Aus dem Institut für Tierphysiologie der
Justus-Liebig-Universität

Immunhistologische Identifikation von Proteinen des Cytoskeletts und Feinbau isolierter Seitenlinien-Haarsinneszellen von *Pantodon buchholzi*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie/Chemie/Geowissenschaften

vorgelegt von
Achim Schott
aus
Limburg/Lahn

Gießen, 2001

D26

Dekan:	Prof. Dr. Jürgen Janek
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Erich Schwartz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Clauss

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2001

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG **1**

2 MATERIAL UND METHODEN **4**

2.1 Das Versuchstier **4**

2.1.1 Allgemeines zum Versuchstier *Pantodon buchholzi* 4

2.1.2 Haltung der Versuchtiere im Labor 6

2.1.3 Die Seitenlinie von Fischen 6

2.1.4 Die Seitenlinienorgane von *Pantodon buchholzi* 9

2.2 Zellisolierung **12**

2.2.1 Verwendete Reagenzien, Lösungen und Objekträgerbehandlung zur Zellisolierung 12

2.2.2 Überprüfung der Zellvitalität 13

2.2.2.1 Verwendete Reagenzien zur Zellvitalitätsprüfung 14

2.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM) **14**

2.3.1 Reagenzien und Geräte zur Fixierung und Trocknung der REM-Präparate 16

2.3.2 Auswertung der REM-Aufnahmen 16

2.4 Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot **16**

2.4.1 Probenvorbereitung zur Durchführung der SDS-PAGE und des Blots 16

2.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese und des Blots 18

2.4.3 Verwendete Lösungen und Materialien für Elektrophorese und Western Blot 20

2.5 Immunfärbungen – Proteinlokalisation über Antikörpermarkierung **24**

2.5.1 Immunfärbung der isolierten Haarsinneszellen 25

2.5.1.1 Verwendete Antikörper 27

2.5.1.2 Verwendete Reagenzien zur Immunfärbung 29

2.6 Mikroskopie und Auswertung der Immunpräparate **30**

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie 30

2.6.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 31

2.6.3 Zellgrößenbestimmung 33

3 ERGEBNISSE **34**

3.1. Zellisolierung **34**

3.1.1 Morphologie der Gewebe und Zellen im Phasenkontrast 34

3.1.2 Morphologie der Zellen in der Rasterelektronenmikroskopie 37

3.1.3 Zellvitalität und -ausbeute 41

3.2 SDS-PAGE und Western Blot 42

3.3 Immuncytochemie 44

3.3.1 Verwendete Methode 44

3.3.2 Aktin-Immunfluoreszenz 45

3.3.3 α-Aktinin-Immunfluoreszenz 49

3.3.4 Bande 3 (AE1)-Immunfluoreszenz 52

3.3.5 Myosin-Immunfluoreszenz 56

3.3.6 Spektrin-Immunfluoreszenz 60

3.3.7 Tubulin-Immunfluoreszenz 63

3.3.8 Zusammenfassung der in den HSZ durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen Proteine 67

4 DISKUSSION 69

4.1 Zellisolierung 69

4.2 Zellausbeute 70

4.3 Morphologie und Zelldimensionen der isolierten HSZ 73

4.4 Spezifität der Antikörper 80

4.5 Immunfluoreszenz 83

4.6 Das Cytoskelett der Seitenlinien-HSZ 94

4.7 Kontraktilitätsbetrachtungen und Ähnlichkeiten zum Erythrocyten-Cytoskelett 96

5 ZUSAMMENFASSUNG 102

6 LITERATURVERZEICHNIS 104

7 ANHANG 125

7.1 Meßdaten zu Haarsinneszellen im REM 125

7.2 Zelldimensionen ausgemessener HSZ 131

1 Einleitung

Die Seitenlinie von Fischen und Amphibien ist ein mechanosensorisches Sinnessystem, das phylogenetisch am Anfang einer Reihe von Sinnesorganen steht, die alle gemeinsam Haarsinneszellen (HSZ) als reizaufnehmende, zelluläre Struktur aufweisen (im Überblick: Jorgensen, 1989). Zu nennen sind hierbei in erster Linie die vestibulären Organe des Bogengangsystems mit den Cristae ampulares, die wie die Seitenlinie eine Cupula ausbilden, und den Maculae des Sacculus und Utriculus sowie die akustischen Organe mit Lagena, Papilla basilaris und Cochlea. Während der Vestibularapparat funktionell den Gleichgewichts- und Schweresinn repräsentiert und die akustischen Systeme das Gehör, nutzen Fische und Amphibien die Organe der Seitenlinie als sog. Ferntastsinn (Dijkgraaf, 1934). Oberflächenfische, die an das Leben an der Wasseroberfläche sehr gut angepasst sind, verwenden die stark ausgeprägten cephalen Seitenlinienneuromasten zur Beuteortung (Schwartz, 1965; 1967; 1970). Dabei können sie Richtung und im Nahbereich auch die Entfernung einer Reizquelle exakt detektieren (Schwartz, 1971; Bleckmann, 1980). Erstaunlich ist hierbei auch die extrem ausgeprägte Empfindlichkeit dieser Fische für Oberflächenwellen. So konnte an konditionierten Fischen der Art *Pantodon buchholzi* eine Verhaltensreaktion schon bei einer Wasserwellenamplitude von 0,0007 µm und einer Reizfrequenz von 150 Hz ausgelöst werden (Müller, 1984). Für einen weiteren Vertreter der Oberflächenfische, *Aplocheilus lineatus*, ist zudem die Fähigkeit der Frequenzdiskriminierung mit einer minimalen Differenz von 15 % (Bleckmann et al., 1981; Vogel & Bleckmann, 1997) nachgewiesen worden.

Derartige Sinnesleistungen beruhen in erheblichem Maße auf den Eigenschaften der HSZ und ihrem charakteristischen zellulären Feinbau. Grundsätzlich wird der Wellenreiz über die das Cilienbündel der Sinneszellen überdeckende Cupula an die mechanorezeptiven Zellen weitergegeben. Durch Abscherung ihrer Stereocilien in Richtung auf das Kinocilium erfolgt eine Depolarisation, in entgegengesetzter Richtung eine Hyperpolarisation der Haarsinneszelle, wobei – wie Hudspeth und Jacobs (1979) als erste direkt zeigen konnten – die Stereocilien die Struktur darstellen, welche den Transduktionsprozess bedingt.

In welchem Umfang morphologische und strukturelle Aspekte der Sinneszellen Einfluss auf die Abstimmung der Reizperzeption und Frequenzdiskriminierung haben können, zeigen u.a. Untersuchungen an HSZ der Papilla basilaris von Reptilien, bei denen Zellen mit kurzen Stereocilien für höhere Frequenzen besonders sensitiv und solche mit längeren Stereocilien empfindlich gegenüber niedrigeren Frequenzen sind (Turner et al., 1981; Holton & Weiss, 1983; Holton & Hudspeth, 1983). Aber auch der

molekulare Aufbau der reizperzipierenden Zellstrukturen kann Hinweise auf das mechanische Verhalten etwa der Haarbündelauslenkung geben. So wurde an HSZ der Crista ampullaris des Frosches, des Meerschweinchens und der Papilla basilaris von Hühnern das Vorkommen von dicht gepackten, parakristallin angeordneten Aktinfilamenten als struktureller Kern der Stereocilien gezeigt. Diese verleihen den Stereocilien ihre Steifigkeit und sind daher maßgeblich für das mechanische Verhalten der HSZ bei der Haarbündeldeflektion verantwortlich (Flock & Cheung, 1977, Tilney et al., 1980).

Hinweise für die Beteiligung von Cytoskelettstrukturen bei Adaptationsprozessen und aktiven zellulären Kontraktilitätsvorgängen konnten in den letzten Jahrzehnten an HSZ aus dem Vestibularorgan und insbesondere äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) der Säugercochlea gewonnen werden. Flock & Orman (1984) konnten zeigen, dass bei HSZ der Crista ampullaris die Auslenkbarkeit des Haarbündels in einer Lösung, die in Muskelsystemen Kontraktion auslöst, deutlich reduziert war. Sie machten dafür die Interaktion von Aktin (Flock & Cheung, 1977; Flock, 1980) mit Myosin in der Cuticularplatte verantwortlich (Flock & Orman, 1984; Orman & Flock, 1983). Myosin selbst ist in cochleären HSZ in der Cuticularplatte zu finden, in die die aus Aktin bestehenden Stereocilien mit ihren Wurzelfilamenten inserieren (u.a. Drenckhahn et al., 1982). Eine weitere Funktion einer Myosinisoform, die in den Stereocilien von sacculären HSZ des Ochsenfrosches nachweisbar ist, wird als struktureller Bestandteil des an den Transduktionskanälen der Stereocilien lokalisierten „Adaptationsmotors“ vermutet (Hudspeth, 1989; Gillespie et al., 1993; 1996; Hudspeth & Gillespie, 1994). Hier werden über Aktin-Myosin-Interaktionen Adaptationsvorgänge durch aktive Bewegungen entlang der Stereocilien gesteuert.

Neben diesen Prozessen konnten an cochleären ÄHZ und vestibulären HSZ zwei unterschiedliche Bewegungsvorgänge, die mit Verkürzungen des Zellleibs sowie Kippbewegungen der Cuticularplatte einhergehen, beobachtet werden. Sie werden als sog. langsame Motilität, bei der sich der Zellkörper langsam und reversibel verkürzt und als schnelle Motilität, bei der schnelle Kontraktionen bzw. Elongationen des Zellkörpers auftreten, bezeichnet (im Überblick: Zenner, 1994; Zenner & Zimmermann, 1991). Lange wurde auch eine Beteiligung des Cytoskeletts bei der Kontraktilität von ÄHZ diskutiert, was für die langsame Form der Motilität, die durch chemische und akustische Reize auslösbar ist, auch nachgewiesen werden konnte (Flock et al., 1986; Zenner et al., 1985 b; Zenner, 1986 a, b; Canlon et al., 1988).

Für schnelle Längenänderungen (schnelle Motilität), die durch elektrische Stimulation von ÄHZ bewirkt werden kann und welche vermutlich den cochleären Verstärkermechanismus zur feinen Frequenzdiskrimination innerhalb der Cochlea von

Säugetieren bildet (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986; Ashmore, 1987; Zheng et al., 2000), stellen Cytoskelettstrukturen vermutlich eine Rahmenfunktion dar, indem sie Formveränderungen erleichtern bzw. die extrem längliche Form der ÄHZ bedingen und aufrechterhalten (Slepecky, 1989; Holley & Ashmore, 1988 a, 1990).

Die aufgeführten Befunde zeigen, dass über die Aufklärung von Proteinen, die das Cytoskelett von HSZ bilden und eine Rolle beim Transduktionsprozess der Zelle spielen, Rückschlüsse auf physiologische Sinnesleistungen der Tiere und die Funktionsweise der zugehörigen Organe auf zellulärer Ebene gezogen werden können.

Die für HSZ angestellten Untersuchungen wurden vornehmlich an Sinneszellen aus Organen höherer Vertebraten durchgeführt. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie die Cytoskelettorganisation der HSZ aus der Seitenlinie eines Fisches, *Pantodon buchholzi*, aufzuklären und über die Identifizierung von Cytoskelett-Proteinen Hinweise darüber zu erhalten, ob die für Adaptations- und Motilitätsvorgänge in HSZ anderer Organe verantwortlichen Strukturen auch in den phylogenetisch ursprünglichen Seitenlinien-HSZ vorhanden sind. Darüber hinaus sollte über die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung isolierter Sinneszellen der strukturelle Feinbau der HSZ des Schmetterlingsfisches aufgeklärt werden.

Die vorliegende Arbeit stützt sich dabei auf die von Stroh (1992) entwickelte Methode zur Isolierung von vitalen HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* und führt mit spezifischen Antikörpern den immuncytochemischen Nachweis von Aktin, Myosin und wichtigen Aktin-bindenden Proteinen sowie Tubulin unter Einsatz der konfokalen Mikroskopie.

2 Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier

2.1.1 Allgemeines zum Versuchstier *Pantodon buchholzi*

Abb. 1: *Pantodon buchholzi*, weibliches Exemplar etwa natürliche Größe (Foto: Schwartz)

Als Versuchstier diente bei der vorliegenden Arbeit der Afrikanische Schmetterlingsfisch *Pantodon buchholzi* Peters, 1876 (Abb. 1). Diese Fischart ist der einzige Vertreter der Familie der Pantodontidae. Obwohl er nur geringe Ähnlichkeiten zur Familie der Knochenzüngler (Osteoglossidae) aufweist, bildet er mit diesen die Unterordnung der Osteoglossoidei (Abb. 2).

Seine Verbreitung findet der Oberflächenfisch im westlichen Afrika (Kamerun, Nigeria und Zaire). Dabei bevorzugt er langsam fließende bis stehende Gewässer, gelegentlich ist *Pantodon* auch in toten Flussarmen, Urwaldtümpeln oder Gräben zu finden (Sterba, 1995). Dort verbirgt er sich unter Schwimmpflanzen und verharrt (oft stundenlang) bewegungslos an der Wasseroberfläche. An die oftmals recht sauerstoffarme Umgebung ist der Fisch durch eine obligate, akzessorische Luftatmung über die Schwimmblase sehr gut angepasst (Nysten, 1962; Schwartz, 1969).

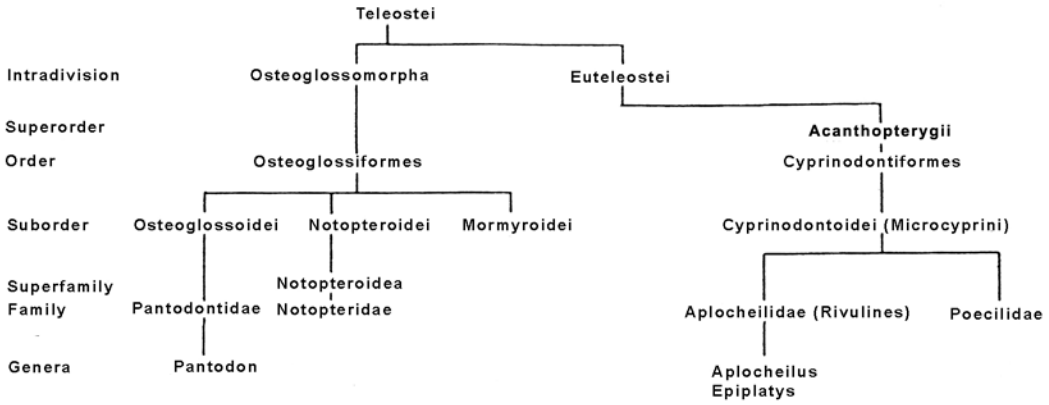


Abb. 2: Systematik der Teleostei verändert nach Nelson (1984). Beispielhaft sind hier Oberflächenfische dargestellt.

Die Schmetterlingsfische werden 10–15 cm groß, Kopf und Rumpf sind dorsal abgeflacht. Der ventrale Körperbereich ist rostral abgerundet und läuft caudad kielartig zu, sodass der Fisch insgesamt ein bootsförmiges Aussehen aufweist. Das Maul ist groß und oberständig aufgerichtet. Für die deutsche Namensgebung maßgeblich sind die auffälligen flügelartigen Pectoralen des Schmetterlingsfisches, die es den Tieren ermöglichen bis zu 2 m weit über dem Wasser zu gleiten. Die Ventralen sind fadenförmig verlängert und dienen vermutlich als Tastorgan (Blübaum, 1984). Ein gutes Unterscheidungsmerkmal zur Geschlechtsbestimmung bietet die Afterflosse (Anale), deren Hinterrand beim Weibchen eine gerade Linie bildet. Beim Männchen ist der Hinterrand der Afterflosse hingegen bogenförmig, wobei die mittleren Strahlen nach Frank (1997) eine Röhre bilden (Sterba, 1995).

Farblich zeigen Fische der Art *Pantodon buchholzi* erhebliche individuelle Variationen, die nach eigener Beobachtung auch vom Untergrund abhängig sind. Rücken und Körper sind meist bräunlich gefärbt, die Flanken weisen eine silbrige bis graugrüne Färbung auf und können zusammen mit den Zwischenhäuten am Ansatz der Ventralen auch rötliche bis violette Pigmentierung zeigen. Die Pectoralen sind außen schwärzlich gefärbt mit hellem oder weißem Saum. Die Flossenstrahlen aller Flossen sind hell-dunkel geringelt. (Sterba, 1995)

Pantodon buchholzi zeigt eine extreme Anpassung an den Lebensraum Wasseroberfläche, die sich darin ausdrückt, dass er als räuberisch lebender Fisch Nahrung ausschließlich von der Wasseroberfläche aufnimmt. Diese besteht vorwiegend aus Insekten, die auf die Wasseroberfläche gefallen sind oder diese aufsuchen. Mithilfe der Seitenlinienorgane ortet der Fisch die von den Insekten verursachten Oberflächenwellen und nimmt so seine Beute wahr.

2.1.2 Haltung der Versuchtiere im Labor

Versuchstiere, zwischen 8 bis 12 cm groß, wurden über den Zierfischhandel bezogen und anschließend einer Behandlung mit Malachitgrün (Costapur-Serva; Dosierung laut Herstellerangaben) unterzogen. Dies diente der vorbeugenden Behandlung gegen *Ichthyophthirius multifilis*. Bei evtl. auftretender Lochfrasserkrankung, ausgelöst durch den Flagellaten *Spironucleus* wurde eine Behandlung mit 0,4 mg/l Clont (Bayer) in einem 3-tägigen Dauerbad vorgenommen.
Eventuell auftretende Pilzerkrankungen wurden mit Salzkurzbädern (täglich 10 min) mit einer Konzentration von 10–15 g/l NaCl behandelt.
Die Haltung der Fische erfolgte in Glasbecken der Größe 60 x 30 x 30 cm, die wegen des guten Springvermögens der Schmetterlingsfische mit beschwerten Styroporplatten abgedeckt worden waren. Als Sichtschutz wurden die Aquarienbecken mit Wasserpflanzen Javamoos (*Vesicularia dubyana*) oder Tausendblatt (*Myriophyllum spec.*) ausgestattet. Die Wassertemperatur betrug 27 °C. Aufgrund der erwähnten akzessorischen Luftatmung (s. 2.1.1) und der allgemeinen Merkmale des natürlichen Biotops konnte auf zusätzliche Filterung und Wasserdurchlüftung verzichtet werden. Ein Teilwasserwechsel erfolgte alle zwei Wochen. Als Futter wurden flügellose Fruchtfliegen (*Drosophila*) sowie junge Heimchen (*Acheta domesticus*) verwendet.
Die durchgeführten Experimente waren anzeigepflichtig und wurden beim Regierungspräsidium Gießen angemeldet: 17.09.1996, Az.: 17 a - 19 c 20/15 (1).

2.1.3 Die Seitenlinie von Fischen

Das Seitenlinienorgan der Fische dient in erster Linie der Perzeption von Wasserbewegungen. Dijkgraaf (1934) bezeichnete dieses Sinnesorgan als sog. „Ferntastsinnesorgan“ und sieht seine biologische Funktion in der Ergänzung oder bei Bedarf als Ersatz des Gesichtssinnes. An der Grenze der Medien Luft und Wasser, wo das Gesichtsfeld aus physikalischen Gründen eingeschränkt ist, ermöglicht die Seitenlinie Oberflächenfischen sogar die exakte Entfernungs- und Richtungsbestimmung von z.B. Beutetieren in einer Entfernung von 3–4 Körperlängen (Schwartz, 1965; 1970),
Das Vorkommen von Seitenlinienorganen ist streng an eine aquatische Lebensweise gebunden. So findet man dieses Sinnesorgan im Tierreich bei Cyclostomen, allen rezenten Fischen sowie bei wasserlebenden Amphibien. Entwicklungsgeschichtlich geht die Seitenlinie aus einer lateralen ektodermalen Placode (Verdickungen) hervor, aus der auch das Labyrinthsystem entstammt (Northcutt, 1989). Hierin spiegelt sich

u.a. auch die phylogenetische Verwandtschaft der Seitenlinie zu den übrigen Organen des octavolateralen Systems (Labyrinth, Utriculus, Sacculus, Lagena) wider.
Auf dem Fischkörper findet man die Seitenlinienorgane in charakteristischer Weise in Reihen an Kopf und Rumpf verteilt. Nach morphologischen Kriterien lässt sich das Lateralissystem dabei in sechs verschiedene Abschnitte aufteilen. Man unterscheidet eine Supraorbital-, Infraorbital-, Supratemporal-, Hyomandibular- und Rumpfseitenlinie (Allis, 1889; Flock, 1965). Dijkgraaf (1934) ergänzt dieses Einteilungsschema noch durch eine dorsal gelegene Rückenlinie (Abb. 3).

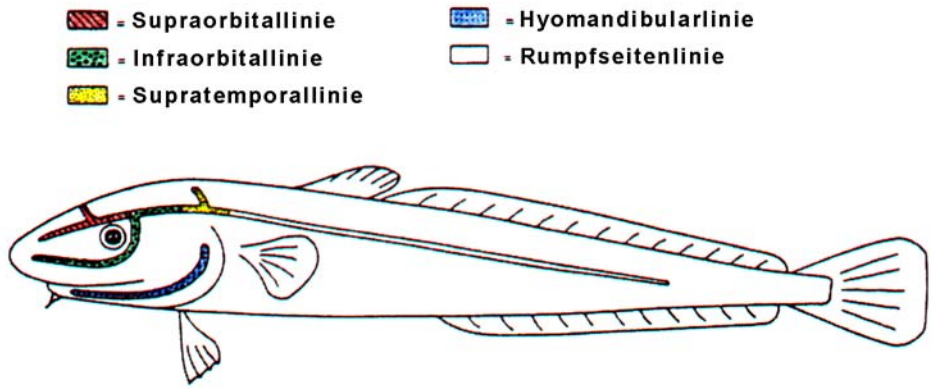


Abb. 3: Morphologische Verteilung des Seitenliniensystems bei Fischen am Beispiel von *Lota vulgaris* (verändert nach Flock, 1965)

Grundlage für die Reizaufnahme und Erregungsweiterleitung an das Nervensystem sind beim Seitenlinienorgan Haarsinneszellen (HSZ), d.h. sekundäre Sinneszellen wie man sie auch aus den Sinnesorganen des Innenohres her kennt. Jede Haarsinneszelle besitzt an ihrem apikalen Ende ein Kinocilium und 40–50 Stereocilien. Die Ablenkung der Stereocilien zum Kinocilium hin bewirkt eine Depolarisation der Zelle, in entgegengesetzter Richtung wird sie dagegen hyperpolarisiert. Innerviert werden die Seitenlinienorgane durch eigene Seitenliniennerven, den Nervus lateralis anterior und posterior (Dijkgraaf, 1934; Flock, 1965).
Im Gewebe sind die rezeptiven Zellen von Stützzellen und am Rand des Sinnesepithels von sog. Mantelzellen umgeben. Gemeinsam mit diesen beiden Zellarten bilden die HSZ das eigentliche rezeptive Gewebe, den von Kingsbury (1895) so benannten „Nervenhügel“ oder „Neuromasten“. Überdeckt wird das Sinnesepithel von einer gallertigen Masse, der Cupula, die von den Stütz- und Mantelzellen sezerniert wird. Durch Ablenkung selbiger werden die Stereocilien geschert und die

Sinneszellen erregt (Görner, 1963; Flock, 1965; 1967). Dabei kann die Cupula je nach Organtyp direkt oder indirekt vom umgebenden Wasser abgelenkt werden. Hiernach unterscheidet man zwei Arten von Neuromasten:

a) Die superfiziellen Neuromasten, die direkt auf der Haut sitzen und in das umgebende Wasser ragen.
b) Die Kanalneuromasten, welche in Rinnen oder (z.T. knöcherne) Kanäle eingesenkt sind, die über Poren Kontakt zum Außenmedium haben. Hierbei werden Wasserbewegungen indirekt über eine den Kanal ausfüllende visköse Flüssigkeit auf die Neuromasten übertragen (Dijkgraaf, 1934; 1962).

Allgemein wird angenommen, dass Fischarten, die einen ruhigen Lebensraum bewohnen und wenig lebhafte Schwimmer sind, ihre Kanalneuromasten zugunsten freier Neuromasten reduziert haben (Dijkgraaf, 1962; Marshall, 1971; Merrilees & Crossman, 1973). Ebenso wie der Lebensraum, spiegelt sich auch die Spezialisierung auf die Wasseroberfläche als ökologische Nische in der Ausprägung der Seitenlinienorgane bei Oberflächenfischen wider. Hier findet man eine starke Ausprägung der cephalen (supraorbitalen und supratemporalen) Seitenlinienabschnitte, die in den Dienst des Beuteerwerbs gestellt wurden (Schwartz, 1965).

2.1.4 Die Seitenlinienorgane von *Pantodon buchholzi*

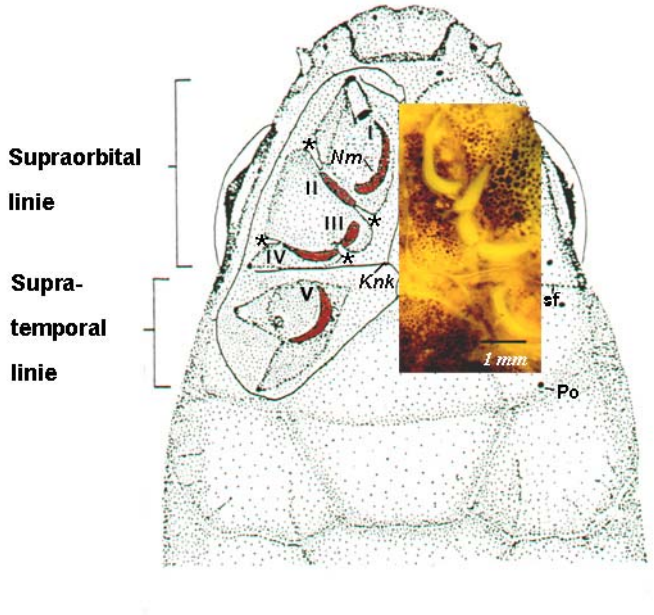


Abb. 4: Die cephalen Seitenlinienorgane von *Pantodon buchholzi*. I–IV: Organe der Supraorbitallinie; V Neuromast der Supratemporallinie; Nm: Neuromast; Knk: Knochenkamm, sf: superfizielle Neuromasten, Po: Pore, *: Knochenspange; Zeichnung: Blübaum-Gronau; Foto: Hammer)

Die Seitenlinienorgane des Oberflächenfisches *Pantodon buchholzi* haben als Anpassung an den Lebensraum einige Veränderungen erfahren, die dem von Flock (1965) beschriebenen Grundbauplan nicht entsprechen. Diese beziehen sich in erster Linie auf die cephalen Organe der Supraorbital- und Supratemporallinie, welche in Organgröße, -form und HSZ-Anzahl bzw. -anordnung besondere Ausprägungsmerkmale aufweisen (Abb. 4).

Statt in Kanälen verborgen befinden sich diese Organe, in mit Gallerte gefüllten Hohlräumen eingesenkt, unter der Haut auf der abgeflachten Schädelplatte. Die 4 Kanalneuromasten (I–IV) der Supraorbitallinie liegen in einer durch Bindegewebe ausgekleideten Kaverne, die durch dieses Gewebe eine weitere Aufgliederung in einen rostralen und einen caudalen Hohlraum erfahren. Der rostrale beinhaltet den Neuromasten I und wird durch zwei Knochenspangen und Neuromast II vom caudalen getrennt, der die Organe III und IV beherbergt. Zusammen mit den genannten Knochenspangen unterstützen zwei weitere, den Neuromasten IV umrahmende Spangen, das die Organe überspannende Septum. In diesem Zusammenhang müssen zwei Knochenkämme Erwähnung finden: Einer der transversal die Organe der Supraorbital- von denen der Supratemporallinie trennt und ein weiterer median verlaufender Knochenkamm, der die supraorbitalen Neuromasten in ipsi- und

kontralateral liegende trennt. Der Neuromast V bildet die Supratemporallinie und liegt ebenfalls in einem mit Bindegewebe ausgekleideten Hohlraum. Beide Kavernensysteme (supraorbitales und supratemporales) stehen über je zwei rostral und temporal liegende Poren mit dem umgebenden Wasser in Verbindung (Schwartz, 1970; Blübaum-Gronau, 1989).

Eine Sonderform der Seitenlinienorganausprägung ist des Weiteren auch die „bumerangförmige“ Gestalt der Neuromasten I und IV. Wie bei den übrigen Organen der Supraorbitallinie sind die Haarsinneszellen hier über die gesamte Neuromastenmacula verteilt und in Paaren angeordnet, wobei die Kinocilien eines solchen Pärchens entgegengesetzt orientiert sind (Blübaum-Gronau, 1989). Denkt man sich beide Neuromasten als Kreisbogen (bzw. als Teil eines Kreises), so sind die HSZ-Paare radial auf den Kreismittelpunkt ausgerichtet. Insgesamt stehen die HSZ in ihrer Ausrichtung quer zur Längsachse des Neuromasten (Müller, 1984).

Entsprechend seiner Bedeutung für das Leben des Oberflächenfisches findet man in den Organen der cephalen Neuromasten ungewöhnlich viele Haarsinneszellen, insgesamt ca. 20.000 (genaue Zahlen siehe Tabelle 1). Diese Tatsache bildet eine Grundvoraussetzung für die Isolierung von Haarsinneszellen aus der Seitenlinie.

Nach Blübaum-Gronau (1989) gehören zur Supraorbitallinie auch die beiden nasalen Kanäle sowie auf der den Kopf überdeckenden Haut sitzende, superfizielle Neuromasten. Hierbei findet man die längste Reihe an freien Organen auf einer transversalen Linie zwischen Supraorbital- und Supratemporallinie (etwa an der Stelle des oben beschriebenen Knochenkamms).

Die übrige Ausprägung der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* entspricht in etwa der von Flock (1965) getroffenen Einteilung und Beschreibung. So besitzt der Oberflächenfisch eine mit Kanalneuromasten ausgestattete Infraorbital-, Temporal- und Operculomandibularlinie. Des Weiteren findet man eine Rumpfseitenlinie, die sowohl Kanal- als auch freie Neuromasten enthält und so in unterscheidbare Abschnitte einteilbar ist (Schürmann, 1987). Die auf der abgeplatteten Rückenpartie erkennbare Rückenkantenlinie beinhaltet superfizielle Neuromasten, die auf der Epidermis sitzen, welche die Schuppen überziehen (Blübaum-Gronau, 1989).

Tabelle 1: Einige Daten zu den cephalen Seitenlinienorganen von *Pantodon buchholzi*
Nm: Neuromast; HSZ: Haarsinneszellen
(Daten aus Blübaum-Gronau, 1989 und Müller, 1984 (*); Überblick s. Bleckmann et al., 1989)

	Supraorbitallinie	**Supratemoprallinie**
Neuromastenlänge [mm]	I 1,87 ± 0,19 II 1,42 ± 0,05 III 0,77 ± 0,13 IV 1,34 ± 0,13	V 1,8 *
HSZ-Verteilung	über den Neuromasten verteilt	über den Neuromasten verteilt
HSZ-Orientierung	antagonistisch in Paaren in Linien quer zur Organ-längsachse des Nm	antagonistisch in Paaren In Linien quer zur Organ-längsachse des Nm
Vorkommen kleiner HSZ	peripher	peripher
HSZ-Anzahl	I 2213 ± 291 II 1755 ± 222 III 1456 ± 283 IV 2306 ± 977	V ca. 3000 *
Stereocilienzahl	bis 40 *	bis 40*
Länge Kinocilium [µm]	bis 18 *	bis 18 *
Verhältnis Afferenzen/ Efferenzen		ca. 1:4 *
Anzahl der den Nm innervierenden myelini-sierten Fasern		ca. 800 *
Mittlere Konvergenz HSZ/Nervenfasern		1:4 *

2.2 Zellisolierung

Die Isolierung der Haarsinneszellen erfolgte nach der von Stroh (1992) entwickelten Methode, indem das Versuchstier zunächst für 20 Minuten in einer 0,08 %igen MS-222 (Sigma) Lösung (Überdosis) getötet wurde. Daraufhin entfernte man die Epidermis auf der abgeflachten Schädeldecke des Fisches und präparierte die Kopfneuromasten der Supraorbitallinie (I-IV) sowie der Supratemporallinie (V) heraus (Abb. 4). Die entfernten Neuromastenmaculae wurden in eine Petrischale (Greiner) in 100 µl Hanks Medium (HBSS, siehe 2.2.1) überführt, ein Zellkulturmedium, in dem das Gewebe bzw. die isolierten Haarsinneszellen bis zu 3,5 h in Kurzzeitkultur am Leben erhalten werden können (Stroh, 1992). Jeweils 5 Neuromasten jeder Seite wurden in eine Petrischale gegeben, wobei ein Ansatz später mit dem 1. Antikörper versetzt, der andere als Kontrolle ohne diesen inkubiert wurde. Anschließend wurden 100 µl einer Collagenaselösung mit einer Konzentration von 2–4 mg/ml (je nach Enzymaktivität, s.u.) hinzupipettiert, sodass eine Endkonzentration von 1–2 mg/ml erreicht wurde. Nach 10–20 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur, in der die Bindegewebsstrukturen durch das zugesetzte Enzym angelöst werden, entfernte man die Neuromasten aus der Collagenaselösung und suspendierte die in 100 µl HBSS aufgenommenen Maculae mit einer Mikropipette (Eppendorf, 100 µl) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt). Die herausisolierten Haarsinneszellen wurden auf einen durch Epoxid in drei Rundfelder aufgeteilten Objektträger pipettiert, und das Reaktionsgefäß wurde mit 100 µl HBSS-Lösung gespült.

Um ein Anhaften der Zellen auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurden die Objetträger zuvor mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) beschichtet, und ein Silikonring wurde um die beiden äußersten Rundfelder gelegt, der ein Auslaufen der Lösungen verhindern sollte (siehe 2.2.1).

Nach 10–20 min Inkubation in einer feuchten Kammer, in der die Zellen sich absetzten, wurde die Zellausbeute an einem inversen Leitz Diavert Mikroskop im Phasenkontrast kontrolliert.

2.2.1 Verwendete Reagenzien, Lösungen und Objekträgerbehandlung zur Zellisolierung

Diagnostikobjektträger epoxidbeschichtet mit 3 Rundfeldern

Die von der Firma Langenbrinck bezogenen Objetträger wurden vor ihrer Verwendung mit einem 1:1 Ethanol/Diethylethergemisch entfettet und anschließend mit dem Lektin Concanavalin A, Sigma C-2010 (0,01 mg/cm^2) beschichtet (Sugihara & Furukawa,

1989), wobei die Lösung zuvor abzentrifugiert wurde (10 min, 3500 U/min; Christ, Typ: UJ 2 KS). Nach dem Abtrocknen der Objektträger versah man die Objektträger mit einem Silikonring, der ein Auslaufen des Methanols bei der späteren Fixierung der Zellen verhindern sollte.

Hanks' balanced salt solution (HBSS)

Sigma H 6136 (mit Phenolrot) bzw. Sigma H 1387 (ohne Phenolrot)

Das verwendete Medium wurde zur Pufferung laut Herstellerangaben mit 0,35 g/l $NaHCO_3$ und 1,2 g/l HEPES (Sigma) versetzt und der pH-Wert mit 1 N NaOH Lösung auf $7{,}3 \pm 0{,}1$ eingestellt. Die Osmolalität des Kulturmediums betrug nach entsprechender Zugabe von 4 N NaCl-Lösung 300 mOsmol/l (Knauer Halbmikro-osmometer).

Collagenase Enzymlösung

Sigma Typ IV, C 5138

Die zum Verdau der Neuromasten zugegebene Collagenase-Lösung wurde in HBSS-Medium angesetzt in einer Konzentration von 2–4 mg/ml je nach der vom Hersteller angegebenen Enzymaktivität, die zwischen 350–600 units/mg lag.

2.2.2 Überprüfung der Zellvitalität

Die Isolation von Haarsinneszellen durch eine Collagenasebehandlung gilt als eine der schonendsten Methoden zur Gewinnung lebender Haarsinneszellen aus dem sensorischen Gewebe des Innenohrs (Zenner et al., 1985 a). In der hier verwendeten Präparation lagen die gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten der Enzymlösung im Bereich der für cochleäre Haarsinneszellen beschriebenen Zeiten (Hudspeth & Jacobs, 1979; Zenner et al., 1985 a; Pickles et al., 1990) und der Inkubationszeiten von Stroh (1992). Die Zellvitalität wurde anhand der von Zajic und Schacht (1987) festgelegten morphologischen Kriterien im Phasenkontrast überprüft (siehe Ergebnisteil).

Eine weitere Quantifizierung der Zellausbeute erfolgte über eine PI (Propidium Iodid)/FDA (Fluorescein Diacetat)-Anfärbung der Zellen. Dazu isolierte man die Zellen wie in Kapitel 2.2 beschrieben und überführte die isolierten Haarsinneszellen aller 10 Neuromasten auf ein Rundfeld. Die eigentliche Anfärbung der Zellen erfolgte angelehnt an die Methode von Jones und Senft (1985). Nach Entfernen der HBSS-Lösung gab man 100 µl FDA-Arbeitslösung und 30 µl der PI-Arbeitslösung auf das Rundfeld. Nach 10 min Inkubation wurde 1 x mit 100 µl HBSS gewaschen, und die Haarsinneszellen

wurden im Rundfeld unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH2-RFC, FITC-Filterset, siehe Kap. 2.6.1, Tab. 6) ausgezählt. Das verwendete Filtersystem erlaubte es, die Rotfluoreszenz des PI und die Grünfluoreszenz des Fluorescein unter der gleichen eingestrahlten Wellenlänge zu untersuchen.

2.2.2.1 Verwendete Reagenzien zur Zellvitalitätsprüfung

Propidium Iodid (PI)

Sigma P 4170

Die PI-Stammlösung enthielt 1 mg PI gelöst in 5 ml PBS, welches mit 4N NaCl-Lösung auf 300 mOsmol/kg (Knauer Halbmikroosmometer) eingestellt wurde. Durch Verdünnung dieser Lösung 1:10 in PBS (300 mOsmol/kg) erhielt man die Arbeitslösung, von der 30 µl zur Probe hinzugegeben wurden.

Fluorescein-Diacetat (FDA)

Sigma F 1397

Für den Ansatz der FDA-Stammlösung wurden 2,5 mg FDA in 1 ml Aceton gelöst. Zum Einsatz im Experiment kam eine Arbeitslösung, bei der zunächst 0,04 ml der Stammlösung in 10 ml HBSS gelöst wurden. Durch nochmaliges Verdünnen 1:10, erhielt man die einzusetzende Lösung, von der 100 µl auf die Probe gegeben wurde.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Methode der Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht es, Oberflächenstrukturen von Zellen und Geweben dreidimensional darzustellen. Dazu werden die biologischen Objekte fixiert, getrocknet und mit einer dünnen Goldschicht bedeckt. Mithilfe eines Elektronenstrahls, der auf die Probe gerichtet wird, rastert man Punkt für Punkt die Oberfläche der zu untersuchenden Struktur ab. Zur Bildentstehung werden dabei die von der Probenoberfläche gestreuten und emittierten Elektronen genutzt. Durch die REM-Technik kann man Strukturen bis zu einer Größe von 10 nm darstellen, was ein wesentlich besseres Auflösungsvermögen im Vergleich zur Lichtmikroskopie darstellt (Alberts et al., 1995).

Zur Probenvorbereitung wurden die Neuromasten eines Fisches zunächst isoliert (siehe Kap. 2.2), in 100 µl HBSS-Zellkulturmedium aufgenommen und daraufhin zur Isolation der Haarsinneszellen suspendiert. Anschließend fixierte man die Zellen in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) durch Zugabe von 900 µl Fixierlösung.

Nach Inkubation der Proben über Nacht bei 4 °C zog man den Überstand bis auf ca. 20 µl Restvolumen ab und suspendierte vorsichtig die abgesetzten Zellen.

Die Zellsuspension jeder Probe wurde auf ein Aluminiumfolienschälchen (∅ = 5 mm) gegeben, welches sich in der Trocknungskammer befand. Anschließend ließ man die Probe 20 min zum Absetzen der Zellen stehen.

Die Kammer (Balzers Union) besteht aus einem runden Metallblock (∅ = 23 mm, Höhe: 8 mm), der 4 Bohrungen (∅ = 5 mm) enthält, in welche die Aluminiumfolienschälchen (matte Seite oben) eingelegt wurden. Nach oben und unten wurde das Behältnis (die Bohrungen) mit je einem mit Isopropanol benetzten Papierfilter (Schleicher & Schüll) verschlossen. Mit zwei runden Metallscheiben (∅ = 23 mm, Höhe: 8 mm), die mit dem Metallblock verschraubbar sind, konnten die Papierfilter fixiert werden. Die mit den Zellen beladene Trocknungskammer wurde nun jeweils für 10 min in eine aufsteigende Isopropanol-, Isopropanol/Isoamylacetat- und Isoamylacetat- (2 x) Reihe gelegt, und so wurden die Haarsinneszellproben entwässert.

Anschließend erfolgte die Kritische-Punkt-Trocknung (Gerät: Balzers Union). Dieses Trocknungsverfahren für biologische Objekte soll verhindern, dass Zellstrukturen beim Übergang von der flüssigen in die feste Phase Schaden nehmen (zerreißen). Dabei nutzt man die Tatsache, dass bei einem bestimmten Druck-Temperatur-Verhältnis der Phasenübergang flüssig/gasförmig nicht mehr existiert. Da der kritische Punkt für Wasser bei ungünstigen Temperaturen liegt (374,15 °C und 22,1 MPa), entwässert man die Proben und nutzt die bezüglich des kritischen Punktes günstigen Druck-Temperatur-Verhältnisse des CO_2 (kritischer Punkt bei 31,04 °C und 7,4 MPa) (Atkins, 1990).

Zur Trocknung wurde zunächst die Trocknungskammer in das mit 100 % Isoamylacetat befüllte Trocknungsgerät überführt. Der auf 5 °C abgekühlte Probenraum wurde nun unter Druck mit flüssigem CO_2 geflutet und das CO_2-Isoamylacetat-Gemisch nach 5 min teilweise abgelassen. Diesen Vorgang wiederholte man 3–4-mal, bis das Isoamylacetat gegen das CO_2 vollständig ausgetauscht war. Nach anschließendem Aufheizen auf 45 °C und Erreichen des kritischen Punktes wurde das Gas abgelassen und die abgekühlte Trocknungskammer aus dem Gerät entnommen. Die Präparate (Aluminiumfolienschälchen) wurden nun auf Präparatehalter aufgeklebt und in einem Sputter-Gerät (Leitz) mit einer Goldschicht bedampft.

Die weitere Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Phillips Rasterelektronenmikroskop XL 20. Die Aufnahmen wurden direkt digitalisiert. Probenvorbereitung und REM-Aufnahmen wurden in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

2.3.1 Reagenzien und Geräte zur Fixierung und Trocknung der REM-Präparate

Fixierlösung

150 ml Phosphatpuffer PBS für Zellkultur (0,1 M; siehe 2.4.3)
9 ml Formaldehyd 37 % (Roth)
9 ml Glutaraldehyd 25 % (Sigma)

Trocknungsreihe

50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 100 % Isopropanol (Fluka)
4:1, 1:2, 1:4 Isopropanol/Isoamylacetat (Merck)
2 x 100 % Isoamylacetat

2.3.2 Auswertung der REM-Aufnahmen

Die Bestimmung der Dimensionen der Zellbestandteile (Kinocilium, Stereocilium etc.) erfolgte anhand ausgedruckter REM-Bilder. Die Größen konnten anhand des auf dem Bild digital abgespeicherten Größenmaßstabes bestimmt werden.

2.4 Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die SDS-PAGE ist eine gängige Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Über Natrium-Dodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert sowie alle gleich geladen. Sie wandern im Polyacrylamidgel gemäß ihres Molekulargewichtes. Im anschließenden Immunoblot überträgt man die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran und weist die gesuchten Proteinkomponenten mit einem Antikörper nach (Liddell & Weeks, 1996).
Die durchgeführten Western Blots dienten, dazu die verwendeten Erstantikörper, die z.T. mit Vogel- oder Säugetierantigenen hergestellt wurden, auf ihre Spezifität für Fischgewebe bzw. -proteine zu prüfen.

2.4.1 Probenvorbereitung zur Durchführung der SDS-PAGE und des Blots

Die Western Blots wurden für Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin am Humanbiologischen Institut in Heidelberg durchgeführt, die für Myosin und α-Tubulin im Institut für Veterinärbiochemie in Gießen. Daraus ergaben sich einige Unterschiede bei den verwendeten Lösungen, auf die im Text hingewiesen wird.

Zur Kontrolle der Spezifität der einzelnen 1. Antikörper wurden Gewebe verwendet, in denen das jeweilige Protein vorkommt. Aufgrund der geringen Gewebe- und Proteinmengen, die man aus der Isolation der Neuromasten eines Fisches erhält, wurde darauf verzichtet, die Proteine im Seitenlinienorgangewebe nachzuweisen, da der Verbrauch an Versuchsfischen sehr groß gewesen wäre.

Gehirn, Muskel, Darm und Seitenliniengewebe (Kopfneuromasten) von *Pantodon buchholzi* wurden entnommen und in 300 µl HBSS aufbewahrt und eingefroren.

Zur Probenvorbereitung versetzte man oben genannte Gewebe, die in jeweils 50 µl HBSS aufbewahrt waren, mit 1,5 ml Lysepuffer und sonifizierte selbige in einem Reaktionsgefäß (Nunc) jeweils 3 x 30 s auf Eis. Zwischen jedem Sonifizierungszyklus wurden die Proben jeweils für 30 s auf Eis gestellt, um eine Überwärmung zu verhindern.

Anschließend zentrifugierte man die Proteinlösung für 10 min bei 13000 U/min / 4 °C (Tischzentrifuge). Der Überstand diente als Probenlösung, deren Proteingehalt nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt wurde.

Dazu wurden Standardlösungen mit 5, 10 ,15 µl einer 6 mg/ml Albumin Proteinlösung und gleiche Mengen an Gehirn- und Darm-Probelösung mit je 0,5 ml H_2O (A. bidest.), 3,5 ml Na_2CO_3 und 0,5 ml $CuSO_4$ versetzt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend versetzte man die Proteinlösungen mit 1 ml Folin-Reagenz und inkubierte wiederum für 15 min im Dunkeln.

Bei der photometrischen Bestimmung wurde das Photometer (Eppendorf) zunächst mit einer Leerprobe beschickt, daraufhin wurde die Extinktion der Standardlösungen zur Erstellung einer Eichgeraden gemessen. Die Messung erfolgte bei 578 nm.

Anhand der Eichgeraden ermittelte man die Proteinmengen der angesetzten Proteinlösungen.

In die anschließende Gelelektrophorese wurden Proteinmengen zwischen 5 µg und 10 µg eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte ausschließlich für die Proteine α-Tubulin und Myosin.

Vor dem Einsatz in die Elektrophorese erfolgte der Zusatz des Probenpuffers. Für Myosin und α-Tubulin wurden entsprechend der Proteinbestimmung die Probelösungen mit jeweils 2,5 µl Probenpuffer versetzt und zusammen mit den Markern für 1 min bei 100 °C aufgekocht. Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Die Proteinlösungen von Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin versetzte man im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer, woraufhin Marker und Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt wurden. Zwischen 15–50 µl der auf Eis abgekühlten Probelösung trug man in die Geltaschen auf.

2.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese und des Blots

Die Gelkonzentrationen variierten je nach Größe des nachzuweisenden Proteins zwischen 5 und 12 % (siehe verwendete Lösungen 2.4.3).
Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 58 V über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese für weitere 30 min fortgeführt.
Für die Proteine α-Tubulin und Myosin wurde die Elektrophorese für 30 min bei 60 V und 1 h bei 100 V laufen gelassen. Mittels eines Bio Rad Blotters wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt (nach vorherigem Wässern der Filterpapiere und der Membran mit Transferpuffer). Das Blotten erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 25 V.
Der anschließende Blot für die Proteine Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin erfolgte im Blotpuffer für 2 h bei 100 V.
Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine färbte man die Membran mit Ponceau S (Boehringer), wobei die Proteinbanden nach Entfernen der Färbelösung und anschließendem Abspülen mit Aqua dest. (entfernt Farbstoff aus dem Membranpapier) sichtbar wurden.
Die Proteinanfärbung wurde durch Waschen mit PBS entfernt.
Während der Ponceau S Färbung markierte man die Positionen der Markerbanden, um später die Proteingrößen anhand der Marker ermitteln zu können.
Zur Vorbereitung der Antikörperfärbung erfolgte zunächst die Blockierung der Membran in 5 % Magermilch/PBS-T über Nacht bei 4 °C für die Proteine α-Tubulin und Myosin.
Die Blockierungslösung für die Proteine Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin enthielt 7 % Magermilch/TBS-T, und die Inkubation der Nitrocellulosemembran erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.
Nach 1 h Waschen in PBS-T wurde am nächsten Tag der 1. Antikörper – anti-α-Tubulin-mo (5 µg/ml) in PBS-T und anti-Myosin-rb (1:1000) in PBS-T – auf die Membranen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.
Für die Proteine Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin erfolgte die Verdünnung der Erstantikörper in 7 % Magermilch/TBS-T folgendermaßen:

anti-Aktin-mo	1:500
anti-α-Aktinin-rb	1:500
anti-Bande 3-rb	1:1000

anti-Spektrin-rb 1:1000

Danach wurde erneut für 30 min mit PBS-T bzw. TBS-T gewaschen (1x 15 min und 3x 5 min), woraufhin der 2. Antikörper α-mo-HRP für Aktin und α-Tubulin und α-rb-HRP für α-Aktinin, Bande 3, Myosin und Spektrin auf die jeweiligen Membranen gegeben wurde.

Die Verdünnung betrug 1:10.000 in PBS-T für die Proteine α-Tubulin und Myosin; für Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin betrug diese 1:20.000 in 7 % Magermilch/TBS-T.

Nach erneutem Waschen mit PBS-T bzw. TBS-T erfolgte die Entwicklung der Membran mit einem ECL-kit (Amersham) sowie die Belichtung des Röntgenfilms.

2.4.3 Verwendete Lösungen und Materialien für Elektrophorese und Western Blot

Tabelle 2: Trenngel-Zusammensetzung (Gassen & Schrimpf, 1999)

Gelzusammen-setzung	**5 %**	**8 %**	**10 %**	**12 %**
40 % Acrylamid	6,2 ml	11,6 ml	12,5 ml	15 ml
Trenngelpuffer 1 mM Tris-HCl pH 8,8	18,8 ml	18,8 ml	18,8 ml	18,8 ml
Wasser (A. bidest.)	29 ml	22,3 ml	17,8 ml	14,1 ml
10 % SDS	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
10 % APS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Tabelle 3: Sammelgel-Zusamensetzung (Gassen & Schrimpf, 1999)

Gelzusammen-setzung	**5 %**	**7,5 %**	**10 %**	**12,5 %**
40 % Acrylamid	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer 1 mM Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Wasser (A. bidest.)	14,6 ml	14,6 ml	14,6 ml	14,6 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
10 % APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Verwendete Lösungen für die Proteine α-Tubulin und Myosin:

SDS-Probenpuffer

Rotiphorese SDS-PAGE (Roth)

Elektrodenpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Transferpuffer

39 mM Glycin
48 mM Tris-HCl
0,14 mM SDS
2 % Methanol

PBS (Zellkultur)

136 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,8 mM KH_2PO_4
10 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
pH 7,3 (eingestellt mit 1 N NaOH)

PBS-T

0,1 % Tween

Membran Blockierungslösung

1 g Magermilchpulver (Glücksklee) auf 20 ml PBS-T

Filterpapier/Nitrocellulosefolie

5,5 cm x 8,3 cm
(Bio Rad Filterpapier Nr. 79825 / Nitrocellulosemembran: Schleicher & Schuell 0,45 µm; Nr.401196)

Proteinbestimmung nach Lowry-Reagenzien

10 % $Na_2 CO_3$-Lsg.
0,1 % $CuSO_4$-Lsg.
Folin-Reagenz – MERCK (1 ml + 2 ml H2O)
Proteinstandard BSA 6 mg/ml

Lysepuffer

10 ml PBS
10 µl DTT (1 mM)
10 µl Benzamidin (1 mM)
53 µl Aprotinin (10 µg/ml)
100 µl Leupeptin (10 µg/ml)
alle Bestandteile bezogen von der Firma Sigma

Marker

Sigma Myosin (M 3989) aus MW-SDS-200 KIT

Verwendete Lösungen für die Proteine Aktin, α-Aktinin, Bande 3 und Spektrin:

SDS-Probenpuffer

50 mM Tris-HCl pH 6,8
2 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
10 % Glycerol
100 mM DTT

Elektrodenpuffer

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1 % SDS

Transferpuffer

39 mM Glycin
37 mM Tris-HCl
20 % Methanol

TBS-T

10 mM Tris-HCL pH 7,4
150 mM NaCl
0,2 % Tween

Membran Blockierungslösung

1,4 g Magermilchpulver (Glücksklee) auf 20 ml TBS-T

Filterpapier / Nitrocellulosefolie

12 cm x 14 cm
(Filterpapier: Whatman / Nitrocellulosemembran: Protran-N-Nitrocellulose)

Lysepuffer

10 ml PBS
10 µl DTT (1 mM)
10µl Benzamidin (1 mM)
53 µl Aprotinin (10 µg/ml)
100 µl Leupeptin (10 µg/ml)
alle Bestandteile bezogen von der Firma Sigma

Marker

Sigma, NEB, Amersham

2.5 Immunfärbungen – Proteinlokalisation über Antikörpermarkierung

Immunfluoreszenz-Verfahren werden im Allgemeinen zur Detektion von Antigenstrukturen in Zellen oder Geweben verwendet. Dabei macht man sich Antiseren bzw. daraus aufgereinigte Antikörper zunutze, die man durch Immunisierung eines Organismus gegen ein zu untersuchendes Antigen gewinnt.

Die weiteste Verbreitung unter den Immunfluoreszenztechniken hat die indirekte Markierung erlangt, welche auch in der vorliegenden Studie angewendet wurde. Bei diesem Verfahren markiert man das gesuchte Antigen zunächst mit einem Primärantikörper, der z.B. aus Kaninchen stammt. Der zweite Antikörper ist fluorochromkonjugiert und ein anti-Kaninchen-IgG oder -IgM, der aus einem anderen Tier (Ziege, Affe etc.) erhalten wurde.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung gilt allgemein als sensitiver, da mehrere Moleküle des Zweitantikörpers und damit mehrere Markermoleküle an einen Primärantikörper binden können (siehe Abb. 5). Zum anderen ist die Methode kostensparend und flexibel, da jeder Erstantikörper aus demgleichen Tier mit demselben Zweitantikörper markiert werden kann (Liddell & Weeks, 1996).

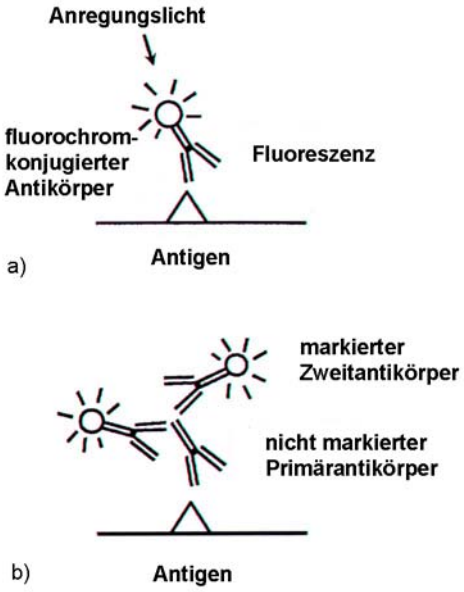


Abb. 5: a) **Direkte Immunfluoreszenzmarkierung:** Das Fluorochrom befindet sich direkt am Markierungsantikörper, der nach Beleuchtung mit der Anregungswellenlänge Fluoreszenzlicht emittiert.
b) **Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung:** Das Antigen wird zunächst mit einem nicht-markierten Antikörper (z.B. aus Kaninchen) detektiert. Anschließend erfolgt die Fluoreszenzmarkierung mit einem fluorochromkonjugierten Zweitantikörper anti-Kaninchen-Ig (verändert nach Liddell & Weeks, 1996).

2.5.1 Immunfärbung der isolierten Haarsinneszellen

Für die Antikörperfärbung wurden die Haarsinneszellen zunächst isoliert und auf zwei Objektträger-Rundfeldern ausgebracht, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Nach der Kontrolle der Zellausbeute wurde zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen die HBSS-Lösung abgezogen und eiskaltes Methanol (100 µl, -20°C) auf die Zellen gegeben. Dieser Schritt erfolgte auf Eis. Anschließend wurde 2 x gewaschen mit jeweils 100 µl HBSS oder PBS. Nach dem Fixierungsschritt ist die Verwendung des Zellkulturmediums HBSS nicht mehr von Nöten, so dass hier auch reiner Waschpuffer (PBS) verwendet werden kann.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der permeabilisierten Zellen erfolgte eine Präinkubation für 30 min in einer feuchten Kammer mit 1 % BSA in PBS, später mit 3 % Magermilchpulver in PBS-Lösung. Die Hintergrundfärbung nach Magermilchbehandlung erwies sich als geringer im Vergleich zur BSA-Blockierung.

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Zellen eines Rundfeldes mit 100 µl der Primärantikörperlösung. Das Kontrollrundfeld (zweites Rundfeld) wurde mit 100 µl PBS versehen und der Objektträger über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde 3 x mit 400 µl PBS gewaschen, woraufhin 100 µl des 2. Antikörpers auf beide Rundfelder gegeben und der Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur, im Dunkeln und in einer feuchten Kammer stehen gelassen wurde.

Nach erneutem Waschen (2 x 400 µl PBS) entfernte man den Silikonring mit einem Skalpell. Der letzte Waschschritt erfolgte unter Zugabe von 100 µl PBS, dem sich das Eindeckeln mit dem Mountingmedium Vectashield anschloss. Dieses sog. anti-fading-Medium soll ein schnelles Ausbleichen der Proben während der Fluoreszenzmikroskopie verhindern.

Zur Befestigung des Deckglases wurde dieses mit Nagellack umrahmt und so am Objektträger fixiert.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Arbeitsschritte zur Isolierung und Immunfärbung von Haarsinneszellen

Arbeitsschritt	**Verwendete Lösungen und Arbeitsmittel**
Präparation der Neuromasten	Aufnehmen von je 5 Neuromasten in 100 µl HBSS in zwei Petrischalen
Haarsinneszellisolierung	Zugabe von 100 µl Collagenase (2-4 mg/ml) Inkubation für 10-20 min / RT
Suspendieren	Suspendieren der aus der Collagenase in je 100 µl HBSS aufgenommenen Neuromasten in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml); 1 x ausspülen mit 100 µl HBSS
Übertragung auf Objekträger	Isolierte HSZ von je 5 Neuromasten werden auf 1 Rundfeld eines beschichteten Objektträgers gegeben
Kontrolle der Zellausbeute	Mikroskop
Fixierung und Permeabilisierung	Methanol –20 °C / auf Eis / 15 min
Waschen	2 x 100 µl PBS / RT / je 5 min
Präinkubation zur Blockierung	3 % Magermilchpulver / PBS / RT / 30 min in feuchter Kammer
1. Antikörper	gelöst in 0,5 % BSA / PBS / 100 µl / 4 °C / über Nacht in feuchter Kammer
Waschen	3 x 400 µl PBS je 5 min
2. Antikörper	gelöst in 0,5 % BSA / PBS / 100 µl / RT / 1 h / Dunkel in feuchter Kammer
Waschen	2 x 400 µl PBS je 5 min
Silikonringentfernung	Skalpell
Waschen	1 x 100 µl PBS 5 min
Eindecken	1 Tropfen Vectashield
Deckglasfixierung	Nagellack

RT = Raumtemperatur

2.5.1.1 Verwendete Antikörper

In der vorliegenden Studie wurden handelsübliche mono- und polyklonale Antikörper verwendet und ihre Spezifität im Fischgewebe im Western Blot überprüft. Dabei kamen folgende **primäre Antikörper** zum Einsatz:

Monoklonale Antikörper:

Anti-Aktin-IgG$_1$-aus Maus
Antigen: Aktin aus Hühnermagen
(Roche)
angewendete Verdünnung: 1:100 in 0,5 % BSA/PBS

Anti-α-Tubulin-IgG$_1$ aus Maus-Ascites-Flüssigkeit
Antigen: α-Tubulin aus Hühnergehirn
(Sigma)
angewendete Verdünnung: 1:10 in 0,5 % BSA/PBS

Polyklonale Antikörper:

Anti-α-Aktinin aus Kaninchen (Gesamtserum)
Antigen: α-Aktinin aus Hühnermagen
(Sigma)
angewendete Verdünnung: 1:100 in 0,5 % BSA/PBS

Anti-Bande 3 Anionen Austauscher (AE) aus Kaninchen
Antigen: Anionen-Transporter aus Hühnererythrozyten
(Chemicon)
angewendete Verdünnung: 1:80 in 0,5 % BSA/PBS

Anti-Myosin (glatter und quergestreifter Muskel) aus Kaninchen (Gesamtserum)
Antigen: Myosin aus glattem Muskel (Uterus) vom Rind
(Sigma)
angewendete Verdünnung: 1:150 - 1:200 in 0,5 % BSA/PBS

Anti-Spektrin aus Kaninchen (Gesamtserum)
Antigen: Spektrin (α und β Ketten) Hühnererythrozyten
(Sigma)
angewendete Verdünnung: 1:80 in 0,5 % BSA/PBS

Als sekundäre Antikörper wurden FITC (Fluoresceinisothiocyanat)- und Cy (Cyanin)-Farbstoffe verwendet. Diese beiden Farbstoffe haben unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften, d.h. verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen:

Tabelle 5: Fluoreszenzdaten der verwendeten Farbstoffe (aus Lidell & Weeks, 1996)

Farbstoff	Abkürzung	Anregungs-wellenlänge [nm]	Emmissions-wellenlänge [nm]	Farbe
Fluorescein-isothiocyanat	FITC	495	515	Apfelgrün
Indocarbo-cyanin	Cy3	554	568-574	Orange

Folgende Zweitantikörper fanden bei der Probenvorbereitung Verwendung:

Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)-FITC konjugiert
(ICN)
angewendete Verdünnung: 1:120 in 0,5 % BSA/PBS

Ziege-anti-Kanninchen-IgG (H+L)-FITC konjugiert
(Jackson ImmunoResearch bezogen über DIANOVA)
angewendete Verdünnung: 1:120 in 0,5 % BSA/PBS

Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)-Cy3 konjugiert
(Jackson ImmunoResearch bezogen über DIANOVA)
angewendete Verdünnung: 1:800 bis 1:3000 in 0,5 % BSA/PBS

Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)-Cy3 konjugiert
(Jackson ImmunoResearch bezogen über DIANOVA)
angewendete Verdünnung: 1:3000 in 0,5 % BSA/PBS

Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)-Cy2 konjugiert
(Jackson ImmunoResearch bezogen über DIANOVA)
angewendete Verdünnung: 1:300 bis 1:500 in 0,5 %BSA/PBS

2.5.1.2 Verwendete Reagenzien zur Immunfärbung

Hanks balanced salt solution (siehe Kapitel 2.2.1) HBSS (Sigma)

PBS-Waschpuffer (für Zellkultur)

136 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,8 mM KH_2PO_4
10 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
pH 7,3 (alle Fluka und Merck)

Fixier- bzw. Permeabilisierungslösung
Methanol 98 % (Fluka)

Blockierungslösung
Um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren, wurden die Zellen zunächst mit einer 1 % BSA (Serva)/PBS-Lösung geblockt. Da man mit 3 % Magermilchpulver (Glücksklee) eine noch geringere Hintergrundfluoreszenz erreichen konnte, wurde im Verlaufe der Experimente auf genannte Blockierungslösung umgestiegen.

Antikörperverdünnungslösung
Die Antikörper wurden zur Stabilisierung mit 0,5 % Rinderserumalbumin-BSA (Serva) in PBS verdünnt.

Silikonumrahmung
Mit einer 1 ml Einwegspritze, die mit Aqua Dicht Silikon (Knauf) gefüllt und an deren Ende eine 100 µl Pipettenspitze angebracht war, wurde ein Silikonring um die Objektträgerrundfelder gespritzt.

Eindeckmedium und Deckgläser
Das Eindeckmedium Vectashield (Vector) verhindert vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzpräparate. Deckglas 18 x 18 mm (Menzel).

2.6 Mikroskopie und Auswertung der Immunpräparate

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie nutzt die Eigenschaft von Fluoreszenzmarkern, durch eine bestimmte Anregungswellenlänge zur Abgabe von längerwelligem Licht (Emissionsspektrum) angeregt zu werden.
Zur Auswertung der hergestellten Fluoreszenzpräparate wurde ein Olympus-Fluoreszenzmikroskop verwendet (OLYMPUS BH2-RFC). Dabei diente eine 100 Watt Quecksilberdampflampe (Osram HBO 100 W/2) als Lichtquelle, und folgende Filtereinsätze kamen zum Einsatz:

Tabelle 6: Verwendete Filtersätze des Olympus Fluoreszenzmikroskops

	FITC	**Cy 3**
Anregungsfilter	B 435	G 546
Farbteiler	20 BP 490	20 BP 545
Sperrfilter	17 AFC + 170515	170590

Verwendung fanden folgende Objektive:
OLYMPUS SPLAN 10 PL 10fach 0,30
OLYMPUS SPLAN 20 PL 20fach 0,46
OLYMPUS SPLAN 40 PL 40fach 0,70
OLYMPUS SPLAN 100 PL 100fach 1,25 Öl
Mit dem 100fach Objektiv wurden die Einzelaufnahmen im Phasenkontrast- und der Fluoreszenzdarstellung erstellt, bei der man eine effektive Vergrößerung von 1250fach [Okulare (10 x) x Tubusvergrößerung (1,25 x) x Objektiv (100 x)] erreichte.
Die fotografische Auswertung erfolgte mithilfe der automatischen Photoeinrichtung (OLYMPUS PM-10ADS) unter Verwendung von AGFA pan 100 s/w Film sowie KODAK Ektachrome 64 Kunstlichtfarbfilm. Die Belichtungszeiten für die Fluoreszenzbilder wurden zunächst automatisch ermittelt und die Zeiten festgehalten, um hierauf die Blende für die gemessene Zeit zu öffnen.
Aufgrund der Möglichkeiten der feineren Belichtungszeiteinstellung in der abschließenden fotografischen Papierentwicklung im Fotolabor wurden die Bildabzüge mit Schwarzweißfilmmaterial angefertigt.

2.6.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bietet gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie den Vorteil, dass von markierten Zellen und Geweben dünne optische Schnitte in verschiedenen Ebenen angefertigt werden können, ohne dabei wie im normalen Fluoreszenzmikroskop Streulicht aus den Ebenen darüber und darunter mit aufzufangen. Dabei erreicht man mit dem Konfokalmikroskop eine höhere räumliche, d.h. axiale Auflösung. Der genannte Vorteil beruht auf der Tatsache, dass nicht die gesamte gefärbte Struktur beleuchtet wird, sondern nur ein kleiner Ausschnitt (regulierbar über eine Lochblende). Hierbei dient als Lichtquelle ein Laser, der spezifische Anregungswellenlängen aussendet. Das von der Probe abgegebene Fluoreszenzlicht wird ebenfalls durch eine Lochblende geleitet, die Streulicht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, ausblendet und nur die Fluoreszenz des konfokal eingestellten Fokusebenenbereichs abbildet (Abb. 6). Zur Erstellung des Gesamtbildes wird nun Punkt für Punkt der gewählte Bildausschnitt abgescannt und auf einem Photomultiplier aufgezeichnet, indem der Lichtstrahl über bewegliche Spiegel in X- und Y-Richtung bewegt wird und ein Computer die gesammelten Bilddaten zu einem zweidimensionalen Bild zusammensetzt. Über Schnittserien kann man später ein Gesamtbild der Zelle erstellen, welches jede Ebene scharf und ohne Schleierfluoreszenz darstellt oder dreidimensionale Bilder der aufgenommenen Zelle bzw. Struktur digital berechnen lassen.

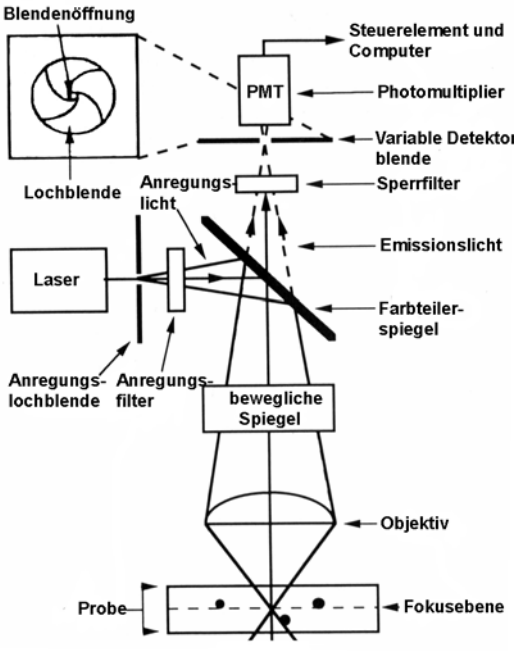


Abb. 6: Aufbau eines Konfokalmikroskopes (verändert nach Centonze & Pawley, 1995)

Bei der vorliegenden Studie wurde mit einem MRC-1000 Konfokalmikroskop (Bio-Rad Microscience Ld., Hempstead, UK) gearbeitet, das mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 135) verbunden ist. Als Anregungslichtquelle findet an der vorliegenden Messapparatur ein Argon-Laser (Coherent Enterprise Argon Ion Laser, Modell 622, Coherent Laser Group, Santa Clara, USA) Verwendung, der Licht der Wellenlängen 351 nm und 363 nm sowie sichtbares Licht der Wellenlängen 488 nm und 514 nm abgibt. Über einen Anregungsfilter, der die gewünschte Wellenlänge hindurchlässt und einen Farbteilerspiegel (UHBS, reflektiert Wellenlängen von 351/363 und 488 nm, Bio-Rad) wird die Probe mit dem Laserlicht angeregt. Das Anregungslicht trifft beim Durchgang zum Präparat auf die beweglichen Spiegel, die die Verschiebung des Laserstrahls in X-/Y-Richtung auf unterschiedliche Punkte des Fokusbereiches ermöglichen. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird über denselben Weg durch einen entsprechenden Sperrfilter (OG 515 für FITC und 580/32 für Cy 3) auf einen Photomultiplier, der als Epidetektor fungiert, geleitet. Vor dem Photomultiplier befindet sich eine einstellbare Lochblende mit der die jeweilige Größe des Fokusbereiches eingestellt werden kann. Die gesamte Apparatur, mit der das Anregungslicht das Präparat abtastet sowie die drei verfügbaren Photomultiplier, befinden sich im sog. Scan Head, der einerseits mit dem Lasergenerator und andererseits mit dem Mikroskop verbunden ist. Am Mikroskop lässt sich der Objekttisch (und damit die Probe) mit einem Fokusmotor in vertikaler Richtung bewegen, so dass Bilder verschiedener „Schnittebenen“ aufgezeichnet werden können. Mit dieser Einrichtung wurden die untersuchten Zellen in sog. Z-Serien vertikal mit Schnittabständen zwischen 0,25 µm und 0,5 µm dargestellt.

Die Bestandteile des Scan Heads sowie der Fokusmotor werden über eine Software (Bio-Rad Laser Sharp MRC-1024 Confocal System, Version 3.1, Bio-Rad Microscience Ltd., Hempstead, UK) vom Computer aus gesteuert, der über die Steuerungseinheit „System Control Unit (SCU)“ genannte Apparaturteile des Aufbaus anspricht. Über dieselbe Schaltstelle werden die vom Photomultiplier aufgezeichneten Bilder an den Computer geleitet und auf dem Monitor abgebildet.

Die Präparate wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan Neofluar 63 x / 1,25 Oil) untersucht. Die weitere Bildbearbeitung (Falschfarbendarstellung, Größeneinstellung etc.) erfolgte mit der Sofware Bio Rad Laser Sharp MRC-1024 Confocal System bzw. mit dem Bio-Rad Programm Confocal Assistant (Version 4.02, Copyright 1994-1996 Todd Clark Brelje) am Computer.

Abschließend wurden sowohl die Phasenkontrast- und Normalfluoreszenzbilder als auch die am Konfokalmikroskop erstellten Bilder digital nachbearbeitet (Kontrast- und

Hintergrundbearbeitung) mit dem Programm Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc., 1999).

2.6.3 Zellgrößenbestimmung

Die Zellgrößenbestimmung wurde an Fotos von fixierten Zellen in der Phasenkontrastdarstellung vorgenommen. Dabei diente die Strecke zwischen Cuticularplatte und basalem Zellende der Bestimmung der Längsachse. Die Querachse wurde an der breitesten Stelle der Zelle gemessen. Zellen, die verformt oder nicht plan in der mikroskopischen Ebene lagen, wurden nicht in die Zellgrößenbestimmung miteinbezogen.
Die Zelldimensionen wurden mithilfe eines abfotografierten Größenmaßstabs (Leitz) ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1. Zellisolierung

3.1.1 Morphologie der Gewebe und Zellen im Phasenkontrast

Die von der Schädelplatte des Fisches abgelösten Neuromasten zeigen im Phasenkontrastbild die HSZ im Gewebeverband, über denen sich die bei *Pantodon* trapezförmig ausgeprägte Cupula erhebt (Schwartz, 1965). In Abbildung 7 A erkennt man die Haarsinneszellen (Pfeil) an den Stereocilienbündeln, die in die massige Cupula hineinragen.

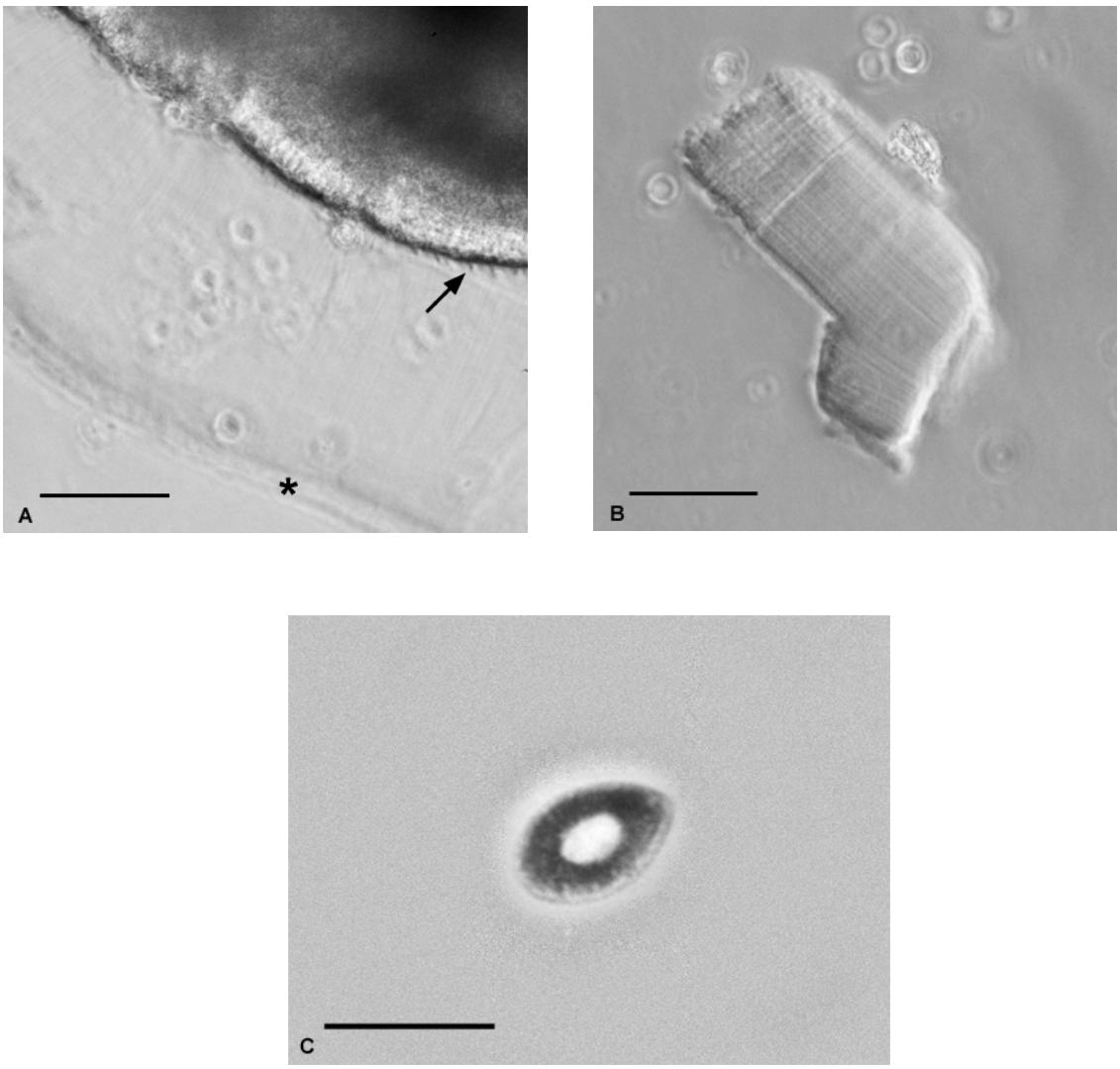


Abb. 7: A Herauspräparierter Kopfneuromast von *Pantodon buchholzi* vor der Suspendierung mit der Mikropipette. Pfeil: Stereocilienbündel; *: Cupularand. Der Balken entspricht 100 µm.
B Cupularest nach erfolgter Suspendierung. Deutlich zu erkennen ist die Längs- und Querstreifung der Cupula. Der Balken entspricht 10 µm.
C Fischerythrocyt mit zentriert liegendem weiß erscheinendem Kern. Der Balken entspricht 10 µm.

Nach erfolgter Suspendierung der Kopfneuromasten mit der Mikropipette erhält man eine Zellsuspension, die verschiedene schon bei Stroh (1992) beschriebene Zellbestandteile enthält. Neben Gewebetrümmern und Resten des Neuromastengewebes, findet man im Phasenkontrast abgekugelte Stützzellen, Erythrocyten (Abb. 7 C) sowie die eigentlichen Haarsinneszellen (Abb. 8), die durch ihre charakteristische Form und ihr stark doppelbrechendes Erscheinungsbild gut erkennbar sind.

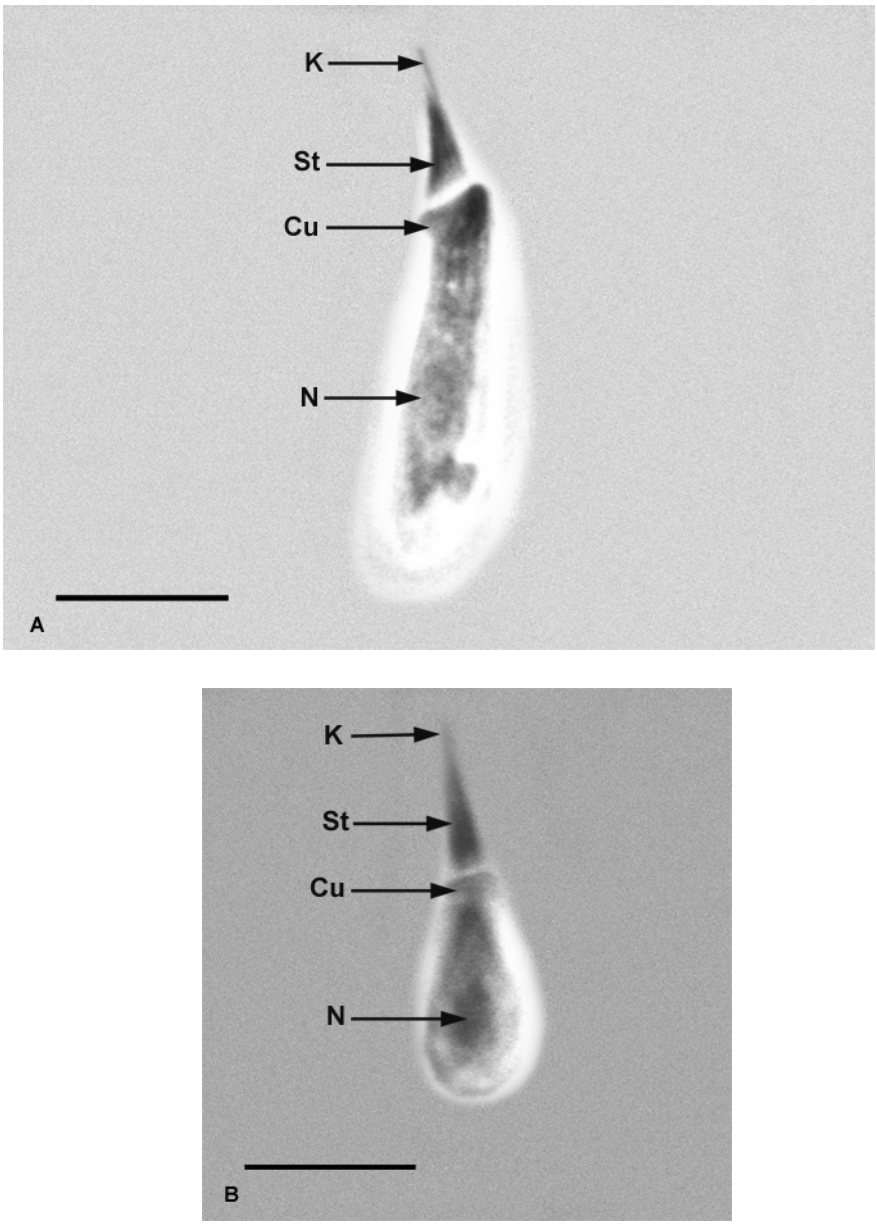


Abb. 8: A Zylindrische bzw. flaschenförmige Haarsinneszelle im Phasenkontrast.
B Haarsinneszelle mit birnenförmiger Gestalt.
K: Kinocilium; St: Stereocilien; Cu: Cuticularplatte; N: Nucleus
Skalierungsbalken entspricht jeweils 10 µm.

Des Weiteren kann man an Cupularesten deren sowohl längs- als auch quer verlaufende, fibrilläre Netzwerkstruktur erkennen, wie sie auch die intakte Cupula in-situ zeigt (Müller, 1984; Blübaum, 1989; Stroh, 1992) (Abb. 7 B).

Gelegentlich erscheinen Sinneszellpärchen in den Präparationen, die die typische paarweise Anordnung der HSZ im Neuromasten widerspiegeln. Diese beiden HSZ weisen eine entgegengesetzte Richtungsempfindlichkeit auf, wie aus der Stellung des jeweils apikal entspringenden Kinociliums abgeleitet werden kann. Auf die pärchenweise Anordnung der HSZ im Neuromasten von *Pantodon* weist auch Müller (1984) mit in-situ-REM-Aufnahmen hin.

Im Allgemeinen kommen die Haarsinneszellen aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* sowohl in zylindrischer- (flaschenförmiger) als auch in einer eher birnenförmigen Gestalt vor (Abb. 8 A, B). Im Gegensatz zu cochleären HSZ weisen sie ein einzelnes Kinocilium auf, das randständig ist und an das sich die Stereocilien in abgestufter Größe anschließen. Die Länge des Kinociliums variierte in den Präparationen erheblich, wobei es immer deutlich größer war als das längste Stereocilium. Das längste im Phasenkontrast gemessene Cilium maß 16 µm und erreichte damit fast die Länge des Zellkörpers, der 19,1 µm umfasste. Eine in 3.1.2 beschriebene rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt eine Zelle, die mit 18,7 µm ein um ca. 3,6 µm längeres Kinocilium im Vergleich zum Zellkörper aufwies. Bei den übrigen Zellen lag die Kinocilienlänge über dem des längsten Stereociliums im Bereich zwischen 6,9 und 4,1 µm (REM-Aufnahmen, n = 6).

Die Zellkörperlängen zeigten ebenfalls variierende Werte. Dabei wurden zum einen fixierte Zellen aus verschiedenen Präparationen (n = 74) sowie 60 Zellen eines einzelnen Präparates in ihrer Länge und Breite bestimmt. Im Querschnitt über verschiedene Präparationen umfasste die längste Zelle 27,4 µm und die kürzeste 12,2 µm. Die Breite der Zellen umspannte einen Wertebereich zwischen 10,4 µm und 4,3 µm.

Bei der ausgemessenen Einzelisolation wies die längste Zelle eine Länge von 27,4 µm auf, die kürzeste maß 13,9 µm. Die Zellbreiten differierten hierbei zwischen 10,4 µm und 5,2 µm. In Tabelle 7 sind die Mittelwerte beider Messungen gezeigt, im Anhang (siehe Kap. 7.2) befinden sich die Tabellen der Größenbestimmung.

Trotz den bei den Haarzellisolationen auffallenden unterschiedlichen Formen (längere, flaschenförmige und dickere birnenförmige HSZ) konnte in beiden ausgemessenen Zellgruppen anhand der Zellmaße keine Aufteilung der HSZ in zwei Zellpopulationen vorgenommen werden. Die grafische Auswertung (s. Anhang Kap. 7.2, Abb. 29, 30) zeigt vielmehr eine kontinuierliche Längenverteilung von großen zu kleinen HSZ, die einer „Gaußschen Verteilung“ ähnelt.

Tabelle 7: Durchschnittswerte für die Zelldimensionen von Haarsinneszellen aus der Seitenlinie

	Zelldimensionen mehrerer Präparationen (n = 74)	**Zelldimensionen eines einzelnen Präparates (n = 60)**
Durchschnittliche Zelllänge	19,3 ± 3 µm	20,8 ± 3,4 µm
Durchschnittliche Zellbreite	7,3 ± 1,2 µm	7,6 ± 1 µm

3.1.2 Morphologie der Zellen in der Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen an isolierten HSZ boten genauere Einblicke insbesondere hinsichtlich der apikalen Zelldifferenzierung.

Prominent ist hierbei das randständige Kinocilium, an das sich die abgestuften Stereocilien anschließen. Das Kinocilium war mit 0,1–0,2 µm bei den meisten Zellen etwas dünner. Es konnte dabei keine Verdickung am distalen Ende beobachtet werden (Abb. 9, 10, 11), wie dies für HSZ aus dem Gehörorgan des Frosches beschrieben wurde (Flock, 1971). Die Größe des Kinociliums variierte wie erwähnt (Kap. 3.1.1) erheblich. Man konnte dabei, neben den HSZ mit extrem langem Cilium, Zellen finden, deren Kinocilium offensichtlich bei der Isolation abgebrochen war, wie in Abbildung 17 gezeigt. Der Pfeil weist hier auf die Abbruchstelle hin, die eine Vertiefung in der Mitte erkennen lässt und den Eindruck eines Hohlzylinders vermittelt. In der Mehrzahl der Fälle war das Kinocilium jedoch von mittlerer Länge zwischen 4,1 und 6,85 µm (n = 5), wobei diese keine distinkte Abbruchkante aufwiesen (Abb. 9, 10, 16).

Die HSZ bildeten in der Regel 6–8 Längsreihen (n = 14) von Stereocilien, wobei 7 Reihen am häufigsten vorkamen (bei 9 Zellen). Die Stereocilien selbst verjüngten sich vor dem Eintritt in die Cuticularplatte, welche bei den meisten Zellen als stabile Plattform ausgeprägt war (Abb. 9, 13, 14). Das Cilienbündel insgesamt zeigte V-Form (Abb. 10), wobei die Spitze vom Kinocilium gebildet wurde und die Stereocilien die Flanken bildeten. Die Stereocilienbreite betrug im distalen Bereich zwischen 0,15 und 0,22 µm (∅ = 0,18 µm ± 0,02 µm mit n = 16), währenddessen sich diese auf 0,06–0,03 µm im Bereich der Cuticularplatteninsertionsstelle reduzierte (Abb. 9). Die verschieden langen Stereocilien einer Zelle unterschieden sich untereinander wenig bezüglich der Breite, liefen aber in sich leicht konisch zu, um an der Spitze abgerundet zu enden.

Die Anordnung der 30–50 Stereocilien war bei intakten HSZ stets hochgeordnet, und deren Höhe nahm zum Kinocilium hin zu. Die Auswertung der Stereocilienlängen ergab

für das längste Cilium Werte zwischen 2,7 und 4,3 µm mit einer durchschnittlichen Länge von 3,62 ± 0,76 µm (n = 13). Für das kürzeste Stereocilium wurden Werte zwischen 0,6 und 1,07 µm gemessen, mit einer Durchschnittslänge von 0,78 ± 0,18 µm (n = 14).

Bei einigen Zellen (n = 5) konnte die Größenabstufung der Stereocilien bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass oftmals die Größenzunahmen der Stereocilien von Reihe zu Reihe mit gleichen Differenzbeträgen anstieg. Dies ist vermutlich auch der Grund für das hochgeordnete Erscheinungsbild des Cilienbündels bei den HSZ (Abb. 9, 10, 16). Die Größenordnung der Stufen lag dabei meist im Bereich von 0,3–0,4 µm (s. Anhang Kap. 7.1).

Die Stereocilien wiesen des Weiteren bei einigen Zellen fibrilläre Verbindungen untereinander auf, die im mittleren bis basalen Bereich lagen (Abb. 14). Weitere Verbindungen waren, z.T. im apikalen Bereich der Stereocilien zu beobachten (Abb. 15). Diese, an „tip links“ von cochleären HSZ erinnernde Filamente, befanden sich zwischen Stereocilien hintereinander stehender Reihen.

In den Präparaten fanden sich auch Zellen, deren Cilienbündel defekt bzw. abgerissen war. In Abbildung 18 ist die Cuticularplatte einer HSZ gezeigt, deren Stereocilien zum größten Teil aus- bzw. abgebrochen sind. Mit St gekennzeichnet sieht man links „Stereocilienstümpfe“, die weiter distal abgebrochen sind. Der schwarze Pfeil markiert die relativ glatte Membranoberfläche an den Stellen, an denen die Stereocilien herausgebrochen sind. Offenbar hinterließen diese keine gravierenden Löcher in der Plasmamembran.

Insgesamt zeigten die Zellkörper der meisten Zellen in der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung eine glatte Oberfläche (Abb. 11, 13). Anhänge konnten bei einigen Zellen jedoch beobachtet werden. In Abbildung 16 sieht man eine HSZ, die im hinteren Bereich der Cuticularplatte eine lappenförmige Zellausstülpung aufweist. Weiterhin zeigten einige HSZ kleinere Zellausstülpungen auf der Zelloberfläche (Abb. 13) oder wiesen, wie von Tittel (1991) für *Aplocheilus lineatus* beschrieben, irreguläre Mikrovilli außerhalb des Cuticularplattenbereiches auf (Abb. 14).

Einen weiteren Zellanhang zeigen die Abbildungen 19 und 20. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen Rest der afferenten oder efferenten Innervation der HSZ im basolateralen Zellabschnitt. Man könnte dies, nach der Auschnittvergrößerung zu urteilen, als synaptisches Endköpfchen (Pfeil) mit einem Stück der ableitenden Faser deuten.

Die genauen Daten zu den Zelldimensionen im REM befinden sich im Anhang (Kap. 7).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Haarsinneszellen aus dem Seitenlinienorgan von *Pantodon buchholzi*

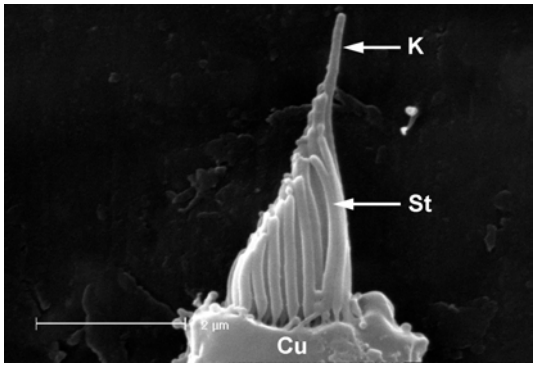


Abb. 9: Apikaler Zellbereich einer Haarsinneszelle (HSZ) in der Seitenansicht. Gut erkennbar sind die sich zur Cuticularplatte (Cu) hin verjüngenden Stereocilien. St: Stereocilien; K: Kinocilium. Balken entspricht 2 µm.

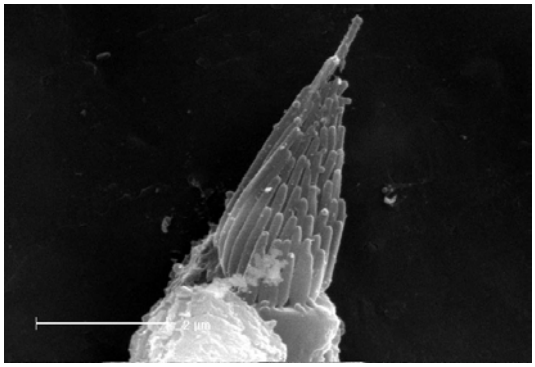


Abb. 10: Cilienbündel einer HSZ, schräg von oben. Das lange Kinocilium im Hintergrund überragt die 50 V-förmig angeordneten und nach vorne hin deutlich abgestuften Stereocilien. Balken entspricht 2 µm.

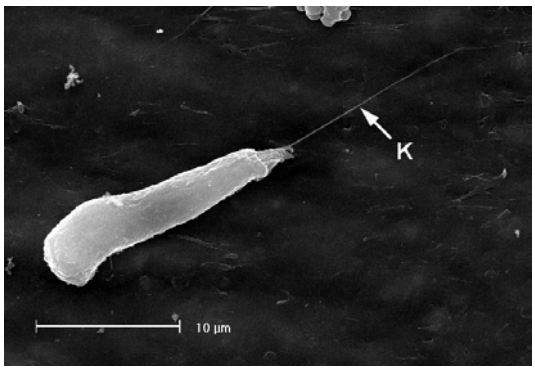


Abb. 11: HSZ in der Gesamtansicht. Die Länge des Kinociliums (K) beträgt bei dieser Zelle 18,7 µm und ist damit länger als der Zellkörper (15,1 µm). Balken entspricht 10 µm.

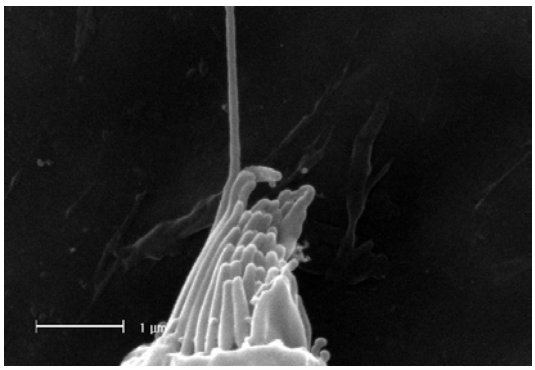


Abb. 12: Ausschnittvergrößerung des Cilienbündels der HSZ aus Abb. 11. Im Hintergrund überragt das Kinocilium die bei dieser Zelle wesentlich kleineren Stereocilien. Balken entspricht 1 µm.

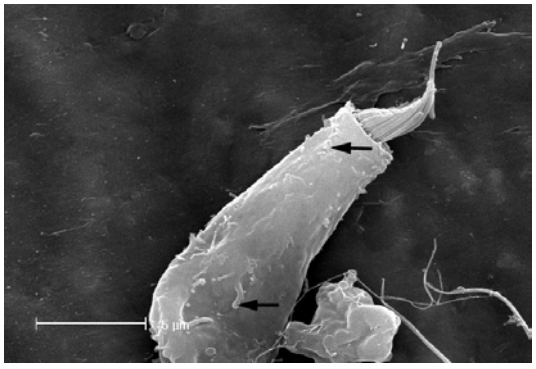


Abb. 13: Isolierte HSZ. Erkennbar ist hier die insgesamt glatte Oberfläche des Zellkörpers. Die Pfeile zeigen bei einigen HSZ erkennbare Zellausstülpungen. Balken entspricht 5 µm.

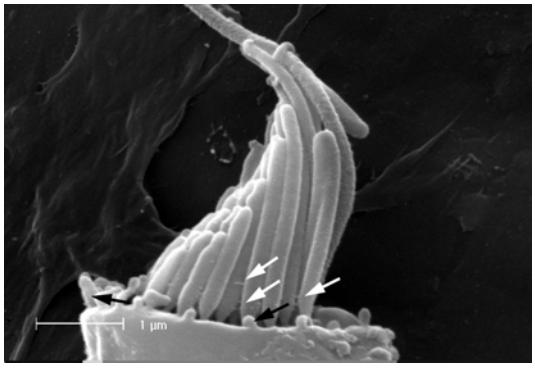


Abb. 14: Ausschnittvergrößerung des Cilienbündels der Zelle aus Abb. 13. Die weißen Pfeile markieren feine Verbindungen zwischen den Stereocilien. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen irreguläre Mikrovilli außerhalb des Cuticularplattenbereiches. Balken entspricht 1 µm.

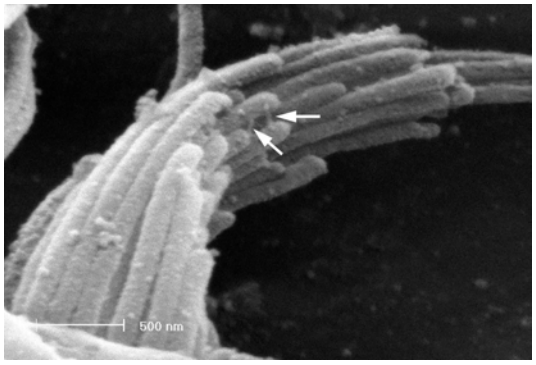


Abb. 15: Stark vergrößertes Cilienbündel mit Verbindungsfilamenten im apikalen Bereich in der Art von „tip links“. Die mit Pfeilen markierten Strukturen haben eine Länge von 122 nm und 134 nm. Balken entspricht 0,5 µm.

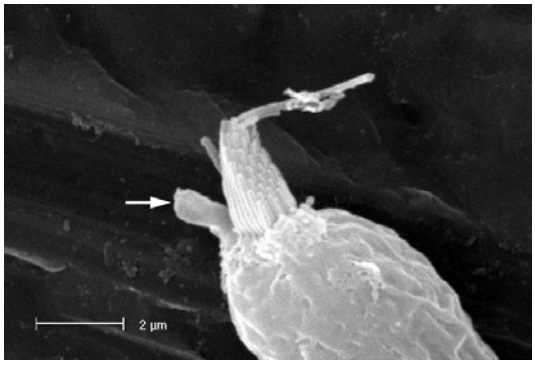


Abb. 16: Der Pfeil markiert eine lappenförmige Zellausstülpung im hinteren Bereich der Zelle. Das Cilienbündel zeigt bei dieser HSZ die hochgeordnete, nach Länge abgestufte Anordnung der Stereocilien. Balken entspricht 2 µm.

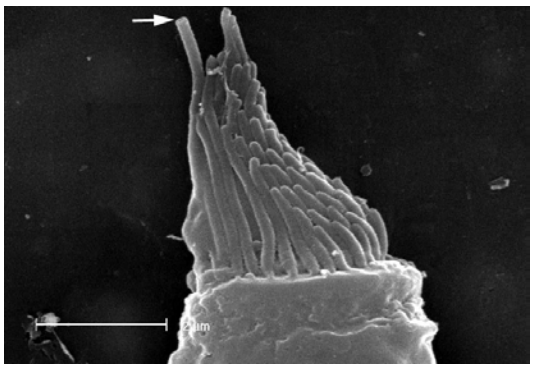


Abb. 17: Die HSZ zeigt ein Kinocilium, welches während der Isolierung abgebrochen ist. Gut erkennbar ist hier der hohlkörperartige, zylindrische Aufbau desselben (Pfeil). Balken entspricht 2 µm.

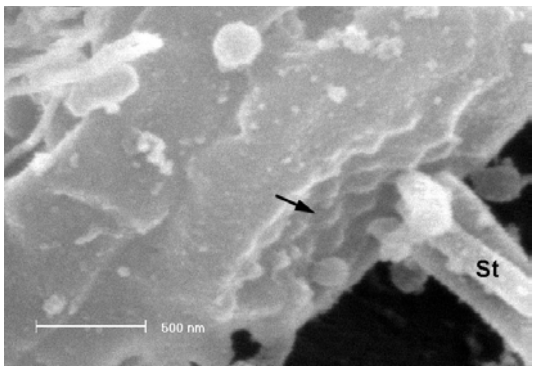


Abb. 18: Apikales Ende einer HSZ, deren Stereocilien zum größten Teil weggebrochen sind. Der Pfeil markiert die Ansatzstelle eines Stereociliums, das eine „glatte Membran“ hinterlässt. St: verbliebene Stereocilienstümpfe. Balken entspricht 0,5 µm.

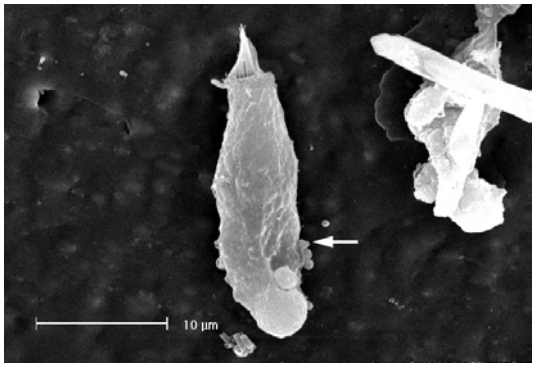


Abb. 19: Isolierte HSZ mit mutmaßlichen synaptischen Fortsätzen im basolateralen Bereich des Zellkörpers (Pfeil). Im basalen Teil der leicht deformierten Zelle bildet sich als kugelige Struktur der Zellkern ab. Balken entspricht 10 µm.

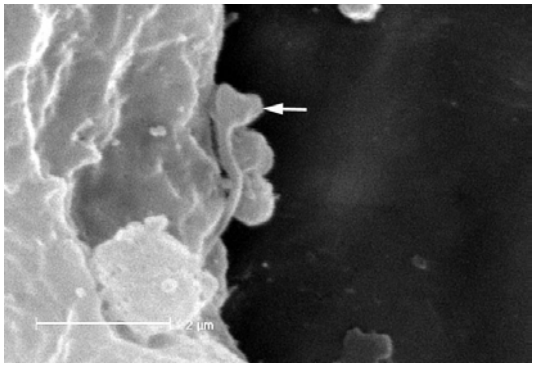


Abb. 20: Ausschnittvergrößerung der synaptischen Strukturen der Zelle in Abb. 19. Der Pfeil markiert ein synaptisches Endköpfchen mit ableitender Faser. Balken entspricht 2 µm.

3.1.3 Zellvitalität und -ausbeute

Die Zellausbeute wurde durch Auszählen der vitalen Zellen im Phasenkontrast bestimmt. Dabei verwendete man die von Zajic & Schacht (1987) beschriebenen morphologischen Kriterien zur Bestimmung der Vitalität von HSZ. Hiernach sollten vitale HSZ im Hellfeld doppelbrechend erscheinen, ihr Kern im basalen Teil der Zelle lokalisiert sein und über ein intaktes Cilienbündel verfügen. Degenerierende HSZ weisen dagegen eine „ausgebeulte“ und vakuolisierte Plasmamembran auf und besitzen ein granuliertes Cytoplasma, in dem Zellorganellen Brownsche Bewegungen zeigen. Stroh (1992) erzielte durch Einschätzung der HSZ nach diesen morphologischen Gesichtspunkten eine Ausbeute von 300–400 vitalen Zellen pro Isolationsvorgang, was einer Ausbeute von 2 % entspricht.

Zusätzlich zu dieser sich an morphologischen Kriterien orientierenden Vitalitäts- und Ausbeutebestimmung wurde in der vorliegenden Studie eine FDA/PI-Vitalfärbung durchgeführt und unter Fluoreszenzlicht ausgewertet. Der Test basiert auf der Membrangängigkeit des FDAs, welches bei enzymatisch intakten Zellen von intrazellulären Esterasen gespalten wird und so der unter FITC Anregungslicht grün fluoreszierende Farbstoff Fluorescein entsteht. Vitale HSZ zeigen somit Grünfluoreszenz.

PI dagegen kann die intakte Plasmamembran nicht passieren und kann somit nicht in vitale HSZ eindringen. Zellen mit defekter Membran dagegen durchdringt der Farbstoff und färbt intrazelluläre DNA und RNA an, was zu einer Rotfluoreszenz des Kerns im FITC-Anregungslicht führt (Jones & Senft, 1985).

Für diesen Vitalitätstest wurden Haarsinneszellisolationen von vier Fischen durchgeführt. In Abhängigkeit von der Fischgröße und der jeweiligen Versuchsdurchführung konnte man zwischen 500 und 1200 HSZ insgesamt isolieren. Dabei fanden sich in der Vitalfärbung vier verschiedene Kategorien an Zellen:

1. 400 bis 700 HSZ zeigten eine positive FDA-Fluoreszenz, eine negative PI-Anfärbung und waren nach morphologischen Gesichtspunkten intakt.
2. Der Anteil defekter und degenerierender Zellen, mit negativer FDA-Färbung und PI positivem Signal (rote Kernfärbung) sowie morphologischer Deformationen betrug weniger als 5 Zellen.
3. 90–120 HSZ zeigten Deformationen des Zellkörpers oder ein Fehlen des Cilienbündels. Trotz dieser Degenerationserscheinungen wiesen diese eine positive FDA-Färbung und keine rote Kernfärbung auf.
4. 25–270 Zellen, darunter intakte wie auch deformierte Zellen, zeigten weder FDA- noch PI-Anfärbung.

Bereits 4–5 Stunden nach der Isolation zeigten fast alle Zellen Degenerationserscheinungen und wiesen dann eine positive PI-Kernanfärbung auf.
Zusammenfassend: Nach allen Kriterien vitale Haarsinneszellen konnten mit dem FDA/PI-Zellvitalitätstest in einer Ausbeute zwischen 2 und 3,5 % bestimmt werden.

3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Kontrolle der Primärantikörper bezüglich ihrer Spezifität im Fischgewebe wurden Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) und anschließend Western Blots durchgeführt. Dazu wurde aufgrund der geringen Proteinmengen, die die Neuromasten pro Fisch liefern, darauf verzichtet, alle Primärantikörper an Neuromastengewebe zu testen. Verwendung fanden Gewebe, die in ausreichenden Mengen vorhanden sind und in denen die zu überprüfenden Antikörper (AK) vorkommen.
Muskelgewebe und Gehirn von *Pantodon buchholzi* diente der Spezifitätsprüfung des Aktin-Antikörpers. Laut Hertstellerangaben detektiert der monoklonale AK alle Isoformen von Vertebraten-Aktin. Sowohl im Hirn- als auch im Muskelgewebe färbte dieser ausschließlich eine 42 kD Bande auf der Nitrocellulosemembran an (Abb. 21 A).
Der α-Aktinin-AK markierte in den aufgetrennten Proteinen von Muskelgewebe eine prominente Bande bei 100 kD (Abb. 21 B).
Der Western Blot von Bande 3 zeigte erst nach langer Expositionszeit des mit dem ECL-Kit behandelten Gels auf der Fotoplatte distinkte Banden. Dabei wurden die Blots mit Neuromasten- sowie Hirngewebe durchgeführt. Im Neuromastengewebe markierte der AK eine Bande im Bereich von 120 kD (Abb. 21 E; N = Neuromastengewebe). Der Western Blot mit Fischhirngewebe zeigt zusätzlich je 2 Banden im Bereich von 85 kD und 70 kD sowie eine schwache Bande bei ca. 45 kD. Hier handelt es sich vermutlich um Bruchstückbanden (Abb. 21 E; G = Gehirngewebe).
Der AK gegen Myosin wurde anhand von Darmgewebe überprüft. Hier färbte dieser eine einzelne Bande bei 200 kD (Abb. 21 D).
Spektrin markierte im Western Blot an Gehirnproteinen vier verschiedene Banden. Eine bei ca. 260 kD, eine weitere schwächer ausgeprägte bei ca. 240 kD sowie Banden bei 220 und 180 kD (Abb. 21 F).
Der AK gegen α-Tubulin zeigte auf der Nitrocellulosemembran eine Markierung bei 50 kD (Abb. 21 C).

Western Blot-Untersuchungen

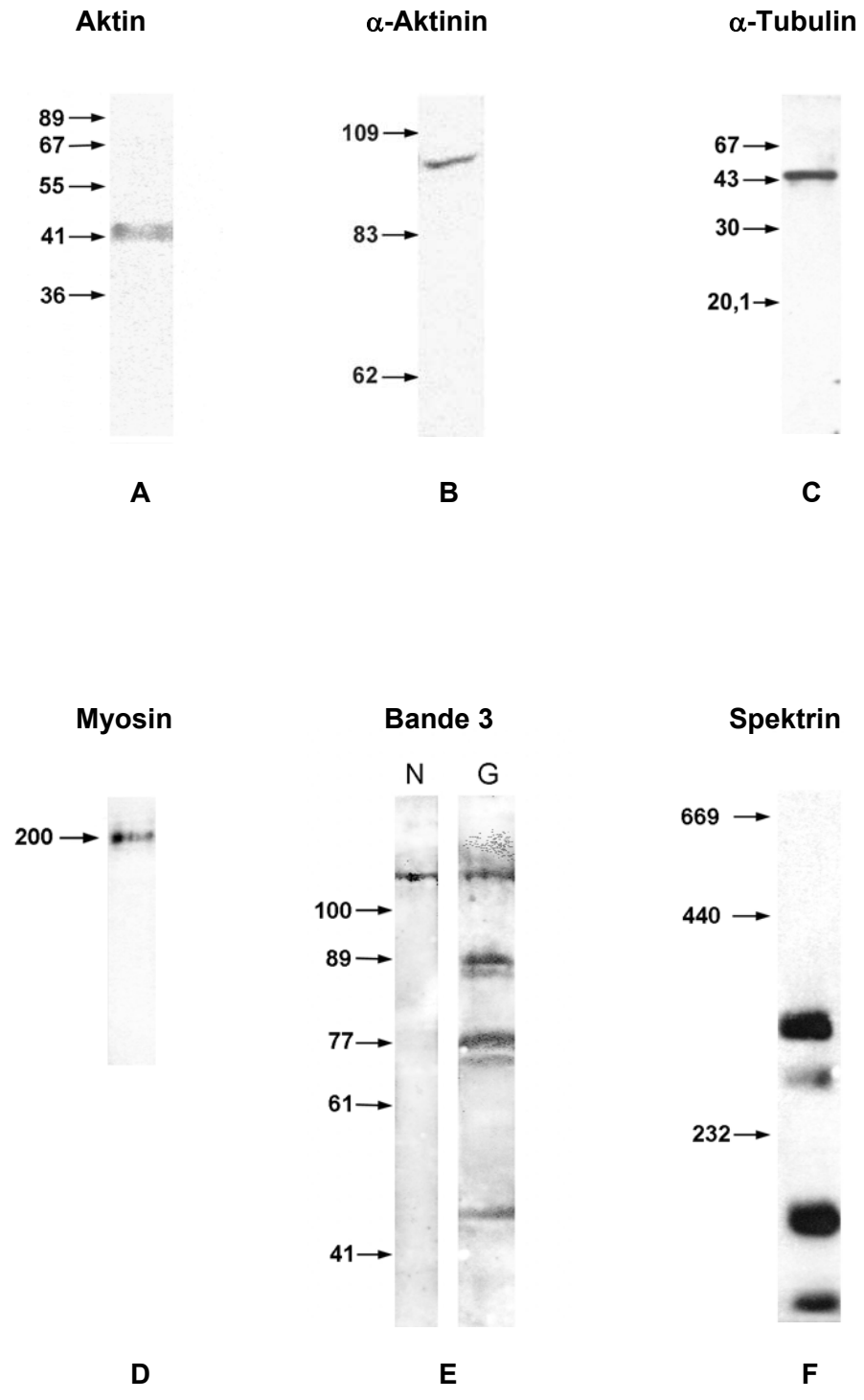


Abb. 21: SDS-PAGE-Immunoblot Analyse der untersuchten Proteine, getestet an Fischgewebe von *Pantodon buchholzi*. Die Gele in **A** und **B** wurden mit Muskelproteinen, **C** und **F** mit Proteinen aus Fischgehirn und **D** mit Darmproteinen beladen; in **E** entspricht N: Neuromastengewebe und G: Gehirngewebe. Zahlenangaben in kD.

3.3 Immuncytochemie

3.3.1 Verwendete Methode

Die Herstellung der Fluoreszenzpräparate erfolgte unter Verwendung von immuncytochemischen Standardmethoden (Stroh, 1992; U. Zimmermann, pers. Mitteilung). Dabei wurde die von Stroh (1992) angewandte Färbemethode in der Weise verändert, dass statt der von ihm praktizierten Fixierung der Zellen mit 3,7 % Formaldehyd und anschließender Permeabilisierung mit kaltem Aceton (-18 °C), der Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt durch Verwendung von kaltem Methanol zusammengefasst wurde. Dies hatte den Vorteil, dass ein Behandlungsschritt und mehrere Waschschritte wegfielen, was Zellverluste bei der Färbeprozedur verringerte.
Als Blockierungslösung wurde zudem von 0,5 % BSA/PBS-Lösung auf 3% Milch/PBS-Lösung umgestellt, da hiermit unspezifische Hintergrundfärbungen in den Präparaten verringert werden konnten. Beim Eindecken der Präparate fand Vectashield (Vector) als anti-fading-Medium Verwendung, das das Ausbleichen der Präparate unter Fluoreszenzlicht im Vergleich zu dem von Stroh verwendeten PBS/Glycerin-Gemisch erheblich reduzierte.
Durch schrittweise Annäherung an die optimale Antikörperverdünnung wurden die vom Hersteller empfohlenen Antikörperverdünnungen – falls notwendig – variiert.
Die besten Ergebnisse in Bezug auf Leuchtintensität, Färbungsstabilität (Fading) und Signal-Hintergrund-Verhältnis konnte mit dem Cy3-Zweitantikörper erreicht werden. Dieser war z.T. in sehr hoher Verdünnung verwendbar. Entgegen den Herstellerangaben, die ein anti-fading-Eindeckmedium zumindest bei der Verwendung von Cy-Antikörpern in der Normalfluoreszenz für unnötig erachten, konnte durch den Einsatz von Vectashield (Vector) ein deutlich geringeres Ausbleichen der Präparate erreicht werden. Cy2-Antikörper wurden bei der Herstellung von α-Aktinin- und Bande 3-Präparaten verwendet. Dabei trat zunächst das Problem auf, dass sowohl bei Verwendung von Vectashield (Vector) als auch beim Eindecken der Präparate ohne anti-fading-Reagenz (PBS/Glycerin-Gemisch 1:10) extremes Ausbleichen der gefärbten Strukturen unter Fluoreszenzlicht zu beobachten war. Durch die Anwendung von 10 g/l NPG (n-Propylgallat, Sigma) in PBS/Glycerin-Gemisch 1:10 als Eindeckmedium konnte dieser nachteilige fading-Effekt behoben werden.
Die Verwendung von Cy2-Antikörpern wurde eingestellt, nachdem einige Zeit nach der Herstellung der Präparate Artefaktfärbungen im Bereich des Kerns auftraten. Diese unspezifische Fluoreszenz trat unabhängig vom gewählten Primärantikörper auf und ist vermutlich auf Diffusion von abgelöstem 2. Antikörper zurückzuführen.

In der folgenden Ergebniszusammenstellung sind jeweils konfokale Schnitte durch mit Antikörpern Protein gefärbte HSZ gezeigt, z.T aus Serien und z.T. aus einzelnen Zellen. Zudem wurden Übereinanderprojektionen von optischen Schnittserien einzelner Zellen angefertigt. Diese sind als konfokale Gesamtfluoreszenzaufnahmen dargestellt. Im Anschluss an diese Bilder finden sich jeweils Aufnahmen aus der Normalfluoreszenz, bei denen meist das zugehörige Phasenkontrastbild der untersuchten Zelle vorangestellt ist. Kontrollen sind sowohl für die konfokalen als auch für die Zellen in der Normalfluoreszenz abgebildet.
Die Beschreibung der Markierungen erfolgt dabei vom apikalen Zellbereich mit Kinocilium, den Stereocilien, der Zonula adhaerens (ZA), der Cuticularplatte ausgehend zur Cytoplasma- und Zellkörperregion hin.

3.3.2 Aktin-Immunfluoreszenz

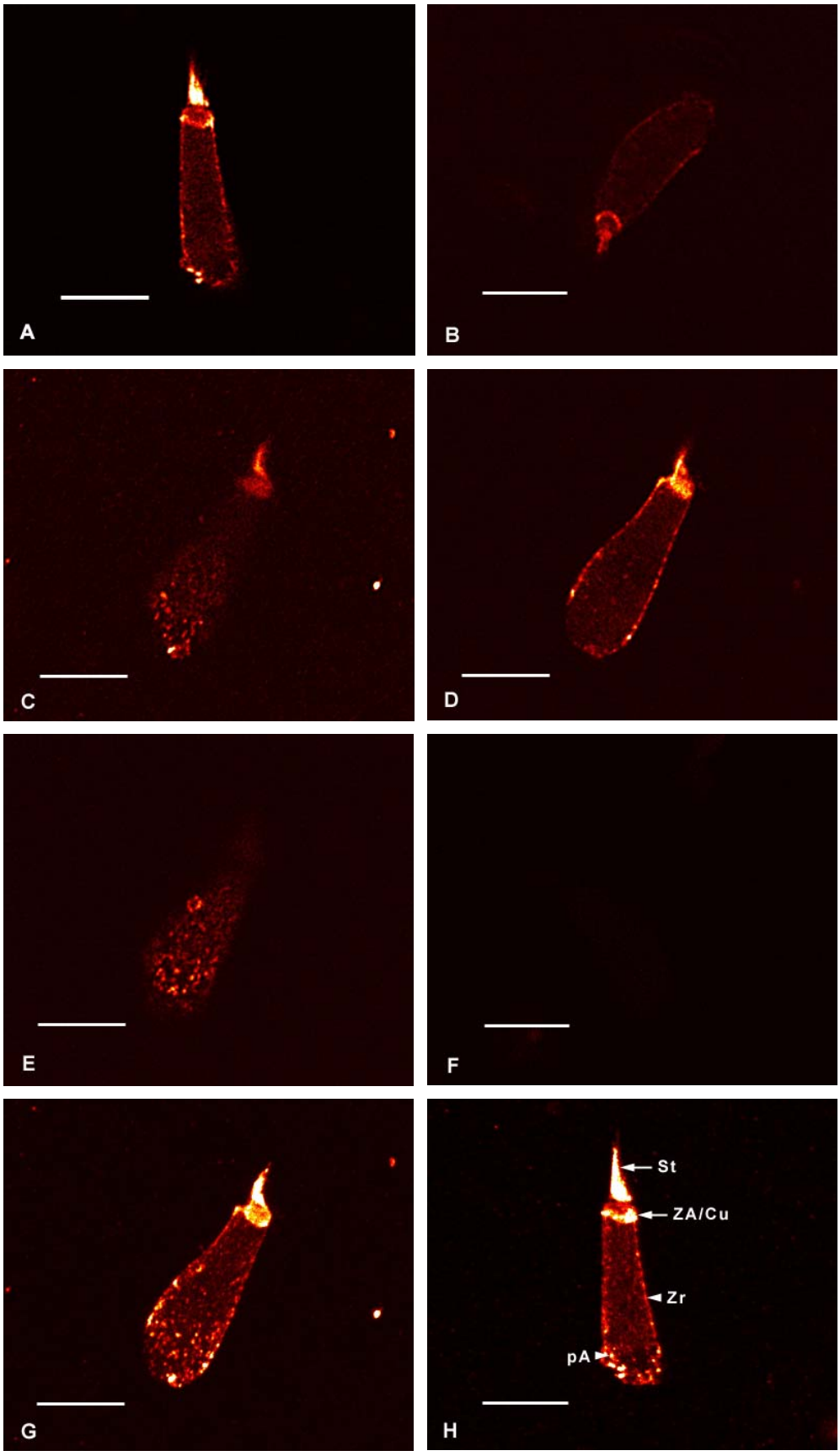
Die Anfärbung der HSZ mit Aktin-Antikörpern zeigte eine schon von Stroh (1992) beschriebene, starke Fluoreszenz der Stereocilien (Abb. 22 A, B, D, G, H, I). Im Zellapexbereich war des Weiteren eine deutliche Färbung eines die Cuticularplatte umfassenden Ringes zu beobachten, der auf Höhe der Zonula adhaerens (ZA) lokalisiert ist (Abb. 22 A, B, H) (Schott & Schwartz, 2000). Die Cuticularplatte als solche wies ein differenziertes Fluoreszenzspektrum auf. Während bei einigen Zellen diese durchgehend gefärbt zu sein schien (Abb. 22 D, G, J), deuteten andere Zellen auf ein nur geringes Vorkommen von Aktin innerhalb der Cuticularplatte hin (A, B, H). Hier könnte die Lage der Zelle auf dem Objektträger eine Rolle spielen, die durch eine optisch ungünstige Position die mikroskopische Untersuchung erschwert.
In konfokalen Aufnahmen, in denen Schnittebenen durch die Zellmitte (Abb. 22 A, B, D) gelegt wurden, sowie in der Übereinanderprojektion von konfokalen Schnittserien (Abb. 22 G, H), konnte eine den gesamten Zellkörper umrahmende Fluoreszenz detektiert werden. Diese meist punktförmig ausgeprägte Anfärbung ist Ausdruck der in Bild 22 C und E sichtbaren ebenfalls punktförmigen Aktin-Fluoreszenz in den lateralen Zellbereichen. Beide Bilder repräsentieren einen Flachschnitt in der Nähe der Plasmamembran, eine am oberen „Zellrand“, die andere am gegenüberliegenden unteren „Zellrand“ einer Schnittserie. Bild 22 D zeigt die Zelle im zwischen C und E liegenden mittleren Zellbereich.
Die in der Normalfluoreszenz (Abb. 22 J) am deutlichsten hervortretenden kurzen Aktinfilamente scheinen die Zellen mantelförmig zu umgeben, während das übrige Cytoplasma und der Zellkern weitgehend frei von F-Aktin sind, da hier keine

Aktinstrukturen angefärbt wurden. Hier trat bei einigen Zellen lediglich eine diffuse Fluoreszenz auf.

Die Kontrollen, in denen jeweils der Primärantikörper weggelassen wurde, waren in allen erstellten Präparaten negativ (Abb. 22 F, L).

Im Vergleich zu den Aktinfärbungen von Stroh (1992), der Aktin in isolierten HSZ im Bereich der Stereocilien mit schwacher Färbungsintensität in der Cuticularplatte und im infrakutikulären Plasma nachgewiesen hat, konnten durch die Verwendung eines spezifischeren Aktin-Antikörpers somit weitere Aktinstrukturen im Zellapex- und Zellkörperbereich detektiert werden.

Immunfärbung AKTIN



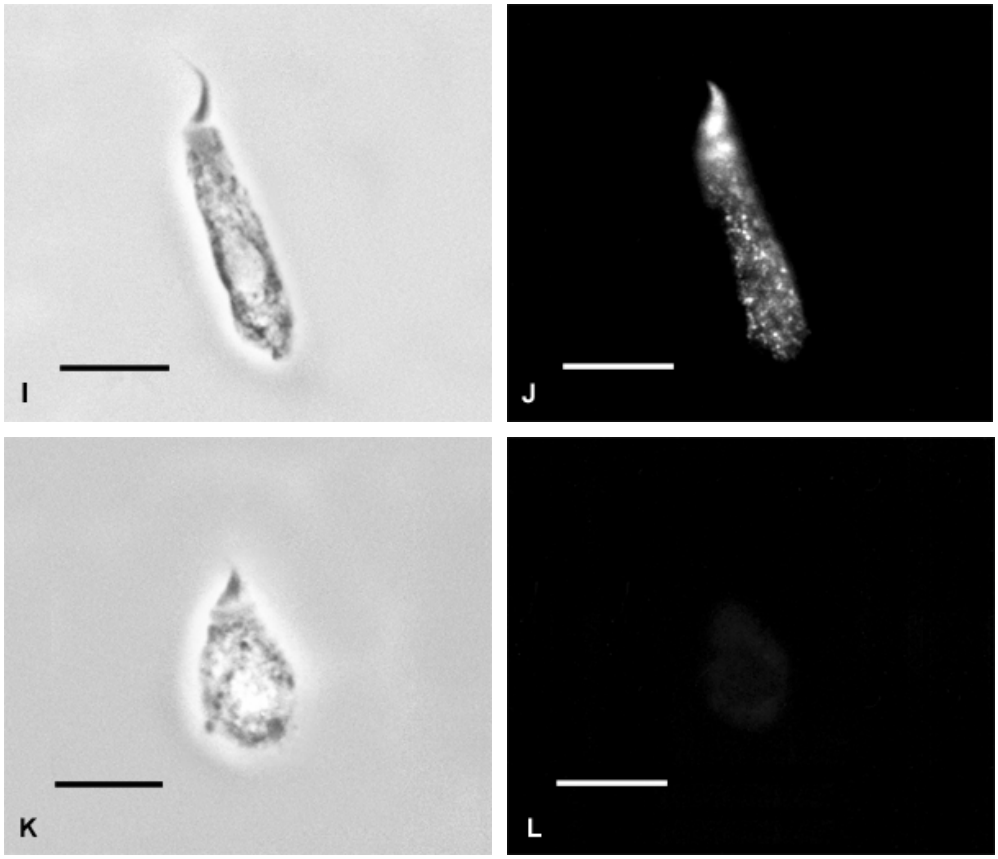


Abb. 22: Aktin-Immunfluoreszenz in HSZ aus der cephalen Seitenlinie von *Pantodon buchholzi*. **A-E** zeigt konfokale Aufnahmen in verschiedenen Längsschnitten unterschiedlicher Zellen. **F** entspricht einer Kontrolle in der konfokalen Aufnahme. **G, H** stellen Gesamtfluoreszenzen der konfokalen Schnittserien durch Übereinanderprojektion der einzelnen Schnitte dar. **I** ist eine HSZ im Phasenkontrast; **J** die gleiche Zelle in der Normalfluoreszenz. **K** und **L** Kontrolle einer Zelle im Phasenkontrast und der Normalfluoreszenzdarstellung. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Deutliche Fluoreszenz ist in den Stereocilien zu erkennen **(A, B, D, H, J)**. Des Weiteren färbt der Antikörper intensiv einen Ring um die Cuticularplatte im Bereich der Zonula adhaerens (ZA) an. Die Cuticularplatte selbst zeigt bei vielen Zellen in der konfokalen Darstellung wenig Anfärbung (**A, B**), in **D** und **G** sowie in der Normalfluoreszenz **J** scheint sie durchgängig gefärbt zu sein. Der Zellkörper erscheint von einem fluoreszierenden Netzwerk punktförmiger Strukturen bindfadenartig umgeben zu sein (**A, B, D, G, H**), wie Schnitte im mittleren Zellbereich zeigen. Dies ist Ausdruck des punktförmigen Aktinvorkommens in den lateralen Zellbereichen, wie sie die Schnitte **C** am oberen und **E** am unteren Zellrand zeigen. Auch die Übereinanderprojektion in **G** und **H** sowie insbesondere die Zelle in der Normalfluoreszenz (**J**) lassen diese Färbung deutlich erkennen. Der übrige Zellkörper sowie das Kinocilium zeigen keine strukturierte Aktinfluoreszenz.

H: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: St: Stereocilien; ZA/Cu: Zonula adhaerens assoziierter Ring/Cuticularplatte; Zr: lateraler Zellrand; pA: punktförmige Aktinfilamente.

3.3.3 α-Aktinin-Immunfluoreszenz

HSZ, die mit α-Aktinin-Antikörpern angefärbt wurden, zeigten in der Normalfluoreszenzaufnahme ein deutliches Färbungsmuster im apikalen Zellbereich (Abb. 23 H). Dabei war stets eine geschlossene ringförmige Struktur um die Cuticularplatte erkennbar (Schott & Schwartz, 1998). Da bei den meisten Zellen dieser Zellteil nicht in der Aufsicht oder schräg von oben einsehbar war, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob sich das Vorkommen von α-Aktinin auf den Bereich um die Zonula adhaerens beschränkte. Bei einigen Zellen schien auch die Cuticularplatte gefärbt zu sein, wenn auch mit deutlich schwächerer Intensität. Zudem kam es durch den stark fluoreszenten Ring, wie die Abb. 23 H zeigt, auch bei Zellen mit günstiger mikroskopischer Lage zu Überstrahlungseffekten, die kein eindeutiges Bild in Bezug auf die Verteilung von α-Aktinin in der Cuticularplatte lieferten.

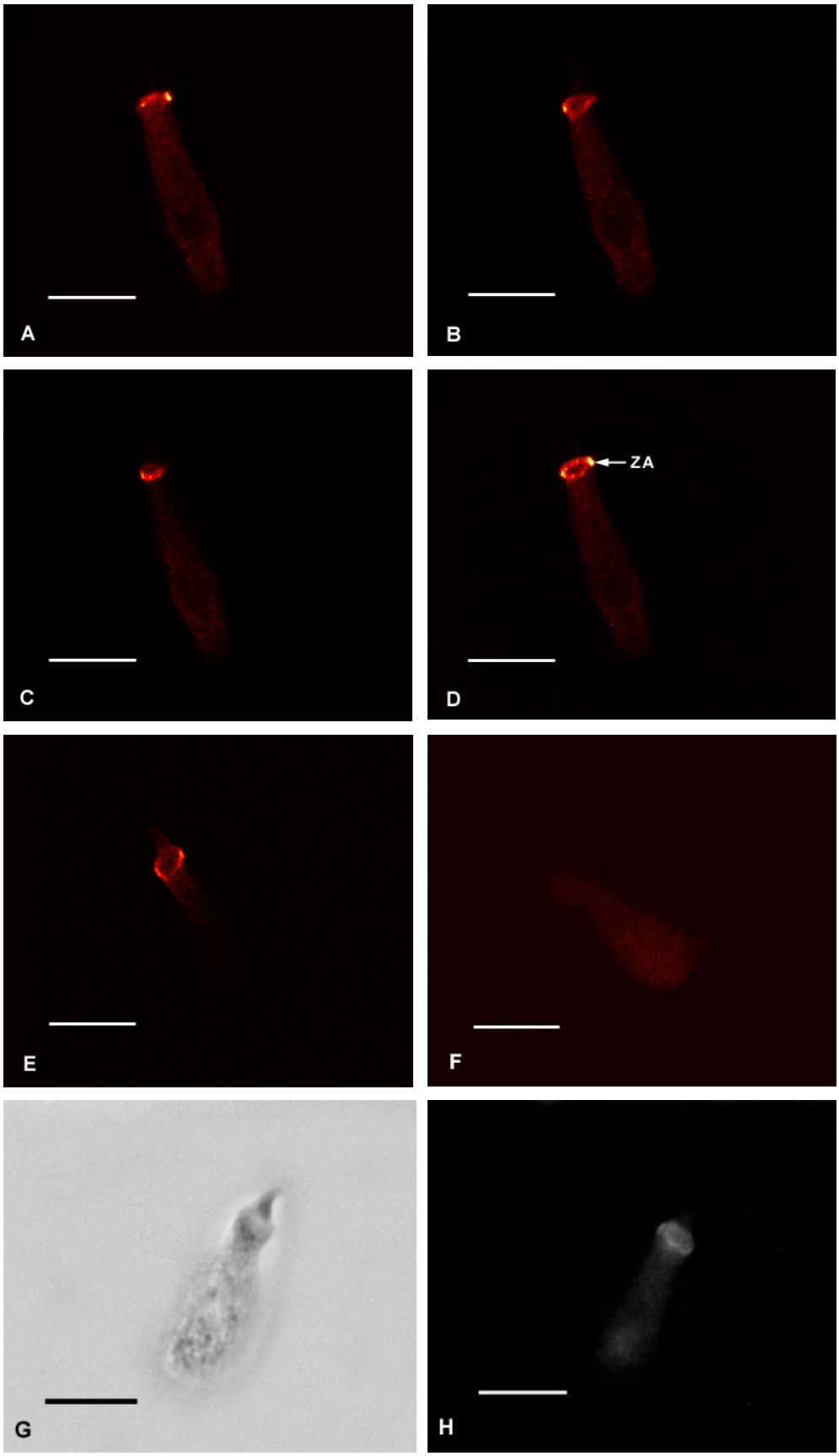
Demgegenüber fanden Drenckhahn et al. (1991) α-Aktinin innerhalb der Cuticularplatte nur bei äusseren HSZ von Hühnchen in Form von punktförmiger Fluoreszenz. Ansonsten wiesen die HSZ aus der basilären Papilla von Hühnchen immunfluoreszenzmikroskopisch einen Ring um die Cuticularplatte nahe der Zonula adhaerens auf.

Durch die Anfertigung von konfokalen Aufnahmen, d.h. einzelnen optischen Schnitten durch HSZ, konnte die Frage nach dem Vorkommen des Proteins innerhalb der Cuticularplatte bei Sinneszellen von *Pantodon buchholzi* aufgeklärt werden. Wie in der gezeigten Schnittserie in Abb. 23 A-C zu sehen ist, findet sich α-Aktinin nur im erwähnten Ring um die Cuticularplatte (Schott & Schwartz, 2000). Dabei zeigt der optische Schnitt in Abb. 23 A den hinteren Teil des Ringes und C den vorderen. Hier wie auch in der Übereinanderprojektion (Abb. 23 D) sowie einer weiteren Zelle (Abb. 23 E), in der der apikale Zellbereich zu erkennen ist, findet man α-Aktinin um die Cuticularplatte herum, nicht aber innerhalb der Cuticularplatte.

Weder das Kinocilium und die Stereocilien noch der übrige Zellkörper zeigten eine Anfärbung.

Bei den Kontrollen in der Normalfluoreszenzaufnahme (Abb. 23 J) konnte eine gewisse Fluoreszenz des Zellkörpers festgestellt werden, die bei den mit α-Aktinin behandelten Zellen (Abb. 23 H) als Hintergrund gewertet wurde. In keiner der Kontrollen wurden fluoreszierende Strukturen gefunden.

Immunfärbung α-AKTININ



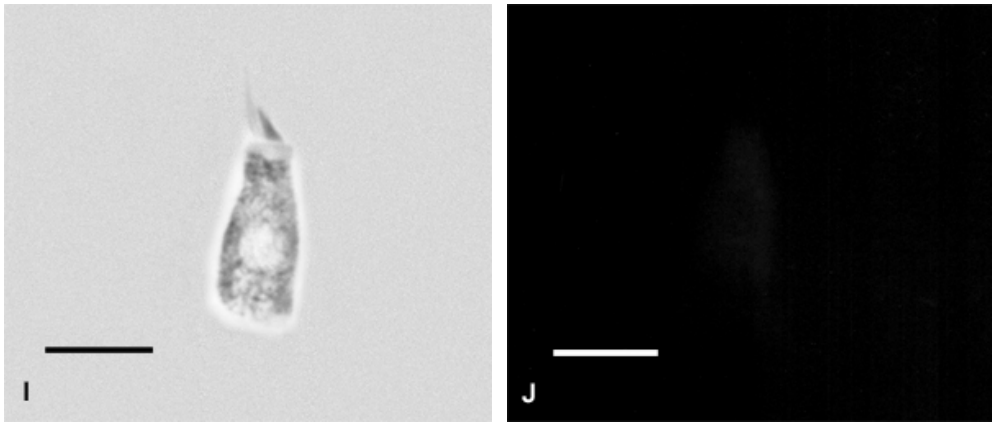


Abb. 23: α-Aktinin-Immunfluoreszenzfärbung an Seitenlinien-HSZ. **A-C** zeigt konfokale optische Längsschnitte einer HSZ, **D** die Übereinanderprojektion der Schnittserie derselben Zelle. In Bild **E** ist der apikale Teil einer weiteren Zelle dargestellt, **F** entspricht einer Kontrolle in der konfokalen Darstellung. **G-J** zeigt die α-Aktinin-Anfärbung in der Normalfluoreszenz sowie eine Kontrollzelle links in Phasenkontrast- und rechts in Fluoreszenzdarstellung. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Der Antikörper gegen α-Aktinin färbt einen deutlichen Ring um die Cuticularplatte (nahe der Zonula adhaerens, ZA) (**A-E, H**). Während anhand der Normalfluoreszenzaufnahmen bei den angefärbten Zellen eine Fluoreszenz innerhalb der Cuticularplatte selbst nicht auszuschließen war (**H**), zeigt die Schnittserie der Zelle in **A-C** sowie die Übereinanderprojektion der Schnittserie in **D** (und auch die HSZ in **E**) eindeutig, dass Aktinin nur im Randbereich der Cuticularplatte vorkommt. Alle übrigen Zellbestandteile weisen keine Fluoreszenzfärbung auf.

D: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: ZA: Zonula adhaerens assoziierter Ring.

3.3.4 Bande 3 (AE1)-Immunfluoreszenz

Antikörperfärbungen, bei denen Antikörper gegen den Anionentransporter (AE1) Bande 3 verwendet wurden, zeigten ein in ihrer Intensität variierendes Bild. Im apikalen Zellbereich waren die Stereocilien und das Kinocilium bei einigen Zellen schwach angefärbt (Abb. 24 D, F). Des Weiteren konnte Bande 3-Fluoreszenz (wie schon bei Aktin und α-Aktinin) ringförmig um die Cuticularplatte detektiert werden (Schott & Schwartz, 1999, 2000). Die Cuticularplatte selbst ließ je nach Präparat eine starke (Abb. 24 F, J) oder aber eine im Vergleich zu den Randbereichen schwächere, aber deutliche Färbung (Abb. 24 B-D) erkennen. Konfokale Schnitte, die auf der Ebene der lateralen Zellmembran gemacht wurden, zeigten ebenfalls distinkte Bande 3-Fluoreszenz (Abb. 24 A, C, F). Auch bei Zellen, deren Anfärbungsniveau stärker war, erkennt man in optischen Schnitten, die in der Zellmitte erstellt wurden, dass Bande 3-Strukturen in der Plasmamembran vorhanden sind (Abb. 24 E) (Schott & Schwartz, 2000). Die Färbungsergebnisse entsprechen in Teilen denen, die Zine & Schweitzer (1997) für äußere HSZ aus der Cochlea der Wüstenrennmaus beschrieben haben. Diese konnten mit dem gleichen Antikörper Fluoreszenz im lateralen Zellmembranbereich von äußeren HSZ, d.h. im gesamten Umfang der Zelle, nachweisen. Kalinec et al. (1997) konnten an HSZ des Meerschweinchens neben genannter Fluoreszenz eine Färbung der Stereocilien innerer und äußerer HSZ aus der Cochlea zeigen. Sie verwendeten Antikörper gegen die Anionentransporter-Isoform AE2α.

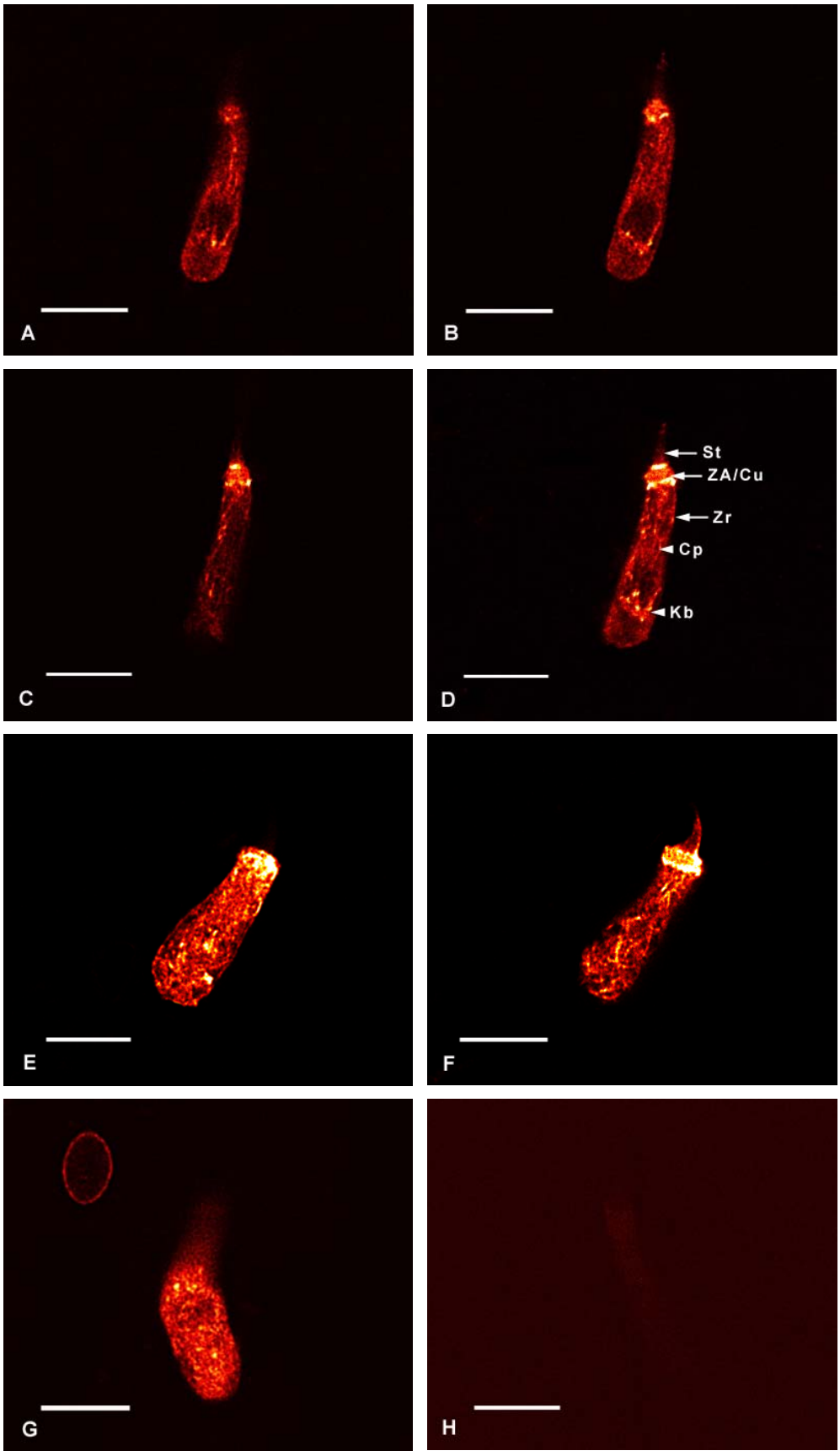
Neben den oben beschriebenen Markierungen konnte in Seitenlinien-HSZ zudem eine deutliche Markierung des Cytoplasmas beobachtet werden. Dieses war bei Zellen mit starker Fluoreszenz mit netzwerkartigen Strukturen erfüllt, welche eine deutliche Strukturierung aufwiesen (Abb. 24 E, F, G). Der Strukturierungsgrad sowie die Tatsache, dass der Antikörper wie in Abb. 24 G links oben gezeigt, die Erythrocytenmembran anfärbt (Ringstruktur), sprechen für die prinzipielle Validität des Antikörpers bzw. der Färbung, aus der auch die Zelle in den Bildern E und F stammt. Das Vorkommen von Bande 3 in der Membran von Erythrocyten als Verankerungspunkt des Aktin-Spektrin-Cytoskeletts über das Protein Ankyrin ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden (Alberts et al., 1995; Liu et al., 1987).

In anderen Präparationen war eine Anfärbung des Cytoplasmas zwar deutlich erkennbar, aber in ihrem Intensitäts- und Strukturierungsgrad wesentlich geringer (Abb. 24 B). Intensiv fluoreszierende Strukturen traten in diesen Zellen im Kernbereich auf, der jedoch im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zellen immer sichtbar war und wenn, dann nur im Randbereich Bande 3-Fluoreszenz aufwies (Abb. 24 B und D).

Im Vergleich zu den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen zeigten die Zellen in der Normalfluoreszenzdarstellung deutlich die beschriebene Cuticularplattenfärbung und deren Randbereiche sowie die verstärkte Fluoreszenz im lateralen Zellbereich. Eine starke Anfärbung des Cytoplasmas war hier ebenfalls erkennbar. Eine Färbung des Kinociliums und der Stereocilien hingegen konnte bei keiner Zelle in der Normalfluoreszenz gesehen werden.

Die bei jedem Präparat angefertigten Kontrollen waren negativ (Abb. 24 H, L).

Immunfärbung BANDE 3



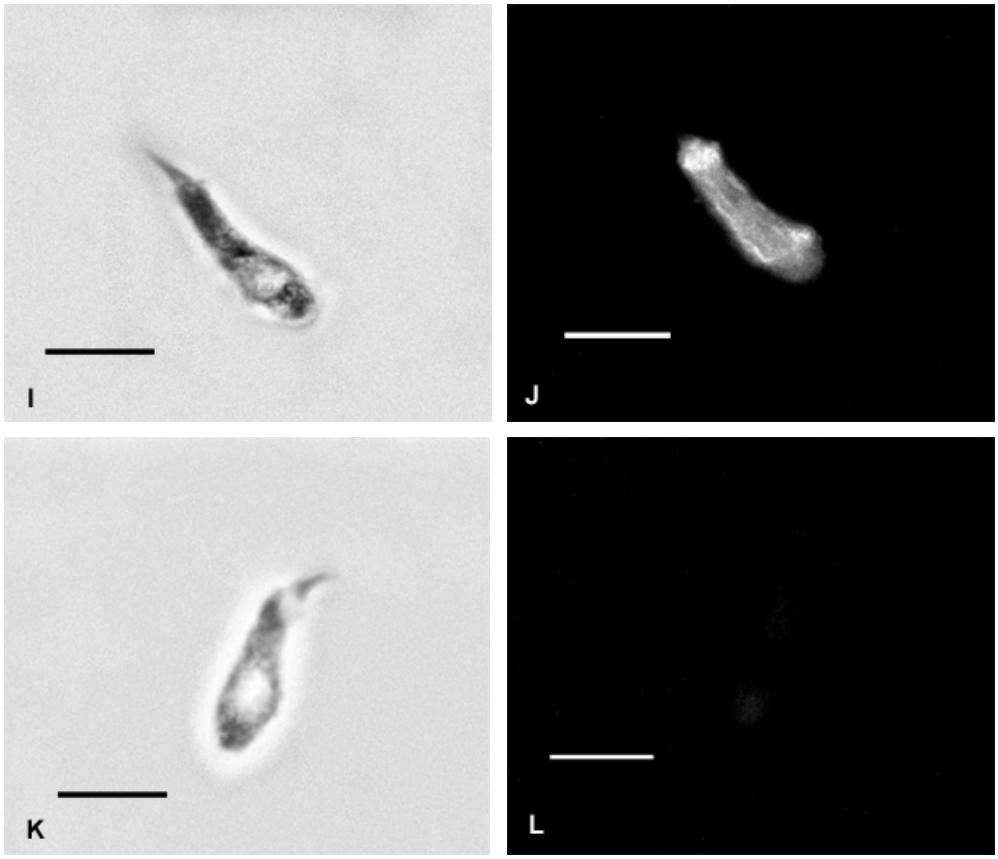


Abb. 24: Bande 3 (AE)-Fluoreszenz. In den Bildern **A-C** und **E-F** sowie **G** sind konfokale Schnitte durch verschiedene HSZ dargestellt. **D** zeigt die Übereinanderprojektion der gesamten Schnittserie einer Zelle; in **H** sieht man eine Kontrolle in der konfokalmikroskopischen Darstellung. In den Bildern **I-L** sind jeweils Normalfluoreszenzaufnahmen von mit Bande 3 gefärbten HSZ gezeigt; links entsprechende Phasenkontrastaufnahmen. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Der Anfärbungsgrad der Zellen variierte z.T. bei unterschiedlichen Präparaten. So fand sich bei einigen Zellen Fluoreszenz des Kinociliums und, wenn auch schwach, der Stereocilien (**D, F**). Bei allen HSZ ist die Cuticularplatte und verstärkt deren Randbereich nahe der ZA gefärbt (**B, D, F, J**). In **A, C, E** sowie **J** erkennt man Fluoreszenz im Lateralbereich in der Nähe der Plasmamembran. Das Cytoplasma war bei einigen Präparaten sehr stark, aber immer strukturiert (**E, F, G**) gefärbt. In anderen Zellen war diese Fluoreszenz weniger deutlich ausgeprägt, wenn, dann im Kernbereich (**B, D**). Links oben in **G** ist das ringförmige Färbungsmuster eines Erythrocyten gezeigt.

D: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: St: Stereocilien; ZA/Cu: Zonula adhaerens assoziierter Ring/Cuticularplatte; Zr: lateraler Zellrand; Cp: Cytoplasma; Kb: Kernbereich

3.3.5 Myosin-Immunfluoreszenz

Mit Myosin-Antikörpern gefärbte HSZ zeigten Fluoreszenz in nahezu allen Teilen der Zelle, was die Bedeutung dieses Proteins, das in fast allen Vertebratenzellen vorkommt, unterstreicht (Alberts et al., 1995). Konfokale Schnitte zeigten bei einigen Zellen Myosinstrukturen im Bereich der Stereocilien. Die punkförmig verteilte schwächere Anfärbung der Stereocilien (Abb. 25 B) endete im Verlauf der Schnittserie in einer deutlichen, ringförmig strukturierten Fluoreszenz (Abb. 25 A), die im Spitzenbereich der größeren Stereocilien zu erkennen war (Abb. 25 D). Auch die Übereinanderprojektionen der beiden im konfokalen Bild gezeigten Zellen Abb. 25 D und G weisen diese Stereocilienfärbung auf. In der Normalfluoreszenz und im überwiegenden Teil der mithilfe der konfokalen Mikroskopie aufgenommenen HSZ konnte diese klare Fluoreszenz nicht detektiert werden.

Wie in den bereits beschriebenen Proteinen fand sich Myosin auch unmittelbar im Bereich der Zonula adhaerens als eine die Cuticularplatte ringförmig umfassende Struktur. Diese war sowohl in den HSZ der konfokalen Schnittserien Abb. 25 A-G als auch, wie in Abb. 25 J und K deutlich erkennbar ist, in der Normalfluoreszenz zu sehen.

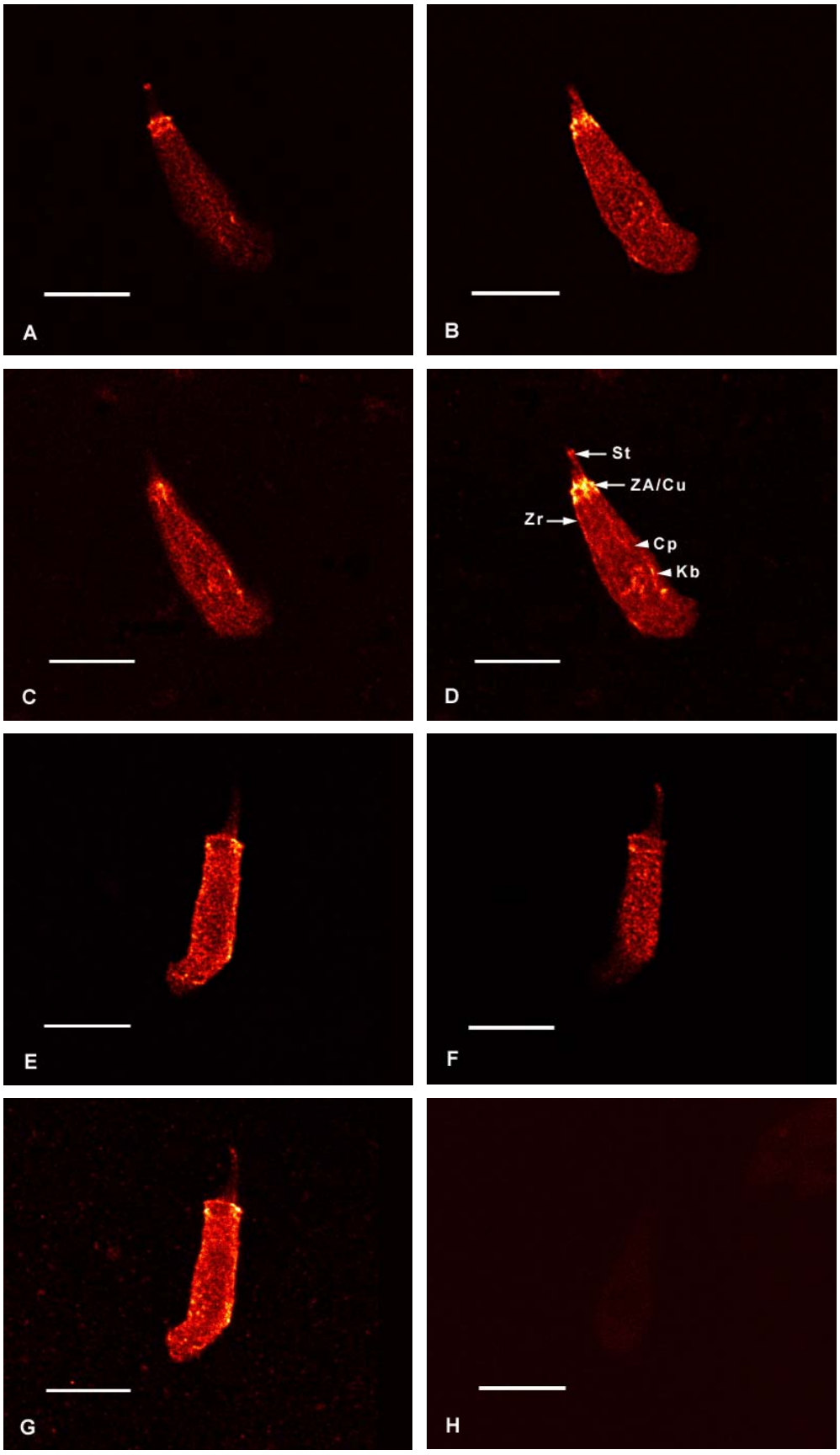
In der Cuticularplatte selbst konnte Myosinfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 25 C, D, J, K); dieser Zellteil erschien oftmals durchgehend gefärbt zu sein (Schott & Schwartz, 2000).

Die lateralen Zellbereiche waren in den konfokalen Bildern, die die HSZ im Zellrandbereich zeigten (Abb. 25 A, C, G) und in der Normalfluoreszenzdarstellung (Abb. 25 K) eindeutig markiert. Der übrige Zellkörper, d.h. das Cytoplasma ließ in konfokalen Bildern meist durchgängig fluoreszierende, strukturierte Färbung erkennen (Abb. 25 E-G) (Schott & Schwartz, 2000). Die Cytoplasmafluoreszenz war im Kernbereich, wie in den Normalfluoreszenzbildern J und K zu sehen ist, verstärkt. Abbildung 25 D, in der eine Schnittserien-Übereinanderprojektion gezeigt ist, deutet dies auch für die konfokalen Bilder an. Alle angefertigten Kontrollfärbungen zeigten keine Fluoreszenz.

Die von Stroh (1992) mit einem monoklonalen Myosin-AK angefärbten Seitenlinien-HSZ zeigten ebenfalls Fluoreszenz im Bereich der Cuticularplatte und allerdings nur punktuell Anfärbungen im Bereich der Zonulae adhaerentes sowie im supranucleären Cytoplasma. In den Stereocilien konnte er keine Immunreaktivität nachweisen. Insgesamt blieb die Intensität und Quantität der Myosinstrukturen weit unter der in dieser Studie beobachteten.

In HSZ von Amphibien und Säugern konnten Hasson et al. (1997) die Verteilung vier unterschiedlicher Myosin-Isoformen zeigen. Diese befanden sich in jeweils spezifischer Verteilung ebenfalls in den Stereocilien, der Cuticularplatte, ZA assoziiert und im Cytoplasma.

Immunfärbung MYOSIN



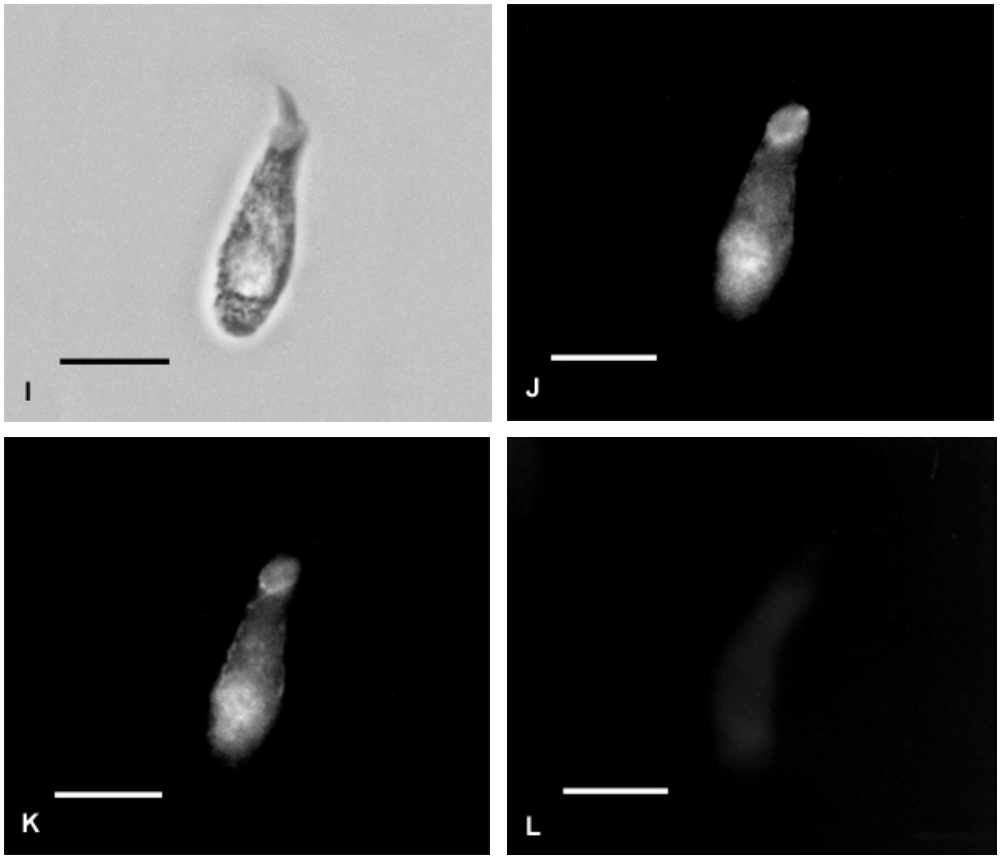


Abb. 25: Myosin-Fluoreszenzfärbung an HSZ von *Pantodon buchholzi.* Die Bilder **A-C** und **E-F** zeigen konfokale Schnitte an zwei mit Myosin-Antikörpern gefärbten Zellen. **D** und **G** sind Übereinanderprojektionen der Schnittserien oben genannter Zellen. **I-K** zeigt eine angefärbte HSZ im Phasenkontrast und der dazugehörigen Normalfluoreszenz; **L** eine Kontrolle in der Fluoreszenzdarstellung. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Einige Zellen im Konfokalbild zeigen eine Myosinfluoreszenz der Stereocilien (**B, E**) mit deutlichem Färbungsmuster im Spitzenbereich der größeren Stereocilien (**A, D, F, G**). Diese Färbung war nicht in der Normalfluoreszenz zu erkennen. Des Weiteren ist die Cuticularplatte deutlich angefärbt sowie ein Ring um die Cuticularplatte im Bereich der Zonula adhaerens (ZA), was gut in der Normalfluoreszenz (**J, K**) zu sehen ist. Das gesamte Cytoplasma weist durchgängig fluoreszierende Myosinstrukturen auf (**A-G** und **J-K**), mit einer besonders in der Normalfluoreszenz deutlich hervortretenden Färbung im Kernbereich (**J-K** sowie **D**). Sowohl in den konfokalen Schnitten im Lateralbereich (**A, C, E**) als auch die Zelle in der Normalfluoreszenz (**K**) zeigt verstärkte Fluoreszenz im Randbereich in der Nähe der Plasmamembran.

D: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: St: Stereocilien; ZA/Cu: Zonula adhaerens assoziierter Ring/Cuticularplatte; Zr: lateraler Zellrand; Cp: Cytoplasma; Kb: Kernbereich.

3.3.6 Spektrin-Immunfluoreszenz

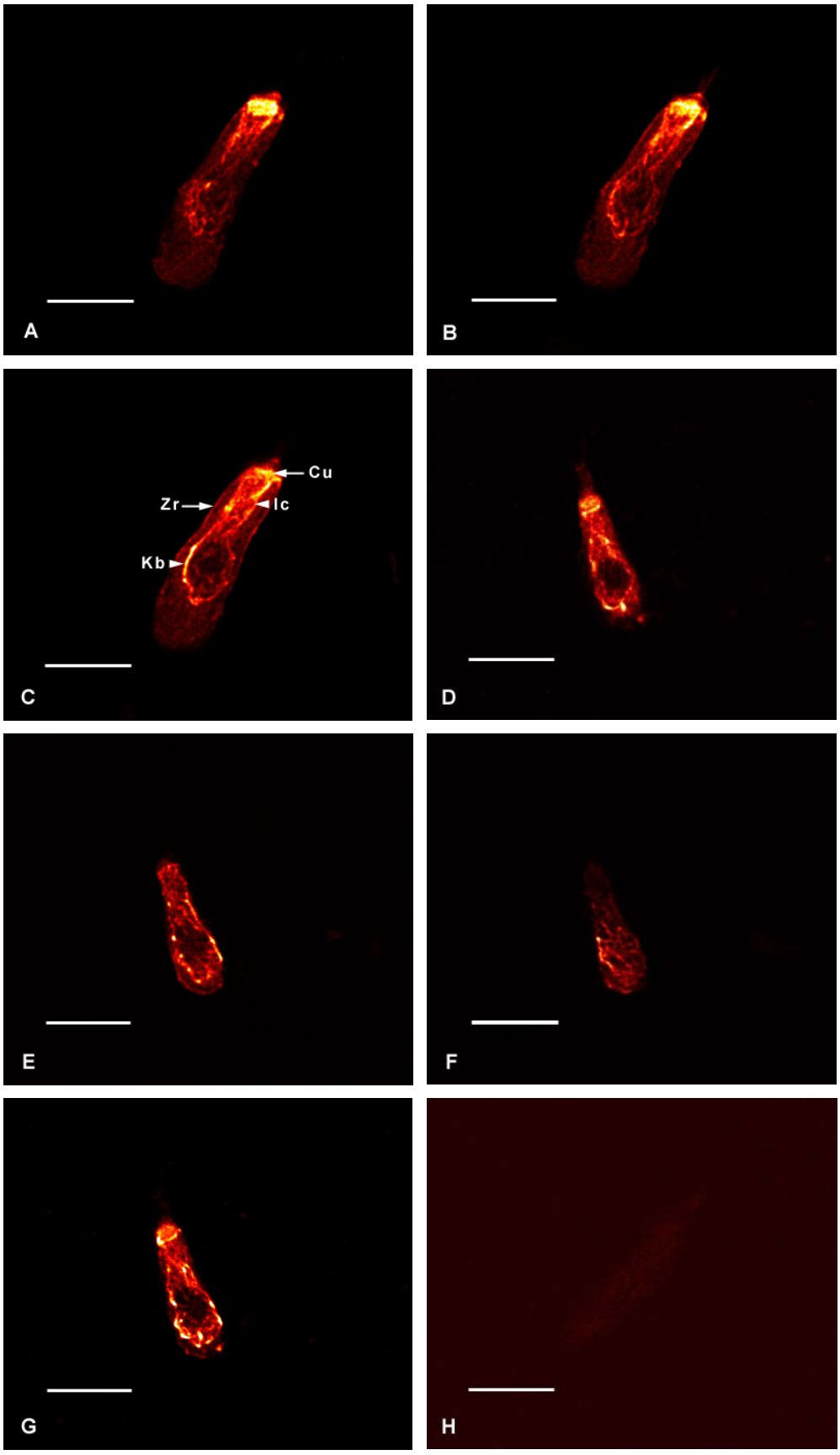
Mit Spektrin-Antikörpern gefärbte HSZ wiesen eine starke Fluoreszenz der Cuticularplatte auf (Abb. 26 A, B, D, G und J). Wie die Schnittserie der Zelle in den Bildern A-C und die Normalfluoreszenz J zeigte, setzte sich diese im infracuticulären Cytoplasma fort, um den Kern schließlich in einer z.T. netzwerkförmigen Struktur zu umrahmen. Stereocilien und das Kinocilium ließen keine Fluoreszenz erkennen.

Konfokale Schnitte im lateralen Zellbereich (Abb. 26 D, F) zeigten ebenfalls meist netzwerkartige Spektrin-Immunfluoreszenz. Ausdruck dieser lateral lokalisierten Strukturen ist auch die in Bildern, die der Zellmitte entsprechen, sichtbare (wenn auch im Vergleich zu Aktin schwache) Umrahmung des Zellkörpers, die bei einigen Zellen zu beobachten war (Schott & Schwartz, 1998, 2000).

Sowohl die Kontrollen der mit der konfokalen Mikroskopie bearbeiteten Zellen als auch die der Normalfluoreszenz zeigten keine angefärbten Strukturen und waren somit negativ (Abb. 26 H, L).

Die beschriebene Spektrin-Immunreaktivität in Seitenlinien-HSZ ähnelt der von Holley und Ashmore (1990) nachgewiesenen Verteilung dieses Proteins in äußeren cochleären HSZ des Meerschweinchens. Hier konnte Spektrinfluoreszenz im Bereich der Cuticularplatte, im infracutikulären Netzwerk sowie deutlich in den cortikalen Bereichen der Zelle (als zellumrahmende Fluoreszenz) gezeigt werden.

Immunfärbung SPEKTRIN



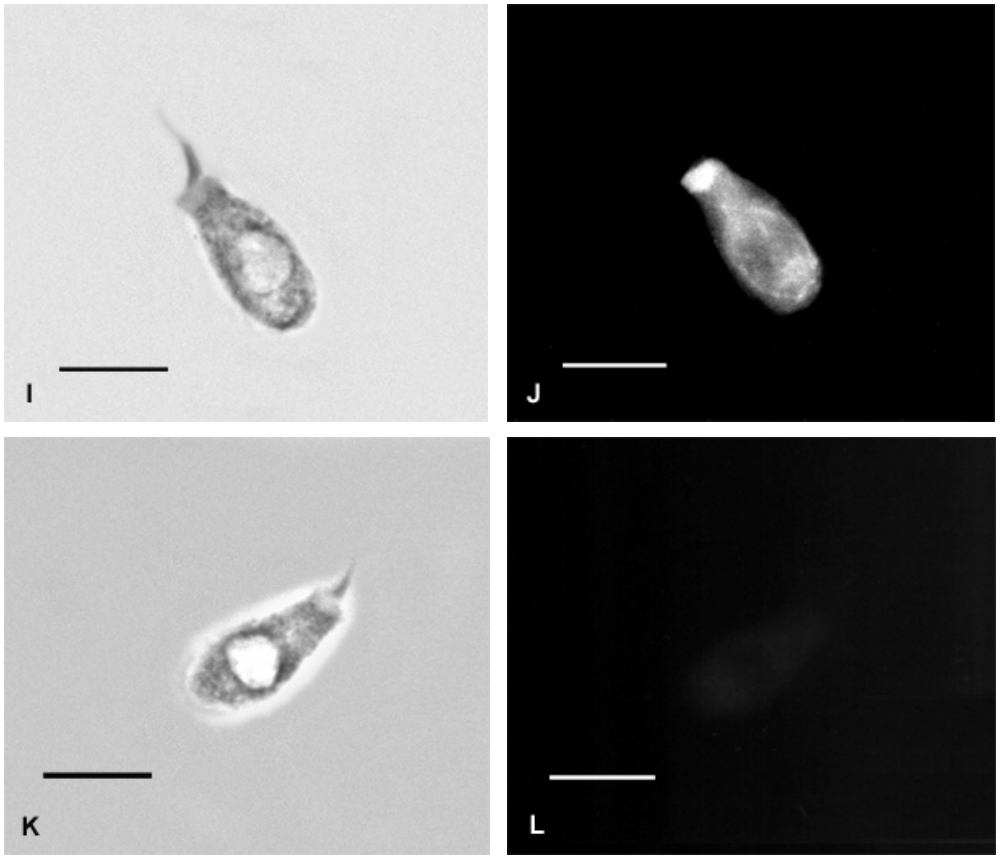


Abb. 26: Spektrinfluoreszenz. **A-C** und **D-F** zeigen konfokale Schnittserien von isolierten HSZ, die mit Spektrinantikörpern gefärbt wurden; **G** entspricht einer Gesamtschnittprojektion und **H** einer Kontrolle. **I-L** Phasenkontrast- (links) und Normalfluoreszenzaufnahmen (rechts), jeweils als Färbungs- und Kontrollzelle. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Die Zellen zeigen starke Fluoreszenz der Cuticularplatte **(A, B, D, G, J)**, die sich fortsetzt im infracuticulären Bereich. Spektrin ist des Weiteren bei den meisten Zellen als kernumrahmende Struktur zu erkennen (**C, E, J**). In der Schnittserie der Zelle **D-F** sieht man in **F** netzwerkartige Spektrin-Fluoreszenz im Bereich der lateralen Zellmembran. Das Vorkommen des Proteins im lateralen Zellbereich erkennt man auch an der, wenn auch schwachen, bindfadenartigen Umrahmung der Zelle in **B** und **C**.

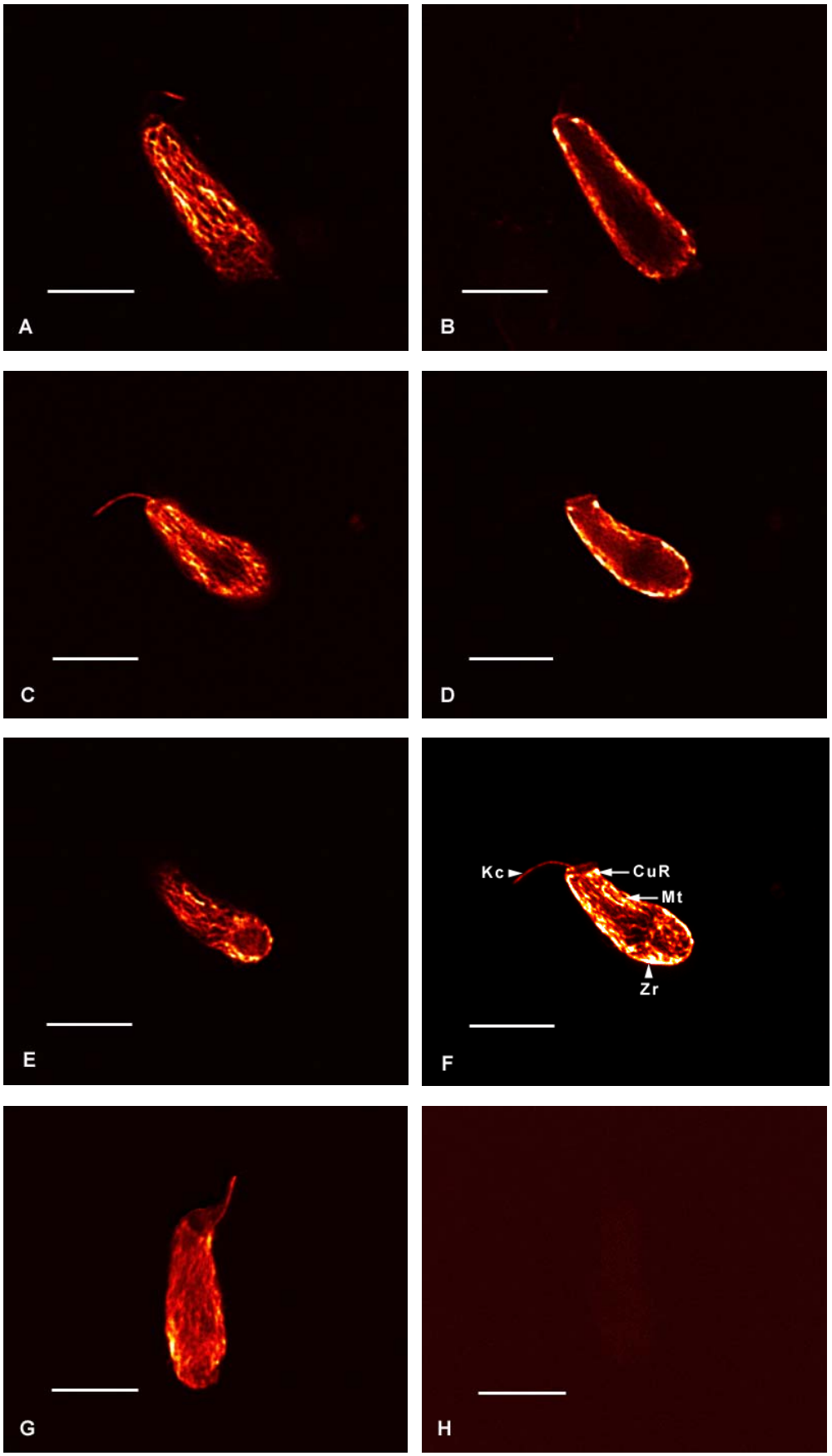
C: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: Cu: Cuticularplatte; Ic: infracuticulärer Bereich; Zr: lateraler Zellrand; Kb: Kernbereich.

3.3.7 Tubulin-Immunfluoreszenz

HSZ, die mit α-Tubulin-Antikörpern angefärbt wurden, zeigten besonders in den konfokalen Aufnahmen eine deutliche Markierung des Kinociliums, was die Tatsache bestätigt, dass es sich hier um das einzige „echte Cilium“ der Zelle handelt (Abb. 27 A, C, F, G, J, K). Die Stereocilien ließen dementsprechend keine Fluoreszenz erkennen, da sie wie in 3.3.2 beschrieben hauptsächlich Aktin enthalten (Abb. 27 A-L).
Der apikale Zellbereich scheint bis auf das Kinocilium insgesamt frei von Tubulinstrukturen zu sein, da auch die Cuticularplatte kein α-Tubulin enthielt (Abb. 27 A-L). In Abb. 27 G und J erkennt man, dass dieser Zellteil dunkel und schalenförmig gegenüber dem übrigen gefärbten Cytoplasma erscheint. Der untere Randbereich der Cuticularplatte erscheint bei einigen Zellen eine verstärkte, punktförmige Fluoreszenz aufzuweisen (Schott & Schwartz, 1998, 1999, 2000). Dies könnte auf eine angeschnittene ringförmige Struktur hinweisen, wie sie bei Steyger et al. (1989) für cochleäre HSZ beschrieben wurde.
Der Zellkörper war bei allen Färbungen deutlich markiert Abb. 27 A-G und J, K. Dabei konnte man schon in einigen Fokussierungsebenen in der Normalfluoreszenz mikrotubuläre Strukturen ausmachen (Abb. 27 J), wobei in anderen Ebenen eine eher diffuse Anfärbung des Cytoplasmas vorherrschte (Abb. 27 K). Durch Einsatz der konfokalen Mikroskopie wurde die Verteilung der Mikrotubuli innerhalb des Zellkörpers näher charakterisiert. Wie optische Schnitte durch verschiedene Zellen zeigen, verlaufen Mikrotubuli parallel zur Plasmamembran vom Rande der Cuticularplatte bis zum basalen Zellende und weisen dabei z.T. Quervernetzungen auf (Abb. 27 A, C, E, F, G, J) (Schott & Schwartz, 1999, 2000). Das Vorkommen paralleler zur Zellbasis verlaufender Mikrotubuli konnte auch von Zenner et al. (1981) an HSZ aus der Lagena eines Fisches sowie an äußeren HSZ des Meerschweinchens nachgewiesen werden (Zenner, 1981).
Der Bereich der Zellmitte ist, wie Abb. 27 B, D erkennen lässt, frei von Mikrotubuli und weist lediglich im lateralen Bereich deutliche Randfärbung auf. Die in Abb. 27 D zu beobachtende „diffuse“ Färbung könnte auf das Vorkommen von freiem α-Tubulin hinweisen, wie Zenner (1981) dies für HSZ von Meerschweinchen aufgrund von Immunfluoreszenzstudien vorgeschlagen hat. Der in der Zellmitte liegende Kern erscheint als dunkle Struktur innerhalb der Zelle, d.h. er weist keinerlei Immunreaktivität auf.
Die Schnittserie der Zelle 27 C-E, in der C und E die jeweils gegenüberliegenden Randbereiche der Zelle zeigen und D die dazwischenliegende Zellmitte, weisen darauf

hin, dass die gesamte Zelle von einem Netzwerk aus Mikrotubuli korbartig umgeben ist, wobei dieses Geflecht nahe der Plasmamembran lokalisiert zu sein scheint.
Gegenüber der konfokalen Abbildung ist das Fluoreszenzniveau der Normalfluoreszenzabbildung (Abb. 27 K) erheblich höher, was die Charakterisierung der Zellmitte als mikrotubulifreien Raum erschwert. Der scharf abgegrenzte Zellrand deutet jedoch darauf hin, dass es sich bei diesem Bild nicht um eine unscharfe Abbildung handelt, sondern hier der Bereich der Zellmitte dargestellt ist.

Immunfärbung α-TUBULIN



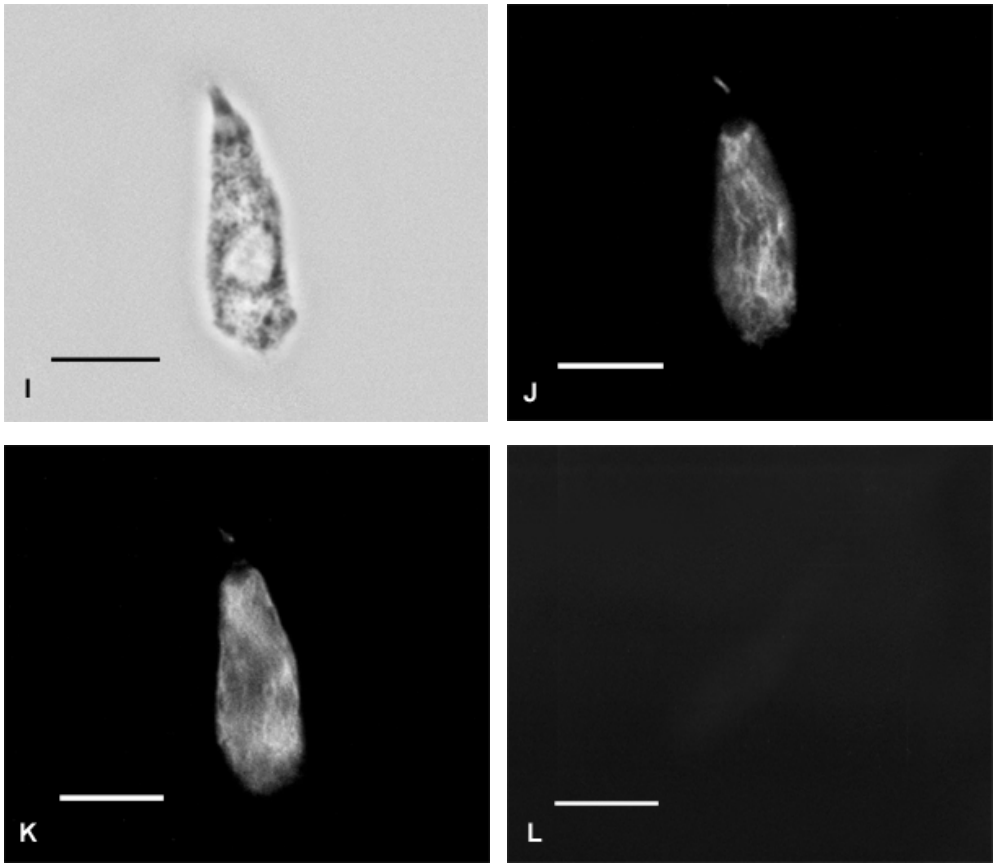


Abb. 27: Anfärbung von HSZ des Fisches *Pantodon buchholzi* mit α-Tubulin Antikörpern. **A-E** zeigen konfokale Schnitte durch mehrere Zellen, **F** und **G** die Übereinanderprojektion der gesamten Schnittserie der jeweiligen Zelle; **H** entspricht einer Kontrollfärbung, in der der erste Antikörper weggelassen wurde. In **I-L** ist eine Zelle in der Phasenkontrast- und Normalfluoreszenz dargestellt; **L** Kontrolle im Normalfluoreszenzpräparat. Die Balken entsprechen jeweils 10 µm.
Sowohl in der Normalfluoreszenz als auch in den konfokalmikroskopischen Schnitten erkennt man deutlich angefärbte mikrotubuläre Strukturen, die von der Cuticularplatte aus zu den basalen Bereichen der Zelle verlaufen (**A, C, E, F, G** und **J**) und Quervernetzungen aufweisen. Das Zentrum der Zelle, d.h. in der Ebene des Zellkerns ist die Zelle frei von mikrotubulären Strukturen, und nur der Randbereich weist eine intensive Fluoreszenzfärbung auf (**B, D**). Dies ist Ausdruck der lateralen Mikrotubuli innerhalb der Zelle. Wie die Schnittserie **C-E**, in der ein lateraler Schnitt, ein Schnitt in der Zellmitte und wiederum ein lateraler Schnitt der anderen Seite dargestellt sind, zeigt, sind die HSZ von einem Netzwerk aus Mikrotubuli umgeben. Die Stereocilien und die Cuticularplatte waren bei allen Zellen frei von tubulären Strukturen (**F, G, J**). In einigen HSZ konnte eine punktuelle, verstärkte Färbung am unteren Rand der Cuticularplatte detektiert werden (**D**). Das Kinocilium ist als einzige „echtes" Cilium gefärbt (**A, C, F, G, J, K**).

F: fluoreszenzmarkierte Strukturen sind mit Pfeilen bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet: Kc: Kinocilium; CuR: Cuticularplattenrand; Mt: Mikrotubuli; Zr: lateraler Zellrand.

3.3.8 Zusammenfassung der in den HSZ durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen Proteine

Kinocilium: Das Kinocilium zeigte in Bezug auf die untersuchten Proteine deutliche Immunreaktivität mit α-Tubulin-Antikörpern (Abb. 27 F, Kc). Eine schwächere Anfärbung konnte bei einigen mit Bande 3-Antikörpern behandelten Zellen beobachtet werden.

Stereocilien: Am prominentesten war hier das Vorkommen von Aktin durch Fluoreszenz nachweisbar (Abb. 22 H, St). Auch Myosin konnte, wenn auch in der Intensität schwächer, bei einigen HSZ in den Stereocilien detektiert werden. Die Fluoreszenz verstärkte sich dabei in der Regel im Spitzenbereich der größeren Stereocilien, wo ein deutlich strukturiertes Färbungsmuster zu erkennen war (Abb. 25 F, St).

In einer Reihe von Zellen zeigte sich eine schwache Bande 3-Fluoreszenz (Abb. 24 D**,** St).

Cuticularplatte: Spektrin war in diesem Zellteil das Protein mit der deutlichsten Markierung, aber auch Bande 3 (Abb. 24 D, Cu) und Myosin ließen sich innerhalb der Cuticularplatte nachweisen. Das Vorkommen von Aktin in der Cuticularplatte schien bei den meisten HSZ nur sehr gering zu sein (Abb. 22 H, Cu). Tubulinstrukturen fehlten im beschriebenen Zellbereich eindeutig (Abb. 27 G).

Zonula adhaerens (ZA)-Bereich: Der Bereich um die Cuticularplatte, der ZA assoziiert ist, zeigte einen fluoreszenten Ring sowohl bei mit Aktin-Antikörpern (Abb. 22 H, ZA) als auch mit α-Aktinin-Antikörpern (Abb. 23 D, ZA) behandelten Zellen. Aktinin scheint hier das vorherrschende Aktin-verknüpfende Protein zu sein, wobei Bande 3 (Abb. 24 D, ZA) und Myosin (Abb. 25 D, ZA) ebenfalls im ZA-Bereich zu finden sind. Auch diese zeigen ein ringförmiges Anfärbungsmuster.

Infracuticulärer Bereich: Dieser Zellbereich, der den Raum zwischen Cuticularplatte und Nucleus umfasst, ließ deutliche Spektrin Fluoreszenz erkennen (Abb. 26 C, Ic).

Zellkern: HSZ, die mit Spektrin-Antikörpern angefärbt wurden, zeigten Fluoreszenz, die um den Zellkern herum verlief, d.h diesen meist einrahmte (Abb. 26 C, Kb). Eine Markierung die kernassoziiert war, lag auch bei mit Bande 3-AK gefärbten HSZ vor (Abb. 24 D, Kb). Eine verstärkte Immunreaktivität konnte zudem für Myosin nachgewiesen werden.

Aktin, α-Aktinin sowie α-Tubulin wurden im Zellkernbereich nicht nachgewiesen.

Lateraler Zellbereich: Anti-Aktin gefärbte Zellen, die in der Normalfluoreszenz oder in medialen konfokalen Längsschnitten aufgenommen wurden, zeigten eine deutliche Markierung im Randbereich des Zellkörper (Abb. 22 H, Zr). Dies weist auf Strukturen

hin, die den Zellkörper netzwerkartig umgeben. Gleiches, wenn auch z.T. in ihrer Intensität schwächer, konnte für die Proteine Bande 3 (Abb. 24 D, Zr), Myosin (Abb. 25 D, Zr) und Spektrin (Abb. 26 C, Zr) nachgewiesen werden. Mit α-Tubulin-Antikörpern angefärbte Zellen ließen in Schnitten durch die Zellmitte eine starke laterale Fluoreszenz erkennen (Abb. 27 F, Zr).

Bei allen genannten Proteinen fand diese Färbung ihren Ausdruck auch in Schnitten durch den lateralen Zellbereich (nahe der Plasmamembran).

Cytoplasma: Das Cytoplasma von HSZ zeigt deutliche Fluoreszenz mit Antikörpern gegen Bande 3 (Abb. 24 D, Cp) und Myosin (Abb. 25 D, Cp). Aktin und α-Tubulin waren z.T. als schwache unstrukturierte Markierung nachweisbar, was mutmaßlich auf das Vorhandensein von freiem G-Aktin bzw. α-Tubulin hinweist.

4 Diskussion

4.1 Zellisolierung

Die in der vorliegenden Studie verwendete Methode zur Isolierung vitaler HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* orientierte sich im Wesentlichen an der von Stroh (1992) entwickelten Isolationsprozedur. Die Enzymbehandlung mithilfe einer proteolytisch wirkenden Collagenase ist eine Standardmethode zur Gewinnung und Steigerung der Ausbeute von isolierten Sinneszellen aus dem Sacculus des Frosches und der Cochlea von Säugetieren (Hudspeth & Jacobs, 1979; Ashmore, 1983; Zenner et al., 1985 a, b; Zajic & Schacht, 1987). Andere wirksame Enzyme wie Papain und Hyaluronidase fanden bei der Isolierung von cochleären ÄHZ ebenfalls Verwendung (Brownell et al., 1985; Lim & Flock, 1985). Für alle drei genannten Enzyme wurde die Wirkung auf die isolierten Zellen untersucht. So konnten Lim & Flock (1985) zeigen, dass Papain behandelte isolierte HSZ aus der Chinchilla-Cochlea auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene bis zu 4 h in Kurzzeitkultur keine erkennbaren Degenerationszeichen zeigten. Für Papain und auch die Hyaluronidase findet man in der Literatur jedoch unterschiedliche Beurteilungen der Eignung als Isolationsenzym. Zenner et al. (1985 a), die die Überlebenszeit von isolierten HSZ in Abhängigkeit von verschiedenen proteolytisch wirksamen Enzymen testeten und ihre Vitalität anhand elektrophysiologischer Methoden nachwiesen, geben für die Behandlung mit Papain und Hyaluronidase eine geringe Überlebenszeit der isolierten HSZ an. Sie konnten zeigen, dass die Isolierung unter Zuhilfenahme des Enzyms Collagenase die vom elektrophysiologischen Standpunkt aus besten Ergebnisse lieferte. Nach einer Collagenaseinkubation (1 mg/ml) für 5–20 min konnten äußere Haarsinneszellen (ÄHZ) mit 3–6 h am längsten in Kurzzeitkultur am Leben erhalten werden. Pickles et al. (1990), die die Papilla basilaris von Hühnchen mit Collagenase behandelten, bestätigten das Ergebnis von Zenner et al. (1985 a). Sie untersuchten gezielt die Wirkung von Collagenase auf die tip links von HSZ, welche als sehr feine Strukturen die Stereocilien in ihrem apikalen Bereich miteinander verbinden und bei der Signaltransduktion der HSZ eine bedeutende Rolle spielen (Pickles et al., 1984; Osborne et al., 1988). Dabei konnten sie in rasterelektronenmikroskopischen Studien zeigen, dass selbst eine Inkubation der Papillae in einer Collagenaselösung mit einer Konzentration von 2,22 mg/ml (1200 units/ml) für 1 h keinen Effekt auf die Gesamtkonformation und die tip links der Stereocilienbündel im Vergleich zu den Kontrollen hatte. Messungen der Mikrophonpotenziale an behandelten Papillae ließen ebenfalls den Schluss zu, dass keine Beeinträchtigung der Transduktion durch die

Enzymbehandlung erfolgte. Selbiges Ergebnis beschrieben die Autoren für die Behandlung mit Hyaluronidase.

Die Eignung der Collagenasebehandlung zur Isolierung von HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* und die Vitalität der gewonnenen Zellen konnte Stroh (1992) anhand von Ruhemembranpotenzialmessungen an HSZ nachweisen. Die von ihm gemessenen Werte lagen zwischen -30 und -70 mV (Mittel: -53,3 mV). Diese Werte liegen im Bereich der von Kroese und van Netten (1989) an HSZ von Kanalneuromasten der Seitenlinie des Kaulbarsches, *Acerina ceruna,* in-situ und intrazellulär gemessenen Ruhemembranpotenzialen und entsprechen auch denen von isolierten sacculären und cochleären HSZ (Hudspeth & Jacobs, 1979; Gitter & Zenner, 1990; Zenner et al., 1985 a, b).

Aufgrund der oben genannten Ausführungen erschien ein Wechsel des Isolationsenzyms wenig sinnvoll. Lediglich die Inkubationszeiten (10-20 min) und die Enzymkonzentration (zwischen 1 und 2 mg/ml) wurden je nach Enzymaktivität (zwischen 350 und 600 units/mg) variiert. Die hier verwendeten Konzentrationen und Zeiten lagen damit jedoch immer noch weit unter denen von Pickles et al. (1990) (2,22 mg/ml für 1 h) und denen von Hudspeth & Jacobs (1979) mit 3 mg/ml Collagenase für 30 min. Zudem zeigen die in dieser Studie durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Hinweise auf durch die Enzymbehandlung verursachte Zellläsionen, wofür die glatte Zelloberfläche und die intakten Stereocilienbündel der Zellen sprechen.

In neueren Artikeln finden sich auch eine Proteasebehandlung (Yuhas & Fuchs, 1999) zur Isolierung von Hühner-HSZ und der Einsatz von Trypsin zur Gewinnung von inneren Haarsinneszellen (He et al., 2000). Neben Papain und der Hyaluronidase könnten diese bzw. eine Kombination selbiger eine Isolierung von HSZ aus der Seitenlinie von *Aplocheilus lineatus*, einem weiteren Oberflächenfisch, ermöglichen. Stroh (1992) konnte hier unter Verwendung von Collagenase keine HSZ isolieren.

4.2 Zellausbeute

Voraussetzung für die Isolierung von Seitenlinien-HSZ mit nennenswerten Ausbeuten ist eine hohe Anzahl an Sinneszellen im Maculagewebe der zu isolierenden Neuromasten sowie eine nicht zu feste Verankerung der Zellen im Gewebeverband. Zusätzlich sollten die Neuromasten in Bezug auf die Präparation gut zugänglich sein.

Bei Fischen und Amphibien findet man sehr unterschiedliche HSZ-Anzahlen pro Neuromast. So besitzen die großen dorsocephalen Neuromasten des Oberflächenfisches *Aplocheilus lineatus* zwischen 158 und 388 Rezeptorzellen (Tittel, 1991), während die Quappe *Lota vulgaris* zwischen 1000–1200 HSZ pro Neuromast aufweist

(Flock, 1965). Für Amphibien sind 30 Zellen pro Macula (Xenopus) beschrieben worden (Görner, 1963). *Pantodon buchholzi* nimmt dagegen in Bezug auf die HSZ-Anzahl eine besondere Stellung ein. Die supraorbitalen und supratemporalen Kanalneuromasten enthalten mit im Mittel 1456 (Nm III) und 2660 (Nm V) ungewöhnlich viele Sinneszellen (Blübaum-Gronau, 1989). Insgesamt besitzt der Schmetterlingsfisch in seinen dorsocephalen Seitenlinienorganen 20.000–21.000 HSZ. Demgegenüber verfügt *Aplocheilus lineatus* mit seinen ebenfalls stark ausgeprägten superfiziellen Kopfneuromasten nur über ca. 5500 HSZ pro Fisch (Tittel, 1991). Stroh (1992) konnte bei diesem Fisch keine HSZ isolieren, was er auf eine festere Verankerung der Sinneszellen im Gewebe, dieser als superfizielle Neuromasten stärkerer mechanischer Beanspruchung ausgesetzten Zellen, zurückführte. Dies leitet über zur zweiten anfangs erwähnten Voraussetzung, die ein Versuchsfisch erfüllen sollte, damit man Seitenlinien-HSZ isolieren kann. Das Sinnesepithel von *Pantodon buchholzi* ist in einem hautüberdeckten Kavernensystem lokalisiert, d.h. die mechanische Beanspruchung des Gewebes und damit die Verankerung der Zellen ist hier vermutlich geringer ausgeprägt als bei *Aplocheilus.* Der dritte Vorteil, den der Schmetterlingsfisch bezüglich der HSZ-Isolierung aufweist, ist der nur noch in den Knochenspangen rudimentär vorhandene Verknöcherungsgrad seiner „Kanäle“ bzw. die häutige Ausprägung des Hohlraumsystems, in dem die Neuromasten liegen (Blübaum-Gronau, 1989). Dies macht das HSZ-Gewebe der Präparation leicht zugänglich, was der Gefahr einer präparationsbedingten Gewebeschädigung vorbeugt. Zusammenfassend machen genannte Eigenschaften des dorsocephalen Seitenlinien-systems von *Pantodon buchholzi* diesen zu einem idealen Versuchsfisch für die Isolierung von lebenden Seitenlinien-HSZ.

Die Ausbeute an nach morphologischen und immunfluoreszenztechnischen Maßstäben vitalen HSZ lag bei der verwendeten Methode bei maximal 400–700 Zellen pro Fisch, was 2–3,5 % bezogen auf die Gesamtzahl entspricht. Dies liegt im Bereich bzw. leicht über der von Stroh (1992) erzielten Ausbeute von 2 %. Bedenkt man die relativ starke mechanische Beanspruchung der Zellen beim Isolationsprozess, so ist die Ausbeute verhältnismässig hoch und liegt im Bereich der für cochleäre HSZ beschriebenen. Zajic & Schacht (1987) geben die höchsten isolierten Zellzahlen nach Collagenasebehandlung für Meerschweinchen und Chinchillas an, welche bei 500 ÄHZ lag. Bei einer Gesamtzahl an ÄHZ in der Meerschweinchen Cochlea von 20.000–30.000 (Zenner et al., 1985) ergeben sich hierbei ähnliche Ausbeuten. Dabei muss man beachten, dass die ÄHZ relativ geringe Gewebeanknüpfungspunkte aufweisen und nur relativ locker mit den Deiterschen Zellen (den Stützzellen in der Säugercochlea) verbunden sind (Zenner, 1994). Daher wird die Enzymbehandlung

hierbei nur zur Ausbeutensteigerung verwendet, wobei die eigentliche Isolation mechanisch mit einer feinen Nadel erfolgt (Zenner et al., 1985 a). IHZ sind dagegen fest im Stützzellengewebe verankert. Für die Isolierung von IHZ aus der Cochlea von Wüstenrennmäusen mithilfe einer Trypsin-Behandlung und anschließendem Suspendieren mit einer Hamilton Pipette konnten He et al. (2000) kürzlich bis zu 1000 vitale innere Sinneszellen pro Cochlea isolieren, was 8–10 % der Gesamtzahl an IHZ entspricht.

Der in der vorliegenden Studie beschriebene Zellvitalitätstest wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Jones & Senft (1985), die die Vitalität von Mäusezellen überprüften, und Saito et al. (1996), welche die ototoxische Wirkung von Cisplatin bzw. dessen Metaboliten auf ÄHZ mit diesem Testsystem bestimmten, durchgeführt. Dieser diente als zusätzlicher Test neben der rein morphologischen Einschätzung vitaler Sinneszellen, wie sie bereits Stroh (1992) angewendet hatte. Dabei ergeben sich aus den gefundenen Zellkategorien einige interessante Aspekte. Zum einen fällt auf, dass der Anteil an PI-positiven und FDA-negativ gefärbten Zellen in den Isolaten sehr gering war, trotz zahlreicher auffallender morphologischer Deformationen. Die Tatsache, dass nach 4–6 h nahezu alle Zellen eine rote Kernfärbung, d.h. ein PI-positives Signal zeigten, weist darauf hin, dass dies nicht auf eine zu gering gewählte PI-Konzentration zurückzuführen ist, sondern dass die Plasmamembran nahezu aller HSZ während des Isolationsvorgangs intakt bleibt bzw. wieder geschlossen wird und PI somit nicht in die Zelle eindringen kann. Die negative FDA-Anfärbung dieser Zellen hingegen deutet jedoch auf eine Schädigung der Zellstoffwechselvorgänge hin, da zur Spaltung des FDAs und damit zur Erzeugung des Farbstoffes Fluorescein eine intakte intrazelluläre Esteraseaktivität Voraussetzung ist. Die 3. Kategorie an Zellen, die in den Isolaten gefunden werden konnten, zeigte deutliche morphologische Defekte wie das Fehlen des Haarbündels oder Zellkörperverformungen. Dabei waren sie aber FDA-positiv und PI-negativ angefärbt. Offensichtlich führt ein Abreißen des Stereocilienbündels nicht zwangsläufig zu einem Verlust der Zellvitalität. Für diese These sprechen auch REM-Aufnahmen von HSZ, die mehrere Stereocilien bei der Isolation verloren hatten. Die glatte Membranoberfläche auf Höhe der Cuticularplatte (Abb. 18) spricht dafür, dass das Abbrechen der Cilien keine dauerhaften Löcher in der Zellmembran hinterlässt, was wiederum zur Degeneration der Zellen und damit zu einer positiven PI-Färbung führen müsste. Vielmehr scheinen die Löcher, welche durch den Stereocilienverlust in der Plasmamembran entstehen, spontan wieder geschlossen zu werden. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Prozesses wird durch die Tatsache erhöht, dass die Stereocilienbreite zur Cuticularplatte hin abnimmt und an der Eintrittsstelle nur 0,03–0,06 µm beträgt. Hinweise auf regenerationsfähige und damit noch vitale HSZ, die ihr

Haarbündel verloren haben, beschreibt auch Heuer (1989) für *Aplocheilus lineatus.* Dabei untersuchte er die Schädigung der Seitenlinienorgane durch aminoglykosidische Antibiotika, die auf HSZ-Ebene zum Verlust des Kinociliums und der Stereocilien führt. Aufgrund der kurzen Regenerationsphase (18-24 h), d.h. der funktionellen (Reaktionsbereitschaft des Fisches) und morphologischen (Regeneration der HSZ in REM-Aufnahmen) Wiederherstellung der Seitenlinienorgane nach Antibiotikabehandlung, ist eine selektive Neubildung der Haarbündel durch die geschädigten Zellen wesentlich wahrscheinlicher als der Ersatz der gesamten HSZ (Heuer, 1989). Auch diese Ergebnisse zeigen, dass HSZ durch den Verlust ihres Haarbündels nicht zwingend irreparabel geschädigt werden und darüber hinaus die apikalen Stereocilien regenerieren können. Einen weiteren Hinweis für den Erhalt der Vitalität von ÄHZ aus der Meerschweinchencochlea trotz Verlustes der apikalen Zellbestandtteile beschrieb Slepecky (1989). Dabei zeigten HSZ, die aufgrund der mechanischen Isolierung Stereocilien und Cuticularplatte verloren hatten und deren Membran sich vermutlich jedoch schnell wieder geschlossen hatte, eine normale Zellform und Kontraktilität nach Zugabe von Ca^{2+} und ATP. Zellen, bei denen sich die Plasmamembran nicht wieder geschlossen hatte und die Cytoplasma oder den Kern ausgestoßen hatten, zeigten hingegen keine Kontraktilität mehr.

Die 4. Kategorie der in den Vitalfärbungen gefundenen Zellen setzte sich aus deformierten und morphologisch unauffälligen Sinneszellen zusammen.

Dabei zeigten diese Zellen weder FDA- noch PI-Fluoreszenz, was Schädigungen des Zellstoffwechsels bei gleichzeitig intakten Membranverhältnissen bei diesen HSZ wahrscheinlich macht.

4.3 Morphologie und Zelldimensionen der isolierten HSZ

Die in dieser Arbeit isolierten HSZ entsprechen in der Phasenkontrastmikroskopie dem von Stroh (1992) beschriebenem Aussehen. Es handelt sich bei den Seitenlinienrezeptorzellen der Form nach um Typ II HSZ, wie sie auch im vestibulären Labyrinth der Säuger vorkommen (Wersäll, 1956; Müller, 1984; Blübaum-Gronau, 1989)

Die in einzelnen Präparaten gelegentlich anzutreffenden HSZ-Pärchen spiegeln die von Müller (1984) und Blübaum-Gronau (1989) beschriebenen Sinneszell-Dupletts, die mit entgegengesetzter Richtungsempfindlichkeit im Neuromastengewebe paarweise angeordnet sind, wider. Eine ähnliche paarige Zellanordnung als Entwicklungsstadium bei unreifen HSZ konnten Rouse & Pickeles (1991) bei *Parapriacanthus ransonetti* und *Apogon cyanosoma* nachweisen.

Die schon von Stroh (1992) bei *Pantodon* festgestellten Größenunterschiede der HSZ konnten ebenfalls bestätigt werden. Dabei ergab die Größenbestimmung sowohl bei einer einzelnen Präparation als auch bei einer Auswahl von HSZ verschiedener Präparate keine Hinweise auf das Vorhandensein von zwei distinkten Zellpopulationen (Daten siehe Anhang Kap. 7.2), wie dies z.B. für den Sacculus des Goldfisches *Carassius auratus* beschrieben ist (Sugihara & Furukawa, 1989; Landford et al., 2000). Vielmehr konnte eine kontinuierliche Größenverteilung von größeren zylindrischen bis zu kleinen birnenförmigen HSZ festgestellt werden (Abb. 8 A, B). Eine solches Größenspektrum ist für HSZ aus der Papilla basilaris beschrieben worden (Rosenhall, 1971; Köppl et al., 1998; Tilney & Saunders, 1983). Hier fanden die genannten Autoren größere Sinneszellen im apikalen Bereich der Papilla, deren Länge graduell zum basalen Bereich hin abnahm. Die morphologische Differenzierung spiegelte sich auch in einer unterschiedlichen Stereocilienanzahl und -anordnung sowie dem Fehlen einer afferenten Innervation bei den meisten kleineren HSZ wider (Köppl et al., 1998; Tilney & Saunders, 1983).

In von Müller (1984) angefertigten raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der Organe von *Pantodon buchholzi* konnten keine unterschiedlichen Stereocilienanordnungen und auffallend unterschiedliche Stereocilienanzahlen in whole-mount-Präparaten des Neuromasten festgestellt werden, wobei der Autor anmerkt, dass eine Aussage darüber anhand der angefertigten Aufnahmen nicht eindeutig zu treffen war. Auch die rasterelektronenmikroskopische Studie von Blühbaum-Gronau (1989) an den cephalen Neuromasten von *Pantodon buchholzi* kommt zwar zu dem Schluss, dass die Stereociliengrößen im Randbereich der Neuromasten kürzer sind als im medialen Bereich, sie konnte aber keine genaueren Angaben über Stereocilien- und Kinocilienlängen an unterschiedlichen Stellen des Neuromasten liefern.

Dagegen beschreibt Tittel (1991) für den Oberflächenfisch *Aplocheilus lineatus* das Vorkommen von kleineren HSZ, die regelmäßig im Randbereich der Neuromasten und verstreut in der Neuromastenmacula zu finden waren. Dabei unterschieden sich diese neben ihrer Größe auch in der Anzahl der Stereocilien (>20) und dem Stereocilien-durchmesser. Ein unterschiedliches Innervationsmuster bei großen und kleinen HSZ konnte nur insoweit festgestellt werden, dass einige kleine HSZ nicht innerviert waren, was aber nicht unbedingt auf einen physiologischen Unterschied beider hinweist, sondern den kleinen HSZ die Rolle von reifenden Zellen zuweist (Tittel, 1991). Für das Vorkommen von unterschiedlichen Entwicklungsstadien bei HSZ und eines Zell-turnovers spricht zum einen das sehr gute Regenerationvermögen von Seitenlinienorganen bei *Pantodon buchholzi* und *Aplocheilus lineatus* (Kaus, 1987;

Blübaum, 1984; Neff, 2000; Norwig, 2000), zum anderen die Tasache, dass ein Zellturnover in Neuromasten bei Larven des Zebrafisches und vielen anderen HSZ tragenden Geweben nachgewiesen werden konnte (u.a. Williams & Holder, 2000; Corwin, 1981; Kil et al., 1997; Kirkegaard & Jorgensen, 2000).

In der vorliegenden Studie war zwangsläufig keine örtliche Zuweisung von großen und kleinen HSZ im Neuromastengewebe möglich, ihre Morphologie bezüglich der Zell-, Stereocilien- sowie Kinociliendimensionen wurde jedoch anhand von Phasenkontrast- und REM-Aufnahmen näher charakterisiert.

Dabei ergaben sich für die durchschnittliche Zelllänge und Zellbreite nahezu gleiche Werte unabhängig davon, ob eine einzelne oder ein Querschnitt aus mehreren Präparationen ausgewertet wurde. Die Längen-Werte von $20{,}8 \pm 3{,}4$ µm und $19{,}3 \pm 3$ µm entsprechen dem von Stroh (1992) angegebenen Wert von $18{,}2 \pm 3{,}9$ µm für isolierte HSZ. Auch die Zellbreite mit $7{,}6 \pm 1$ µm und $7{,}3 \pm 1{,}2$ µm deckt sich mit dem Durchschnittswert von Stroh (1992) mit 7,8 µm $\pm$ 1,3 µm.

Die hier beschriebenen Daten stimmen in weiten Teilen auch mit denen von Blübaum-Gronau (1989) anhand von histologischen Schnittpräparaten bestimmten Größen überein. Sie konnte eine mittlere Länge von 16,4 µm für HSZ aus dem supraorbitalen Neuromasten I (Nm I) und 18,4 µm aus dem supraorbitalen Neuromasten II (Nm II) angeben. Die Länge der Zellen im supratemporalen Neuromast V (Nm V) betrug 20,6 µm. Die ermittelten Werte für die Breite lagen mit 5,6 µm (Nm I) bis 7,1 µm leicht unter den an isolierten HSZ gemessenen. Stroh (1992) diskutiert in diesem Zusammenhang eine gewisse Breitenausdehnung der isolierten Zellen aufgrund des fehlenden Gewebeverbandes oder Schrumpfungseffekte bei der histologischen Aufarbeitung der Schnitte Blübaum-Gronaus.

Im Vergleich zu anderen HSZ aus der Seitenlinie von Fischen liegen die Sinneszellgrößen von *Pantodon buchholzi* im unteren bis mittleren Bereich. Für *Acerina cernua*, den Kaulbarsch, sind mit 15 µm eine kleinere durchschnittliche Länge und 10 µm eine größere Breite angegeben (Kroese et al., 1987). Tittel (1991) beschreibt für *Aplocheilus lineatus* ähnliche Werte wie für den Schmetterlingsfisch mit 18–23 µm (Länge) und einer mittleren Breite von 5–6,5 µm. Die Quappe, *Lota vulgaris* hingegen besitzt deutlich größere Seitenlinien-HSZ mit 40 µm langen und 10 µm breiten Sinneszellen (Flock, 1965). Eine Sonderstellung bezüglich der Größe seiner Seitenlinien-HSZ nimmt der Axolotl, *Necturus maculosus*, ein, der HSZ mit einer Länge von 80 µm und 15 µm Breite (an der Zellbasis) ausbildet (Frishkopf et al., 1972).

HSZ aus anderen Organen des akustiko-lateralen Systems zeigen in der Regel deutlich größere Zelldimensionen im Vergleich zum überwiegenden Teil der

Seitenlinien-HSZ. So geben Sugihara & Furukawa (1989) für isolierte Zellen aus dem Sacculus des Goldfisches *Carassius auratus* Längen zwischen 13 und 50 µm an.
In licht- und elektronenmikroskopischen Studien an der Papilla basilaris von Tauben konnten HSZ-Längen zwischen 10 µm und 17 µm je nach Ort in der Macula bestimmt werden. Die Zellbreiten differierten hier auch ortsspezifisch und lagen im Bereich von 10 µm (Rosenhall, 1971). Köppl et al. (1998) beschreiben Werte für große HSZ der Papilla basilaris des Emus von 30–35 µm (Länge) und 5 µm (Breite) bzw. 6–8 µm (Länge) und 8-10 µm (Breite) für kleine HSZ.
Für IHZ des Meerschweinchens findet man in der Literatur Werte von 25–40 µm bzw. 15–20 µm (mittlere Breite) (Dulon et al., 1991) und für die Wüstenrennmaus 20–25 µm bzw. 9–13 µm (He et al., 2000). Die in der Säugetiercochlea des Weiteren vorkommenden ÄHZ bilden mit Längen zwischen 22 (Maus) und bis über 70 µm (Meerschweinchen) sehr lange HSZ aus (Zajic & Schacht, 1987; Zenner & Schacht, 1986; Brownell et al., 1985). Dabei muss man jedoch diesen Zellen eine Sonderstellung gegenüber den übrigen Sinneszellen einräumen, da sie aufgrund ihrer wohl einzigartigen physiologischen Funktion als kontraktile Verstärker innerhalb der Säugercochlea eine besonders elongierte Form aufweisen (Brownell et al. 1985; Zenner et al., 1985 a, b).
Bei der Auswertung der Zelllängen und -breiten wurde auch der Länge/Breite-Index bestimmt. Dieser lag für die Größenbestimmung aus verschiedenen Präparationen im Mittel bei 2,7:1 mit Extremwerten von 1,7:1 und 4,5:1. Für die Bestimmung des Indexes, welcher Zellen eines einzelnen Präparates zur Grundlage hatte, ergab sich ein Mittelwert von 2,8:1 mit gleicher Bandbreite. Die ermittelten Werte stimmen mit dem von Blübaum-Gronau (1989) beschriebenen Länge-Breite-Index der subepidermalen Neuromasten von 3:1 gut überein. Ein interessanter Aspekt ist dabei die Tatsache, dass Indices >1:1, wie sie Köppl et al. (1998) für kleine HSZ der basilären Papilla des Emus konstatiert haben, in der cephalen Seitenlinie von *Pantodon* nicht vorkommen. Im Sacculus des Goldfisches konnten für kleine ei- bzw. auberginenförmige HSZ Länge zu Breite Indices von >2:1 und für die zweite morphologisch und physiologisch unterscheidbare (größere) Zellform-Werte von 4:1 gefunden werden (Sugihara & Furukawa, 1989).
Im Rahmen der vorliegenden Studie lieferten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HSZ besonders detaillierte Einsichten über den Feinbau der apikalen Zellbestandteile. Dieser apikale Zellbereich der HSZ von *Pantodon buchholzi* weist ein apolar inserierendes Kinocilium auf, an das sich meist 7 parallele Längsreihen Stereocilien anschließen. Dabei lässt sich in Bezug auf das Kinocilium eine V-förmige Geometrie erkennen. Die Größe der Stereocilien nimmt zum Kinocilium hin

kontinuierlich zu, wobei der Betrag der Längenzunahme bei vielen Zellen auffallend gleiche Werte zeigt. Dies ist vermutlich der Grund für das hochgeordnete Erscheinungsbild des Haarbündels. Die Gesamtzahl der Stereocilien lag bei Zellen, deren Lage ein Auszählen ermöglichte, zwischen 30 und 50. Die Kompaktheit des Haarbündels sowie die bei den Zellen meist glatte Oberfläche weist darauf hin, dass die angewandte Enzymbehandlung die Isolation von Zellen mit keinen bzw. nur geringen oberflächlich sichtbaren Schädigungen ermöglicht, was die elektrophysiologischen Befunde betreffend der Vitalität der Zellen von Stroh (1992) stützt.

Der Grundbauplan der Zellen entspricht in vielen Aspekten dem von Flock (1965) für HSZ aus der Seitenlinie von Kanalneuromasten beschriebenen. Dabei wiesen die Zellen von *Lota vulgaris* ein apolares Kinocilium sowie 7 parallele Reihen mit 5–6 Stereocilien auf, die V-förmig in einem Winkel von 110–115° zum Kinocilium hin angeordnet sind. Die Stereocilienanzahl war hier 40–50. Die beschriebenen Befunde decken sich ebenfalls in weiten Teilen mit denen von Tittel (1991) an superfiziellen Neuromasten von *Aplocheilus lineatus* angefertigten REM und TEM in-situ-Aufnahmen von HSZ. Auch bei diesen Sinneszellen kann man eine V-förmige Geometrie der Stereocilienanordnung in Bezug auf das Kinocilium erkennen, und die Anzahl der Cilien lag bei 20–50. Die Anordung und Anzahl der Stereocilien erinnert an die Verhältnisse von vestibulären Sinneszellen (u.a. Hillman & Lewis, 1971), differiert dagegen stark von derjenigen der cochleären HSZ beim Säugerohr. Hier findet man eine höhere Anzahl von Stereocilien mit 30–150 pro Haarbündel und die Anordnung ist bei ÄHZ dergestalt, dass drei Stereocilienreihen ein W bzw. V bilden und die IHZ gerade Haarbündelreihen zeigen (Flock, 1971; Lim, 1986; Zenner, 1994). Für HSZ aus dem Innenohr der Alligatoreidechse (*Gerrhonotus multicarinatus*) sind in der Literatur 75 Stereocilien angegeben (Tilney et al., 1980) und für die Papilla basilaris von Hühnern je nach Position der Zelle auf der Macula 50–300 Stereocilien (Tilney & Saunders, 1983).

Als weitere Strukturen im apikalen Zellbereich waren die von Tittel (1991) für *Aplocheilus* beschriebenen „irregulären Mikrovilli“ außerhalb der Cuticularplatte auch bei einigen isolierten HSZ von *Pantodon buchholzi* vorhanden. Zusätzlich zu diesen traten bei manchen Zellen lappenförmige Zellfortsätze hinter der Ursprungsstelle des Kinociliums auf. Die Bedeutung dieser auch von Müller (1984) und Neff (2000) für HSZ des Schmetterlingsfisches beschriebenen Zellanhänge ist unklar und bildet möglicherweise eine Sonderausprägung bei *Pantodon buchholzi*. Weiterhin zeigten die Stereocilien untereinander im basalen Bereich fibrilläre Verbindungen sowie an die tip links cochleärer Stereocilien (Pickles et al., 1984) erinnernde Verbindungen im apikalen Bereich; sie verknüpfen hintereinander stehende Stereocilien. Verbindungen

der Stereocilien untereinander sind für HSZ sowohl aus der Seitenlinie (Tittel, 1991; Flock, 1965) als auch aus den Vestibularorganen von Fisch, Frosch und Hühnern (Hirokawa & Tilney, 1982; Neugebauer & Thurm, 1984) bekannt. Inwieweit es sich bei den hier nachgewiesenen Verbindungsstrukturen im apikalen Stereocilienbereich um mit tip links vergleichbare Strukturen handeln könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ, da die Anzahl an Aufnahmen, die derartige Strukturen zeigten, relativ gering war.

Im basolateralen Teil des Zellkörper wies eine Zelle in der rasterelekronenmikroskopischen Aufnahme Strukturen auf, die mutmaßlich Reste eines synaptisches Endköpfchen mit ableitender Faser darstellen. Müller (1984) konnte in TEM-Aufnahmen afferente und efferente Innervation an HSZ im basalen Zellbereich zeigen. Die Größe der afferenten Synapsen lag dabei bei ca. 2 µm, was in der Größenordnung der an der isolierten HSZ nachgewiesenen Struktur liegt.

Im Hinblick auf ein möglicherweise vorhandenes morphologisches Tuning der HSZ ist die Länge der Stereocilien von Interesse, da sie die Struktur darstellen, welche für die mechanoelektrische Transduktion maßgeblich ist (Hudspeth & Jacobs, 1979).

Eine solche morphologische Frequenzabstimmung anhand der Länge der Stereocilien (Turner et al., 1981) bzw. deren Steifheit (Flock & Orman, 1984) konnte nachgewiesen werden. Dabei lassen Sinneszellen der Papilla basilaris von Reptilien mit kurzen Stereocilien eine stärkere Sensitivität für höhere Frequenzen erkennen, wohingegen solche mit längeren Stereocilien ihre Empfindlichkeitsmaxima im niederfrequenten Bereich aufweisen (Holton & Weiss, 1983; Holton & Hudspeth, 1983).

Beim Schmetterlingsfisch findet man für die kürzesten Stereocilien Werte zwischen 0,6 und 1,07 µm ($\varnothing = 0{,}78 \pm 0{,}18$; n = 14). Die längsten Stereocilien maßen zwischen 2,41 und 4,66 µm ($\varnothing = 3{,}62 \pm 0{,}76$; n = 13). Bei Neff (2000) lagen die Stereocilienlängen für HSZ von *Pantodon buchholzi* im gleichen Größenbereich. Prozentual variieren die kürzesten Stereocilien verschiedener Sinneszellen in ihrer Länge also um bis zu 44 %, die größten sogar um bis zu 49 %. Inwieweit die Stereocilienlängen und -anzahlen mit den Zellgrößen korrelieren, konnte aufgrund des begrenzten Datenmaterials nicht definitiv geklärt werden. Die gewonnenen Daten weisen jedoch in Bezug auf die Stereocilienlängen Unterschiede auf, die die Schlussfolgerung auf Zellen mit in diesem Parameter deutlich unterschiedlichen Haarbündeln zulassen.

Variierende Stereocilienlängen wurden auch für *Aplocheilus lineatus* beschrieben, wobei Tittel (1991) für die Kürzeren Werte zwischen 0,3–0,6 µm und für die Längsten Werte zwischen 1,0 und 3,5 µm bestimmen konnte. Auch hier wird eine beträchtliche Größendifferenz bei unterschiedlichen HSZ deutlich. Zusätzlich beschreibt er kleine

HSZ mit dünneren und weniger zahlreichen (<20) Stereocilien. In diesem Zusammenhang diskutiert Tittel ein mögliches morphologisches Tuning als Teilmechanismus zur Frequenzdiskriminierung insbesondere für HSZ, welche nicht über Hilfsstrukturen, wie etwa die Cupula oder die otolithische Membran, miteinander verbunden sind. Im anderen Fall wird die HSZ-Antwort entscheidend von der überlagernden Struktur beeinflusst (Sand & Michelsen, 1978) wie z.B. die otolithische Membran.

Ob ein sog. morphologisches Tuning bei Seitenlinien-HSZ des Schmetterlingsfisches tatsächlich zu beobachten ist und inwieweit HSZ vorhanden sind, die für ein derartiges Tuning infrage kommen, muss in weiteren elektronenmikroskopischen und elektrophysiologischen Studien aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass *Pantodon* die Frequenzmodulation von Oberflächenwellen zur Entfernungslokalisation von Beuteobjekten nutzt (Hoin-Radkovsky et al., 1984), lässt ein deratiges Tuning möglich erscheinen.

Einen anderen Aspekt die Stereocilienbündel betreffend behandelte eine Arbeit von Flock & Orman (1984). An HSZ aus der Crista ampullaris des Frosches untersuchten sie mögliche mechanische Filtereigenschaften der Stereocilien durch die Beobachtung der mechanischen Auslenkung von Haarbündeln mit einem feinen Flüssigkeitsstrahl. Dabei konnten sie verschieden gut auslenkbare Stereocilienbündel unterscheiden. Schnelle Bündel hatten große massive, wohingegen langsame eher dünne und kurze Stereocilien besaßen, was auf passive funktionelle Charakteristika verschiedener HSZ, die während der Entwicklung der Sinneszellen ihre Ausprägung finden, hindeutet. Zur Beurteilung, ob ein solcher strukturell bedingter mechanischer Filter für Seitenlinien-HSZ von *Pantodon buchholzi* infrage kommt, müssten ebenfalls REM- und physiologische Studien folgen. Das Vorkommen von unterschiedlich großen Stereocilienbündeln bei den untersuchten HSZ kann aufgrund der vorhandenen Daten jedoch schon jetzt vermutet werden.

Eine weitere auffallende morphologische Variation betrifft die Länge des bei Seitenlinien-HSZ in Einzahl vorkommenden Kinociliums. Es zeigt in den Phasenkontrast- und REM-Aufnahmen unterschiedliche Maße. In den Isolaten konnten einige HSZ gefunden werden, die ein Kinocilium ausbildeten, welches nahezu die Größe des Zellkörpers (16–19 µm) erreichte. In der Regel jedoch fanden sich bei isolierten HSZ Längen von 4,1–6,9 µm, wobei das längste Stereocilium normalerweise an Größe überragt wurde. Die in der Literatur erwähnten Kinociliengrößen für andere Fische und Amphibien liegen in einem ähnlichen Größenordnungsbereich mit 4,5–10 µm bei *Aplocheilus lineatus*, 10 µm bei *Lota vulgaris* (Flock, 1965) und 40 µm bei *Xenopus laevis* (Görner, 1963).

Fontilla & Peterson (2000) berichteten kürzlich von verschiedenen Kinociliengrößen an unterschiedlichen Positionen auf dem Utriculus-Epithel der Schildkröte (*Pseudemys scripta*). Dabei könnten unterschiedliche Kinocilienlängen über Kinocilium-Stereocilia, Verbindungen wie sie Hillman & Lewis (1971) bei Amphibien nachweisen, eine modulierende Rolle bei der mechanoelektrischen Transduktion von Otolithenorganen spielen (Fontilla & Peterson, 2000). Einen solchen Zusammenhang für die HSZ bei *Pantodon buchholzi* zu vermuten scheint jedoch nicht allzu plausibel, da das gesamte Haarbündel der Seitenlinien-HSZ mit dem fibrillären Netzwerk der Cupula Matrix verflochten ist (Flock, 1967).

Müller (1984) beschreibt anhand von in-situ-Aufnahmen der Neuromasten, Kinocilienlängen von 18 µm, ohne eine auffallende Größenvariation zu erwähnen. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei isolierten HSZ das Kinocilium bei den meisten Zellen während der Isolationsprozedur abbricht. Dagegen spricht das Aussehen der Kinocilienenden in den REM-Aufnahmen, bei denen die Enden der meisten Cilien keine Abbruchkante aufwiesen, wie sie in Abb. 17 gut zu erkennen ist. In einer Studie von Corwin (1981) an HSZ aus der Macula neglecta beim Hai postuliert er das Vorkommen von reifenden HSZ, die vorübergehend ein, im Vergleich zu den noch kurzen Stereocilien, 2–3 x so langes Kinocilium ausbilden, bevor sie als reife HSZ in seiner Beschreibung kaum größere Kinocilien als das längste Stereocilium aufweisen.

4.4 Spezifität der Antikörper

Aufgrund der geringen Mengen an Neuromastengewebe pro Fisch erfolgten die Western-Blot-Analysen größtenteils mithilfe von Fischgewebe, in denen die untersuchten Proteine bekanntermaßen vorkommen.

Für den Aktin-Nachweis wurde Muskel- und Hirngewebe verwendet. Bei diesem Protein handelt es sich um ein 42 kD Peptid (Herstellerangabe Boehringer Mannheim; McGough, 1998), wobei in anderen Arbeiten auch eine Größe von 43 kD angegeben wird (Alberts et al., 1995; Knipper et al., 1995). Der Nachweis im Blot erfolgte mit einem monoklonalen AK, der über die Erkennung eines hochkonservierten Epitops spezifisch alle sechs Isoformen von Wirbeltieraktin markiert (Herstellerangabe Boehringer Mannheim). Die Anfärbung der Nitrocellulosemembran sowohl bei Hirn- als auch bei Muskelgewebe zeigte nur eine Bande, welche im Bereich von 42–43 kD lokalisiert war. Somit ist der Aktin-AK geeignet, dieses Protein in Fischgewebe bzw. in HSZ nachzuweisen.

Der Western Blot zum Nachweis von α-Aktinin erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen AK (Sigma), der spezifisch gegen Hühnermagen-Aktinin ist. Dabei wurde

in der Proteinauftrennung von Fischmuskelgewebe eine einzelne Bande im Bereich von 100 kD angefärbt. Dies entspricht der Proteingröße, die vom Hersteller und Alberts et al. (1995) für α-Aktinin angegeben wird.

Der verwendete AK zum Nachweis des Bande 3-Anionentransporters ist laut Herstellerangaben (Chemicon) ein polyklonaler AK mit nachgewiesener Spezifität für Vogel- und Säugertiergewebe. Der Nachweis dieses Proteins erfolgte mithilfe von Neuromasten- und Hirngewebe des Schmetterlingsfisches. In den elektrophoretisch aufgetrennten Seitenlinienproteinen konnte eine Bande bei 120 kD detektiert werden, während im Hirngewebe neben dieser Bande zwei eng nebeneinander liegende Doppelbanden im Bereich von 85 kD und um 70–75 kD markiert waren. Zusätzlich färbte der AK eine Bande bei 43–45 kD. Beim Bande 3-Anionentransporter handelt es sich um ein Transporterprotein, das zellspezifisch in verschiedenen Isoformen vorkommen kann (AE1-AE3) und abhängig von Kohlenhydratketten unterschiedliche Größen ausbildet (Alper, 1991; Tanner, 1993). Das transmembrane Protein besteht aus einer N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, die den Anknüpfungspunkt für die Verbindung des Aktin-Spektrin-Cytoskeletts mit der Plasmamembran trägt, und der C-terminalen Transmembrandomäne, die die eigentlichen Transporter-Funktion besitzt (Alper, 1991). Durch Papain- oder Trypsin-Behandlung kann der N-Terminus abgespaltet werden (Bennett, 1981).

In Alberts et al. (1995) ist Bande 3 in einer SDS-Page von menschlichen Erythrocyten-membranen gezeigt und bildet dort eine breite Bande um 100 kD aus. Knipper et al. (1995) konnten Bande 3-Proteine mit dem gleichen AK in Western Blots von Vestibularorgen-, Cochleagewebe, ÄHZ und roten Blutzellen des Meerschweinchens nachweisen. Dabei fanden sie Banden im Bereich von 150–160 kD, 120 kD und im Bereich von 55 kD. Die letztgenannte Bande (54 kD) konnten auch Zine & Schweitzer (1997) mit genanntem AK in Blots mit Cochlea- und Hirngewebe der Wüstenrennmaus detektieren. Bennett (1981) konnte nach Enzymbehandlung von menschlichen Erythrocyten ein 43 kD Fragment nachweisen, was vermutlich von der cytoplasmatischen Zellseite stammte.

Was die in dieser Studie gefundenen Markierungen des Bande 3 Blots betrifft, so stimmt die angefärbte 120 kD Bande mit der von Alberts et al. (1995) und Knipper et al. (1995) in diesem Größenbereich beschriebenen gut überein. Bei der Bande im Bereich von 43–45 kD (für das Hirngewebe) könnte es sich um das von Bennett (1981) für Erythrocyten beschriebene 43 kD Spaltprodukt handeln. Die Doppelbanden, die beim Hirngewebe detektiert wurden, bilden vermutlich Bruchstücke des Anionentransporterproteins oder könnten unspezifische Markierungen darstellen, da

die Proteinanfärbung relativ lange Entwicklungszeiten der Membran mit dem ECL-Kit erforderte.

Der zum Nachweis von Myosin verwendete polyklonale AK (Sigma) markiert spezifisch Myosin aus glatter und Skelettmuskulatur. Zum Nachweis dieses Proteins im Fisch wurde Darmgewebe eingesetzt. Laut Hersteller und Alberts et al. (1986) besteht Myosin aus zwei Polypeptidketten von 200 kD (schwere Ketten) und 4 leichten Ketten mit einem Gewicht von 15–20 kD. Im Western Blot konnte mit dem genannten AK eine Bande bei 200 kD im Fischgewebe nachgewiesen werden.

Spektrin wurde mithilfe eines polyklonalen AK nachgewiesen, der spezifisch die α und β-Ketten von Hühnererythrocyten-Spektrin erkennt (Herstellerinformation Sigma). Dabei konnten im Western Blot, unter Verwendung von Fischhirngewebe, vier Banden bei ca. 260, 240, 220 und ca. 160-180 kD detektiert werden.

Spektrine kommen in vielen verschiedenen Zellarten vor und bilden in der Regel Heterotetramere aus je 2α- und 2β-Untereinheiten (Alberts et al., 1995). Das zunächst als Bestandteil des Cytoskeletts nachgewiesene Erythrocyten-Spektrin besteht aus 240 kD und 220 kD großen Polypeptiden, während das in Hirngewebe vorkommende Gehirn-Spektrin, auch Fodrin genannt, aus 240 kD und 235 kD Untereinheiten besteht (Levine & Willard, 1981; Glenney et al., 1982 b; Burridge et al., 1982). Zusätzlich wird für dieses Gewebe in der Literatur ein weiteres Polypeptidpaar beschrieben mit Größen von 265 und 260 kD, welche immunologisch und strukturell ähnlich dem Erythrocyten Spektrin ist (Bennett et al., 1982; Alberts et al., 1995). In Darmepithelzellen konnte des Weiteren eine Spektrin-Isoform (TW-260/240) mit Polypeptidgrößen der Untereinheiten von 260 und 240 kD detektiert werden (Glenney et al., 1982 a; Hirokawa et al., 1983; Glenney et al., 1983).

Kreuzreaktivitäten der Antiseren zwischen den einzelnen Spektrinisoformen (insbesondere der 240 kD Untereinheiten) konnten gezeigt werden (Glenney et al., 1982 b).

Die im Western Blot im Rahmen dieser Studie nachgewiesenen Banden liegen im für Spektrine typischen Größenbereich, wobei es sich bei der im Bereich von 160–180 kD vermutlich um eine Bruchstückbande handelt. Eine Aussage, inwieweit das in den HSZ gezeigte Spektrin mit dem an Hirngewebe im Blot gezeigten Untereinheiten übereinstimmt, kann nicht getroffen werden.

Der Nachweis von Tubulin erfolgte mit einem monoklonalen AK gegen α-Tubulin, wobei Hühnerhirn als Immunogen diente (Sigma). Das als α- und β-Tubulin vorkommende Protein weist für beide Untereinheiten jeweils ein Molekulargewicht von

50 kD auf (Alberts et al., 1986). Der unter Verwendung von Fischhirngewebe angefertigte Western Blot zeigte eine einzige Bande, die im Bereich von 50 kD lag.
Während die Immunoblots von Aktin, α-Aktinin, Myosin und Tubulin für die jeweiligen Proteine eindeutige Banden aufweisen, ist das Bild für Spektrin und Bande 3 durch mögliche Bruchstückbanden und verschiedene Isoformen weniger eindeutig.
Insgesamt zeigen die Western Blots jedoch, dass alle verwendeten Antikörper zum Nachweis der untersuchten Proteine im Fischgewebe resp. in den Seitenlinien-HSZ geeignet sind.

4.5 Immunfluoreszenz

a) Aktin
Die Aktin-Immunfluoreszenzergebnisse der vorliegenden Studie lassen, im Vergleich zu den von Stroh (1992) an HSZ des Schmetterlingsfisches mit einem monoklonalen Aktin-Antikörper (Amersham) nachgewiesenen Strukturen, einige Unterschiede erkennen. Neben der Anfärbung der Stereocilien und einer schwachen Markierung der Cuticularplatte, konnte zusätzlich eine starke Fluoreszenz im Bereich der ZA, d.h. am Cuticularplattenrand, sowie Fluoreszenzaktivität im lateralen Zellmembranbereich eindeutig detektiert werden. Eine wie von Stroh (1992) beschriebene Anfärbung des infracuticulären Plasmas konnte hingegen bei keiner Zelle verifiziert werden. Der Grund für das unterschiedliche Fluoreszenzmuster liegt vermutlich in der Spezifität des verwendeten Antikörpers. Während Stroh mit einem monoklonalen IgM-Antikörper der Firma Amersham arbeitete, wurde in der vorliegenden Arbeit ein monoklonaler AK (IgG) verwendet, der laut Herstellerangaben (Boehringer Mannheim, Roche) spezifisch alle sechs Isoformen von Wirbeltieraktin erkennt. Dabei könnte der Unterschied darin liegen, dass dieser AK neben den vier Muskelaktinisoformen (glatte, Skelett- und Herzmuskelisoformen) auch für die cytoplasmatischen Isoformen spezifisch ist. Leider konnte auf Anfrage beim Hersteller nicht mehr nachvollzogen werden, gegen welches Aktinantigen der von Stroh verwendete AK gerichtet war, wobei es sich hier vermutlich um eine Spezifität gegen Aktin aus quer gestreiftem oder glattem Muskel handelte. Slepecky & Savage (1994) konnten für innere und äußere HSZ des Meerschweinchens mit isoformspezifischen AK die β- und γ-cytoplasmatischen Aktinisoformen nachweisen, erhielten jedoch mit AK gegen Muskelisoformen des Aktins sowohl im Immunoblot als auch in der Schnittfärbung keine positive Markierung. Möglicherweise beruhte die von Stroh detektierte Fluoreszenz auf Kreuzreaktionen des AK mit den vermutlich auch in Seitenlinien-HSZ vorkommenden cytoplasmatischen Aktinisoformen. Dabei könnte das Fehlen der Anfärbung im Bereich der lateralen

Zellmembran und oftmals in der Cuticularplatte darauf hinweisen, dass evtl. nur eine cytoplasmatische Isoform detektiert wurde.

Im Vergleich mit HSZ aus anderen Organen (vestibuläre- und Innenohr-Zellen) zeigt das hier beschriebene Markierungsmuster deutliche Parallelen und entspricht der für diesen Zelltyp charakteristischen Aktinverteilung.

So konnte mit immuncytochemischen Methoden Aktin in den Stereocilien und in der Cuticularplatte von HSZ aus dem Innenohr von Frosch, Goldfisch, Meerschweinchen, Maus, Hamster, Ratte, Affe und Huhn nachgewiesen werden (Flock, 1980, 1985; Flock et al., 1981, 1982; 1986; Zenner, 1981, 1986 a, b; Slepecky & Chamberlain, 1985; Slepecky & Ulfendahl, 1992; Drenckhahn et al., 1985, 1991; Thorne et al., 1987; Raphael et al., 1994; Jaeger et al., 1994). In TEM-Aufnahmen von Innenohr-HSZ der Alligatoreidechse wurde gezeigt, dass ein Stereocilium aus mehr als 3000 parakristallin in Reihen und Filamentbündeln angeordneten Aktinfilamenten besteht, deren Anzahl sich beim Eintritt in die Cuticularplatte auf 18–29 Filamente reduziert (Tilney et al., 1980) und die dort Wurzelfilamente bilden.

Auch in der Cuticularplatte konnte in verschiedenen Arbeiten Aktin als ein Hauptbestandtteil des apikalen Cytoskeletts nachgewiesen werden; einmal als Netzwerk, in dem die Wurzelfilamente der Stereocilien ihre Verankerung finden und zum anderen in ringförmig angeordneten Filamenten um die Cuticularplatte herum, die ZA assoziiert sind (u.a. Flock & Cheung, 1977; Tilney et al., 1980).

Durch Markierung der Aktinfilamente mit S_1- Fragmenten des Myosins konnten Flock & Cheung (1977) an HSZ aus der Crista ampullaris des Frosches und des Meerschweinchens, elektronenoptisch nicht nur Aktin erstmals im apikalen Zellbereich nachweisen, sondern auch erste Aussagen über die Polarität der Aktinfilamente machen. Da die Myosinköpfchen, welche F-Aktin wie Pfeilspitzen markieren, Filamente unterschiedlicher Polarität auch in unterschiedlicher Richtung markieren, konnten genannte Autoren zeigen, dass die Stereocilien bis in die Cuticularplatte hinein, aus Aktinfilamenten mit nur einer Polaritätsrichtung bestehen. In weiteren Arbeiten, in denen die räumliche Anordnung der Aktinfilamente mit Gefrierbruch- bzw. Gefrierätzmethode sowie mit S_1-Fragmentmarkierung und anschließender Elektronenmikroskopie aufgeklärt werden konnte, zeigte sich zusammengefasst folgendes Bild der Aktinverteilung im apikalen Bereich der HSZ. Man konnte hier prinzipiell drei unterschiedliche Aktinfilamentsysteme detektieren (Flock & Cheung, 1977; Flock, 1980; Flock et al., 1981; Tilney et al., 1980; Hirokawa & Tilney, 1982; Hirokawa, 1986; DeRosier & Tilney, 1989):

1. Aktinfilamente mit gleicher Polarität in den Stereocilien, die mit Wurzelfilamenten in der Cuticularplatte verankert sind.

2. Die Cuticularplatte enthält nahezu rechtwinklig zu den Stereocilienwurzeln verlaufende Aktinfilamente, die unterschiedliche Polarität aufweisen.
3. Im Bereich der ZA verlaufen Aktinfilamente unterschiedlicher Polarität, eine ringförmige Struktur bildend, um den Zellapex.

Mit Immunfluoreszenzmethoden konnte diese Verteilung von Aktin für ÄHZ aus der Meerschweinchencochlea und an HSZ aus der Papilla basilaris von Hühnern bestätigt werden (Zenner, 1986 a, b, 1994; Drenckhahn et al., 1991).

Während der genannte Ring im Bereich der Zonula adhaerens sowie eine Markierung der Stereocilien bei den HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* anhand einer starken Fluoreszenz deutlich zu erkennen sind, scheint die Menge an Aktin innerhalb der Cuticularplatte bei vielen Zellen nur gering zu sein. Weniger Aktin in genanntem Zellbereich wurde auch für IHZ beschrieben; die Stärke der Fluoreszenz blieb bei diesen deutlich hinter der der ÄHZ zurück (Slepecky & Chamberlain, 1985).

Zusätzlich zu der apikalen Aktinverteilung wiesen Flock et al. (1986) elektronenoptisch anhand einer Immunogoldanfärbung Aktinstrukturen im lateralen Zellmembranbereich von ÄHZ von Meerschweinchen nach. Diese zwischen den lateralen Zisternen und der Membran lokalisierte Markierung fehlte bei IHZ; hier waren ausschließlich die Stereocilien und die Cuticularplatte angefärbt. Immuncytochemisch konnte Zenner (1986 a, b) an ÄHZ (ebenfalls aus der Meerschweinchen-Cochlea) ein geringer als in der Cuticularplatte ausgeprägtes Netzwerk von Aktinstrukturen, welches von selbiger bis zu den basalen Zellteilen reicht, nachweisen.

Die in der vorliegenden Studie beschriebene Fluoreszenz im lateralen Zellmembranbereich erscheint in konfokalen Schnittbildern, die durch den medialen Zellbereich geführt wurden, wie eine bindfadenartige Umrahmung des Zellkörpers, wie sie für ÄHZ in gleicher Intensität (Flock et al., 1986; Zenner et al., 1986 a, b; Thorne et al., 1987; Slepecky, 1989) und für IHZ wenn, dann in erheblich geringerem Umfang (Raphael et al., 1994) oder sogar als fehlend beschrieben wurde (Flock et al., 1986; Slepecky & Ulfendahl, 1992). In optischen Schnittebenen in der Nähe der Zellmembran weisen die HSZ des Schmetterlingsfisches in ihrer Aktinfluoreszenz eine deutlich punktförmige Struktur auf, was zusammen mit der zellumrahmenden Fluoreszenz auf eine Ummantelung der Zelle mit kurzen Aktinfilamenten unterhalb der Plasmamembran hindeutet. Dies ähnelt den Ergebnissen von Flock et al. (1986) an ÄHZ, bei dessen elektronenmikroskopischen Aufnahmen lokale Anhäufungen von aktinmarkierenden Immunogoldpartikeln („clusters“) im lateralen Zellbereich zu erkennen sind. Auch Zenner (1986 a, b, 1994) weist auf eine netzwerkartige Verteilung der lateralen Aktinvorkommen in ÄHZ des Meerschweinchens hin.

Einen weiteren interessanten Aspekt bildet die von Stroh (1992) beschriebene Markierung im infracuticulären Bereich bei HSZ des Schmetterlingsfisches. Wie erwähnt konnte in den vorliegenden Versuchen keine distinkte Anfärbung von Zellen in dieser Zellregion gezeigt werden. Für ÄHZ des Meerschweichens wurden solche infracuticulären Aktinnetzwerkstrukturen nachgewiesen (Zenner, 1986 a, b). Das Vorkommen dieser beschränkte sich jedoch auf ÄHZ der oberen (apikalen) Cochleawindungen, d.h. HSZ aus dem basalen Teil der Hörschnecke zeigten nie Fluoreszenz in diesem Zellbereich (Thorne et al., 1987; Ylikoski et al., 1992). Das Vorkommen eines infracuticulären Netzwerkes konnte bisher auch nur bei ÄHZ des Meerschweinchens nachgewiesen werden (Raphael et al., 1994). Inwieweit Seitenlinien-HSZ hier Unterschiede im Aktinvorkommen aufweisen, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht grundsätzlich entscheiden, jedoch würde das Vorhandensein von Aktin im infracuticulären Cytoplasma sehr gut zur Anfärbung des Aktin-bindenden Proteins Spektrin passen, welches an gleicher Stelle nachgewiesen werden konnte (Abb. 26 C, D). Slepecky (1989) diskutiert in diesem Zusammenhang, dass die bei ÄHZ des Meerschweinchens zu beobachtende infracuticuläre Aktinfluoreszenz möglicherweise ein Fixierungsartefakt darstellt und auf Zellschädigungen bei der Verwendung von Paraformaldeyd und Glutaraldehyd als Fixierungsmedium zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung resultiert aus ihren Ergebnissen bei der Verwendung von eiskaltem Ethanol als Fixiermedium. Hier zeigten die Zellen, im Gegensatz zu formaldehydfixierten aus den apikalen Cochleawindungen, keine Färbung der infracuticulären Zellregion, sondern vielmehr eine diffus verteilte Aktinmarkierung des Cytoplasmas. Dieser Aspekt könnte somit auch bei dem schon erwähnten Unterschied der Färbeergebnisse von Stroh (1992) und der vorliegenden Studie bezüglich des Vorkommens von Aktin im infracuticulären Cytoplasmas eine Rolle spielen. Während Stroh (1992) 3,7 %ige Formaldehydlösung als Fixiermedium verwendete, wurde in den von mir durchgeführten Experimenten Methanol angewendet, was der Ethanolfixierung Slepeckys entspricht. Fraglich erscheint diese Argumentation jedoch durch das von Thorne et al. (1987) beschriebene Vorkommen dieser Struktur in Abhängigkeit von der Position der ÄHZ (apikal oder basal) und aufgrund der Tatsache, dass an Triton X-100 behandelten unfixierten Zellen das infracuticuläre Netzwerk erkennbar ist (Holley & Ashmore, 1990).

Die in einigen Zellen der vorliegenden Studie zu beobachtende diffuse und schwache Fluoreszenz des Cytoplasmas ist in der Intensität wesentlich geringer als die von Slepecky (1989) beschriebene und könnte eher auf depolymerisiertes Aktin (G-Aktin) zurückzuführen sein. Einen Pool an depolymerisiertem Aktin vermutet Zenner

(1981, 1986 a, b, 1994) für ÄHZ des Meerschweinchens im Bereich der Cuticularplatte und in der supranukleären Region.

b) α-Aktinin

Für das Aktin-bindende Protein α-Aktinin konnte in der vorliegenden Arbeit ein Vorkommen ausschließlich im Bereich der Zonula adhaerens (ZA) als ringförmige Struktur nachgewiesen werden. Weder Stereocilien und Cuticularplatte noch der übrige Zellkörper zeigten strukturierte Fluoreszenz. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Drenckhahn et al. (1991), die mit immunhistologischen und immunoelektronenmikroskopischen Methoden α-Aktinin als ringförmige Anfärbung in der ZA-Region von HSZ aus der Papilla basilaris von Hühnern nachwies. Sie beschrieben hierbei ein gestreiftes Muster der Fluoreszenz bzw. von stärkerer und geringerer Markierung in der Immunogoldanfärbung, ein Muster, das für die HSZ des Schmetterlingsfisches bestätigt werden kann. Die von ihnen zusätzlich nur in der Immunfluoreszenzfärbung detektierte punktförmige Fluoreszenz in der Peripherie äußerer HSZ konnte für die Sinneszellen von *Pantodon buchholzi* in den konfokalen Aufnahmen nicht gesehen werden. Was die Verteilung von α-Aktinin im apikalen Zellbereich betrifft, so findet man z.T. recht unterschiedliche und widersprüchliche Angaben. Während Drenckhahn et al. (1982) und Slepecky & Chamberlain (1985) an Schnitten von Meerschweinchen-Cochlea α-Aktinin in der Cuticularplatte von inneren und äußeren HSZ nachweisen konnten, jedoch keine Färbung der Stereocilien erhielten, beschrieben Drenckhahn et al. (1985) bei einer weiteren Studie mit verschiedenen Spezies unterschiedliche Markierungsergebnisse. So zeigten alle HSZ eine Färbung der Cuticularplatte, während bei HSZ aus Nicht-Säugetierspezies (Goldfisch, Amerikanischer Kaiman und Huhn) auch die Stereocilien deutliche Fluoreszenz aufwiesen, was bei allen Säugetier-HSZ (Meerschweinchen, Hamster, Maus und Ratte) klar nicht der Fall war (Drenckhahn et al., 1985). Einen differenzierten Befund zur Verteilung des Proteins in HSZ aus der Meerschweinchencochlea lieferten Slepecky & Ulfendahl (1992), die unter Verwendung eines gegen die Skelettmuskelisoform gerichteten AKs eine Markierung ausschließlich der Cuticularplatte fanden, bei der Anfärbung mit einem AK, der spezifisch für die glatte Muskelisoform war, jedoch zusätzlich eine Fluoreszenz der Stereocilien nachweisen konnten.

Flock et al. (1982) konnten an Stereocilien aus Meerschweinchen–Utriculus und Cochlea-Fragmenten keine α-Aktinin-Fluoreszenzmarkierung erzielen, sie diskutieren

jedoch die Aldehyd-Fixierung als mögliche Fehlerquelle für ein fälschlicherweise negatives Ergebnis.
In keiner der von mir durchgeführten Färbungen, in denen wie bei Drenckhahn et al. (1985) ein Antikörper der gegen Hühnermagen-Aktinin spezifisch war, verwendet wurde, konnte eine Fluoreszenz der Stereocilien beobachtet werden.

c) Bande 3

Bande 3 (AE1) konnte in der vorliegenden Studie mit einem polyklonalen AK, der spezifisch gegen das Anionen-Transporter-Protein von Hühnererythrocyten gerichtet war, in HSZ des Schmetterlingsfisches nachgewiesen werden.
Die Anionen-Transporter-Proteine bilden eine Familie, bei der neben dem AE1 weitere Proteine in „Nicht-Erythrocyten-Geweben“ detektierbar waren. Die cDNAs von AE2 und AE3 konnten in Ratten und Mäusen ermittelt werden und vermutlich gibt es mit AE4 einen weiteren Vertreter dieser Protein-Familie (Alper et al., 1988; Alper, 1991; Tanner 1993). Dabei zeichnen sich diese Proteine im Vergleich mit AE 1 durch eine hohe Aminosäure-Sequenzhomologie in der C-terminalen (Transporter-) Domäne aus und unterscheiden sich hauptsächlich in der Sequenz des N-Terminus (Alper, 1991; Tanner, 1993).
Strukturell besitzen die Anionen-Austauscherproteine zwei unterschiedliche Domänen, welche mit verschiedenen Funktionen in der Zelle in Zusammenhang gebracht werden. Die transmembrane C-terminale ist für die Austauscherfunktion von HCO_3^- aus der Zelle gegen Cl^--Ionen verantwortlich und dient u.a. in Erythrocyten zur pH- und Zellvolumen-Regulation (Alper, 1991). Der physiologische Nachweis eines Cl^-/HCO_3^- Austausches konnte auch für ÄHZ erbracht werden (Ikeda et al., 1992), wobei hier dem Vorkommen des Anionen-Austauschers in verschiedenen cochleären Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des endolymphatischen pHs zugemessen wird (Stankovic et al., 1997).
Die N-terminale, auf der cytoplasmatischen Seite lokalisierte Domäne dient in der Erythrocytenmembran, unter Beteiligung der Proteine Bande 4.1 und Ankyrin, als Verankerungsstelle zwischen Cytoskelett (Aktin-Spektrin) und der Plasmamembran (Bennett & Stenbuck, 1980; Liu et al., 1987; Alper, 1991; Tanner, 1993, 1997; Alberts et al., 1995). Bei der Untersuchung der Cytoskelettproteinausstattung von ÄHZ ergaben sich Ähnlichkeiten zu den das Erythrocytencytoskelett aufbauenden Proteinkomponenten. So konnten Knipper et al. (1995) in Western-Blot- und ELISA-Untersuchungen in ÄHZ u.a. das Vorkommen von Bande 3 (AE1) in ähnlichen Mengen wie in Erythrocyten nachweisen. Den Autoren zufolge ist Bande 3 auch Bestandteil des Vestibularorgangewebes.

In HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* findet man Bande 3 in vielen Zellregionen. Neben dem Vorkommen ringförmig um die Cuticularplatte und im lateralen Zellmembranbereich zeigten die Zellen unterschiedlich starke Anfärbungen der Cuticularplatte als solche und des Cytoplasmas sowie teilweise der Stereocilien und des Kinociliums.

Das Anfärbungsmuster ähnelt in Teilen dem von Zine & Schweitzer (1997) beschriebenen. Sie wiesen Bande 3 (AE1) in ÄHZ der Wüstenrennmaus nach und konnten Fluoreszenz im lateralen Umfang der Zelle, konzentriert im Bereich zwischen der Cuticularplatte und dem Kern, detektieren, nicht aber in den Stereocilien.

Das Vorkommen von AE2α, einer in der transmembranen Region verkürzten Isoform, die vermutlich ausschließlich strukturelle Verankerungsfunktion besitzt, ist für die Stereocilien von IHZ und ÄHZ des Meerschweinchens belegt. Diese Art des Bande 3-Proteins fand man zusätzlich im Lateralbereich von ÄHZ nicht aber von IHZ (Kalinec et al., 1997).

In Klonierungsversuchen konnten Mhatre et al. (1998) die cDNA von AE2 und AE3, nicht aber die von AE1 und AE2α im Cortischen Organ von Meerschweinchen nachweisen. Immuncytochemisch und in in-situ-Hybridisierungsexperimenten war AE2-Fluoreszenz in ÄHZ nicht erkennbar. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Stankovic et al. (1997), die AE2 zwar im basolateralen Bereich von IHZ und HSZ des Vestibularorgans von Meerschweinchen detektierten, jedoch kein Fluoreszenzsignal in ÄHZ fanden.

Der Vergleich einiger Befunde mit den in der Literatur für HSZ aus dem Cortischen Organ von Meerschweinchen beschriebenen Ergebnissen lässt den Schluss zu, dass mit dem verwendeten AK gegen das AE1-Protein möglicherweise auch die übrigen Proteine der Anionen-Transporter-Familie (AE2 und AE3) in HSZ des Schmetterlingsfisches markiert wurden. Dies würde die Fluoreszenz der Stereocilien erklären und resultiert aus der Tatsache, dass zum einen ein polyklonaler AK Verwendung fand und aufgrund der starken AS-Sequenzhomologien der Anionen-Transporter-Proteine untereinander Kreuzreaktionen nicht auszuschließen sind (Tanner, 1993).

Die in manchen Präparationen zu beobachtende starke und strukturierte Fluoreszenz des Cytoplasmas konnte bei keinem der beschriebenen Autoren gefunden werden. Sie erscheint fragwürdig, da es sich bei Bande 3 (AE1) um ein in Membranen lokalisiertes Protein handelt. In schwächerer Form war diese Markierung auch in den übrigen HSZ-Präparaten zu erkennen. Die Tatsache, dass Präparate, bei denen die HSZ stark angefärbt waren, Erythrocyten enthielten, die ein für diese Zellen typisches

ringförmiges Fluoreszenzmuster im Bereich der Plasmamembran zeigten, deutet auf eine valide Färbung in solchen Präparationen hin.
Inwieweit es sich hierbei um Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen oder um eventuelle Artefaktfärbungsmuster aufgrund von durch die Fixierung abdissoziierten, angefärbten Proteinanteilen der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne handelt, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Hinweise für die Möglichkeit solcher Prozesse lieferte die Verwendung von Cy2-Sekundärantikörpern, bei der nach einiger Lagerungszeit der Präparate eine unspezifische Färbung des Kernrandbereich auftrat (s. 3.3.1).

d) Myosin
Myosine spielen in Muskel- aber auch Nicht-Muskelzellen der Vertebraten eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren konnten neben dem konventionellen Myosin II, welches hauptsächlich bei kontraktilen Vorgängen eine Rolle spielt, sehr viele weitere Myosin-Isoformen in Nicht-Muskelzellen nachgewiesen werden. Letztere fasst man zur Gruppe der unkonventionellen Myosine zusammen. Diese fungieren vermutlich als Motorproteine für intrazelluläre Bewegungen entlang von Aktinfilamenten (Alberts et al., 1995; Hasson, 1999). Die unterschiedlichen Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Schwanzregion, während alle Myosine sich durch eine evolutionär stark konservierte Kopf-/Motor-Region auszeichnen (Alberts et al., 1995; Gillespie et al., 1996).
Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der Myosin II nachgewiesen wurde, zeigen, dass Myosin ein bedeutender Bestandteil des Cytoskeletts von Seitenlinien-HSZ ist. Mithilfe eines polyklonalen AKs, der spezifisch Myosin aus glattem und quer gestreiftem Muskel erkennt, konnten Strukturen im Bereich der Stereocilien, der Cuticularplatte und deren Randregion sowie im gesamten Zellkörper, dem Kern und den lateralen Zellmembranregionen nachgewiesen werden.
Dieses stark ausgeprägte Anfärbungsmuster steht einem relativ schwachen Markierungsergebnis von Stroh (1992) an HSZ des Schmetterlingsfisches gegenüber. Er detektierte unter Verwendung eines monoklonalen Myosin AKs Myosin lediglich in der Cuticularplatte und dem infracuticulären Cytoplasma. Die Diskrepanz beider Ergebnisse liegt vermutlich in den verwendeten AK, d.h. der von Stroh (1992) verwendete monoklonale AK zeigte möglicherweise nur wenig Spezifität für die in den HSZ lokalisierten Myosinstrukturen, während der in dieser Studie benutzte polyklonale AK, der mehrere Epitope erkennt, diese anfärbte.

In der Literatur berichtete Macartney et al. (1980), die einen polyklonalen AK gegen Myosin aus gattem Muskel verwendeten, von einer Anfärbung der Stereocilien und in schwächerer Intensität der Cuticularplatte an HSZ der Meerschweinchen-Cochlea.
Dieses Färbeergebnis konnte von Drenckhahn et al. (1982) nur für die Markierung der Cuticularplatte bestätigt werden, wobei auch ein schmales Band im Bereich der lateralen Zellmembran bei ÄHZ nicht aber IHZ gefärbt war. Die Stereocilien zeigten eindeutig keine Fluoreszenz, und das Ergebnis Macartneys et al. (1980) wurde als eventuelle Artefaktfärbung angezweifelt. Weitere Untersuchungen an HSZ aus der Säuger-Cochlea und vestibulären HSZ unter Verwendung von AK gegen Nicht-Muskelmyosin zeigten das Vorkommen von Myosin ausschließlich in der Cuticularplatte und in deren Randbereich der ZA-Region (Drenckhahn et al., 1982, 1985; Sans et al., 1989; Gillespie & Hudspeth, 1991; Slepecky & Ulfendahl, 1992). Während Drenckhahn et al. (1985) Myosin in der Papilla basilaris von Hühnern mit einem AK spezifisch gegen Hühnermagen-Myosin in der Cuticularplatte nachweisen konnten, beschreiben sie in einer weiteren Studie ein negatives Färbeergebnis für HSZ der Papilla basilaris von Hühnern in der Cuticularplatte und ZA-Region (Drenckhahn et al., 1991). Ebenso konnte mit AK gegen glattes Muskelmyosin und Nicht-Muskelmyosin in HSZ der Meerschweinchen Cochlea bei zwei Untersuchungen keine Myosin-Markierung erreicht werden (Slepecky & Chamberlain, 1985; Slepecky & Ulfendahl, 1992).
Die z.T. doch stark variierenden Färbeergebnisse sind vermutlich abhängig von der unterschiedlichen Spezifität der verschiedenen AK für das in den HSZ vorkommende Myosin. Trotzdem ergeben sich insgesamt einige Übereinstimmungen mit den in dieser Studie beschriebenen Fluoreszenzen bezüglich des Myosinvorkommens in Cuticularplatte, ZA-Bereich und lateraler Zellmembran.
Was die Fluoreszenz in den Stereocilien und dem Cytoplasma betrifft, so gibt es zwar keinen bzw. keinen eindeutigen Nachweis von Myosin II in cochleären und vestibulären HSZ, jedoch konnten hier unkonventionelle Myosinisoformen nachgewiesen werden.
Myosin Iβ ist in sacculären HSZ des Ochsenfrosches im Bereich der distalen Enden der Stereocilien an den tip-link-Ansatzstellen lokalisiert und fungiert hier mit großer Wahrscheinlichkeit als Adaptationsmotor (Gillespie et al., 1993, 1996; Hasson et al., 1997; Garcia et al., 1998; Steyger et al., 1998). Mit Myosin VI und VIIa sind zwei weitere unkonventionelle Isoformen im Bereich der Stereocilien angesiedelt. Dabei scheint Myosin VI beim Ochsenfrosch in den Stereocilien der Länge nach und konzentriert an den spitz zulaufenden, der Cuticularplatte zugewandten Enden der Stereocilien vorzukommen. Myosin VIIa findet man bei Frosch-HSZ als schmales

Band, das etwa 1 µm über der Basis der Stereocilien liegt. In Säugetier-HSZ sind die Stereocilien der Länge nach angefärbt (Gillespie et al., 1996; Hasson et al., 1997). Beide Myosintypen, die noch in anderen HSZ-Teilen vorkommen (Überblick siehe Hasson et al., 1997), sind für eine intakte Stereocilienbündelentwicklung und -struktur und damit auch für eine intakte Hörfunktion verantwortlich, wie Mutationen in den zugehörigen Genloci bei Mäusen und Menschen (Snell`s waltzer-Mäuse und Usher- und Shaker-Syndrom) gezeigt haben (Avraham et al., 1995; Weil et al., 1995; Self et al., 1998, 1999; Hasson et al., 1997; Hasson, 1999). Inwieweit die in der vorliegenden Studie bei einigen Zellen auftretende Stereocilienfärbung und speziell auch die im distalen Bereich der größten Sterocilien verstärkte Myosinfärbung auf Myosin II oder kreuzreagierende unkonventionelle Myosine zurückzuführen sind, muss in weiteren Studien unter Verwendung spezifischerer AK geklärt werden. Das hier vorkommende Myosin kann jedoch schon jetzt als Hinweis dafür gewertet werden, dass dieses Protein bei der strukturellen Organisation des Haarbündels und eventuell vorhandenen Adaptationsmechanismen, in der Art wie sie in sacculären HSZ des Frosches vorhanden sind, eine Rolle spielen könnte.

d) Spektrin

Das Aktin-bindende Protein Spektrin, welches einen Hauptbestandteil des cortikalen Cytoskeletts von Erythrocyten bildet, konnte mit einem AK gegen Hühnererythrocyten-Spektrin in HSZ von *Pantodon buchholzi* nachgewiesen werden.

Die Markierung umfasste die Cuticularplatte, das infracuticuläre Cytoplasma, eine kernumrahmende Struktur sowie den Bereich der lateralen Zellmembran.

Spektrine findet man in verschiedenen Zellen und Geweben wie z.B. Fibroblasten, Monocyten, Nierenepithelzellen, Darmzellen und Leber. Im Gehirn ist eine Spektrin-Isoform ausgeprägt, welche als Fodrin bezeichnet wird und mit AK gegen Erythrocyten-Spektrin kreuzreagiert (Levine & Willard, 1981; Burridge et al., 1982).

Die in der Literatur in HSZ verschiedener Spezies nachgewiesenen Spektrinstrukturen wurden hauptsächlich mit AK durchgeführt, die gegen Erythrocyten-Spektrin oder Fodrin gerichtet waren. Für HSZ verschiedener Spezies ergab sich dabei ein recht einheitliches Färbungsmuster, bei dem immer die Cuticularplatte, in einigen Studien der ZA-Ring und die Region der lateralen Zellmembran sowie bei Meerschweinchen das infracuticuläre Netzwerk markiert waren (Drenckhahn et al., 1985, 1991; Holley & Ashmore, 1990; Ylikoski et al., 1990, 1992; Slepecky & Ulfendahl, 1992; Nishida et al., 1993; Raphael et al., 1994; Pack et al., 1995; Kuhn & Vater, 1995; Mahendrasingam et al., 1998). Eine Fluoreszenz der Sterocilien konnten lediglich Mahendrasingam et al. (1998) an HSZ des Meerschweinchens beobachten. Ebenso zeigte das Cytoplasma

der Sinneszellen bis auf die IHZ der Hufeisennasenfledermaus (Kuhn & Vater, 1995) in der Regel keine Anfärbung.
Das Markierungsmuster der HSZ von *Pantodon buchholzi* entspricht in weiten Teilen dem an cochleären ÄHZ und IHZ beschriebenen, wobei das Spektrin-Vorkommen als kernumrahmende Struktur für HSZ neu ist. Allerdings zeigen viele andere Zelltypen bei Anfärbung mit Fodrin-AK ein solches um den Kern konzentriertes Fluoreszenzmuster (Burridge et al., 1982).

e) Tubulin

Tubulinstrukturen wurden mit einem monoclonalen Antikörper gegen die α-Tubulin Untereinheit nachgewiesen. Dabei konnten einzelne mikrotubuläre Filamente, die vorwiegend in Zellmembrannähe die Zellen von der Cuticularplatte bis zur basalen Region durchlaufen, gezeigt werden. Im Bereich der Cuticularplatte als solcher und in den Stereocilien waren keine Tubulinstrukturen vorhanden. Lediglich die Randbereiche der Cuticularplatte wiesen z.T. punktuell verstärkte Fluoreszenz auf. Das Kinocilium war stets angefärbt.
In cochleären und vestibulären HSZ verschiedener Säugetier-Spezies, der Papilla basilaris, des Frosch-Sacculus und der Lagena von Fischen konnte ein ähnliches Muster von Mikrotubuli-Strukturen im Zellkörper nachgewiesen werden (Tilney et al., 1980; Zenner, 1981; Zenner et al., 1981; Flock et al., 1981; Favre & Sans, 1983; Slepecky & Chamberlain, 1985; Steyger et al., 1989; Slepecky & Ulfendahl, 1992; Troutt et al., 1994; Jaeger et al., 1994; Raphael et al., 1994; Pack & Slepecky, 1995; Ogata & Slepecky, 1995; Kuhn & Vater, 1995; Hallworth et al., 2000).
Während in einigen fluoreszenzmikroskopischen Studien der Cuticularplattenbereich als frei von Tubulin beschrieben wurde (Slepecky & Chamberlain, 1985; Slepecky & Ulfendahl, 1992; Troutt et al., 1994; Ogata & Slepecky, 1995), wiesen andere Autoren vorwiegend in TEM-Untersuchungen Mikrotubuli im Bereich der Cuticularplatte nach (Flock et al., 1981; Favre & Sans, 1983; Zenner, 1981; Zenner et al., 1981). Jaeger et al. (1994) detektierten in HSZ des Frosch-Sacculus schwache Tubulin-Fluoreszenz auch innerhalb der Cuticularplatte und zeigten an deren Basis mit Mikrotubuli kolokalisiert MAP1-A und B, was darauf hinweist, dass das Tubulincytoskelett hier über MAPs mit dem Aktinnetzwerk des apikalen Zellteils verknüpft wird, wobei dabei Mikrotubuli-Säulen zumindest in die basalen Bereiche der Cuticularplatte vordringen.
Die häufig beschriebene Tubulin-Fluoreszenz im peripheren Bereich der Cuticularplatte konnte für innere HSZ als ringförmige Strukturen nachgewiesen werden (Steyger et al., 1989; Hallworth et al., 2000). Darunter zeigen IHZ in der Regel ein besonders stark

ausgeprägtes Mikrotubulinetzwerk in der Halsregion, das vom unteren Rand der Cuticularplatte ausgeht (Slepecky & Ulfendahl, 1992).
ÄHZ des Meerschweinchens weisen dagegen Ringstrukturen nur bedingt auf, wobei auch hier vom unteren Cuticularplattenrand, das infracuticuläre Netzwerk umrahmend, Tubulinfilamente ins Cytoplasma laufen (Steyger et al., 1989).
In HSZ von *Pantodon buchholzi* geht das Mikrotubulinetzwerk vom Cuticularplattenrand aus, wobei einige Zellen punktförmige, verstärkte Fluoreszenzstrukturen auf beiden Seiten zeigen (Abb. 27 D). Hier könnte es sich ebenfalls um eine „angeschnittene" Ringstruktur handeln, die auch in der Übereinanderprojektion der konfokalen Schnitte (Abb. 27 F) andeutungsweise erkennbar wird. Die Frage inwieweit Tubulinfilamente in der Cuticularplatte über Mikrotubuli verknüpfende Strukturen (MAPs) organisiert sind, bietet interessante Ansätze für weitere Immunfluoreszenzstudien.
Im Zellkörper scheinen Mikrotubulistrukturen beim Schmetterlingsfisch ausschließlich im lateralen Bereich vorzukommen, um die Zelle letztlich netzwerkförmig zu ummanteln. Während einige Autoren Mikrotubuli bei cochleären ÄHZ vorwiegend als lateral verteilt und im Bereich der lateralen Cisternen liegend nachgewiesen haben (Lubitz, 1981; Nadol, 1983; Lim, 1986), beschrieben andere eine eindeutig homogene Verteilung von Mikrotubuli innerhalb der Zelle (Slepecky & Chamberlain, 1985; Steyger et al., 1989; Slepecky & Ulfendahl, 1992). In konfokalen Schnitten, die in der medialen Ebene durch das Cytoplasma geführt wurden, findet man bei den Seitenlinien-HSZ hingegen keine Tubulinfilamente, sondern lediglich eine diffuse Anfärbung, die vermutlich auf depolymerisiertes α-Tubulin zurückzuführen ist. Die Existenz eines solchen Pools depolymerisierten Tubulins schlug Zenner (1981) für ÄHZ des Meerschweinchens vor.
Das Kinocilium als echtes Cilium weist eindeutig Fluoreszenz auf, die auch Troutt et al. (1994) bei HSZ aus der Papilla basilaris von Hühnern nachwiesen.

4.6 Das Cytoskelett der Seitenlinien-HSZ

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immuncytochemischen Untersuchungen konnten Aktinstrukturen verstärkt im apikalen Zellbereich, aber auch nahe der Zellmembran zeigen. Welche Aktin-bindenden Proteine in den einzelnen Zellregionen bei der Verknüpfung von Aktinfilamenten eine Rolle spielen und welche funktionellen Aspekte sich daraus ergeben, soll nun im Zusammenhang dargestellt werden.
Die Stereocilien der HSZ von *Pantodon buchholzi* bestehen vornehmlich aus Aktin und inserieren mit ihren Wurzelfilamenten tief in der Cuticularplatte. Wie andere Studien

zeigen, sind die Filamente hier in erster Linie über das Protein Fimbrin verknüpft (Slepecky & Chamberlain, 1985; Drenckhahn et al., 1991). Dieses Protein verbindet Aktinfilamente zu eng gepackten Bündeln (Alberts et al., 1995). Was die von mir nachgewiesenen Proteine betrifft, so markierten über Aktin hinaus lediglich Bande 3 und Myosin die Stereocilien einiger Zellen.

Im Bereich der Cuticularplatte fällt zunächst einmal die Kolokalisation der Proteine Aktin und α-Aktinin im Bereich der Zonula adhaerens auf. Die hier ringförmigen, parallel angeordneten Aktin-Filamente liegen mit wechselnden Polaritäten vor (Hirokawa & Tilney, 1982) und werden vermutlich von den stabförmigen α-Aktinin-Dimeren zu lockeren Bündeln verknüpft. Diese erlauben die Einlagerung von Myosin II und so die Bildung eines kontraktilen Ringes, wie er in einigen epithelialen Zellen vorkommt (Alberts et al. 1995). In zweierlei Hinsicht könnte α-Aktinin bei HSZ des Schmetterlingsfisches im Bereich der Zonula adhaerens funktionell wirken. Zum einen als dem apikalen Zellbereich Stabilität verleihender Faktor und zum anderen, über das in der ZA ebenfalls in dieser Studie nachgewiesene Myosin, als kontraktiler Ring, der die Eigenschaften der Cuticularplatte bzw. der Stereocilien aktiv verändert (s.u.).

In der Cuticularplatte selbst scheint Spektrin der maßgebliche Bestandteil zur Vernetzung von Aktinfilamenten zu sein. Das in einigen Zellen geringe Vorkommen von Aktin in der Cuticularplatte liefert dabei offenbar ein widersprüchliches Ergebnis, wobei Spektrin beispielsweise in Erythrocyten kleinere Aktin-Protofilamente zu einem Gerüstwerk verknüpft (Weeds, 1982). In gleicher Weise bildet das vorkommende Spektrin vermutlich ein festes strukturelles Netzwerk, in das zumindest die aus Aktin bestehenden Wurzelfilamente der Stereocilien stabil verankert werden.

Das gleichzeitig in der Cuticularplatte nachgewiesene Myosin könnte, wie der schon beschriebene sie umgebende Ring, bei Kontraktilitätsvorgängen innerhalb der als Insertionspunkt für die Stereocilien fungierenden Cuticularplatte, eine aktive Rolle spielen. Bande 3 wiederum ist ebenfalls Bestandteil dieser Zellregion und fungiert hier eventuell als Anbindungsprotein, welches das Spektrin-Aktin-Gerüst des apikalen Zellbereichs mit der Plasmamembran verbindet.

Unterhalb der Cuticularplatte verlaufen Spektrinstrukturen und verknüpfen Aktinfilamente im infracuticulären Plasma, die Stroh (1992) an Seitenlinien-HSZ zeigen konnte. Eine Kolokalisation beider Proteine in dieser Zellregion konnte auch für ÄHZ der Meerschweinchen-Cochlea gezeigt werden (Holley & Ashmore, 1990). In den Präparationen der vorliegenden Studie wurden keine Aktinfilamente im infracuticulären Bereich gefunden.

In der lateralen Zellregion spielen drei Aktin-assoziierte Proteine (Spektrin, Myosin und Bande 3) sowie Tubulin eine Rolle beim Aufbau des Cytoskeletts der HSZ von *Pantodon buchholzi*. Die hier nachgewiesenen kurzen Aktinfilamente werden über Spektrin netzwerkartig verknüpft, wobei auch das ebenfalls detektierte Myosin vermutlich an diese Filamente gebunden ist. Bande 3 könnte als transmembranes Protein das Aktincytoskelett über Spektrin mit der Plasmamembran verankern und so als Rahmen für eventuelle Motilitätsvorgänge im lateralen Zellmembranbereich dienen. Tubulin bildet zusätzlich zu dem Aktinfilamentsystem ein die Zelle ummantelndes Netzwerk aus Mikrotubuli, das die gesamte Zelle von den Randbereichen der Cuticularplatte ausgehend umrahmt. Funktionell verleiht es der Zelle Stabilität und wird als Transportsystem insbesondere synaptischer Vesikel in HSZ sowie als Bestandteil bei Motilitätsvorgängen diskutiert (Lubitz, 1981; Favre & Sans, 1983; Steyger et al., 1989; Slepecky & Ulfendahl, 1992). So konnte in cochleären und vestibulären Sinneszellen tyrosiniertes Tubulin nachgewiesen werden, das in Zellregionen, welche Formveränderungen durchlaufen, zu finden ist und dynamischer als das stabilere detyrosinierte Tubulin ist. In den cochleären Zellen findet man die tyrosinierte Form in ÄHZ, nicht aber in den Stützzellen (Bré et al., 1987; Slepecky & Chamberlain, 1992; Slepecky et al., 1995; Ogata & Slepecky, 1995).

4.7 Kontraktilitätsbetrachtungen und Ähnlichkeiten zum Erythrocyten-Cytoskelett

Mit Aktin und Myosin weisen die HSZ aus der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* Proteine auf, die in quer gestreiftem und glattem Muskel für Kontraktionsvorgänge verantwortlich sind. Neben dieser klassischen Muskelmotilität findet man Kontraktionsvorgänge (und beteiligte Proteine) auch in Nicht-Muskelzellen etwa bei der Zellteilung oder bei Migrationsvorgängen (Alberts et al., 1995). Ein Beispiel für nachgewiesene Zellkontraktilität bilden auch die oft mit den Haarsinneszellen verglichenen Darmepithelzellen (Harris, 1983). Diese bilden eine der Cuticularplatte vergleichbare Zellstruktur, das „terminal web“ aus, in welches Mikrovilli bestehend aus Aktin inserieren. Im terminal web finden sich ebenfalls Cytoskelettproteine wie Aktin, Myosin, α-Aktinin, Spektrin und Tropomyosin in einer Anordnung ähnlich der in der Cuticularplatte (Mooseker & Tilney, 1975; Bretscher & Weber, 1978; Glenney et al., 1982 a, b). Die äußeren apikalen Zellbereiche (ZA-Region) werden hierbei ebenfalls von einem Aktin-Filamentring bestimmt, der in vitro unter ATP-Gabe und unter Beteiligung von Ca^{2+}-Ionen kontrahiert, sodass die Mikrovilli nach außen gedrückt

werden (Hirokawa & Tilney, 1982; Harris, 1983). Für diese Kontraktilität wurde die Interaktion von Aktin-Myosin-Strukturen in genanntem Ring und Myosin im Bereich der Wurzelfilamente der Mikrovilli innerhalb des terminal webs verantwortlich gemacht (Harris, 1983). Zwar gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Darmepithelzellen und HSZ insbesondere bezüglich des strukturellen Aufbaus und der Funktion der Mikrovilli und Stereocilien (Tilney et al., 1980), jedoch konnten auch bei den sensorischen HSZ Hinweise dafür gefunden werden, dass durch Akto-Myosin gesteuerte Prozesse die Auslenkbarkeit des Haarbündels im Dienste der Adaptation reguliert wird. So zeigten Orman & Flock (1983) an HSZ der Crista ampullaris des Frosches eine deutliche Reduktion der Stereocilienauslenkbarkeit in einer Lösung, die Kontraktionen in Muskelzellen auslöst (Ca^{2+}; ATP) und machten hierfür ebenfalls Aktin-Myosin-Strukturen innerhalb der Cuticularplatte der Zellen verantwortlich (Flock & Orman, 1984).

Die Verteilung der beiden genannten Proteine in HSZ der Seitenlinie von *Pantodon buchholzi* ließe prinzipiell eine derartige Wechselwirkung durchaus zu, da sowohl im Bereich des apikalen Aktin-Ringes als auch innerhalb der Cuticularplatte, d.h. im Bereich der Stereocilienwurzeln Myosin nachgewiesen werden konnte.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch das Vorkommen von Myosin innerhalb der Stereocilien, wie sie im Rahmen dieser Studie für einige Zellen gezeigt wurde.

Über die Untersuchung unkonventioneller Myosinisoformen konnten mit Myosin Iß und VI zwei Proteine nachgewiesen werden, die unterschiedlichen Funktionen zugeordnet werden. Die Myosinisoform Iß, welche im distalen Bereich der Stereocilien von HSZ des Ochsenfrosches vorkommt, wird als Adaptationsmotorprotein diskutiert, das über einen aktiven Bewegungsprozess die Spannung der die Transduktionskanäle steuernden tip-link-Verbindungen regulieren soll (Howard & Hudspeth, 1987; Assad et al., 1989, 1991; Hudspeth, 1989; Lenzi & Roberts, 1994; Gillespie, 1995; Gillespie et al., 1993, 1996; Hudspeth & Gillespie, 1994). Myosin VIIa hingegen kommt in Säuger-HSZ in den Stereocilien der Länge nach vor und wird für die ordnungsgemäße Anordnung der Stereocilien zu einem funktionsfähigen Bündel verantwortlich gemacht (Gibson et al., 1995; Weil et al., 1995; Hasson et al., 1997; Self et al., 1998; Hasson, 1999).

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Befunde, die in einzelnen Zellen das Vorkommen von tip links und Myosin in den Stereocilien wiedergeben, lassen weitere Untersuchungen zur Aufklärung von Transduktions- und möglichen Adaptations-mechanismen lohnenswert erscheinen.

Neben den genannten Motilitätsbewegungen konnten für cochleäre und vestibuläre Sinneszellen Kontraktionsvorgänge des gesamten Zellkörpers und der Cuticularplatte

nachgewiesen werden. Diese auch in vivo nachweisbaren Bewegungsabläufe dienen in der Cochlea dabei vermutlich als cochleärer Verstärkermechanismus zur feinen Frequenzabbildung und als adaptationsbedingende Faktoren (Brownell et al., 1985; Zenner et al., 1985 b; Zenner, 1986 a, b; Zenner & Drenckhahn, 1986; Zenner et al., 1988; Zenner et al., 1990; Zenner & Zimmermann, 1991; Flock et al., 1986; Valat et al., 1991; Dulon et al.; 1991).

Dabei ließen sich für die ÄHZ von Säugetieren zwei unterschiedliche, jeweils bidirektional, longitudinal verlaufende Bewegungsvorgänge des Zellkörpers und der Cuticularplatte darstellen, eine langsame und eine schnelle Motilität (im Überblick Zenner, 1994). Die langsame Motilität kann bei ÄHZ und vestibulären HSZ akustisch (Canlon et al., 1988) und insbesondere chemisch induziert werden, durch die Depolarisierung der Zellen mit K^+-Ionen oder durch Gabe von ATP, Ca^{2+}. Sie ist abhängig vom Aktin-Myosincytoskelett, da durch Zugabe von Stoffen, die das Cytoskelett bzw. dessen Interaktion beeinflussen, diese Haarsinneszellbewegung gehemmt wird (Zenner et al., 1985 b; Zenner & Drenckhahn, 1986; Zenner, 1988; Zenner et al., 1990; Flock et al., 1986; Valat et al., 1991). Es gibt Hinweise, dass die langsame Motilität durch second messenger wie Calmodulin und IP_3, welches intrazelluläres Calcium freisetzt und damit ähnlich wie die Kontraktilität bei glatten Muskelzellen, reguliert und vermittelt wird (Zenner, 1986 a, b; Zenner & Schacht, 1986; Schacht & Zenner, 1987; Slepecky & Ulfendahl, 1993).

An IHZ konnte eine Motilität bislang nicht gesehen werden (Dulon et al., 1991). Dies steht auch im Einklang mit der Tatsache, dass diesen HSZ Aktin und Myosin im Bereich der lateralen Zellmembran zu fehlen scheint (Drenckhahn et al., 1982). Interessant ist in diesem Zusammenhang der in der vorliegenden Studie eindeutig geführte Nachweis beider Proteine in der lateralen Zellregion von Seitenlinien-HSZ, welche von Stroh (1992) nicht detektiert werden konnten. Dies lässt Bewegungsvorgänge des Zellkörpers und der Cuticularplatte in der Art der langsamen Motilität durchaus möglich erscheinen, was in weiteren elektrophysiologischen Studien geklärt werden müsste. Bei vestibulären HSZ wird vermutet, dass die Motilität einen Einfluss auf die mechanosensitiven Stereocilien hat und so deren Auslenkbarkeit durch eine unterschiedliche Steifheit gegenüber der Cupula als reizleitender Struktur reguliert werden kann (Zenner & Zimmermann, 1991, Valat et al., 1991). Ähnliche Funktion könnte ein Bewegungsvorgang auch bei Seitenlinien-HSZ haben.

Die schnelle Motilität cochleärer ÄHZ kann in vitro durch elektrische Stimulation ausgelöst werden (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986; Ashmore, 1987). Sie wird als eigentlicher cochleärer Verstärkermechanismus diskutiert und ist wohl eine einzigartige funktionelle Entwicklung der ÄHZ der Säugercochlea. Lange war die

strukturelle Basis dieser Elektromotilität unbekannt, wobei eine Beteiligung von transmembranen Proteinen wie etwa Bande 3 und eines Fructose-Transporter-Proteins diskutiert wurde (Knipper et al. 1995; Zine & Schweitzer, 1997; Kalinec et al., 1997; Géléoc et al., 1999). Die Motilitätsbewegungen sollen dabei auf Konformationsänderungen einer großen Anzahl von Motorproteinen in der Zellmembranregion beruhen und nachweislich nicht auf Interaktionen des Aktin-Myosin-Cytoskeletts (Holley & Ashmore, 1988; Dallos et al., 1991; Zenner, 1994; Zheng et al., 2000). In einer eindrucksvollen Studie konnten Zheng et al. (2000) Prestin, ein mit dem Sulphat/Anionen-Transporter Pendrin verwandtes Eiweiß, als ein Motorprotein in ÄHZ identifizieren, das in der Plasmamembran von ÄHZ in großer Menge, nicht aber in inneren Haarsinneszellen (IHZ) exprimiert wird.

Cytoskelettstrukturen haben hierbei vermutlich lediglich eine Rahmenfunktion, indem sie Formänderungen erleichtern bzw. die zylindrische Form der ÄHZ, welche eine Voraussetzung für die Kontraktionsbewegungen bei der Elektromotilität ist, wiederherstellen und aufrechterhalten (Holley & Ashmore, 1988 a, b; 1990; Holley et al., 1992; Adachi & Iwasa, 1999).

In diesem Zusammenhang wurden Vergleiche der cortikalen Proteinstrukturen von Erythrocyten mit denen bei ÄHZ vorkommenden angestellt und Ähnlichkeiten gefunden (Knipper et al., 1995). Dabei ergaben sich Hinweise darauf, dass die Formveränderungen bei Kontraktionsbewegungen möglicherweise, ähnlich wie es bei den extrem formvariablen Erythrocyten diskutiert wird, auf der Interaktion der gleichen Cytoskelettbestandteile bei HSZ beruhen. Erythrocyten besitzen ein cortikales Cytoskelett (Abb. 28 rechts), bei denen kurze Aktinfilamente mit Spektrin verbunden sind, die ihrerseits über Ankyrin oder Protein 4.1 mit dem Transmembranprotein Bande 3 interagieren und somit mit der Plasmamembran verankert sind (Cohen, 1983; Luna & Hitt, 1992; Alberts et al., 1995). Das ebenfalls vorhandene Myosin ist mit Protein 4.1 oder Aktin verbunden (Fowler et al., 1985; Pasternack & Racusen, 1989). Interaktionen dieser Cytoskelettproteine wurden als Ursache für die Formänderungen bei Erythrocyten bzw. für die Formvariabilität im Zuge der Längenänderungen bei der langsamen Motilität von ÄHZ vermutet und diskutiert (Abb. 28 links) (Sheetz, 1983; Pasternack & Racusen, 1989; Whatmore et al., 1992; Tanner, 1993).

In der vorliegenden Studie konnten vier Proteinbestandteile, die auch im Erythrocytencytoskelett vorkommen, nachgewiesen werden. Dabei ergeben sich ebenfalls auffällige Ähnlichkeiten in Bezug auf die Lokalisation der Proteine in den Seitenlinien-HSZ besonders im basolateralen Zellbereich. Hier ist das Anfärbungsmuster von Aktin, Bande 3, Spektrin und Myosin zu nennen. Diese Bestandtteile kommen alle im cortikalen Bereich vor, wobei die punktförmige Aktin-

Fluoreszenz auf kurze Filamentstücke wie in den Erythrocyten hinweist. Die Aktinstrukturen könnten mit Spektrin und Myosin, wie oben beschrieben, über das auch lateral lokalisierte Transmembranprotein Bande 3 mit der Plasmamembran verknüpft sein.

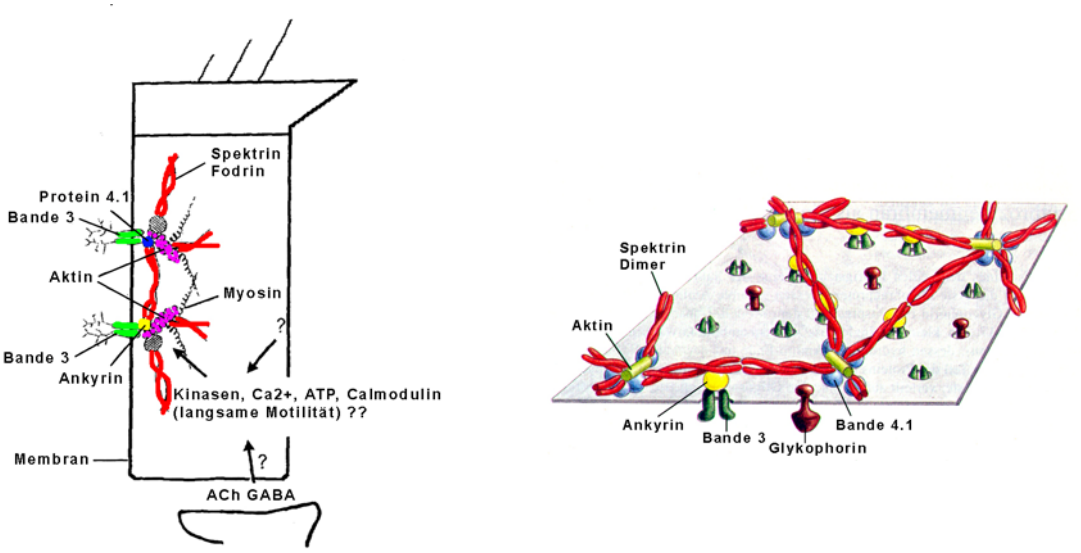


Abb. 28: Modell zum Aufbau des cortikalen Cytoskeletts bei ÄHZ (links) und Erythrocyten (rechts) nach Alberts et al. (1995) und Knipper et al. (1995). Erläuterungen siehe Text.

Interessant ist dabei, dass das für ÄHZ beschriebene stabile cortikale Netzwerk (cortical lattice) sich in bezug auf die Verteilung von Aktin und Spektrin von dem der Erythrocyten zu unterscheiden scheint. Während Aktin in Erythrocyten nur kurze Filamentstücke ausbildet, scheinen die elektronenmikroskopisch in ÄHZ sichtbaren zellumfangenden Filamente (circumferential filaments) aus Aktin zu bestehen. Die diese Filamente verknüpfenden kleineren Verbindungsstücke bestehen dagegen aus Spektrin (Holley & Ashmore 1990; Holley et al., 1992). Die HSZ des Schmetterlingsfisches weisen dagegen in der Aktin-Fluoreszenz wie erwähnt ein punktförmiges Muster auf (Hinweis auf kurze Aktinfilamente), während Spektrin lateral längere netzartige Markierungsmuster ausprägt. Dies ähnelt damit eher dem Erythrocyten-Typus.

Die Befunde zeigen, dass aufgrund der durch die Immunfluoreszenz nachgewiesenen Proteine und deren Lokalisation eine langsame Motilität bei Seitenlinien-HSZ möglich erscheint. Dabei ähnelt die Verteilung der Aktin- und Myosinstrukturen insbesondere im lateralen Zellbereich wie auch die oft längliche Form der HSZ eher den cochleären ÄHZ als den IHZ.

Die stammesgeschichtlich sehr ursprünglichen Seitenlinien-HSZ weisen eine Cytosklettorganisation auf, die die gleichen Proteine enthält, welche in den phylogenetisch später entwickelten vestibulären und cochleären HSZ im Zusammenhang mit Adaptations- und Kontraktionsvorgängen eine Rolle spielen. In weiteren Untersuchungen muss nun geklärt werden, ob diese Funktionen auch physiologisch verwirklicht und nachweisbar sind.

5 Zusammenfassung

1. HSZ wurden aus den supraorbitalen und supratemporalen Seitenlinienorganen des Oberflächenfisches *Pantodon buchholzi* isoliert.

2. Die Vitalität der isolierten Zellen wurde mit einer FDA/PI-Fluoreszenzfärbung überprüft. Dabei konnten bis zu 700 HSZ pro Versuch und Tier als vital eingestuft werden, was einer Ausbeute von 3,5 % entspricht.

3. Die Zelldimensionen der Sinneszellen aus den cephalen Seitenlinienabschnitten von *Pantodon buchholzi* wurden für HSZ aus mehreren Präparationen sowie aus einem Einzelpräparat bestimmt. Sie betrugen 19,3 ± 3 µm bzw. 20,8 ± 3,4 µm für die durchschnittlichen Zelllängen und 7,3 ± 1,2 µm bzw. 7,6 ± 1 µm für die durchschnittlichen Zellbreiten.

4. Die Morphologie der HSZ wurde anhand von REM-Aufnahmen an isolierten HSZ näher charakterisiert. Der apikale Zellbereich weist ein apolar inserierendes Kinocilium mit einer Länge von bis zu 19 µm auf. An dieses schließen sich durchschnittlich 7 Längsreihen Stereocilien an. Die Länge der Stereocilien nimmt von Reihe zu Reihe schrittweise in Richtung des Kinociliums zu und beträgt durchschnittlich 0,78 µm für die kleinsten und 3,6 µm für die längsten Cilien. Dabei erfolgt die Stufung mit oft gleichen Unterschiedsbeträgen. Bezüglich des Kinociliums lässt sich eine V-förmige, geometrische Anordnung der Stereocilien erkennen.
Die Stereocilien verjüngen sich vor Eintritt in die Cuticularplatte. Die Gesamtzahl der Stereocilien pro HSZ betrug 30–50.

5. Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden sechs verschiedene Cytoskelettproteine in den HSZ nachgewiesen und lokalisiert:

- **Aktin** ist im Haarbündel der Sinneszelle sowie ringförmig im Bereich der ZA stark konzentriert. Schwache Fluoreszenz konnte in der Cuticularplatte nachgewiesen werden. Im Lateralbereich des Zellkörpers war ein punktförmiges Markierungsmuster zu erkennen, was auf kurze Aktinfilamente in dieser Region hinweist.
- **α-Aktinin** ist ausschließlich im Bereich um die Cuticularplatte (ZA-Region) als Ringstruktur detektierbar. Hier verknüpft es als Aktin-bindendes Protein das an gleicher Stelle vorhandene Aktin.

- **Bande 3 (AE1)**-Fluoreszenz konnte im Bereich der Cuticularplatte und als Ring um selbige nachgewiesen werden. Auch lateral im Bereich der Zellmembran und im gesamten Cytoplasma der HSZ waren Strukturen markiert. In einigen Zellen zeigten Stereocilien und das Kinocilium schwache Fluoreszenz. Bande 3 wird als Verknüpfungsprotein diskutiert, das das Aktin-Spektrin-Cytoskelett mit der Plasmamembran verbindet.
- **Myosin**-AK färbten die Cuticularplatte und deren Randbereiche (ZA-Region) sowie das Cytoplasma der HSZ. Auch der laterale Zellmembranbereich wies Fluoreszenz auf. Bei einigen Zellen konnte eine Markierung der Stereocilien, die im Spitzenbereich der größten Cilien verstärkt war, gesehen werden. Besonders in den Normalfluoreszenzaufnahmen wies der Kernbereich deutliche Färbung auf.
- Die Anfärbung des Aktin-bindenden Proteins **Spektrin** umfasste die Cuticularplatte, den infracuticulären Raum und den Lateralbereich der Zelle. Zusätzlich war der Zellkern von Spektrinstrukturen umgeben.
- **α-Tubulin** konnte im Kinocilium und im Zellkörper als Mikrotubuli nachgewiesen werden. Hierbei fanden sich, netzwerkartig verlaufend, Mikrotubuli, die vom Cuticularplattenrand in die basalen Region der Zelle zogen. Dabei scheinen die Tubulinfilamente auf den zellmembrannahen Bereich beschränkt zu sein und die Zelle mantelförmig zu umgeben, da im Cytoplasma nur diffuse Tubulinfluoreszenz detektierbar war. In der Cuticularplatte und den Stereocilien war α-Tubulin nicht nachweisbar.

6. Die Eignung der AK zur Anfärbung der genannten Proteine wurde mithilfe von Western Blots am Fischgewebe überprüft.

6 Literaturverzeichnis

Adachi, M. & Iwasa, K.H. (1999)

Electrically driven motor in the outer hair cell: effect of a mechanical constraint

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 96: 7244-7249

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1986)

Molekularbiologie der Zelle

1. Auflage, VCH Weinheim

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1995)

Molekularbiologie der Zelle

2. Auflage, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

Allis, E.P. (1889)

The anatomy and development of the lateral line system in *Amia calva*

J.Morphol. 2 (3): 463-542

Alper, S.L. (1991)

The band 3-related anion exchanger (AE) gene family

Annu.Rev.Physiol. 53: 549-564

Alper, S.L.; Kopito, R.R.; Libresco, S.M.; Lodish, H.F. (1988)

Cloning and characterization of murine band 3-related cDNA from kidney and from a lymphoid cell line

J.Biol.Cem. 263 No. 32: 17092-17099

Ashmore, J.F. (1983)

Frequency tuning in a frog vestibular organ

Nature 304: 536-538

Ashmore, J.F. (1987)

A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier

J.Physiol. 388: 323-347

Assad, J.A.; Hacohen, N.; Corey, D.P. (1989)

Voltage dependence of adaptation and active bundle movement in bullfrog saccular hair cells

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86: 2918-2922

Assad, J.A.; Shepherd, G.M.G.; Corey, D.P. (1991)

Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells

Neuron 7: 985-994

Atkins, P.W. (1990)

Physikalische Chemie

3. korr. Nachdruck der 1. Auflage, VCH Weinheim

Avraham, K.B.; Hasson, T.; Steel, D.M.; Kingsley, D.M.; Russell, L.B.; Mooseker, M.S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A. (1995)

The mouse Snell`s waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structure integrity of inner ear hair cells

Nat.Genet. 11: 369-375

Bennett, V. (1981)

Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin and band 3

Meth.Enzymol. 96: 313-325

Bennett, V. & Stenbuck, P.J. (1980)

Association between Ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane

J.Biol.Chem. 255 No. 13: 6424-6432

Bennett, V.; Davis, J.; Fowler, W.E. (1982)

Brain spectrin, a membrane associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin

Nature 299: 126-131

Bleckmann, H. (1980)

Reaction time and stimulus frequency in prey localization in the surface feeding fish *Aplocheilus lineatus*

J.Comp.Physiol. A 140: 163-172

Bleckmann, H.; Waldner, I.; Schwartz, E. (1981)

Frequency discrimination of the surface feeding fish *Aplocheilus lineatus* – a prerequisite for prey localization

J.Comp.Physiol. A 143: 485-490

Bleckmann, H.; Tittel, G.; Blübaum-Gronau, E. (1989)

The lateral line system of surface-feeding fish: anatomy, physiology, and behavior

In: Coombs, S.; Görner, P.; Münz, H. (eds.)

The mechanosensory lateral line. Neurobiology and evolution

Springer, New York, Berlin, Heidelberg: 501-529

Blübaum, E. (1984)

Untersuchungen der Lokalisationsleistung und Regenerationsfähigkeit des Oberflächenfisches *Pantodon buchholzi* nach sukzessiver Ausschaltung von Neuromasten des Seitenliniensystems

Diplomarbeit, Gießen

Blübaum-Gronau, E. (1989)

Eine HRP-Studie zur topologen Repräsentation morphologisch differenzierter Seitenlinienabschnitte des Oberflächenfisches *Pantodon buchholzi*
Dissertation, Gießen

Bré, M.H.; Kreis, T.E.; Karsenti, E. (1987)

Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules
J.Cell Biol. 105: 1283-1296

Bretscher, A. & Weber, K. (1978)

Localization of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy
J.Cell Biol. 79: 839-845

Brownell, W.E.; Bader, C.R.; Bertrand, D.; Ribaupierre, Y. (1985)

Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells
Science 227: 194-196

Burridge, K.; Kelly, T.; Mangeat, P. (1982)

Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occuring in many cell types
J. Cell Biol. 95: 478-486

Canlon, B.; Brundin, L.; Flock, A. (1988)

Acoustic stimulation causes tonotopic alterations in the length of isolated outer hair cells from the guinea pig hearing organ
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85: 7033-7035

Centonze, V. & Pawley, J. (1995)

Tutorial on practical confocal microscopy and use of the confocal test specimen
In: Pawley, J. (ed.)
Handbook of biological confocal microscopy
Sec. Edition, Plenum Press, New York, London: 549-568

Cohen, C.M. (1983)

The molecular organization of the red cell membrane skeleton
Semin.Haematol. 20 (3): 141-158

Corwin, J.T. (1981)

Postembryonic production and aging of inner ear hair cells in sharks
J.Comp.Neurol. 201: 541-553

Dallos, P.; Evans, B.N.; Hallworth, R. (1991)

Nature of the motor element in electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells
Nature 350: 155-157

DeRosier, D.J. & Tilney, L.G. (1989)

The structure of the cuticular plate, an in vivo actin gel

J.Cell Biol. 109: 2853-2867

Dijkgraaf, S. (1934)

Untersuchungen über die Funktion der Seitenlinienorgane an Fischen

Z.vergl.Physiol. 20: 162-214

Dijkgraaf, S. (1962)

The functioning and significance of the lateral-line organs

Biol.Review 38: 51-105

Drenckhahn, D.; Kellner, J.; Mannherz, H.G.; Gröschel-Stewart, U.; Kendrick-Jones, J.; Scholey, J. (1982)

Absence of myosin-like immunoreactivity in stereocilia of cochlear hair cells

Nature 300: 531-532

Drenckhahn, D.; Schäfer, T.; Prinz, M. (1985)

Actin, myosin and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical studies

In: Drescher, D.G. (ed.)

Auditory biochemistry

Springfield: 317-335

Drenckhahn, D.; Engel, K.; Höfer, D.; Merte, C.; Tilney, L.; Tilney, M. (1991)

Three different actin filament assemblies occur in every hair cell: each contains a specific actin crosslinking protein

J.Cell Biol. 112: 641-651

Dulon, D.; Zajic, G.; Schacht, J. (1991)

Differential motile response of isolated inner and outer hair cells to stimulation by potassium and calcium ions

Hear.Res. 52: 225-232

Favre, D. & Sans, A. (1983)

Organization and density of microtubules in the vestibular sensory cells in cat

Acta Otolaryngol. 96: 15-20

Flock, A. (1965)

The ultrastructure of the lateral line canal organ

Acta Otolaryngol. Suppl. 199: 1-90

Flock, A. (1967)

Ultrastructure and function in the lateral line organs
In: Cahn, P. (ed.)
Lateral line detectors
Indiana University Press: 163-197

Flock, A. (1971)

Sensory transduction in hair cells
In: Loewenstein, W.R. (ed.)
Handbook of sensory physiology Vol. I
Principles of receptor physiology
Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 396-441

Flock, A. (1980)

Contractile proteins in hair cells
Hear.Res. 2: 411-412

Flock, A. (1985)

Contractile and structural proteins in the auditory organ
In: Drescher, D.G. (ed.)
Auditory biochemistry
Springfield 17: 310-315

Flock, A. & Cheung, H.C. (1977)

Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells
J.Cell Biol. 75: 339-343

Flock, A.; Cheung, H.C.; Flock, B.; Utter, G. (1981)

Three sets of actin filaments in the inner ear. Identification and functional orientation determined by gel electrophoresis, immunofluorescence and electron microscopy
J.Neurocytol. 10: 133-147

Flock, A.; Bretscher, A.; Weber, K. (1982)

Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells
Hear.Res. 6: 75-89

Flock, A. & Orman, S. (1984)

Sensory hairs as mechanical filters in crista ampullaris: passive through structure and active through contraction
Acta Otolaryngol. Suppl. 406: 59-60

Flock, A.; Flock, B.; Ulfendahl, M. (1986)

Mechanisms of movement in outer hair cells and possible structural basis
Arch.Otorhinolaryngol. 243: 83-90

Fontilla, M.F. & Peterson, E.H. (2000)
Kinocilia heights on utricular hair cells
Hear.Res. 145: 8-16

Fowler, V.M.; Davis, J.Q.; Bennett, V. (1985)
Human erythrocyte myosin: identification and purification
J.Cell Biol. 100: 47-55

Frank, S. (1997)
Illustriertes Lexikon der Aquarienfische
Karl Müller Verlag, Erlangen

Frishkopf, L.S.; Liff, H.J.; Oman, C.M. (1972)
Structure and motion of cupulae of lateral-line organs in *Necturus maculosus*: I. Introduction
Res.Lab.Electr.M.I.T. 104: 326-329

Garcia, J.A.; Yee, A.G.; Gillespie, P.G.; Corey, D.P. (1998)
Localization of Myosin-Iβ near both ends of tip links in frog saccular hair cells
J.Neurosci. 18 (21): 8637-8647

Gassen, H.G. & Schrimpf, G. (1999)
Gentechnische Methoden
2. Auflage Spektrum Akad. Verlag

Géléoc, G.S.G.; Casalotti, S.O.; Forge, A.; Ashmore, J.F. (1999)
A sugar transporter as a candidate for the outer hair cell motor
Nat.Neurosci. 2 (8): 713-719

Gibson, F.J.; Walsh, P.M.; Mburu, P.; Varela, A.; Brown, M.; Antonio, K.W.; Beisel, K.W.; Steel, K.P.; Brown, S.D.M. (1995)
A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1
Nature 374: 62-64

Gillespie, P.G. (1995)
Molecular machinery of auditory and vestibular transduction
Curr.Opin.Neurobiol. 5: 449-455

Gillespie, P.G. & Hudspeth, A.J. (1991)
High-purity isolation of bullfrog hair bundles and subcellular and topological localization of constituent proteins
J. Cell Biol. 112: 625-640

Gillespie, P.G. & Hudsepth A.J. (1993)
Adenine nucleoside diphosphates block adaptation of mechanoelectrical transduction in hair cells
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90: 2710-2714

Gillespie, P.G.; Wagner, M.C.; Hudspeth, A.J. (1993)
Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips
Neuron 11: 581-594

Gillespie, P.G.; Hasson, T.; Garcia, J.A.; Corey, D.P. (1996)
Multiple myosin isozymes and hair-cell function
Cold Spring Habor Symp.Quant.Biol. 190: 309-318

Gitter, A.H. & Zenner, H.P. (1990)
The cell potential of isolated inner hair cells in vitro
Hear.Res. 45: 87-94

Glenney, J.R., Jr.; Glenney, P.; Osborne, M.; Weber, K. (1982 a)
An F-actin and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush borders has a morphology related to spectrin
Cell 28: 843-854

Glenney, J.R., Jr.; Glenney, P.; Osborne, M.; Weber, K. (1982 b)
Erythroid spectrin, brain fodrin and intestinal brush border proteins (TW-260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell type-specific subunit
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79: 4002-4005

Glenney, J.R., Jr.; Glenney, P.; Weber, K. (1983)
The spectrin-related molecule, TW-260/240, cross-links the actin bundles of the microvillus rootlets in the brush borders of intestinal epithelial cells
J.Cell Biol. 96: 1491-1496

Görner, P. (1963)
Untersuchungen zur Morphologie und Elektrophysiologie des Seitenlinienorgans vom Krallenfrosch
Z.vergl.Physiol. 47: 316-338

Hallworth, R.; McCoy, M.; Polan-Curtain, J. (2000)
Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of corti
Hear.Res. 139: 31-41

Harris, H. (1983)
Brush borders on the move
Nature 302: 106-107

Hasson, T. (1999)
Molecular motors: Sensing a function for myosin-VIIa
Curr.Biol. 9: R838-R841

Hasson, T.; Gillespie, P.G.; Garcia, J.A.; MacDonald, R.B.; Zhao, Y.; Yee, A.G.; Mooseker, M.S.; Corey, D.P. (1997)

Unconventional myosins in inner ear sensory epithelia

J.Cell Biol. 137 (6): 1287-1307

He, D.D.Z.; Zheng, J.Z.; Edge, R.; Dallos, P. (2000)

Isolation of cochlear inner hair cells

Hear.Res. 145: 156-160

Heuer, K.U. (1989)

Untersuchungen zur Toxizität von Antibiotika am Seitenlinienorgan von *Aplocheilus lineatus*

Diplomarbeit, Gießen

Hillman, D.E. & Lewis, E.R. (1971)

Morphological basis for a mechanical linkage in otolithic receptor transduction in the frog

Science 174: 416-419

Hirokawa, N. (1986)

Cytoskeletal architecture of the chicken hair cells revealed with the quick-frozen, deep-etch technique

Hear.Res. 22: 41-54

Hirokawa, N. & Tilney, L.G. (1982)

Interactions between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear

J.Cell Biol. 95: 249-261

Hirokawa, N.; Cheney, R.E.; Willard, M. (1983)

Location of a protein of the fodrin-spectrin-TW 260/240 family in the mouse intestinal brush border

Cell 32: 953-965

Hoin-Radkovsky, I.; Bleckmann, H.; Schwartz, E. (1984)

Determination of source distance in the surface-feeding fish *Pantodon buchholzi* Pantodontidae

Anim.Behav. 32: 840-851

Holley, M.C. & Ashmore, J.F. (1988 a)

A cytoskeletal spring in cochlear outer hair cells

Nature 335: 635-637

Holley, M.C. & Ashmore J.F. (1988 b)

On the mechanism of a high-frequency force generator in outer hair cells isolated from the guinea pig cochlea

Proc.R.Soc.Lond.Ser. B 232: 413-429

Holley, M.C. & Ashmore, J.F. (1990)

Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice

J.Cell Sci. 96: 283-291

Holley, M.C.; Kalinec, F.; Kachar, B. (1992)

Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells

J.Cell Sci. 102: 569-580

Holton, T. & Hudspeth, A.J. (1983)

A micromechanical contribution to cochlear tuning and tonotopic organization

Science 222: 508-510

Holton, T. & Weiss, T.F. (1983)

Frequency selectivity of hair cells and nerve fibres in the alligator lizard cochlea

J.Physiol. 345: 241-260

Howard, J. & Hudspeth, A.J. (1987)

Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechanoelectrical transduction by the bullfrog`s saccular cell

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84: 3064-3068

Hudspeth, A.J. (1989)

How the ear`s works work

Nature 341: 397-404

Hudspeth, A.J. & Jacobs, R. (1979)

Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76: 1506-1509

Hudspeth, A.J. & Gillespie, P.G. (1994)

Pulling springs to tune transduction: adaptation by hair cells

Neuron 12: 1-9

Ikeda, K.; Saito, Y.; Nishiyama, A.; Takasaka, T. (1992)

Intracellular pH regulation in isolated cochlear outer hair cells of the guinea-pig

J.Physiol. 447: 627-648

Jaeger, R.G.; Fex, J.; Kachar, B. (1994)

Structural basis for mechanical transduction in the frog vestibular sensory apparatus: II. The role of microtubules in the organisation of the cuticular plate

Hear.Res. 77: 207-215

Jorgensen, J.M. (1989)

Evolution of octavolateralis sensory cells
In: Coombs, S.; Görner, P.; Münz, H. (eds.)
The mechanosensory lateral line. Neurobiology and evolution
Springer, New York, Berlin, Heidelberg: 115-145

Jones, K.H. & Senft, J.A. (1985)

An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide
J.Histochem.Cytochem. 33 (1): 77-79

Kachar, B.; Brownell, W.E.; Altschuler, R.A.; Fex, J. (1986)

Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells
Nature 322: 365-368

Kalinec, F.; Kalinec, G.; Negrini, C.; Kachar, B. (1997)

Immunolocalization of anion exchanger 2α in auditory sensory hair cells
Hear.Res. 110: 141-146

Kaus, S. (1987)

The effect of aminoglycoside antibiotics on the lateral line organ of *Aplocheilus lineatus* (Cyprinodontidae)
Acta Otolaryngol. 103: 291-298

Kil, J.; Warchol, M.E.; Corwin, J.T. (1997)

Cell death, cell proliferation, and estimates of hair cell life spans in the vestibular organs in chicks
Hear.Res. 114: 117-126

Kingsbury B.F. (1895)

The lateral line system of sense organs in some american amphibia, and comparison with the dipnoans
Trans.Am.Microsc.Soc. 17: 115-145
Zitiert in: Fritsch, B. (1989): Diversity and regression in the amphibian lateral line and electrosensory system
In: Coombs, S.; Görner, P.; Münz, H. (eds.)
The mechanosensory lateral line. Neurobiology and evolution
Springer, New York, Berlin, Heidelberg: 99-114

Kirkegaard, M. & Jorgensen, J.M. (2000)

Continuous hair cell turnover in the inner ear vestibular organs of a mammal, the Daubenton`s bat (*Myotis daubentonii*)
Naturwiss. 87: 83-86

Knipper, M.; Zimmermann, U.; Köpschall, J.; Rohbock, K.; Jüngling, S.; Zenner, H.P. (1995)
Immunological identification of candidate proteins involved in regulating active shape changes of outer hair cells
Hear.Res. 86 (1-2): 100-110

Köppl, C.; Gleich, O.; Schwabedissen, G.; Siegl, E.; Manley, G.A. (1998)
Fine structure of the basilar papilla of the emu. Implications for the evolution of hair-cell types
Hear.Res. 126: 99-112

Kroese, A.B.A. & van Netten, S.M. (1987)
The application of intermittent light polarization microscopy for the visualization of vertebrate sensory hair cells in vivo
J.Microsc. 145: 309-317

Kroese, A.B.A. & van Netten, S.M. (1989)
Sensory transduction in lateral line cells
In: Coombs, S.; Görner, P.; Münz, H. (eds.)
The mechanosensory lateral line. Neurobiology and evolution
Springer, New York, Berlin, Heidelberg: 265-284

Kuhn, B. & Vater, M. (1995)
The arrangements of F-actin, tubulin and fodrin in the organ of corti of the horseshoe bat (*Rhinolophus rouxi*) and the gerbil (*Meriones unguiculatus*)
Hear.Res. 84: 139-156

Landford, P.J.; Platt, C.; Popper, A.N. (2000)
Structure and function in the saccule of the goldfish (*Carassius auratus*): a model of diversity in the non-amniote ear
Hear.Res. 143: 1-13

Lenzi, D. & Roberts, W.M. (1994)
Calcium signalling in hair cells: multiple roles in a compact cell
Curr.Opin.Neurobiol. 4: 496-502

Levine, J. & Willard, M. (1981)
Axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells
J.Cell Biol. 90: 631-643

Liddell, E. & Weeks I. (1996)
Antikörper Techniken. Labor im Fokus
Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Lim, D.J. & Flock, A. (1985)
Ultrastructural morphology of enzyme-dissociated cochlear sensory cells
Acta Otolaryngol. 99: 478-492

Lim, D.J. (1986)

Functional structure of the organ of corti: a review

Hear. Res. 22: 117-146

Liu, S.C.; Derick, L.H.; Palek, J. (1987)

Visualization of hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton

J.Cell Biol. 104: 527-536

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.F.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951)

Protein measurement with folin phenol reagent

J.Biol.Chem. 193: 265-275

Lubitz, D.K.J.E. (1981)

Subsurface tubular system in the outer sensory cells of the rat cochlea

Cell Tissue Res. 220: 787-795

Luna, E.J. & Hitt, A.L. (1992)

Cytoskeleton-plasma membrane interactions

Science 258: 955-963

Macartney, J.C.; Comis, S.D.; Pickles, J.O. (1980)

Is myosin in the cochlea a basis for active motility?

Nature 288: 491-492

Mahendrasingam, S.; Furness, D.N.; Hackney, C.M. (1998)

Ultrastructural localisation of spectrin in sensory and supporting cells of guinea-pig organ of corti

Hear.Res. 126: 151-160

Marshall, N.B. (1971)

Explorations in the life of fishes

Harvard Univ.Press, Cambridge: 204

McGough, A. (1998)

F-actin-binding proteins

Curr.Opinion Struct.Biol. 8: 166-176

Merrilees, M.J.; Crossman, E.J. (1973)

Surface pits in the family Esocidae. I. Structure and types

J.Morphol. 141: 307-320

Mhatre, A.N.; Charachon, G.; Alper, S.L.; Lalwani, A.K. (1998)

The guinea pig cochlear AE2 anion exchanger: cDNA cloning and in situ localization within the cochlea

Biochim.Biophys. Acta 1414: 1-15

Mooseker, M.S. & Tilney, L.G. (1975)

Filament polarity and membrane attatchment in the microvilli of intestinal epithelial cells
J.Cell Biol. 67: 725-743

Müller, U. (1984)

Anatomische und physiologische Anpassung des Seitenliniensystems von *Pantodon buchholzi* an den Lebensraum Wasseroberfläche
Dissertation, Gießen

Nadol, J.B., Jr. (1983)

Serial section reconstruction of the neural poles of hair cells in the human organ of corti. II. Outer hair cells
Laryngoscope 93: 780-791

Neff, C. (2000)

Regenerationsfähigkeit von Haarsinneszellen der Wirbeltiere – Eine Verhaltens- und elektronenmikroskopische Studie an Fischen
Staatsexamensarbeit, Gießen

Nelson, J.S. (1984)

Fishes of the world
John Wiley & Sons, New York

Neugebauer, D.C. & Thurm, U. (1984)

Äußere und innere Membranverbindungen der Stereovilli aus dem Fisch-Innenohr; Untersuchungen mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden
Verh.Dtsch.Zool.Ges. 77: 313

Nishida, Y.; Fujimoto, T.; Takagi, A.; Honjo, I.; Ogawa, K. (1993)

Fodrin is a constituent of the cortical lattice in outer hair cells of the guinea pig cochlea: Immunocytochemical evidence
Hear.Res. 65: 274-280

Northcutt, R.G. (1989)

The phylogenetic distribution and innervation of craniate mechanoreceptive lateral lines
In: Coombs, S.; Görner, P.; Münz, H. (eds.)
The mechanosensory lateral line. Neurobiology and evolution
Springer, New York, Berlin, Heidelberg: 17-78

Norwig, K. (2000)

Differentielle Wirkung von Antibiotika auf Seitenlinienorgane der Fische – Ein verhaltensphysiologischer Test zur Identifizierung von Kanal- und freien Neuromasten
Staatsexamensarbeit, Gießen

Nysten, M. (1962)

Etude anatomique des rapports de la vessie aérienne avec l´axe vertébral chez *Pantodon buchholzi* Peters

Ann.Mus.Roy. de l´Afrique Central, Teruren, Sér. 8; Sci.Zool. 108: 186-220

Ogata, Y. & Slepecky, N.B. (1995)

Immuncytochemical comparison of posttranslationally modified forms of tubulin in vestibular end-organs of the gerbil: tyrosinated, acetylated and polyglutamylated tubulin

Hear.Res. 86: 125-131

Orman, S. & Flock, A. (1983)

Active control of sensory hair mechanics implied by susceptibility to media that induce contraction in muscle

Hear.Res. 11: 261-266

Osborne, M.P.; Comis, S.D.; Pickles, J.O. (1988)

Further observations on the fine structure of tip links between stereocilia of the guinea pig cochlea

Hear.Res. 35: 99-108

Pack, A.K.; Slepecky, N.B. (1995)

Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients

Hear.Res. 91: 119-135

Pasternack, G.R. & Racusen, R.H. (1989)

Erythrocyte protein 4.1 binds and regulates myosin

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86: 9712-9716

Pickles, J.O.; Comis, S.D.; Osborne, M.P. (1984)

Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of corti, and their possible relation to sensory transduction

Hear.Res. 15: 103-112

Pickles, J.O.; Brix, J.; Manley, G.A. (1990)

Influence of collagenase on tip links in hair cells of the chick basilar papilla

Hear.Res. 50: 139-144

Raphael, Y.; Athey, B.D.; Wang, Y.; Lee, M.K.; Altschuler, R.A. (1994)

F-actin, tubulin and spectrin in the organ of corti: comparitive distribution in different cell types and mammalian species

Hear.Res. 76: 173-187

Rosenhall, U. (1971)

Morphological patterns of the organ of corti in birds
Arch.klin.exp.Ohr-, Nas.- u. Kehlk.Heilk. 200: 42-63

Rouse, G.W. & Pickles, J.O. (1991)

Paired development of hair cells in neuromasts of the teleost lateral line
Proc.R.Soc.Lond. B: 246: 123-128

Saito, T.; Yamada, T.; Manabe, Y.; Yamamoto, T.; Saito, H. (1996)

Cisplatin metabolites and their toxicity on isolated cochlear outer hair cells in vitro
Acta Otolaryngol. 116: 561-565

Sand, O. & Michelsen, A. (1978)

Vibration measurements of the perch saccular otolith
J.Comp.Physiol. 123: 85-89

Sans, A.; Atger, P.; Cavadore, C.; Cavadore, J.C. (1989)

Immunolocalization of myosin, tropomyosin, and actin in vestibular hair cells of human fetuses and cats
Hear.Res. 40: 117-126

Schacht, J. & Zenner, H.P. (1987)

Evidence that phosphoinositides mediate motility in cochlear outer hair cells
Hear.Res. 31:155-160

Schott, A. & Schwartz, E. (1998)

Actin-binding proteins and tubulin in lateral line hair cells of the butterfly fish *Pantodon buchholzi*
In: Elsner, N. & Wehner, R. (eds.)
Göttinger Neurobiology Report 1998
Proceedings of the 26th Göttingen Neurobiology Conference 1998, Volume II
Thieme, Stuttgart, New York: 353

Schott, A. & Schwartz, E. (1999)

Further studies on the cytoskeleton in lateral line hair cells of the butterfly fish *Pantodon buchholzi*
In: Elsner, N. & Eysel, U. (eds.)
Göttinger Neurobiology Report 1999
Proceedings of the 1st Göttingen Conference of the German Neuroscience Society 1999; Volume II
27th Göttingen Neurobiology Conference
Thieme, Stuttgart, New York: 338

Schott, A. & Schwartz, E. (2000)

The distribution of cytoskeletal proteins in isolated lateral line hair cells of *Pantodon buchholzi*
Pflugers Arch. Suppl. 439 (6): R 366

Schürmann, M. (1987)

Neuroanatomie der zentralen Projektion primärer Afferenzen einzelner Neuromasten des Seitenliniensystems bei den Oberflächenfischen *Pantodon buchholzi* und *Aplocheilus lineatus*. Eine HRP- und fluoreszenzmikroskopische Studie
Diplomarbeit, Gießen

Schwartz, E. (1965)

Bau und Funktion der Seitenlinie des Streifenhechtlings (*Aplocheilus lineatus Cu. & Val.*)
Z.vergl.Physiol. 50: 55-87

Schwartz, E. (1967)

Analysis of surface-wave perception in some teleosts
In: Cahn, P. (ed.)
Lateral line detectors
Indiana University Press: 123-134

Schwartz, E. (1969)

Luftatmung bei *Pantodon buchholzi* und ihre Beziehung zur Kiemenatmung
Z.vergl.Physiol. 65: 324-339

Schwartz, E. (1970)

Ferntastsinnesorgane von Oberflächenfischen
Z.Morph.Tiere 67: 40-57

Schwartz, E. (1971)

Die Ortung von Wasserwellen durch Oberflächenfische
Z.Morph.Tiere 67: 40-57

Self, T.; Mahony, M.; Fleming, J.; Walsh, J.; Brown, S.D.M.; Steel, K.P. (1998)

Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells
Development 125: 557-566

Self, T.; Sobe, T.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Avraham, K.B.; Steel, K.P. (1999)

Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells
Dev.Biol. 214: 331-341

Sheetz, M.P. (1983)

Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape
Semin.Haematol. 20 (3): 175-188

Slepecky, N. (1989)

Cytoplasmic actin and cochlear outer hair cell motility
Cell Tissue Res. 257: 69-75

Slepecky, N. & Chamberlain, S.C. (1985)

Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells

Hear.Res. 20: 245-260

Slepecky, N. & Ulfendahl, M. (1992)

Actin-binding and microtubule-associated proteins in the organ of corti

Hear.Res. 57: 201-215

Slepecky, N. & Ulfendahl, M. (1993)

Evidence for calcium-binding proteins and calcium-dependent regulatory proteins in sensory cells of the organ of corti

Hear.Res. 70: 73-84

Slepecky, N.B. & Savage J.E. (1994)

Expression of actin isoforms in the guinea pig organ of corti: muscle isoforms are not detected

Hear.Res. 73: 16-26

Slepecky, N.B.; Henderson, C.G.; Sucharrita, S. (1995)

Post-translational modifications of tubulin suggest that dynamic microtubules are present in sensory cells and stable microtubules are present in supporting cells of the mammalian cochlea

Hear.Res. 91: 136-147

Stankovic, K.M.; Brown, D.; Alper, S.L.; Adams, J.C. (1997)

Localization of pH regulating proteins H^+ATPase and CL^-/HCO_3^- exchanger in the guinea pig inner ear

Hear.Res. 114: 21-34

Sterba, G. (1995)

Süßwasserfische der Welt

Weltbild, Augsburg

Steyger, P.S.; Furness, D.N.; Hackney, C.M.; Richardson, G.P. (1989)

Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: Comparative immunocytochemistry and ultrastructure

Hear.Res. 42: 1-16

Steyger, P.S.; Gillespie, P.G.; Baird, R.A. (1998)

Myosin Iβ is located at tip link anchors in vestibular hair bundles

J.Neurosci. 18 (12): 4603-4615

Stroh, T. (1992)

Isolierung von Haarsinneszellen aus dem Seitenlinienorgan von *Pantodon buchholzi* und immuncytochemischer Nachweis von Aktin und Myosin

Diplomarbeit, Gießen

Sugihara, I. & Furukawa, T. (1989)

Morphological and functional aspects of two different types of hair cells in the goldfish sacculus
J.Neurophysiol. 62: 1330-1343

Tanner, M.J.A. (1993)

Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1)
Semin.Haematol. 30 (1): 34-57

Tanner, M.J.A. (1997)

The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review)
Mol.Membr.Biol. 14: 155-165

Thorne, P.R.; Carlisle, L.; Zajic, G.; Schacht, J.; Altschuler, R.A. (1987)

Differences in the distribution of F-actin in outer hair cells along the organ of corti
Hear.Res. 30: 253-266

Tilney, L.G.; DeRosier, D.J.; Mulroy, M.J. (1980)

The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells
J.Cell Biol. 86: 244-259

Tilney, L.G. & Saunders, J.C. (1983)

Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. I. Length, number, width, and distribution of stereocilia of each hair cell are related to the position of the hair cell on the cochlea
J.Cell Biol. 96: 807-821

Tilney, L.G. & DeRosier, D.J. (1985)

The organization of actin filaments in the stereocilia of the hair cells of the cochlear
In: Drescher, D.G. (ed.)
Auditory biochemistry
Springfield: 281-309

Tittel, G. (1991)

Verhaltensphysiologische, ultrastrukturelle und ontogenetische Studien am Seitenliniesystem von *Aplocheilus lineatus*. Ein vorläufiges Modell zur Richtungsdetermination von Beuteobjekten
Dissertation, Gießen

Troutt, L.L.; Van Heumen, W.R.A.; Pickles, P.O. (1994)

The changing microtubule arrangements in developing hair cells of the chick cochlea
Hear. Res. 81: 100-108

Turner, R.G.; Murashi, A.A.; Nielsen, D.W. (1981)

Cilium length: influence on neural tonotopic organization
Science 123: 1519-1521

Valat, J.; Griguer, C.; Lehouelleur, J.; Sans, A. (1991)
Motile response of isolated guinea pig vestibular hair cells
Neurosci.Lett. 127: 231-236

Vogel, D. & Bleckmann, H. (1997)
Water wave discrimination in the surface-feeding fish *Aplocheilus lineatus*
J.Comp.Physiol. A 180: 671-681

Weeds, A. (1982)
Actin-binding proteins–regulateors of cell architecture and motility
Nature 296: 811-816

Weil, D.; Blanchard, S.; Kaplan, J.; Guilford, P.; Gibson, F.; Walsh, J.; Mburu, P.; Varela, A.; Levilliers, J.; Weston, M.D.; Kelley, P.M.; Kimberling, W.J.; Wagenaar, M.; Levi-Acobas, F.; Larget-Piet, D.; Munnich, A.; Steel, K.P.; Brown, S.D.M.; Petit, C. (1995)
Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrom type 1B
Nature 374: 60-61

Wersäll, J. (1956)
Studies on the structure and innervation of sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig
Acta Otolaryngol. 126: 1-8

Whatmore, J.L.; Tang, E.K.Y.; Hickman, J. (1992)
Cytoskeletal proteolysis during calcium-induced morphological transitions of human erythrocytes
Exp.Cell Res. 200: 316-325

Williams, J.A. & Holder,N. (2000)
Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae
Hear.Res. 143: 171-181

Ylikoski, J.; Pirvola, U.; Närvänen, O.; Virtanen, I. (1990)
Nonerythroid spectrin (fodrin) is a prominent component of the cochlear hair cells
Hear.Res. 43: 199-204

Ylikoski, J.; Pirvola, U.; Lethonen, E. (1992)
Distribution of F-actin and fodrin in the hair cells of guinea pig cochlea as revealed by confocal fluorescence microscopy
Hear.Res. 60: 80-88

Yuhas, W.A. & Fuchs, P.A. (1999)
Apamin-sensitive, small conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells
J.Comp.Physiol. A 185: 455-462

Zajic, G. & Schacht, J. (1987)
Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species
Hear.Res. 26: 249-256

Zenner, H.P. (1981)
Cytoskeletal and muscle-like elements in cochlear hair cells
Arch.Otorhinolaryngol. 230: 81-92

Zenner, H.P. (1986 a)
Motile response in outer hair cells
Hear.Res. 22: 83-90

Zenner, H.P. (1986 b)
Aktive Bewegungen von Haarzellen: Ein neuer Mechanismus beim Hörvorgang
HNO 34: 133-138

Zenner, H.P. (1988)
Motility of outer hair cells as an active actin-mediated process
Acta Otolaryngol. 105: 39-44

Zenner, H.P. (1994)
Hören: Physiologie, Biochemie, Zell- und Neurobiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Zenner, H.P.; Wegner, N.; Thalmann, R. (1981)
Die mechano-sensorische Kopplung in der Hörzelle benötigt ein intaktes Zytoskelett
Arch.Otorhinolaryngol. 231: 820

Zenner, H.P.; Gitter, A.; Zimmermann, U.; Schmitt, U.; Frömter, E. (1985 a)
Die isolierte lebende Haarsinneszelle: Ein neues Modell zur Untersuchung der Hörfunktion
Laryngol.Rhinol.Otol. 64: 642-648

Zenner, H.P.; Zimmermann, U.; Schmitt, U. (1985 b)
Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells
Hear.Res. 18: 127-133

Zenner, H.P. & Drenckhahn, D. (1986)
Direct evidence for an mechanical process in mammalian outer hair cells
In: Moore, B.C.J. & Patterson, R.D. (eds.)
Auditory frequency selectivity
Plenum Press, New York: 97-102

Zenner, H.P. & Schacht, J. (1986)

Hörverlust durch Aminoglykosid Antibiotika: Angriff am Membranbaustein PIP_2 in äußeren Haarzellen als Wirkungsmechanismus

HNO 34: 317-323

Zenner, H.P.; Zimmermann, R.; Gitter, A.H. (1988)

Active movements of the cuticular plate induce sensory hair motion in mammalian outer hair cells

Hear.Res. 34: 233-240

Zenner, H.P.; Zimmermann, U.; Gitter, A.H. (1990)

Cell potential and motility of isolated mammalian vestibular hair cells

Hear.Res. 50: 289-294

Zenner, H.P. & Zimmermann, U. (1991)

Motile response of vestibular hair cells following caloric, electrical and chemical stimuli

Acta Otolaryngol. 111: 291-297

Zheng, J.; Shen, W.; He, D.D.Z.; Long, K.B.; Madison, L.D.; Dallos, P. (2000)

Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells

Nature 405: 149-155

Zimmermann, U. (pers. Mitteilung)

Universitäts-HNO-Klinik, Tübingen

Zine, A. & Schweitzer, L. (1997)

Localization of proteins associated with the outer hair cell plasma membrane in the gerbil cochlea

Neurosci. 80 (4): 1247-1254

7 Anhang

7.1 Meßdaten zu Haarsinneszellen im REM

Stereocilienlängen in abgestufter Größe (vom größten zum kleinsten Stereocilium)

Tabelle 8: Zelle 1

Länge Stereocilium [µm]	**Längendifferenzen Δ [µm]**	**Länge in [%] in Bezug auf das längste Stereocilium**	**Prozentuale Längendifferenz Δ [%]**
3		100	
	0,1		3,3
2,9		96,7	
	0,4		13,4
2,5		83,3	
	0,3		10
2,2		73,3	
	0,1		3,3
2,1		70	
	0,4		13,3
1,7		56,7	
	0,3		10
1,4		46,7	
	0,3		10
1,1		36,7	
	0,3		10
0,8		26,7	

Tabelle 9: Zelle 2

Länge Stereocilium [µm]	**Längendifferenzen Δ [µm]**	**Länge in [%] in Bezug auf das längste Stereocilium**	**Prozentuale Längendifferenz Δ [%]**
4,7		100	
	0,7		14,9
4		85,1	
	0,7		14,9
3,3		70,2	
	0,3		6,4
3		63,8	
	0,6		12,7
2,4		51,1	
	0,5		10,7
1,9		40,4	
	0,5		10,6
1,4		29,8	
	0,4		8,5
1		21,3	

Tabelle 10: Zelle 3 (s. Abb. 9)

Länge Stereocilium [µm]	**Längendifferenzen Δ [µm]**	**Länge in [%] in Bezug auf das längste Stereocilium**	**Prozentuale Längendifferenz Δ [%]**
2,6		100	
	0,3		11,5
2,3		88,5	
	0,3		11,6
2,0		76,9	
	0,2		7,7
1,8		69,2	
	0,3		11,5
1,5		57,7	
	0,3		11,5
1,2		46,2	
	0,3		11,6
0,9		34,6	

Tabelle 11: Zelle 4

Länge Stereocilium [µm]	**Längendifferenzen Δ [µm]**	**Länge in [%] in Bezug auf das längste Stereocilium**	**Prozentuale Längendifferenz Δ [%]**
3,7		100	
	0,8		21,6
2,9		78,4	
	0,4		10,8
2,5		67,6	
	0,4		10,8
2,1		56,8	
	0,4		10,9
1,7		45,9	
	0,4		10,8
1,3		35,1	
	0,3		8,1
1,0		27,0	

Tabelle 12: Zelle 5

Länge Stereocilium [µm]	**Längendifferenzen Δ [µm]**	**Länge in [%] in Bezug auf das längste Stereocilium**	**Prozentuale Längendifferenz Δ [%]**
2,5		100	
	0,3		12
2,2		88	
	0,4		16
1,8		72	
	0,4		16
1,4		56	
	0,4		16
1,0		40	

Tabelle 13: Länge der kleinsten und größten Stereocilie je Zelle

Nummer [n]	**Kleinste Stereocilie [µm] (n = 14)**	**Größte Stereocilie [µm] (n = 13)**
1	0,78	2,98
2	0.73	3,02
3	0,61	2,6
4	0,89	4,66
5	0,83	3,31
6	0,89	4,13
7	0,75	4,19
8	0,66	4,26
9	1,07	3,84
10	0,97	3,77
11	0,46	4,73
12	1,02	2,41
13	0,61	3,17
14	0,59	
Mittelwert	**0,78**	**3,62**
STABW	**0,18**	**0,76**

7.2 Zelldimensionen ausgemessener HSZ

Tabelle 14: HSZ-Längen und -Breiten aus verschiedenen Präparationen

Nummer [n]	Länge HSZ [µm]	Breite HSZ [µm]	Länge/Breite Index	Länge sortiert [µm]
1	19,6	6,5	3	27,4
2	17	7,4	2,3	26,1
3	17,8	7,4	2,4	25,7
4	19,6	6,5	3	25,2
5	19,6	6,2	3,2	24,3
6	20	7	2,9	23,9
7	17,4	9,2	1,9	23,9
8	17	7	2,4	23,5
9	15,7	7	2,2	23
10	15,7	6,5	2,4	23
11	18,3	8,3	2,2	22,6
12	20,9	8,3	2,5	22,6
13	18,3	7,4	2,5	22,2
14	20	6,5	3,1	22,2
15	20,9	9,6	2,2	21,3
16	20	8,7	2,3	20,9
17	21,3	6,1	3,5	20,9
18	17,4	9,1	1,9	20,9
19	22,6	7	3,2	20,9
20	20,4	7	2,9	20,9
21	18,7	8,7	2,2	20,4
22	16,1	7	2,3	20,4
23	22,6	7,8	2,9	20,4
24	18,7	8,3	2,3	20,4
25	24,3	6,1	4	20,4
26	20	7,4	2,7	20,4
27	23	9,1	2,5	20
28	23	6,5	3,5	20
29	23,9	7,4	3,2	20

Fortsetzung Tabelle 14:

Nummer [n]	Länge HSZ [µm]	Breite HSZ [µm]	Länge/Breite Index	Länge sortiert [µm]
30	20,9	10	2,1	20
31	23,9	9,1	2,6	20
32	27,4	10	2,7	19,6
33	22,2	7	3,2	19,6
34	19,6	6,1	3,2	19,6
35	12,2	7	1,7	19,6
36	16,1	6,1	2,6	19,6
37	17	6,5	2,6	19,6
38	20,4	7	2,9	19,6
39	20,4	7,8	2,6	19,1
40	14,8	7,4	2	19,1
41	17	7,4	2,3	18,7
42	17	6,1	2,8	18,7
43	13,9	6,1	2,3	18,7
44	20,9	4,3	4,9	18,7
45	18,7	7,4	2,5	18,3
46	17,4	7,4	2,4	18,3
47	17,8	4,8	3,7	18,3
48	17,4	7,4	2,4	17,8
49	15,7	7	2,2	17,8
50	20,9	8,7	2,4	17,8
51	15,7	5,7	2,8	17,4
52	26,1	8,7	3	17,4
53	15,7	8,3	1,9	17,4
54	17	7,8	2,2	17,4
55	25,7	7	3,7	17,4
56	23,5	10,4	2,3	17
57	18,7	9,1	2,1	17
58	16,5	7,8	2,1	17
59	15,7	7,4	2,1	17
60	20,4	7,4	2,8	17
61	20,4	6,1	3,3	17

Fortsetzung Tabelle 14:

Nummer [n]	Länge HSZ [µm]	Breite HSZ [µm]	Länge/Breite Index	Länge sortiert [µm]
62	19,1	6,5	2,9	16,5
63	20,4	7,8	2,6	16,1
64	20	6,1	3,3	16,1
65	17,8	7,4	2,4	15,7
66	25,2	7,4	3,4	15,7
67	19,6	8,3	2,4	15,7
68	19,6	6,5	3	15,7
69	15,2	5,2	2,9	15,7
70	19,1	5,2	3,7	15,7
71	19,6	5,7	3,4	15,2
72	18,3	6,1	3	14,8
73	22,2	7	3,2	13,9
74	17,4	5,7	3,1	12,2
Mittelwert	**19,3**	**7,3**	**2,7**	
STABW	**3**	**1,2**	**0,6**	

Tabelle 15: HSZ-Längen und -Breiten einer einzelnen Präparation

Nummer [n]	Länge HSZ [µm]	Breite HSZ [µm]	Länge/Breite Index	Länge sortiert [µm]
1	21,3	6,5	3,3	27,4
2	26,1	7	3,7	27
3	23,5	5,2	4,5	26,1
4	20,9	7	3	26,1
5	23,5	7,8	3	26
6	27	9,1	3	25,7
7	20	7,4	2,7	25,2
8	23,5	6,1	3,9	25,2
9	25,2	7,8	3,2	25,2
10	20	9,1	2,2	24,3
11	21,7	7,8	2,8	23,5
12	20	7,4	2,7	23,5
13	23	8,3	2,8	23,5
14	20,4	9,6	2,1	23,5
15	18,7	7,8	2,4	23,5
16	18,3	7,8	2,3	23
17	22,2	7	3,2	22,6
18	27,4	7,8	3,5	22,6
19	22,6	8,7	2,6	22,6
20	22,6	9,6	2,4	22,6
21	17,4	7	2,5	22,6
22	21,3	7,8	2,7	22,2
23	20,4	7	2,9	22,2
24	14,8	7,4	2	22,2
25	17,8	7	2,5	21,7
26	20,4	7,8	2,6	21,7
27	22,2	6,5	3,4	21,7
28	22,6	8,7	2,6	21,3
29	22,2	7,4	3	21,3
30	15,7	7,8	2	21,3
31	21,3	5,7	3,7	20,9

Fortsetzung Tabelle 15:

Nummer [n]	Länge HSZ [µm]	Breite HSZ [µm]	Länge/Breite Index	Länge sortiert [µm]
32	26	7	3,7	20,9
33	15,7	7,8	2	20,4
34	16,5	8,7	1,9	20,4
35	14,3	7	2	20,4
36	25,2	7	3,6	20
37	19,6	7,4	2,6	20
38	20	6,5	3,1	20
39	19,1	6,5	2,9	20
40	25,2	7,8	3,2	20
41	22,6	7,8	2,9	19,6
42	20,9	7,4	2,8	19,6
43	15,2	8,3	1,8	19,6
44	13,9	8,3	1,7	19,1
45	22,6	7,8	2,9	18,7
46	13,9	7,4	1,9	18,7
47	24,3	7,8	3,1	18,3
48	16,5	7,8	2,1	17,8
49	18,7	7,4	2,5	17,8
50	21,7	7	3,1	17,4
51	17,4	8,3	2,1	17,4
52	17,8	5,7	3,1	16,5
53	25,7	7,8	3,3	16,5
54	26,1	7	3,7	15,7
55	23,5	7,8	3	15,7
56	20	7,8	2,6	15,2
57	19,6	7,8	2,5	14,8
58	21,7	10,4	2,1	14,3
59	23,5	9,6	2,4	13,9
60	19,6	7,4	2,6	13,9
Mittelwert	**20,8**	**7,6**	**2,8**	
STABW	**3,4**	**1**	**0,6**	

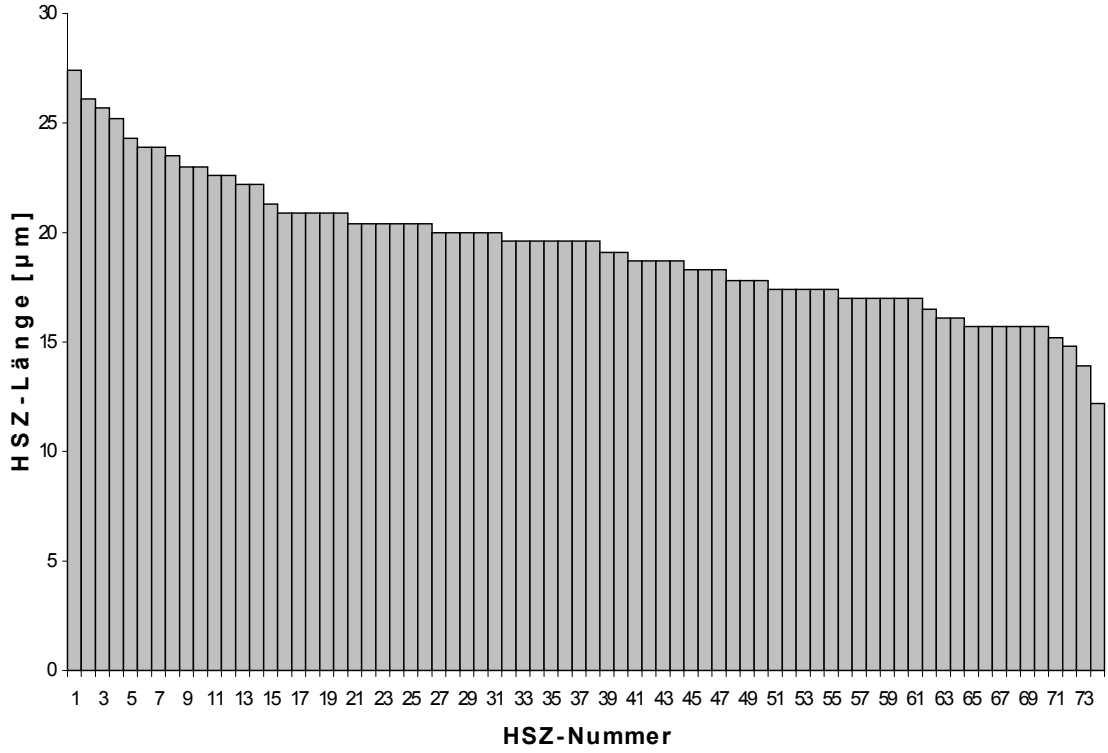


Abb. 29: HSZ-Längen aus verschiedenen Präparationen nach Länge sortiert. Die X-Achse zeigt die den einzelnen HSZ zugewiesene Nummer an (siehe Tabelle 14).

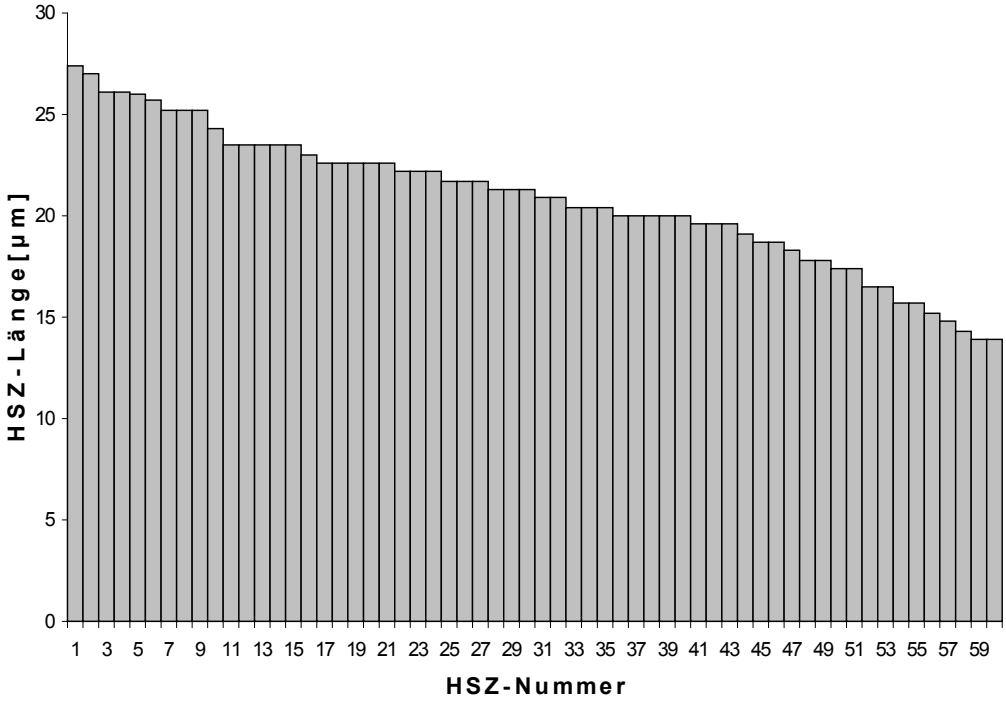


Abb. 30: HSZ-Längen einer einzelnen Präparation nach Länge sortiert. Die X-Achse zeigt die den einzelnen HSZ zugewiesene Nummer an (siehe Tabelle 15).

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Erich Schwartz für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Verlauf der Arbeit sowie für viele fachübergreifende Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss für das Ermöglichen der Arbeiten am Konfokalmikroskop. Herrn Dr. Hubertus Hipke, Herrn Elmar Schröpfer und Herrn Jan Behrendt für ihre Einarbeitung und Unterstützung bei der Arbeit an genanntem Gerät.

Frau Dr. Ulla Hauptmann und Frau Daniela Hild für ihre Hilfestellung bei den ersten REM-Experimentvorbereitungen. Frau Dr. Ursula Richter und Herrn Dr. Martin Hardt von der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit für ihre Hilfe bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Frau Dr. Tanja Heuser und Frau Daniela Hild für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Western Blots.

Frau Gisela Braner für die Einarbeitung am Beginn der Arbeit, die Fischpflege und ihre angenehme Art im Labor.

Frau Walburga Hofmann für ihre Unterstützung bei der Erstellung von Präparaten und die gewissenhafte Fischpflege sowie für die nette Atmosphäre im Labor.

Herrn Bernhard Kahnert und Herrn Siegfried Kristek für ihren Einsatz bei technischen Problemen.

Herrn Andreas Bauer für die Einweihung in manche Geheimnisse des Wunderwerks Computer. Frau Karin Wudtke für ihre Hilfe bei der Verpflegung der Fische. Des Weiteren für ihrer beider Kollegialität und Hilfsbereitschaft.

Allen Examenskandidatinnen für die nette Atmosphäre im Labor.

Den Mitarbeitern des 1. Stocks und der „Villa“ für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Christa Söhl für das Korrekturlesen der Arbeit und das Beseitigen von „Fehlern“ der alten Rechtschreibung. Herrn Dr. Björn Hendel für die Korrektur letzter Tippfehler und allen KorrektorInnen, die Teile der Arbeit durchgesehen haben.

Der Firma Aqua Natura in Leun für die günstige Beschaffung der Versuchsfische.

Meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und allen Freunden, die direkt oder indirekt die wissenschaftliche Arbeit gefördert haben.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und dem Wortlaut oder Inhalt entnommene Text- und Abbildungsquellen entsprechend kenntlich gemacht habe.

Gießen, den 08.05.2001

.....

(Achim Schott)

Lebenslauf

Name: Schott
Vorname: Achim
Geburtsdatum: 07.02.1971
Geburtsort: Limburg/Lahn
Wohnort: 35392 Gießen, Schwarzacker 45
Eltern: Norbert Wilhelm Schott und Hedwig Schott, geb. Wagner
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977-1981	Grundschule Beselich-Obertiefenbach
1981-1990	Fürst-Johann-Ludwig-Schule Hadamar – Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe
1990	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

1990	Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien (L3) an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1993	Zwischenprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik und Chemie
1994	Zweitstudium Biologie Diplom
1996	Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie, Chemie und Erziehungswissenschaften
August 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierphysiologie und Beginn der Promotion am Institut für Tierphysiologie
Mai 2001	Beginn des Referendariats für das Lehramt an Gymnasien (L3) im Studienseminar Gießen an der Liebigschule in Gießen

Gießen, den 08.06.2001

.....
(Achim Schott)