: (i) Bis jetzt musste die TM während der Präparation entfernt werden, um einen ausreichenden Übertritt von Fluo-8<sup>®</sup> zu gewährleisten. Ein Wegfallen dieses Präparationsschrittes würde wesentlich zu einem schonenderen Gewebeumgang beitragen. Ferner könnte man (ii) direkt mit den Messungen beginnen - die Inkubationsphase würde entfallen. Aus persönlicher Information (Tobias Eckrich) ist bekannt, dass die  $Ca^{2+}$ -Signale in cochleären Stützzellen phänomenologisch die gleichen Eigenschaften haben, egal, ob sie mit Fluo-8<sup>®</sup> oder GCaMP gemessen werden. Ein Belassen der TM würde andererseits jedoch auch wiederum die Zugänglichkeit der IDCs für Agonisten erschweren. Elektrophysiologische patch clamp Messungen könnten hier eine gute Alternative darstellen, auch wenn hierbei immer nur einzelne Zellen gemessen werden können.

Ein weiterer, wichtiger Punkt ist die Betrachtung der Räumlichkeit; zum einen innerhalb der Cochlea, zum anderen auch innerhalb der einzelnen IDCs. Viele Studien zeigen einen Entwicklungsgradienten von basal nach apikal in der heranreifenden Cochlea, mit unreiferen Entwicklungsstadien am Apex (Held, 1926; Lim und Anniko, 1985; Lim, 1987; Hayashi et al., 2015; Lim und Brichta, 2016). Erste Bestrebungen, verschiedene Entwicklungsstadien aufzulösen, wurden in der vorliegenden Arbeit mit den drei gemessenen Altersstufen unternommen; jedoch wurden nur die apikale Windung der Cochlea untersucht. Eine Dokumentation verschiedenartiger  $Ca^{2+}$ -Signale entlang der tonotopen Achse im gleichen Entwicklungsalter würde das Reifungsalter als wesentlichen Faktor für die Charakteristiken der  $Ca^{2+}$ -Signale weiter untermauern. Die subzelluläre Auflösung der  $Ca^{2+}$ -Signale stellt hier eine größere Herausforderung dar. Zwar kann mit den eingesetzten mikroskopischen Techniken prinzipiell die optische Auflösungsgrenze für zweidimensionale Bereiche erreicht werden (etwa im Bereich  $244 \text{ nm}$  bei dem eingesetzten  $488 \text{ nm}$  Laser), jedoch ließ die Versuchscharakteristik dies nicht zu. In dem Spannungsfeld zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung musste Kantenlänge eines abgebildeten Pixels größer gewählt werden, um ausreichend hohe Scangeschwindigkeiten erreichen zu können. Eine weitere Problembetrachtung ist die Auflösung in der z-Ebene, genauer der Lichteintrag aus Schichten, welche ober- und unterhalb der Fokusebene lagen. Wesentliche Voraussetzung für eine Minimierung dieses

Fremdlichteintrags ist, dass die Konfokalblende adäquat geschlossen ist (Abb. 57). Dies wäre jedoch mit einer deutlichen Reduktion des Quantenertrages je Pixel und damit bei hohen Scangeschwindigkeiten einem ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis assoziiert. Im Kompromiss musste die Konfokalblende weiter geöffnet werden, so dass eine genaue Zuordnung der gemessenen Quanten zu einer bestimmten räumlichen Ebene nur eingeschränkt möglich ist.



**Abbildung 57: Halbwertsbreite des z-Signals in Abhängigkeit der Konfokalblendenöffnung.** Zu erkennen ist, dass die Halbwertsbreite des axialen z-Signals zunimmt, je weiter die Konfokalblende geöffnet ist. Der für große Öffnungen annähernd lineare Zusammenhang flacht für Durchmesser kleiner 1 AU (Airy Unit) ab, und es gibt kaum noch einen Auflösungszugewinn für kleinere Öffnungen (v. a. links der roten vertikalen Linie). Für Öffnungsdurchmesser  $\geq 1,25$  ergibt sich ein Bild wie in der Weitfeldmikroskopie (rechts der blauen vertikalen Linie). Als Kompromiss zwischen Halbwertsbreite und Quantenertrag ergab sich eine Einigung auf eine Öffnung von 1 AU. Quelle: Nach Borlinghaus (2017).

Eine Möglichkeit diesem Problem, zumindest zum Teil, gerecht zu werden, wäre die Anwendung eines Lattice Light Sheet Mikroskopsystems. Diese Technologie ist ähnlich der etablierten Light Sheet Mikroskopie, bei der das Präparat mit einem Lichtblatt senkrecht zu der Beobachtungsrichtung angeregt wird. Das Lattice Light Sheet Mikroskop hat jedoch den Vorteil, dass die zu untersuchende Probe nicht in einem Gel in eine Glaskapillare eingebracht werden muss. Die Probenaufbereitung für die Mikroskopie wird so deutlich weniger traumatisch, und es besteht weiterhin die Möglichkeit, mit verschiedenen Agentien (z. B. ATP und UTP) in den Versuchsablauf einzugreifen. Dieses Verfahren böte somit die Möglichkeit, große Bereiche der Probe simultan zu beleuchten und äußerst schnell durchzuscannen (das Lichtblatt würde durch die Probe bewegt und beleuchtete dabei immer gleichzeitig eine ganze Bildebene). Mit der Light Sheet Mikroskopie adressiert man somit verschiedene Probleme der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie: (i) Die zeitliche Auflösung steigt deutlich, (ii) die Phototoxizität durch den Laser sinkt und (iii) Photobleichung der Fluochrome ist geriner ausgeprägt, was gerade bei längeren Messungen zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen würde.

In den Aufnahmen dieser Studie wurden die ROIs manuell eingezeichnet. Dies kann mit einer geringen Interrater-Reliabilität assoziiert sein kann. Gerade in Grenzfällen sind die Kriterien, nach denen die ROIs gesetzt wurden, nur schwer zu objektivieren. Folglich sollte für zukünftige Untersuchungen ein Weg gefunden werden, dies automatisiert und nach

immer gleichen Kriterien durchzuführen.

### 5.3 Mechanismus der $Ca^{2+}$ -Transienten

Die hier durchgeführten Experimente erlauben es nicht, den Mechanismus der spontanen und evozierten  $Ca^{2+}$ -Transienten genau zu bestimmen. Gleichwohl kann man über die Veränderungen der Signaleigenschaften im Laufe der cochlären Entwicklung in Zusammenarbeit mit den in der Literatur beschriebenen Prozessen einige Rückschlüsse ziehen. Huang et al. (2010) haben die Expressionsmuster der verschiedenen P2Y-Rezeptoren während der cochlären Entwicklung mit Immunfärbungen untersucht. Die dort herangezogenen Entwicklungsstufen (P0; P6-P12; P20) korrespondieren gut mit denen dieser Studie. Unmittelbar postnatal (P0) ist vor allem der P2ry6 in den IDCs exprimiert. Dessen Expression nimmt zur zweiten untersuchten Altersstufen hin ab. An P6-P12 kommen noch zusätzlich die P2ry1 und P2ry2 hinzu. Nach dem Hörbeginn, ist an P20 ist kein P2ry2 mehr nachweisbar (vgl. Tab. 13).

Wie bereits in Abschnitt 4.4.3 auf Seite 59 dargestellt, unterscheiden sich die Affinitäten der Rezeptoren zu den verschiedenen Nukleotiden. von Kugelgen und Hoffmann (2015) haben in ihrer Übersichtsarbeit einen Überblick über diese Affinitäten im Vergleich der verschiedenen Agonisten dargestellt. Der P2ry2 hat hierbei eine deutlich größere Affinität zu UTP als zu ATP. Von den in dieser Studie getesteten Agonisten ist die Affinität des Rezeptors zu ATP $\gamma$ S am geringsten.

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, ist der P2ry6, welcher an P0 nach Huang et al. (2010) der einzige P2Y-Rezeptor in den IDCs ist, hauptsächlich ein UDP-Rezeptor (auch durch hydrolysiertes UTP stimulierbar). Man würde folglich für UTP an P0/1 größere Amplituden erwarten als für ATP. Tatsächlich unterscheiden sich jedoch die Amplituden von ATP und UTP weder für 1  $\mu$ M noch für 10  $\mu$ M relevant. Andererseits wird die Expression des P2ry6, als UTP-Rezeptor, durch eine relevante Amplitudenvergrößerung bei einer Erhöhung der UTP-Konzentration von 1  $\mu$ M auf 10  $\mu$ M unterstützt. Eine Erhöhung der ATP-Konzentration führte zu keiner relevanten Vergrößerung der Amplitude (Abb. 41 a).

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Amplitude nicht allein von der Rezeptoraktivität abhängt. Ein entscheidender Einflussfaktor ist u. a. auch die Kinetik der  $Ca^{2+}$ -Elimination. Diese unterscheidet sich an P0/1 für ATP und UTP jedoch nicht relevant (Abb. 52 a). Auch die  $t_{tp}$ ,  $t_{dur}$  und das  $isi$  sind an P0/1 für die zwei Agonisten nicht relevant verschieden.

An P4/5 ist die Situation nicht ganz so eindeutig, da hier nach Huang et al. (2010) drei verschiedene Rezeptoren eine Rolle spielen. Wie auch an P0/1, ist an P4/5 der P2ry6 ein möglicher Kandidat für oszillatorische Signale, da auch an dieser Altersstufe UTP robuste  $Ca^{2+}$ -Oszillationen evoziert. Mit ATP $\gamma$ S lassen sich in diesem Alter zwei verschiedene Reaktionen hervorrufen: (i) ATP-ähnliche, grundlinienbasierte Oszillationen und (ii) P18-ähnliche Initialpeaks, welche von einer Plateauphase gefolgt werden. Da der P2ry1 ein ADP-Rezeptor ist, kann dieser nicht durch ATP $\gamma$ S stimuliert werden und erscheint folglich als wenig wahrscheinlicher Kandidat für die ATP-Oszillationen. Die durch

**Tabelle 13: Die Expression der P2ry-Rezeptoren in den IDCs.** In Klammern ist die Expressionsstärke angegeben: s - strong / stark; m - moderate / moderat; w - weak / schwach. Quelle: Darstellung TSM in Anlehnung an Huang et al. (2010).

P0	P6-P12	P20
	P2ry1 (s)	P2ry1 (m)
	P2ry2 (m)	
P2ry6 (w)	P2ry6 (w)	P2ry6 (m)

**Tabelle 14: Überblick über die Affinitäten der in den IDCs exprimierten Rezeptoren zu verschiedenen Purinnukleotiden.** Die nach Huang et al. (2010) in Frage kommenden Rezeptoren sind hier mit ihren Affinitäten zu den in dieser Studie verwendeten Agonisten dargestellt. Quelle: Darstellung TSM in Anlehnung an von Kügelgen und Hoffmann (2015).

REZEPTOR	AFFINITÄTEN
P2ry1	ADP
P2ry2	UTP $\geq$ ATP > ATP $\gamma$ S
P2ry6	UDP; UTP $\gg$ ATP

ATP $\gamma$ S evozierten Oszillationen hatten mit einem  $\Delta F/F_0$  zwischen 2 und 4 eine markante Amplitude. Dies macht auch den P2ry2 wenig wahrscheinlich, da dieser Rezeptor eine nur geringe Affinität zu ATP $\gamma$ S hat. Somit ist der P2ry6 ein guter Kandidat, um die Oszillationen zu erklären. Eine abschließende Erklärung ist jedoch mit diesem Rezeptor nicht gefunden, da die Plateausignale nur an P4/5 und nur bei Stimulation mit ATP $\gamma$ S und an P18 bei Stimulation mit ATP gesehen wurden, der P2ry6 hingegen an allen gemessenen Altersstufen exprimiert ist. In der Zusammenschau muss die Expression eines weiteren Rezeptors postuliert werden.

Bei Messungen an den P2ry1-defizienten Cochleae kam es an P4/5 unter ATP-Stimulation zwar zu  $Ca^{2+}$ -Signalen, jedoch waren diese dysmorph und sehr verschieden von jenen, welche in Wildtyp-Cochleae beobachtet wurden. An P18 war das Antwortmuster des P2ry1-Knockout IDCs auf 10  $\mu$ M ATP hingegen nicht verschieden von dem der IDCs des Wildtyps. Dieser Widerspruch wirft unweigerlich die Frage nach der Penetranz des Knockout-Modells auf (gemessene Tiere entstammen unterschiedlichen Würfen). Da das Modell über keine Reporterfunktion verfügt (Abschnitt 3.1.3 auf Seite 25), gibt es keine Möglichkeit, post hoc das Funktionieren des Knockout nachzuweisen.

Insgesamt war das Antwortmuster bis P4/5 homogen. Anders jedoch nach dem Hörbeginn: An P18 kam es für ATP zu einem differentiellen Bild mit (i) einem einzelnen, großen Initialpeak (Abb. 29 a und Abb. 30 a) oder (ii) dem gleichen Initialpeak, welcher von regelmäßigen Oszillationen mit kleiner Amplitude gefolgt wurde (29 b und 30 b). Diese

Beobachtung lässt auf verschiedene Subpopulationen von IDCs schließen. Wie oben ausgeführt, lässt sich Antwortmuster i auch an P4/5 unter ATP $\gamma$ S-Stimulation beobachten und führt zu der Annahme, dass ein weiterer, bisher nicht bekannter, Rezeptor an P18 exprimiert sein sollte. Die von Huang et al. (2010) an P20 beschriebene Expression von P2ry6 kann die UTP-Oszillationen erklären.

Die in Huang et al. (2010) untersuchte die mittlere Altersstufe ist mit P6-P12 angegeben und es wird nicht klar, wann genau die Expression der beschriebenen Rezeptoren nachgewiesen wurde. Schließlich besteht zwischen der in der vorliegenden Studie gemessenen Stufe (P4/5, unreife Cochlea) und P12 (hörende Cochlea) ein erheblicher Entwicklungsunterschied. Als eine mögliche Trinukleotid-Quelle kämen die IDCs selbst in Betracht, welche über Pannexine ATP freisetzen könnten. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar.

Insgesamt handelt es sich bei den  $Ca^{2+}$ -Signalen um ein sehr komplexes Phänomen. Das oben Diskutierte ist als Vorschlag und keines Falls eine abschließende Erklärung des Phänomens zu verstehen. Zusammenfassend stellen die Interdentalzellen neben den Zellen des Kölliker-Organs, welche spontane  $Ca^{2+}$ -Wellen generieren und den Haarzellen, welche spontane  $Ca^{2+}$ -Aktionspotentiale erzeugen (Ceriani et al., 2019), eine weitere Quelle spontaner Aktivität in der Cochlea dar.

## Literatur

1. Abbracchio, M. P., Burnstock, G. (1998). Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 78:113–145
2. Alexandridis, P., Hatton, T. A. (1995). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: Thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96:1–46
3. Andrade, L. R., Salles, F. T., Grati, M., Manor, U., Kachar, B. (2016). Tectorins crosslink type II collagen fibrils and connect the tectorial membrane to the spiral limbus. *Journal of Structural Biology*, 194:139–146
4. Ashmore, J. F., Géléoc, G. S. G., Harbott, L. (2000). Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:11759–11764
5. Bargmann, W. (1977). *Histologie Und Mikroskopische Anatomie Des Menschen*. Thieme, Stuttgart, 7. überarbeitete Aufl.
6. Becker, L., Schnee, M. E., Niwa, M., Sun, W., Maxeiner, S., Talaei, S., Kachar, B., Rutherford, M. A., Ricci, A. J. (2018). The presynaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse. *eLife*, 7:e30241
7. Bélanger, L. F. (1953). Autoradiographic Detection of S35 in the Membranes of the Inner Ear of the Rat. *Science*, 118:520–521
8. Bélanger, L. F. (1956). On the Intimate Composition of Membranes of the Inner Ear. *Science*, 123:1074–1074
9. Bodratti, A. M., Alexandridis, P. (2018). Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 9:11
10. Borlinghaus, R. T. (2017). Pinhole Effect in Confocal Microscopes
11. Brandt, A., Striessnig, J., Moser, T. (2003). CaV1.3 Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells. *Journal of Neuroscience*, 23:10832–10840
12. Buerbank, S., Becker, K., Becker, C.-M., Brandt, N., Engel, J., Knipper, M., Schick, B., Dlugaczky, J. (2011). Developmental regulation of glycine receptors at efferent synapses of the murine cochlea. *Histochemistry and Cell Biology*, 136:387
13. Burnstock, G. (1972). Purinergic Nerves. *Pharmacological Reviews*, 24:509–581
14. Burnstock, G., Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology: The Vascular System*, 16:433–440

15. Ceriani, F., Hendry, A., Jeng, J.-Y., Johnson, S. L., Stephani, F., Olt, J., Holley, M. C., Mammano, F., Engel, J., Kros, C. J., Simmons, D. D., Marcotti, W. (2019). Coordinated calcium signalling in cochlear sensory and non-sensory cells refines afferent innervation of outer hair cells. *The EMBO Journal*, e99839
16. Chen, J., Zhu, Y., Liang, C., Chen, J., Zhao, H.-B. (2015). Pannexin1 channels dominate ATP release in the cochlea ensuring endocochlear potential and auditory receptor potential generation and hearing. *Scientific reports*, 5:10762–10762
17. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacological Reviews*, 63:641–683
18. Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin*, 112:155–159
19. Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Leibovici, M., Petit, C. (1997). Otogelin: A glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:14450–14455
20. Danoff, S. K., Ross, C. A. (1994). The inositol trisphosphate receptor gene family: Implications for normal and abnormal brain function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 18:1–16
21. Davis, H. (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hearing Research*, 9:79–90
22. Dayaratne, M. W. N., Vlajkovic, S. M., Lipski, J., Thorne, P. R., Dayaratne, M. W. N., Vlajkovic, S. M., Lipski, J., Thorne, P. R. (2014). Kölliker’s Organ and the Development of Spontaneous Activity in the Auditory System: Implications for Hearing Dysfunction. *BioMed Research International*, BioMed Research International, 2014:e367939
23. Deutzmann, R., Bruckner, P. (2014). Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L. (Hg.), Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Lehrbuch, 931–951. Springer Berlin Heidelberg, 9. Aufl.
24. Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:1222
25. Eberhard, M., Erne, P. (1989). Kinetics of calcium binding to fluo-3 determined by stopped-flow fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163:309–314
26. Encke, J., Kreh, J., Völk, F., Hemmert, W. (2016). Codierung von Schallsignalen in Aktionspotenziale des auditorischen Nervs. *HNO*, 64:808–814
27. Fettiplace, R. (2016). Is TMC1 the Hair Cell Mechanotransducer Channel? *Biophysical Journal*, 111:3–9

28. Fettiplace, R., Kim, K. X. (2014). The Physiology of Mechanoelectrical Transduction Channels in Hearing. *Physiological Reviews*, 94:951–986
29. Fuchs, P. A. (Hg.) (2010). *Oxford Handbook of Auditory Science: The Ear*. Oxford University Press, Oxford ; New York, 1. Aufl.
30. Geisler, C. D. (1998). *From Sound to Synapse: Physiology of the Mammalian Ear*. Oxford University Press, New York, 1. Aufl.
31. Goodyear, R. J., Lu, X., Deans, M. R., Richardson, G. P. (2017). A tectorin-based matrix and planar cell polarity genes are required for normal collagen-fibril orientation in the developing tectorial membrane. *Development*, 144:3978–3989
32. Goodyear, R. J., Richardson, G. P. (2002). Extracellular matrices associated with the apical surfaces of sensory epithelia in the inner ear: Molecular and structural diversity. *Journal of Neurobiology*, 53:212–227
33. Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B., Gómez-Casati, M. E. (2015). Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Letters*, 589:3354–3361
34. Hardesty, I. (1908). On the nature of the tectorial membrane and its probable role in the anatomy of hearing. *American Journal of Anatomy*, 8:109–179
35. Hayashi, H., Schrott-Fischer, A., Glueckert, R., Liu, W., Salvenmoser, W., Santi, P., Rask-Andersen, H. (2015). Molecular organization and fine structure of the human tectorial membrane: Is it replenished? *Cell and Tissue Research*, 362:513–527
36. Heckmann, M., Dudel, J. (2010). Synaptische Übertragung. In Schmidt, R. F., Lang, F., Heckmann, M. (Hg.), *Physiologie des Menschen*, 76–97. Springer, Heidelberg, 31. Aufl.
37. Held, H. (1926). Die Cochlea der Säuger und der Vögel, ihre Entwicklung und ihr Bau. In v Buddenbrock, W., Fischer, M. H., v Frey, M., v Frisch, K., Gildemeister, M., Goldscheider, A., Grahe, K., Held, H., Henning, H., Herter, H., Hofmann, F. B., v Hornbostel, E. M., Jost, L., Kleyn, A. D., Koehler, W., Kolmer, W., Kreidl, A., Kümmel, W., Magnus, R., Mangold, E., Masuda, T., Rhese, H., Rohrer, F., Runge, H., Seybold, A., Sierp, H., v Skramlik, E., Stark, P., Teufer, J., Waetzmann, E., v Weizsaecker, V., Zarniko, C. (Hg.), *Receptionsorgane I, Handbuch der Normalen und Pathologischen Physiologie*, 467–534. J.F. Bergmann-Verlag, Berlin, Heidelberg
38. Housley, G. D. (2000). Physiological Effects Of Extracellular Nucleotides In The Inner Ear. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27:575–580
39. Huang, L.-C., Thorne, P. R., Vljakovic, S. M., Housley, G. D. (2010). Differential expression of P2Y receptors in the rat cochlea during development. *Purinergic signalling*, 6:231–248
40. Huh, M. (2018). The relationships between cognitive function and hearing loss among the elderly. *Journal of Physical Therapy Science*, 30:174–176

41. Ilberg, C. (1968). Elektronenmikroskopische untersuchungen über diffusion und resorption von thoriumdioxid an der meerschweinchenschnecke. *Archiv für klinische und experimentelle Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde*, 192:163–175
42. Iurato, S. (1960). Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 52:105–128
43. Iurato, S. (1962). Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 56:40–96
44. Jean, P., de la Morena, D. L., Michanski, S., Tobón, L. M. J., Chakrabarti, R., Picher, M. M., Neef, J., Jung, S., Gültas, M., Maxeiner, S., Neef, A., Wichmann, C., Strenzke, N., Grabner, C., Moser, T. (2018). The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision. *eLife*, 7:e29275
45. Johnson, S. L., Wedemeyer, C., Vetter, D. E., Adachi, R., Holley, M. C., Elgoyhen, A. B., Marcotti, W. (2013). Cholinergic efferent synaptic transmission regulates the maturation of auditory hair cell ribbon synapses. *Open Biology*, 3
46. Kawashima, Y., Géléoc, G. S. G., Kurima, K., Labay, V., Lelli, A., Asai, Y., Makishima, T., Wu, D. K., Santana, C. C. D., Holt, J. R., Griffith, A. J. (2011). Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *The Journal of Clinical Investigation*, 121:4796–4809
47. Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., Takasaka, T., Adams, J. C. (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Research Reviews*, 32:163–166
48. Kimura, R. S. (1966). Hairs of the Cochlear Sensory Cells and Their Attachment to the Tectorial Membrane. *Acta Oto-Laryngologica*, 61:55–72
49. Kitajiri, S.-i., Furuse, M., Morita, K., Saishin-Kiuchi, Y., Kido, H., Ito, J., Tsukita, S. (2004). Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hearing Research*, 187:25–34
50. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S. (Hg.) (2010). *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Aufl.
51. Knipper, M., Richardson, G., Mack, A., Müller, M., Goodyear, R., Limberger, A., Rohbock, K., Köpschall, I., Zenner, H. P., Zimmermann, U. (2001). Thyroid hormone-deficient period prior to the onset of hearing is associated with reduced levels of beta-tectorin protein in the tectorial membrane: Implication for hearing loss. *The Journal of biological chemistry*, 276:39046–39052
52. Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münkner, S., Knipper, M., Engel, J. (2007). Persistence of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> Channels in Mature Outer Hair Cells Supports Outer Hair Cell Afferent Signaling. *Journal of Neuroscience*, 27:6442–6451
53. Kronester-Frei, A. (1978). Ultrastructure of the different zones of the tectorial membrane. *Cell and Tissue Research*, 193:11–23

54. Kronester-Frei, A. (1979a). The effect of changes in endolymphatic ion concentrations on the tectorial membrane. *Hearing Research*, 1:81–94
55. Kronester-Frei, A. (1979b). Localization of the marginal zone of the tectorial membrane in situ, unfixed, and with in vivo-like ionic milieu. *Archives of oto-rhino-laryngology*, 224:3–9
56. Lim, D. J. (1970). Morphology and function of the interdental cell - an ultrastructural observation. *The Journal of laryngology and otology*, 84:1241–1256
57. Lim, D. J. (1972). Fine morphology of the tectorial membrane: Its relationship to the organ of corti. *Archives of Otolaryngology*, 96:199–215
58. Lim, D. J. (1987). Development of the tectorial membrane. *Hearing Research*, 28:9–21
59. Lim, D. J., Anniko, M. (1985). Developmental Morphology of the Mouse Inner Ear: A scanning electron microscopic observation. *Acta Oto-Laryngologica*, 99:5–69
60. Lim, R., Brichta, A. M. (2016). Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hearing Research*, 338:9–21
61. Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. Taschenlehrbuch. Thieme, Stuttgart [u.a.], 3., vollst. überarb. Aufl. Aufl.
62. Majumder, P., Crispino, G., Rodriguez, L., Ciubotaru, C. D., Anselmi, F., Piazza, V., Bortolozzi, M., Mammano, F. (2010). ATP-mediated cell–cell signaling in the organ of Corti: The role of connexin channels. *Purinergic Signalling*, 6:167–187
63. Mann, H. B., Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18:50–60
64. Marchand, P., Marmet, L. (1983). Binomial smoothing filter: A way to avoid some pitfalls of least-squares polynomial smoothing. *Review of Scientific Instruments*, 54:1034–1041
65. McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P. M., Green, G. E., Shpargel, K. B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R. F., Lynch, E., King, M.-C., Brunner, H. G., Cremers, C. W. R. J., Takanosu, M., Li, S.-W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D. J., Camp, G. V., Smith, R. J. H. (1999). Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nature Genetics*, 23:413–419
66. McMahon, S. M., Jackson, M. B. (2014). In situ Ca<sup>2+</sup> titration in the fluorometric study of intracellular Ca<sup>2+</sup> binding. *Cell Calcium*, 56:504–512
67. Messenger, S. W., Falkowski, M. A., Groblewski, G. E. (2014). Ca<sup>2+</sup>-regulated secretory granule exocytosis in pancreatic and parotid acinar cells. *Cell Calcium*, 55:369–375

68. Mikaelian, D., Ruben, R. J. (1965). Development of Hearing in the Normal Cba-J Mouse: Correlation of Physiological Observations with Behavioral Responses and with Cochlear Anatomy. *Acta Oto-Laryngologica*, 59:451–461
69. Minta, A., Kao, J. P., Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264:8171–8178
70. Muñoz, D. J. B., Thorne, P. R., Housley, G. D., Billett, T. E. (1995). Adenosine 5'-triphosphate (ATP) concentrations in the endolymph and perilymph of the guinea-pig cochlea. *Hearing Research*, 90:119–125
71. Nadol, J. B. (1979). Intercellular Fluid Pathways in the Organ of Corti of Cat and Man. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 88:2–11
72. Nagy, A. (2000). Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26:99–109. PMID:
73. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell*, 102:89–97
74. Prieto, J. J., Rueda, J., Merchan, J. A. (1990). Two different secretion mechanisms in the inner ear's interdental cells. *Hearing Research*, 45:51–61
75. Puel, J.-L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Progress in Neurobiology*, 47:449–476
76. Putz, R., Pabst, R. (2007). Sobotta - Der komplette Atlas der Anatomie des Menschen in einem Band mit StudentConsult-Zugang: Allgemeine Anatomie - Bewegungsapparat - Innere Organe - Neuroanatomie. Urban & Fischer bei Elsevier, München; Jena, 22. neu bearbeitete auflage Aufl.
77. Raphael, Y., Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin*, 60:397–422
78. Rau, A., Legan, P. K., Richardson, G. P. (1999). Tectorin mRNA expression is spatially and temporally restricted during mouse inner ear development. *Journal of Comparative Neurology*, 405:271–280
79. Richardson, G., Lukashkin, A., Russell, I. (2008). The tectorial membrane: One slice of a complex cochlear sandwich. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16:458–464
80. Richardson, G. P., Russell, I. J., Duance, V. C., Bailey, A. J. (1987). Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hearing Research*, 25:45–60
81. Saladin, K. S. (2014). *Human Anatomy*. McGraw-Hill, New York, fourth edition. Aufl. HOLLIS number: 014134506

82. Santi, P. A., Aldaya, R., Brown, A., Johnson, S., Stromback, T., Cureoglu, S., Rask-Andersen, H. (2016). Scanning Electron Microscopic Examination of the Extracellular Matrix in the Decellularized Mouse and Human Cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 17:159–171
83. Schiebler, T. H., Korf, H.-W. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Steinkopff, Darmstadt, aufgabe: 10., vollst. überarb. aufl. 2007 Aufl.
84. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9:676
85. Schmitz, F., Königstorfer, A., Südhof, T. C. (2000). RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function. *Neuron*, 28:857–872
86. Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Research*, 23:5080–5081
87. Sellick, P. M., Johnstone, B. M. (1975). Production and role of inner ear fluid. *Progress in Neurobiology*, 5:337–362
88. Sendin, G., Bourien, J., Rassendren, F., Puel, J.-L., Nouvian, R. (2014). Spatiotemporal pattern of action potential firing in developing inner hair cells of the mouse cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:1999–2004
89. Singh, P. (2018). Reply from Abcam to your enquiry regarding ab55917, ab124969 [CCE12738956]
90. Smith, N. A., Kress, B. T., Lu, Y., Chandler-Militello, D., Benraiss, A., Nedergaard, M. (2018). Fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators directly inhibit the Na,K-ATPase and disrupt cellular functions. *Sci. Signal.*, 11:eaal2039
91. Somogyi, P., Takagi, H. (1982). A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience*, 7:1779–1783
92. Spicer, S. S., Schulte, B. A. (1998). Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hearing Research*, 118:1–12
93. Spicer, S. S., Thomopoulos, G. N., Schulte, B. A. (2000). Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hearing Research*, 143:147–161
94. Surprenant, A., North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual Review of Physiology*, 71:333–359

95. Sziklai, I., Tóth, T., Zimmermann, U. (2003). Auswirkungen der Hörforschung auf die klinische Arbeit. *HNO*, 51:456–461
96. Thomas, A. P., Bird, G. S., Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Putney, J. W. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *The FASEB Journal*, 10:1505–1517
97. Thorn, L., Arnold, W., Schinko, I., Wetzstein, R. (1979). The limbus spiralis and its relationship to the developing tectorial membrane in the cochlear duct of the guinea pig fetus. *Anatomy and Embryology*, 155:303–310
98. Trepel, M. (2012). *Neuroanatomie: Struktur Und Funktion*. Elsevier, Urban & Fischer, München, 5. Aufl.
99. Tritsch, N. X., Zhang, Y.-X., Ellis-Davies, G., Bergles, D. E. (2010). ATP-induced morphological changes in supporting cells of the developing cochlea. *Purinergic Signalling*, 6:155–166
100. Verpy, E., Leibovici, M., Michalski, N., Goodyear, R. J., Houdon, C., Weil, D., Richardson, G. P., Petit, C. (2011). Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *The Journal of Comparative Neurology*, 519:194–210
101. Voldrich, L. (1967). Morphology and Function of the Epithelium of the Limbus Spiralis Cochleae L. Voldřich. *Acta Oto-Laryngologica*, 63:503–514
102. von Kügelgen, I., Hoffmann, K. (2015). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*
103. Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S. E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., Oberwinkler, J., Vennekens, R., Gudermann, T., Nilius, B., Voets, T. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron*, 70:482–494
104. Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y. (2012). RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14:22–29
105. Wang, H. C., Bergles, D. E. (2015). Spontaneous activity in the developing auditory system. *Cell and Tissue Research*, 361:65–75
106. Wang, X.-H., Streeter, M., Liu, Y.-P., Zhao, H.-B. (2009). Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *The Journal of Comparative Neurology*, 512:336–346
107. Wangemann, P. (2006). Supporting sensory transduction: Cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *The Journal of Physiology*, 576:11–21

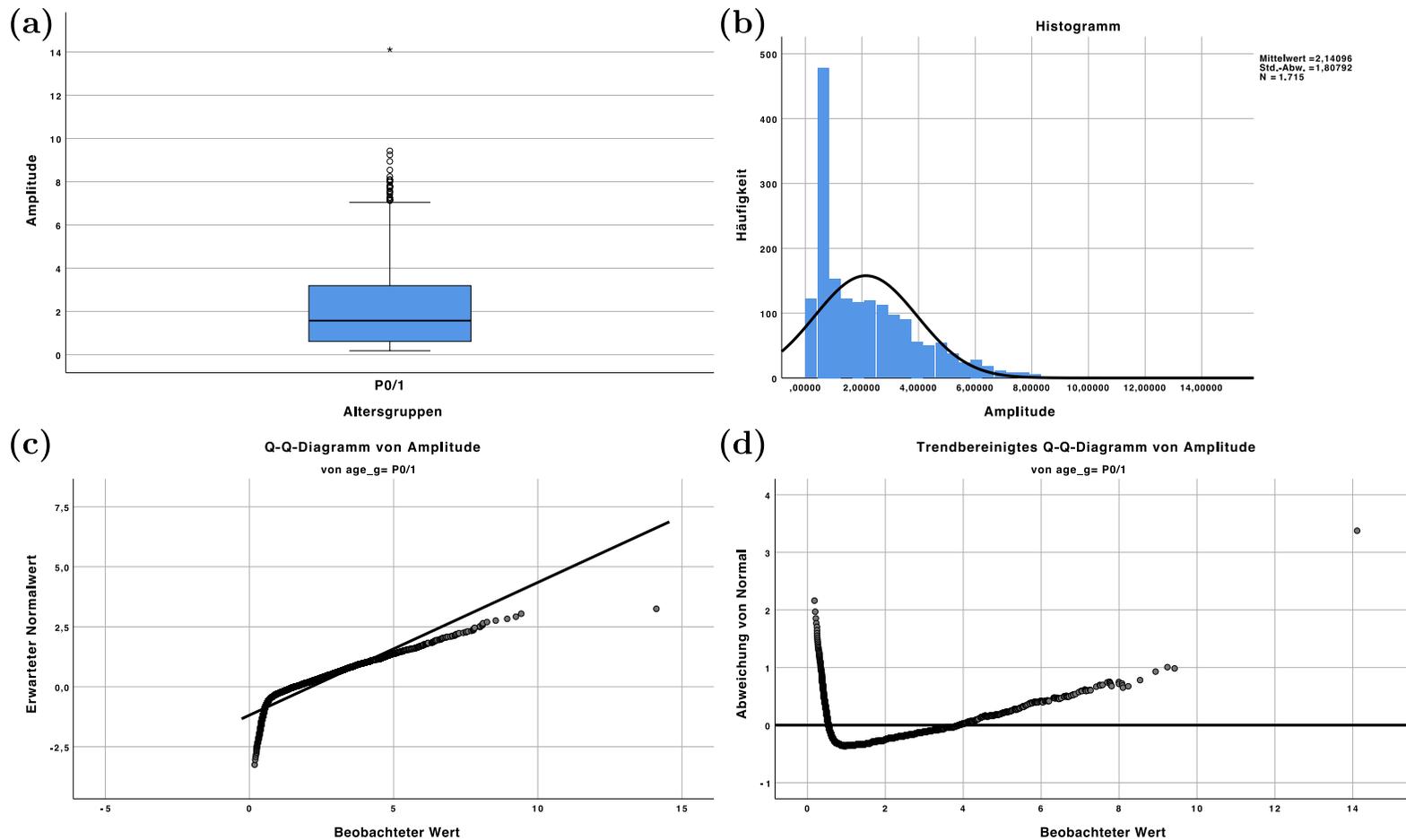
108. Winter, H., Rüttiger, L., Müller, M., Kuhn, S., Brandt, N., Zimmermann, U., Hirt, B., Bress, A., Sausbier, M., Conscience, A., Flamant, F., Tian, Y., Zuo, J., Pfister, M., Ruth, P., Löwenheim, H., Samarut, J., Engel, J., Knipper, M. (2009). Deafness in TR $\beta$  Mutants Is Caused by Malformation of the Tectorial Membrane. *The Journal of Neuroscience*, 29:2581–2587
109. Zenner, H.-P. (2011). Die Kommunikation des Menschen: Hören und Sprechen. In Schmidt, R. F., Lang, F., Heckmann, M. (Hg.), *Physiologie des Menschen*, Springer-Lehrbuch, 315–335. Springer Berlin Heidelberg, 31. Aufl.
110. Zhao, H.-B. (2016). Expression and function of pannexins in the inner ear and hearing. *BMC Cell Biology*, 17:16
111. Zheng, J., Shen, W., He, D. Z. Z., Long, K. B., Madison, L. D., Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405:149–155
112. Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X. Z., Nouaille, S., Nance, W. E., Kanaan, M., Avraham, K. B., Tekaia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., Petit, C. (2002). Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:6240–6245

## Anhang

### Explorative Datenanalyse der spontanen Amplituden an P0/1

**Tabelle 15: Deskriptive Statistik der spontanen Amplituden an P0/1.** Die deskriptiven Statistik stellte einen Teil der Datenexploration dar. Std.-Fehler ist der Standard-Fehler. Quelle: TSM.

PARAMETER		STATISTIK	STD.-FEHLER
Mittelwert		2,140958	0,04365622
95 %-Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	2,055333	
	Obergrenze	2,226583	
5 % getrimmtes Mittel		1,978187	
Median		1,572990	
Varianz		3,268559	
Std.-Abweichung		1,807916	
Minimum		0,179296	
Maximum		14,113700	
Spannweite		13,934404	
Interquartilbereich		2,578305	
Schiefe		1,245535	0,033555
Kurtosis		1,660914	0,067097



**Abbildung 58: Explorative Analyse spontaner Amplituden an P0/1.** **a**, Der Box-Whisker-Plot der Amplituden suggeriert, dass die obere Datenhälfte weiter gestreut ist, als die unteren 50 %. **b**, Das Histogramm bestätigt den Eindruck einer rechtsschiefen Verteilung. Die Verteilung weicht ferner deutlich von der überlagerten Glockenkurve ab. Es könnten u. U. zwei oder mehrere Überlagerte Verteilungen vorliegen. **c und d**, Das Q-Q-Diagramm und das trendbereinigte Q-Q-Diagramm zeigen eine deutlich schiefe, von der bei Normalverteilung geforderten Geraden abweichende Form auf. Quelle: TSM.

## Teststatistiken

**Tabelle 16: Parameter der Teststatistiken zu spontanen  $Ca^{2+}$ -Transienten.** Die Tabelle stellt die Parameter der Mann-Whitney-U-Tests zu den Altersgruppen untereinander dar: U-Wert des Tests (U), Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau ( $p_K$ ) und Effektstärke ( $r$ , Formel 6). Quelle: TSM.

GRUPPENVARIABLE	MERKMAL	TESTPARAMETER		
		U	$p_K$	$r$
$\frac{P0/1}{P4/5}$	Amplitude $\Delta F/F_0$	4.249.820,50	$\leq 0,001$	0,05
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	4.242.204,00	$\leq 0,001$	0,05
	time to peak (s)	2.912.889,00	$\leq 0,001$	0,27
	Peakdauer (s)	1.882.486,50	$\leq 0,001$	0,44
	Abklingzeit (s)	2.098.888,50	$\leq 0,001$	0,40
$\frac{P4/5}{P18}$	Amplitude $\Delta F/F_0$	2.080.503,00	$\leq 0,001$	0,33
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	3.568.380,00	$\leq 0,001$	0,05
	time to peak (s)	3.164.305,50	$\leq 0,001$	0,13
	Peakdauer (s)	2.766.576,50	$\leq 0,001$	0,20
	Abklingzeit (s)	2.788.032,00	$\leq 0,001$	0,20
$\frac{P0/1}{P18}$	Amplitude $\Delta F/F_0$	646.655,00	$\leq 0,001$	0,41
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	1.061.414,50	$\leq 0,001$	0,13
	time to peak (s)	604.199,00	$\leq 0,001$	0,44
	Peakdauer (s)	272.210,50	$\leq 0,001$	0,67
	Abklingzeit (s)	339.318,50	$\leq 0,001$	0,63

$n_{P0/1} = 1715; n_{P4/5} = 5326; n = 1451$

**Tabelle 17: Parameter der Teststatistiken zu den Altersgruppen.** Die Tabelle stellt die Parameter der Mann-Whitney-U-Tests zu den Altersgruppen untereinander dar: U-Wert des Tests ( $U$ ), Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau ( $p_K$ ) und Effektstärke ( $r$ , Formel 6). Quelle: TSM.

			MERKMAL	TESTPARAMETER		
	[c]			$U$	$p_K$	$r$
$\frac{P_{0/1}}{P_{4/5}}$	ATP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	10.155.861,50	$\leq 0,001$	0,10
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	9.726.363,00	$\leq 0,001$	0,13
			time to peak (s)	9.930.492,00	$\leq 0,001$	0,12
			Peakdauer (s)	7.909.479,50	$\leq 0,001$	0,27
			Abklingzeit (s)	7.540.665,00	$\leq 0,001$	0,29
			Interspike Interval (s)	4.708.158,00	$\leq 0,001$	0,11
	10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	29.977.047,00	$\leq 0,001$	0,08	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	33.5572.034,00	$> 0,05$	$\leq 0,01$	
		time to peak (s)	27.504.301,00	$\leq 0,001$	0,13	
		Peakdauer (s)	17.656.316,00	$\leq 0,001$	0,33	
		Abklingzeit (s)	15.760.938,00	$\leq 0,001$	0,36	
		Interspike Interval (s)	8.725.705,00	$\leq 0,001$	0,40	
	UTP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	1.027.197,50	$\leq 0,001$	0,07
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	1.070.771,50	$\leq 0,01$	0,05
			time to peak (s)	784.328,00	$\leq 0,01$	0,21
			Peakdauer (s)	485.385,00	$\leq 0,01$	0,34
			Abklingzeit (s)	473.294,50	$\leq 0,01$	0,39
			Interspike Interval (s)	285.796,50	$\leq 0,001$	0,18
10 $\mu M$		Amplitude $\Delta F/F_0$	22.531.785,00	$\leq 0,001$	0,34	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	33.512.011,50	$\leq 0,001$	0,19	
		time to peak (s)	17.193.134,50	$\leq 0,001$	0,41	
		Peakdauer (s)	6.617.837,00	$\leq 0,001$	0,55	
		Abklingzeit (s)	6.811.005,00	$\leq 0,001$	0,55	
		Interspike Interval (s)	14.744.390,50	$\leq 0,001$	0,31	

ATP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4078$ ;  $n_{P_{4/5}} = 5646$ ;  $n_{P_{18}} = 972$ ; ATP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4002$ ;  $n_{P_{4/5}} = 16957$ ;  $n_{P_{18}} = 2013$ ; UTP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 690$ ;  $n_{P_{4/5}} = 3355$ ;  $n_{P_{18}} = 254$ ; UTP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4280$ ;  $n_{P_{4/5}} = 22263$ ;  $n_{P_{18}} = 826$

## Altersgruppenteststatistiken - Fortsetzung. Quelle: TSM.

			Testparameter			
	[c]	Merkmal	$U$	$p_K$	$r$	
$\frac{P_{4/5}}{P_{18}}$	ATP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	854.173,00	$\leq 0,001$	0,42
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	2.412.975,50	$\leq 0,001$	0,07
			time to peak (s)	2.188.269,50	$\leq 0,001$	0,12
			Peakdauer (s)	2.125.850,00	$\leq 0,001$	0,14
			Abklingzeit (s)	2.121.754,50	$\leq 0,001$	0,14
			Interspike Interval (s)	733.179,00	$\leq 0,001$	0,25
		10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	3.801.928,00	$\leq 0,001$	0,41
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	12.452.539,50	$\leq 0,001$	0,14
			time to peak (s)	16.627.759,00	$> 0,05$	0,01
			Peakdauer (s)	15.601.154,50	$\leq 0,001$	0,05
			Abklingzeit (s)	13.754.959,00	$\leq 0,001$	0,10
			Interspike Interval (s)	10.689.147,00	$\leq 0,001$	0,07
	UTP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	68.356,50	$\leq 0,001$	0,37
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	340.177,50	$\leq 0,001$	0,09
			time to peak (s)	331.706,50	$\leq 0,001$	0,10
			Peakdauer (s)	377.936,00	$\leq 0,01$	0,05
			Abklingzeit (s)	315.830,00	$\leq 0,01$	0,11
			Interspike Interval (s)	168.090,50	$> 0,05$	$\leq 0,01$
		10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	3.544.730,00	$\leq 0,001$	0,20
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	8.444.528,00	$\leq 0,001$	0,03
			time to peak (s)	8.425.730,50	$\leq 0,001$	0,03
			Peakdauer (s)	9.204.954,00	$> 0,05$	$\leq 0,01$
			Abklingzeit (s)	8.658.821,00	$\leq 0,01$	0,02
			Interspike Interval (s)	5.696.304,50	$\leq 0,001$	0,05

ATP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4078$ ;  $n_{P_{4/5}} = 5646$ ;  $n_{P_{18}} = 972$ ; ATP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4002$ ;  $n_{P_{4/5}} = 16957$ ;  $n_{P_{18}} = 2013$ ; UTP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 690$ ;  $n_{P_{4/5}} = 3355$ ;  $n_{P_{18}} = 254$ ; UTP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4280$ ;  $n_{P_{4/5}} = 22263$ ;  $n_{P_{18}} = 826$

## Altersgruppenteststatistiken - Fortsetzung. Quelle: TSM.

			Testparameter			
	[c]	Merkmal	$U$	$p_K$	$r$	
$\frac{P_{0/1}}{P_{18}}$	ATP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	854.173,00	$\leq 0,001$	0,42
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	2.412.975,50	$\leq 0,001$	0,07
			time to peak (s)	2.188.269,50	$\leq 0,001$	0,12
			Peakdauer (s)	2.125.850,00	$\leq 0,001$	0,14
			Abklingzeit (s)	2.121.754,50	$\leq 0,001$	0,14
			Interspike Interval (s)	293.823,00	$\leq 0,001$	0,41
	10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	702.489,00	$\leq 0,001$	0,67	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	2.905.154,00	$\leq 0,001$	0,23	
		time to peak (s)	3.465.935,00	$\leq 0,001$	0,11	
		Peakdauer (s)	2.257.843,00	$\leq 0,001$	0,40	
		Abklingzeit (s)	1.858.243,00	$\leq 0,001$	0,44	
		Interspike Interval (s)	910.922,00	$\leq 0,001$	0,53	
	UTP	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	17.045,00	$\leq 0,001$	0,62
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	75.244,00	$\leq 0,001$	0,11
			time to peak (s)	82.198,50	$> 0,05$	0,05
			Peakdauer (s)	37.799,50	$\leq 0,001$	0,44
			Abklingzeit (s)	27.191,50	$\leq 0,001$	0,53
			Interspike Interval (s)	16.186,00	$\leq 0,001$	0,22
10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	240.352,00	$\leq 0,001$	0,55		
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	1.462.998,50	$\leq 0,001$	0,11		
	time to peak (s)	828.488,00	$\leq 0,001$	0,34		
	Peakdauer (s)	308.053,00	$\leq 0,001$	0,53		
	Abklingzeit (s)	292.804,00	$\leq 0,001$	0,53		
	Interspike Interval (s)	385.738,50	$\leq 0,001$	0,41		

ATP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4078$ ;  $n_{P_{4/5}} = 5646$ ;  $n_{P_{18}} = 972$ ; ATP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4002$ ;  $n_{P_{4/5}} = 16957$ ;  $n_{P_{18}} = 2013$ ; UTP 1  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 690$ ;  $n_{P_{4/5}} = 3355$ ;  $n_{P_{18}} = 254$ ; UTP 10  $\mu M$ :  $n_{P_{0/1}} = 4280$ ;  $n_{P_{4/5}} = 22263$ ;  $n_{P_{18}} = 826$

**Tabelle 18: Agonisten im Vergleich - Teststatistiken.** Die Tabelle stellt die Parameter der Mann-Whitney-U-Tests zu den Agonistengruppen untereinander dar. U-Wert des Tests (U), Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau ( $p_K$ ) und Effektstärke ( $r$ , Formel 6). Quelle: TSM.

			MERKMAL	TESTPARAMETER		
				$U$	$p_K$	$r$
P0/1	$\frac{1}{10} \mu M$	ATP	Amplitude $\Delta F/F_0$	5.668.388,50	$\leq 0,001$	0,26
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	7.365.877,00	$\leq 0,001$	0,08
			time to peak (s)	8.047.770,50	$> 0,05$	0,01
			Peakdauer (s)	7.117.097,50	$\leq 0,001$	0,11
			Abklingzeit (s)	6.953.635,00	$\leq 0,001$	0,13
			Interspike Interval (s)	2.867.892,00	$\leq 0,001$	0,19
	UTP	Amplitude $\Delta F/F_0$	742.267,50	$\leq 0,001$	0,30	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	1.331.183,00	$\leq 0,001$	0,06	
		time to peak (s)	1.246.786,50	$\leq 0,001$	0,09	
		Peakdauer (s)	1.311.965,50	$\leq 0,001$	0,07	
		Abklingzeit (s)	1.376.779,50	$\leq 0,05$	0,04	
		Interspike Interval (s)	496.263,50	$> 0,05$	0,02	
	$\frac{ATP}{UTP}$	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	1.324.769,50	$\leq 0,05$	0,04
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	1.246.921,00	$\leq 0,001$	0,07
			time to peak (s)	1.142.247,50	$\leq 0,001$	0,11
			Peakdauer (s)	1.107.222,00	$\leq 0,001$	0,13
			Abklingzeit (s)	1.169.042,50	$\leq 0,010$	0,10
			Interspike Interval (s)	376.686,50	$> 0,05$	0,05
10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	6.740.240,50	$\leq 0,001$	0,18		
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	7.625.824,00	$\leq 0,001$	0,09		
	time to peak (s)	8.457.641,00	$> 0,05$	0,01		
	Peakdauer (s)	8.289.533,50	$\leq 0,05$	0,03		
	Abklingzeit (s)	8.193.937,50	$\leq 0,01$	0,04		
	Interspike Interval (s)	3.922.255,00	$\leq 0,001$	0,12		

P0/1 ATP:  $n_{1 \mu M} = 4078$ ;  $n_{10 \mu M} = 4002$ ; P0/1 UTP:  $n_{1 \mu M} = 690$ ;  $n_{10 \mu M} = 4280$ ; P4/5 ATP:  $n_{1 \mu M} = 5646$ ;  $n_{10 \mu M} = 16957$ ; P4/5 UTP:  $n_{1 \mu M} = 3355$ ;  $n_{10 \mu M} = 22263$ ; P18 ATP:  $n_{1 \mu M} = 972$ ;  $n_{10 \mu M} = 2013$ ; P18 UTP:  $n_{1 \mu M} = 254$ ;  $n_{10 \mu M} = 828$

Agonistenteststatistiken - Fortsetzung. Quelle: TSM.

		Merkmal		Testparameter		
				$U$	$p_K$	$r$
P4/5	$\frac{1}{10} \mu M$	ATP	Amplitude $\Delta F/F_0$	46.602.506,00	$\leq 0,01$	0,02
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	36.806.074,00	$\leq 0,001$	0,17
			time to peak (s)	45.923.331,50	$\leq 0,001$	0,03
			Peakdauer (s)	40.843.890,50	$\leq 0,001$	0,11
			Abklingzeit (s)	40.359.908,50	$\leq 0,001$	0,12
			Interspike Interval (s)	16.497.720,50	$\leq 0,001$	0,37
	UTP	Amplitude $\Delta F/F_0$	31.603.379,00	$\leq 0,001$	0,09	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	32.691.077,00	$\leq 0,001$	0,07	
		time to peak (s)	28.295.169,50	$\leq 0,001$	0,14	
		Peakdauer (s)	23.194.526,00	$\leq 0,001$	0,22	
		Abklingzeit (s)	23.383.639,50	$\leq 0,001$	0,22	
		Interspike Interval (s)	21.408.189,00	$\leq 0,001$	0,11	
	$\frac{ATP}{UTP}$	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	8.665.995,00	$\leq 0,001$	0,07
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	9.272.019,50	$> 0,05$	0,02
			time to peak (s)	6.965.870,50	$\leq 0,001$	0,22
			Peakdauer (s)	6.805.969,00	$\leq 0,001$	0,24
			Abklingzeit (s)	7.252.649,00	$\leq 0,001$	0,20
			Interspike Interval (s)	4.339.550,50	$\leq 0,001$	0,18
10 $\mu M$		Amplitude $\Delta F/F_0$	139.394.873,00	$\leq 0,001$	0,22	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	118.098.316,00	$\leq 0,001$	0,32	
		time to peak (s)	96.156.232,50	$\leq 0,001$	0,42	
		Peakdauer (s)	89.488.130,00	$\leq 0,001$	0,41	
		Abklingzeit (s)	104.281.178,00	$\leq 0,001$	0,38	
		Interspike Interval (s)	128.762.984,00	$\leq 0,001$	0,17	

P0/1 ATP:  $n_{1 \mu M} = 4078$ ;  $n_{10 \mu M} = 4002$ ; P0/1 UTP:  $n_{1 \mu M} = 690$ ;  $n_{10 \mu M} = 4280$ ; P4/5 ATP:  $n_{1 \mu M} = 5646$ ;  $n_{10 \mu M} = 16957$ ; P4/5 UTP:  $n_{1 \mu M} = 3355$ ;  $n_{10 \mu M} = 22263$ ; P18 ATP:  $n_{1 \mu M} = 972$ ;  $n_{10 \mu M} = 2013$ ; P18 UTP:  $n_{1 \mu M} = 254$ ;  $n_{10 \mu M} = 828$

## Agonistenteststatistiken - Fortsetzung. Quelle: TSM.

		Merkmal	Testparameter		
			$U$	$p_K$	$r$
$\frac{\text{ATP}}{\text{ATP}\gamma\text{S}}$	10 $\mu\text{M}$	Amplitude $\Delta F/F_0$	62.183.062,50	$\leq 0,001$	0,53
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	143.786.167,00	$\leq 0,001$	0,10
		time to peak (s)	149.357.903,00	$\leq 0,001$	0,07
		Peakdauer (s)	109.153.844,00	$\leq 0,001$	0,28
		Abklingzeit (s)	93.575.186,50	$\leq 0,001$	0,37
		Interspike Interval (s)	100.218.837,00	$\leq 0,001$	0,24

P0/1 ATP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 4078$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 4002$ ; P0/1 UTP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 690$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 4280$ ; P4/5 ATP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 5646$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 16957$ ; P4/5 UTP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 3355$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 22263$ ; P18 ATP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 972$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 2013$ ; P18 UTP:  $n_{1 \mu\text{M}} = 254$ ;  $n_{10 \mu\text{M}} = 828$

## Agonistenteststatistiken - Fortsetzung. Quelle: TSM.

		Merkmal		Testparameter		
				$U$	$p_K$	$r$
P18	$\frac{1}{10} \mu M$	ATP	Amplitude $\Delta F/F_0$	905.319,50	$\leq 0,001$	0,06
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	908.721,00	$\leq 0,01$	0,06
			time to peak (s)	790.612,00	$\leq 0,001$	0,16
			Peakdauer (s)	923.299,00	$\leq 0,05$	0,05
			Abklingzeit (s)	956.888,50	$> 0,05$	0,02
			Interspike Interval (s)	422.137,50	$\leq 0,001$	0,12
	UTP	Amplitude $\Delta F/F_0$	62.331,00	$\leq 0,001$	0,30	
		Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	83.855,00	$\leq 0,001$	0,15	
		time to peak (s)	70.973,50	$\leq 0,001$	0,24	
		Peakdauer (s)	87.292,00	$\leq 0,001$	0,12	
		Abklingzeit (s)	99.811,00	$> 0,05$	0,04	
		Interspike Interval (s)	33.281,50	$\leq 0,001$	0,17	
	$\frac{ATP}{UTP}$	1 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	90.116,00	$\leq 0,001$	0,19
			Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	88.547,00	$\leq 0,001$	0,20
			time to peak (s)	106.332,00	$\leq 0,01$	0,10
			Peakdauer (s)	113.154,50	$> 0,05$	0,06
			Abklingzeit (s)	107.347,50	$\leq 0,05$	0,09
			Interspike Interval (s)	30.950,00	$\leq 0,001$	0,16
10 $\mu M$	Amplitude $\Delta F/F_0$	692.888,00	$\leq 0,001$	0,13		
	Z. z. Halbmax. Aktivierung (s)	825.068,00	$> 0,05$	$< 0,01$		
	time to peak (s)	533.150,50	$\leq 0,001$	0,28		
	Peakdauer (s)	581.644,00	$\leq 0,001$	0,24		
	Abklingzeit (s)	693.186,50	$\leq 0,001$	0,13		
	Interspike Interval (s)	462.478,50	$\leq 0,001$	0,14		

P0/1 ATP:  $n_{1 \mu M} = 4078$ ;  $n_{10 \mu M} = 4002$ ; P0/1 UTP:  $n_{1 \mu M} = 690$ ;  $n_{10 \mu M} = 4280$ ; P4/5 ATP:  $n_{1 \mu M} = 5646$ ;  $n_{10 \mu M} = 16957$ ; P4/5 UTP:  $n_{1 \mu M} = 3355$ ;  $n_{10 \mu M} = 22263$ ; P18 ATP:  $n_{1 \mu M} = 972$ ;  $n_{10 \mu M} = 2013$ ; P18 UTP:  $n_{1 \mu M} = 254$ ;  $n_{10 \mu M} = 828$

## Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Jutta Engel nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern auch für die große Unterstützung und das stets offene Ohr. Danke für die exzellente fachliche Beratung und Orientierung bei allen organisatorischen Fragen auch über die Dissertation hinausgehend! Weiterhin danke ich Dr. Tobias Eckrich für die gute Inauguration in das wissenschaftliche Arbeiten und die vor allem initiale Unterstützung. Dr. Stefan Münkner danke ich für die exzellente technische Unterstützung und die vielen, sehr stimulierenden Diskussionen.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern der AG Engel für die große Hilfe während der verschiedenen Phasen dieses Projekts und die kollegiale Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Marlies Knipper (Tübingen), Prof. Dr. Frank Kirchhoff (Homburg) und Dr. Stephan Philipp (Homburg) für die Bereitstellung von Mauslinien und Kryoschnitten.

Zuletzt geht mein großer Dank auch an meine Familie und meine Freunde: Danke für die Unterstützung während der gesamten Zeit des Studiums und die steten motivierenden Worte, die schlussendlich zum Abschluss dieses Projekts beigetragen haben.

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

- MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology  
02/2016 San Diego, CA, USA  
Posterbeitrag, Titel: „Spontaneous Calcium Transients in Interdental Cells of the Neonatal Mouse“
- Cell Physics Meeting  
06/2016 Saarbrücken, Deutschland  
Posterbeitrag, Titel: „Spontaneous Calcium Transients in Interdental Cells during the Critical Period of Cochlear Development“
- MidWinter Meeting, MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology  
02/2017 Baltimore, MD, USA  
Posterbeitrag, Titel: “Interdental Cells Generate Spontaneous Calcium Transients During the Critical Period of Cochlear Development“
- Workshop on inner ear biology  
09/2017 Hannover, Deutschland  
Posterbeitrag, Titel: „Interdental Cells Generate Spontaneous Calcium Transients During the Critical Period of Cochlear Development“
- MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology  
02/2018 San Diego, CA, USA  
Posterbeitrag, Titel: „Calcium signaling of Interdental Cells during the Critical Developmental Period of the Neonatal Mouse“
- MidWinter Meeting, MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology  
02/2019 Baltimore, MD, USA  
Posterbeitrag, Titel: “How is the Tectorial Membrane Formed? Ducts, vesicles and  $Ca^{2+}$  transients in Interdental Cells of the Developing Cochlea“
- In Vorbereitung, kurz vor Einreichung:  
Zusammenfassende Darstellung der Arbeit in einem Fachjournal