

Aus dem Zentrum der Physiologie
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

**AMPA-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)
induzierte Exzitotoxizität im Innenohr der Taube
(*Columba livia*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Diana Reng

Frankfurt am Main 2000

Aus dem Zentrum der Physiologie
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Betreuer: Prof. Dr. Rainer Klinke

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Martin Diener

**AMPA-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)
induzierte Exzitotoxizität im Innenohr der Taube
(*Columba livia*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Diana Reng

Frankfurt am Main 2000

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Klinke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2000

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole propionic acid
BM	Basilarmembran
CAP	Summenaktionspotential (Compound action potential)
CF	charakteristische Frequenz
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium
CY3	Carboxymethylindocyanin-3
dB SPL	Schalldruckpegel ("dB sound pressure level")
GluR	Glutamatrezeptor
IHC	innere Haarzelle
ImHC	Haarzelle mittlerer Länge ("intermediate hair cell")
NMDA	N-methyl-D-aspartate acid
NR	NMDA-Rezeptor
Oct	Oktave
PA	Paraformaldehyd
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffersaline
Q_{10dB}	Abstimmstärke der Tuningkurve: CF dividiert durch die lineare Bandbreite 10 dB über der Schwelle
RT	Raumtemperatur
SEM	Scanningelektronenmikroskopie
SHC	kurze Haarzelle ("short hair cell")
SPL	Sound pressure level
SR	Spontanentladungsrate
TBS	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TBST	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20, pH 7,4
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THC	lange Haarzelle ("tall hair cell")
Tuningkurve	Kurve der neuronalen Antworten als eine Funktion der Frequenz und der Intensität von Tonstimuli

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG.....	1
1.1 Morphologie des Vogellohres.....	1
1.1.1 Mittelohr.....	1
1.1.2 Innenohr.....	1
1.1.3 Basilarmembran und Haarzellen.....	3
1.1.4 Innervation der Haarzellen.....	4
1.2 Physiologie des Vogellohres.....	4
1.2.1 Mittelohr.....	4
1.2.2 Basilarmembran.....	5
1.2.3 Primäre auditorische afferente Fasern.....	6
1.2.4 Signaltransduktion.....	7
1.2.5 Neurotransmission.....	8
1.3 Fragestellung.....	11
II. METHODEN.....	13
2.1 Das Versuchstier.....	13
2.2 Narkose und Beatmung.....	13
2.3 Präparation.....	14
2.4 Messung der Summenaktionspotentiale der Hörnervenfasern (CAP's).....	15
2.4.1 Akustische Reizung.....	15
2.4.2 CAP-Ableitung.....	16
2.5 Einzelfaserableitungen aus dem Ganglion cochleare.....	17
2.5.1 Akustische Reizung.....	17
2.5.2 Ableitung der neuronalen Aktivität von Einzelfasern.....	18
2.6 AMPA,- NMDA- und Hanks-Applikation.....	19
2.7 Immunhistochemische Methoden.....	19
2.7.1 Präparation, Fixierungsbedingungen und Herstellung von Gefrierschnitten für die Lichtmikroskopie.....	19
2.7.2 Immunfärbung.....	20
2.8 Biochemische Methoden.....	21
2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	21

2.8.2	Proteintransfer auf Membranen.....	22
2.8.3	Immunodetektion von Proteinen auf Membranen.....	22
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	23
2.8.5	Immunopräzipitation.....	23
2.9	Elektronenmikroskopische Methoden.....	23
2.9.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	23
2.9.2	Scanningelektronenmikroskopie (SEM).....	24
2.10	Statistische Auswertung.....	25
III. ERGEBNISSE.....		26
3.1	Glutamatrezeptornachweis in Gefrierschnitten der Vogelcochlea.....	26
3.1.1	Nachweis der Glutamatrezeptoruntereinheit 1-4 (GluR1-4).....	26
3.1.2	Detektion der AMPA-Rezeptoruntereinheiten mittels Immunoblotanalyse und Immunopräzipitation.....	31
3.2	CAP-Schwellenkurven.....	32
3.2.1	Veränderung der CAP-Schwellenkurven durch die intracochleäre Gabe von AMPA.....	32
3.2.2	Keine Veränderung der CAP-Schwellenkurven durch die intracochleäre Gabe von NMDA.....	41
3.3	CAP-Intensitätskennlinien.....	43
3.3.1	Veränderung der CAP-Intensitätskennlinien durch AMPA.....	43
3.4	Neuronale Aktivität der auditorischen Neurone von „AMPA-Tieren“ im Vergleich zu Kontrolltieren.....	50
3.4.1	Spontanaktivität.....	50
3.4.2	Schallevozierte Aktivität.....	53
3.4.2.1	Frequenzabstimmkurven (Tuningkurven).....	53
3.4.2.2	Schwelle bei der charakteristischen Frequenz.....	54
3.4.2.3	Abstimmstärke der Tuningkurven (Q_{10dB} Wert).....	56
3.4.2.4	Zusammenhang der Parameter der Aktivität von Hörnervenfasern gleicher charakteristischer Frequenz.....	58
3.4.2.5	Intensitätsabhängigkeit der Entladungsrate.....	61
3.5	Histologische Auswertung (TEM und SEM).....	63
3.5.1	TEM.....	63
3.5.1.1	Präparate unbehandelte Tauben.....	63

3.5.1.2 Präparate mit AMPA behandelte Tauben.....	65
3.5.2 SEM.....	68
IV. DISKUSSION.....	70
4.1 Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheiten (GluR1-4) im Innenohr von Vogel und Säuger.....	70
4.2 Effekte der durch AMPA erzielten excitotoxischen Schädigung auf das Innenohr des Vogels im Vergleich zum Säuger.....	72
4.3 Defizite in der funktionellen Erholung des Hörvermögens.....	76
4.4 Morphologische Unterschiede unbehandelter und mit AMPA behandelte Innenohren der Taube	79
4.5 Vergleich der durch AMPA erzielten funktionellen Schädigungen des Vogelinnenohres mit der Schädigung des Innenohres durch Schall und ototoxische Substanzen.....	81
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	87
VI. SUMMARY.....	89
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	91
VIII. DANKSAGUNG.....	104

I. Einleitung

1.1 Morphologie des Vogelohres

1.1.1 Mittelohr

Das Ohr des Vogels besteht aus einem Mittel- und einem Innenohr. Ein typisches Außenohr ist nicht ausgebildet. Der äußere Gehörgang wird nur von speziellen Deckfedern abgeschlossen und durch das Trommelfell vom Mittelohr abgegrenzt. Das Mittelohr besteht beim Vogel aus der Paukenhöhle (Cavum tubotympanale) mit einer Verbindung zum Pharynx, der Tuba eustachii, den Mittelohrligamenten und -muskeln und dem Gehörknöchelchen (Columella auris), das über das ovale Fenster die Verbindung zum Innenohr herstellt. Im Vergleich zum Säuger fehlen der Hammer (Malleus) und der Amboß (Incus). Die Columella ist dem Stapes homolog und über Knorpelteile, der Extracolumella, mit dem Trommelfell verbunden. Das Mittelohr dient vor allem der Impedanzanpassung zwischen dem luftgefüllten äußeren Gehörgang und dem flüssigkeitsgefüllten Innenohr (z. B. Rosowski, 1991). Übersichtsarbeiten über das Mittelohr des Vogels sind in Gaudin (1968) und Saunders (1985) zu finden. Die Funktion des Taubenmittelohrs wird in Gummer et al. (1989) beschrieben.

1.1.2 Innenohr

Das Innenohr des Vogels besteht aus den drei Bogengängen, dem Utriculus, dem Sacculus und der Cochlea (Ductus cochlearis). Im Ductus cochlearis liegt das Hörsinnesepithel, die Papilla basilaris. Die Cochlea, die sich in drei übereinanderliegende Kanäle gliedert, gleicht in ihrer Form einem blind geschlossenen Schlauch, der um eine halbe Windung tordiert ist und eine Biegung von lateral nach ventral vollführt (Schwartzkopff und Winter, 1960). Das Hörsinnesepithel des Säugers, das im Gegensatz zur Papilla basilaris wirklich aufgerollt vorliegt, wird als Cortisches Organ bezeichnet.

Die drei Kanäle, die Scala vestibuli, media und tympani werden durch das Tegmentum vasculosum und die Basilararmembran voneinander getrennt. Das Tegmentum vasculosum teilt die Scala media von der darüberliegenden Scala vestibuli ab (Takasaka und Smith, 1971; Abbildung 1). Begrenzt wird die Scala vestibuli von dem ovalen Fenster, das durch die

Fußplatte, der Columella verschlossen ist. Die Scala media und die Scala tympani, die an das runde Fenster grenzt, werden durch die Papilla basilaris getrennt. Im basalen Teil der Scala tympani befindet sich eine Erweiterung, der Recessus scalae tympani. Im apikalen Teil steht die Scala tympani über das Helicotrema mit der Scala vestibuli in Verbindung. Während die Scala vestibuli sowie die Scala tympani beide mit natriumreicher Perilymphe gefüllt sind, ist die Scala media mit kaliumreicher Endolymphe gefüllt. Das Tegmentum vasculosum ist für die Bildung der Ionenzusammensetzung der Endolymphe und die Aufrechterhaltung des Potentialgefälles zwischen Endo- und Perilymphe verantwortlich (z. B. Cotanche et al., 1987; Voßieck und Klinke, 1990). Die Scala tympani wird seitlich durch eine innere (superiore fibrocartilaginöse Platte bzw. neuraler Limbus) und eine äußere Knorpelspange (inferiore fibrocartilaginöse Platte bzw. abneuraler Limbus) begrenzt, zwischen denen die Basilarmembran aufgespannt ist. Unter der inneren Knorpelspange befindet sich das Ganglion cochleare.

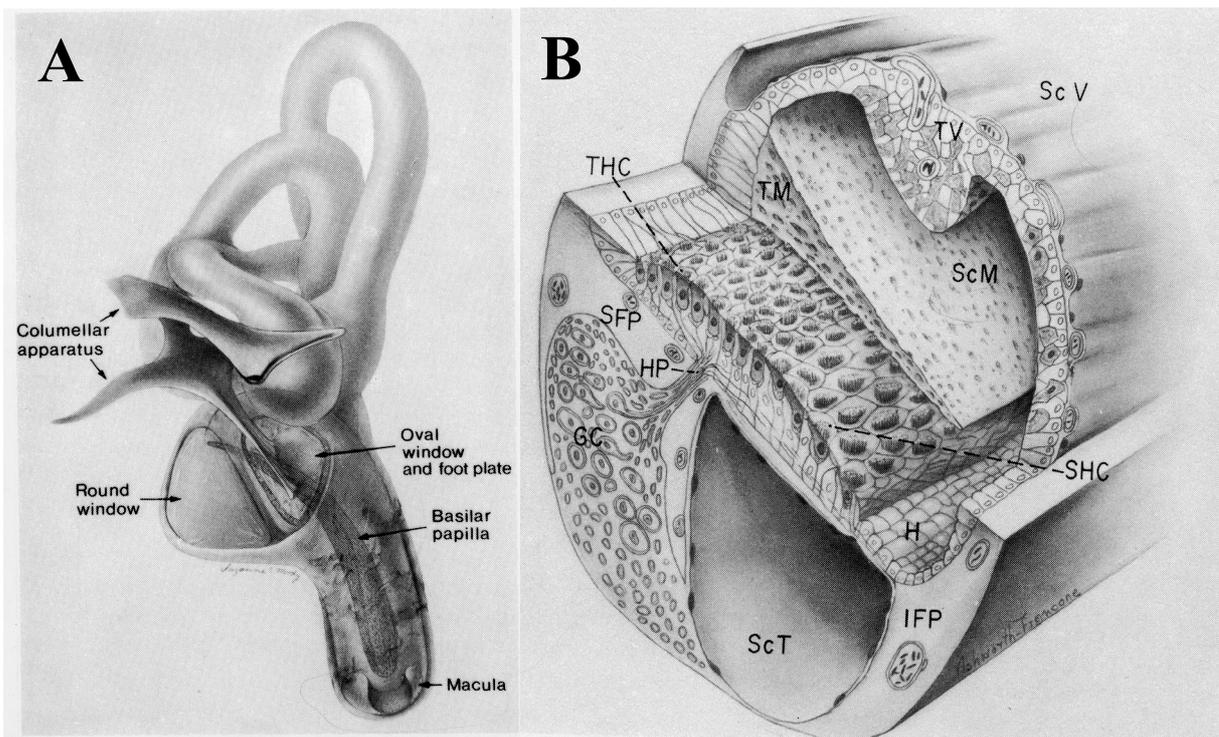


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der Ohrkapsel und des Columella-Apparates des Hühnchens (aus Tanaka und Smith, 1978). Zu erkennen ist außerdem die Papilla basilaris und die Macula in der durchsichtigen Knochenhülle des Ductus cochlearis. Überhalb der Cochlea sind die Semicircularkanäle zu erkennen. (B) Schematische Abbildung eines Querschnitts der Basilar Papilla der Taube (aus Takasaka und Smith, 1971). BM: Basilarmembran; GC: Ganglienzellen; H: Hyalinzellen; HP: Habenula perforata; IFP: „inferior fibrocartilaginöse Platte“; SFP: „superior fibrocartilaginöse Platte“; ScM: Scala media; ScT: Scala tympani; ScV: Scala vestibuli; SHC: „short hair cell“; THC: „tall hair cell“; TV: Tegmentum vasculosum.

1.1.3 Basilarmembran und Haarzellen

Die Länge der Basilarmembran beträgt bei der Taube etwa 4 mm (Gleich und Manley, 1988; Takasaka und Smith, 1971; Smolders et al., 1995). Bei den verschiedenen Spezies variiert sie von etwa 2,5 bis 11 mm, wobei eine globale lineare Korrelation zum Körpergewicht besteht (Schwartzkopff und Winter, 1960; Schwartzkopff, 1968). Die Breite der Basilarmembran der Taube nimmt von basal nach apikal von ca. 40-50 μm auf ca. 250-350 μm zu (Gleich und Manley, 1988). Auf ihr sitzen die eigentlichen Rezeptorzellen, die Haarzellen, deren Anzahl bei ungefähr 10.000 (Gleich und Manley, 1988) liegt. Die Haarzellen sitzen sehr dicht aneinander, umgeben von Stützzellen auf der gesamten Fläche der Basilarmembran, und werden von der Tektorialmembran bedeckt (Takasaka und Smith, 1971). Die auf den Haarzellen sitzenden Stereozilien sind wie beim Säuger gestaffelt angeordnet und durch feine Gewebsbrücken (tip links, Pickles et al., 1989) verbunden. Sie dienen dem Transduktionsprozeß. Nur die längsten von ihnen berühren die Tektorialmembran (Rosenhall, 1971). Die Stützzellen haben mit ihrem basalen Ende Kontakt zur Basilarmembran, so daß die Sinneszellen selbst die Basilarmembran nicht berühren. Die Verteilung der Haarzellen des Vogels steht im Gegensatz zu der des Säugers, bei dem die Haarzellen parallel in drei bis vier Reihen äußerer Haarzellen und einer Reihe innerer Haarzellen angeordnet sind. Die Anzahl der Haarzellen quer zur Basilarmembran der Taube nimmt von etwa 14 Zellen am basalen Ende bis zu 54 Zellen am apikalen Ende zu. Die Form der Haarzellen ändert sich sowohl über die Länge der Basilarmembran als auch über die Breite graduell. Von neural nach abneural sowie von apikal nach basal nimmt die Länge der Haarzellen im Verhältnis zu ihrer Breite kontinuierlich ab. Nach Takasaka und Smith (1971) werden die Haarzellen ihrer Form entsprechend in „tall hair cells“ (THCs), „intermediate hair cells“ (ImHCs) und „short hair cells“ (SHCs) eingeteilt. Die THCs, deren Höhe größer als ihr Oberflächendurchmesser ist, liegen vor allem neural, während sich die SHCs hauptsächlich über der freien Basilarmembran, d. h. im abneuralen Bereich der Papilla basilaris befinden. Die ImHCs liegen zwischen den beiden Haarzelltypen. Im apikalen Drittel gibt es so gut wie keine SHCs, während am basalen Ende ausschließlich SHCs existieren. (Smith et al., 1985; Manley et al., 1991). Als Besonderheit des auditorischen System des Vögel (Theurich et al., 1984; Manley et al., 1991) existieren auch infraschallsensitive Haarzellen auf der Basilarmembran. Diese sind am apikalen Ende der freien Basilarmembran lokalisiert (Warchol und Dallos, 1987; Schermuly und Klinke, 1990).

1.1.4 Innervation der Haarzellen

Die Haarzellen des Vogels sind sowohl afferent als auch efferent innerviert. Die THCs werden überwiegend von afferenten Nervenfasern innerviert, während die SHCs vor allem von efferenten Fasern innerviert werden (Takasaka und Smith, 1971; Firbas und Müller, 1983; Fischer, 1994). Ungefähr 80 % der Afferenzen innervieren neural gelegene Haarzellen im Verhältnis 1:1, wobei jede neural gelegene Haarzelle mit bis zu 4 afferenten Nervenfasern Kontakt hat. Die restlichen 20 % der afferenten Fasern verlaufen in abneuraler Richtung und innervieren durch einige kurze Äste bis zu 6 SHCs (von Düring et al., 1985). Die afferente Innervation nimmt von basal nach apikal und von abneural nach neural zu (Fischer, 1992). Bei den Efferenzen nimmt die Innervationsdichte in entgegengesetzter Richtung zu. Hier ist die Dichte am abneuralen Limbus und an der Basis am größten. Die efferenten Nervenfasern verzweigen sich und bilden mit den abneural gelegenen SHCs große Synapsen (Firbas und Müller, 1983), wobei einige efferente Fasern zu den neural gelegenen THCs ziehen und dort kleine Synapsen bilden. Diese Synapsen liegen vor allem an den Endigungen der afferenten Fasern (von Düring et al., 1985). Alle Nervenfasern verlassen die Basilarmembran durch die Habenula perforata in der superioren fibrocartilaginösen Platte, von wo aus sie zu den Nuclei magnocellularis und angularis ziehen (Boord und Rasmussen, 1963).

1.2 Physiologie des Vogelohres

1.2.1 Mittelohr

Der Schall, der über den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell trifft, wird über die knorpelige und knöcherne Struktur der Columella und das ovale Fenster auf die Flüssigkeit des Innenohres übertragen. Durch das Verhältnis der Größe der Fläche des Trommelfells zur Fläche der Columellafußplatte von 17:1 (Saunders, 1985; Gummer et al., 1989) und durch die als Hebel dienende Extracolumella werden die Schallkennimpedanzen den Medien Luft und Perilymphe einander angepaßt. So wird vermieden, daß ein großer Teil der Schallenergie beim Übergang zu den akustisch verschieden dichten Medien verloren geht. Durch die knorpelige und damit im Vergleich zum Knochen relative elastische Struktur der Extracolumella werden höhere Frequenzen schlechter übertragen, d. h. die

Mittelohrübertragung ist auf Bereiche unter ca. 10 kHz eingeschränkt (Abbildung 2; Manley, 1990; Gummer et al., 1989).

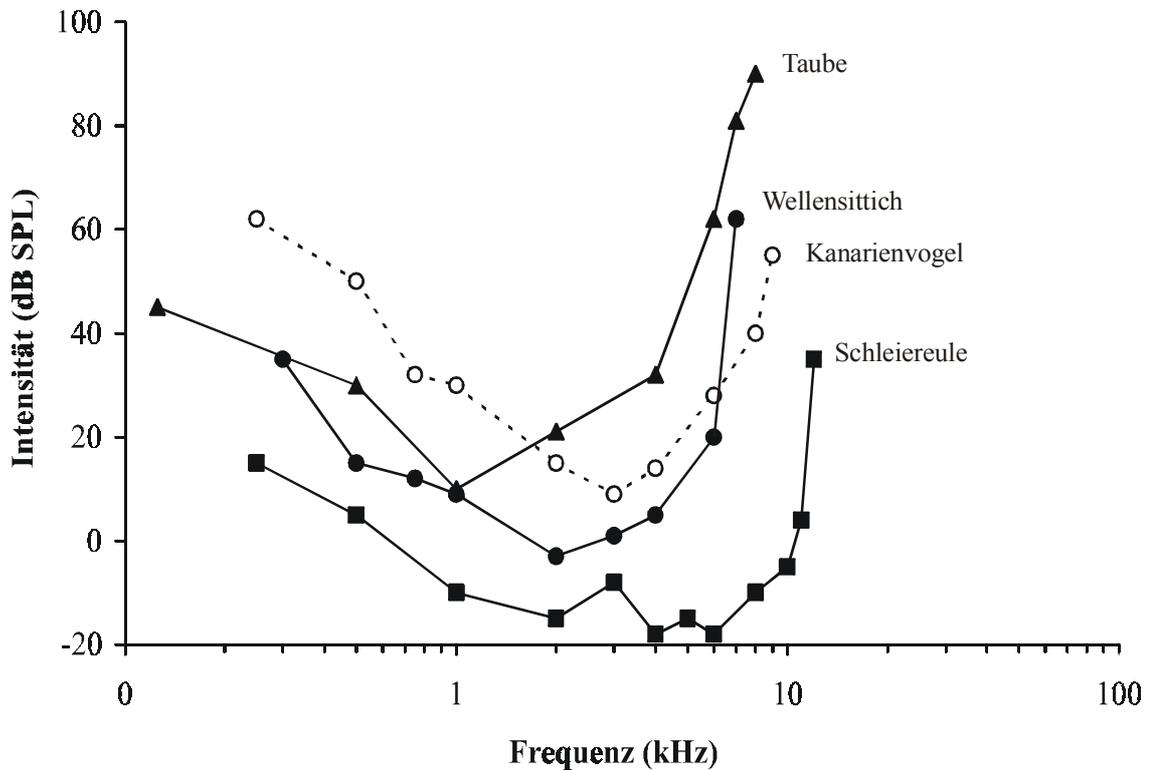


Abbildung 2: Durch Verhaltensexperimente bestimmte Hörschwellenkurven von vier verschiedenen Vogelarten. Die Hörschwellenkurve der Taube steigt ab 4 kHz steil an (Stebbins, 1970). Bei der empfindlichsten Frequenz (ca. 1 kHz) liegt die Hörschwelle der Taube bei etwa 10 dB SPL. Nach Smith (1981).

1.2.2 Basilarmembran

Die Basilarmembran wird durch die sich im Flüssigkeitsraum der Scala vestibuli und Scala media ausbreitenden Schallwellen in Schwingung versetzt. Bereits 1944 wurde von v. Békésy beim Hühnchen beschrieben, daß entlang der Basilarmembran frequenztonotop Amplitudenmaxima der Schwingung existieren, wie dies auch beim Säuger der Fall ist. Auch bei der Taube konnte 1987 mit Hilfe der Mössbauer-Technik von Gummer et al. festgestellt werden, daß eine Wanderwelle auf der Basilarmembran vorhanden ist. Es wird angenommen, daß die Wanderwelle durch den steilen Steifigkeits- und Massengradienten der Basilarmembran entsteht. Durch diesen Gradienten bildet sich für jede bestimmte Frequenz ein Amplitudenmaximum an der dazugehörigen Stelle auf der Basilarmembran aus. Allerdings ist die Frequenzabstimmung der Basilarmembran beim Vogel nicht so scharf wie

die neuronale Frequenzabstimmung der Antworten der primären auditorischen Fasern (Gummer et al., 1987; Klinke und Smolders, 1993). Der Frequenz/Ortsgradient der Basilarmembran beträgt bei der Taube 0.63 Oct/mm (Gummer et al., 1987).

1.2.3 Primäre auditorische afferente Fasern

Die Fasern des VIII. Nervens leiten die aus dem Innenohr erhaltenen Informationen zum Zentralnervensystem weiter. Untersuchungen über ihre Aktivität wurden an einer Vielzahl von Vogelspezies durchgeführt. Für die Taube gibt es ebenfalls eine große Zahl an Untersuchungen (Sachs et al., 1974; Gross und Anderson, 1976; Temchin, 1988; Hill et al., 1989; Gummer, 1991; Voßieck, 1991). Alle abgeleiteten primären auditorischen afferenten Fasern sind spontan aktiv. Das Muster der Spontanaktivität ist irregulär und die Länge der Zeitlücken (Intervalle) zwischen den Aktionspotentialen ist quasi-poissonverteilt (Sachs et al., 1974, 1978; Temchin, 1988). In einigen Fasern mit niedriger charakteristischer Frequenz treten bestimmte Intervalle häufig auf. Diese Intervalle werden als bevorzugte Intervalle bezeichnet (Manley, 1979; Manley et al., 1991), deren Kehrwert der charakteristischen Frequenz des Neurons entspricht (Voßieck, 1991; Salvi et al., 1992). Die quasiperiodische Spontanaktivität wurde von einigen Autoren als Antwort eines in den Haarzellen befindlichen elektrischen Filters auf das interne Rauschen betrachtet (Crawford und Fettiplace, 1981; Temchin, 1988; Voßieck, 1991). Diese Hypothese ist aber umstritten. Jegliches Rauschen, ob externen oder internen Ursprungs und mechanischer oder elektrischer Natur, das über einen scharf abgestimmten Filter übertragen wird, kann am Ausgang periodisches Verhalten hervorrufen und so als mögliche Quelle für die „preferred intervals“ in Frage kommen (Klinke et al., 1993, Klinke et al., 1994). Auf einen Tonreiz reagieren die primären auditorischen Fasern mit einer Erhöhung der Entladungsrate. Sie sind hoch frequenzselektiv. Sucht man die Reizschwelle in Abhängigkeit der Frequenz, so findet man für jede Faser die minimale Reizschwelle bei einer anderen Frequenz. Diese Frequenz nennt man charakteristische Frequenz, den dazugehörigen Schalldruckwert die Schwelle der Faser. Da die Rezeptorpotentiale der Haarzelle bereits eine hohe Frequenzselektivität aufweisen, ist es nicht verwunderlich, daß die Antwort der auditorischen Fasern ebenfalls gut abgestimmt ist. Die Güte der Abstimmung wird durch den $Q_{10\text{dB}}$ -Wert (CF geteilt durch die lineare Bandbreite (in Hz) 10 dB über der Schwelle) ausgedrückt. Der $Q_{10\text{dB}}$ -Wert ist bei Fasern höherer CF größer, d. h. die Abstimmkurven sind relativ schmaler (Abbildung 3).

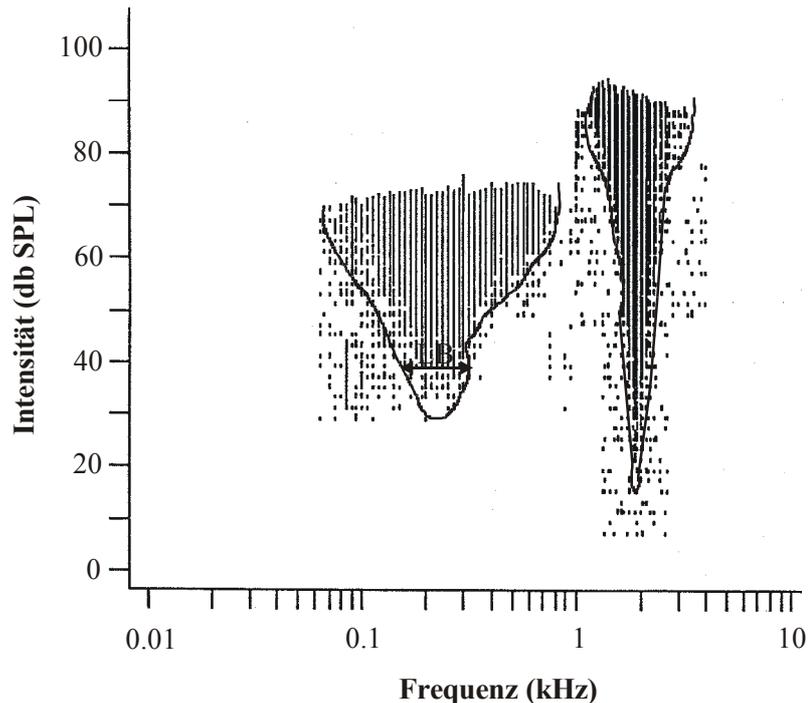


Abbildung 3: Typische Tuningkurven der sensitiven Neurone aus verschiedenen Frequenzbereichen. Dargestellt sind die Frequenz-Intensitäts-Antworten des hoch (CF = 1,89 kHz) und tieffrequenten Neurons (CF = 0,22 kHz). Der Anteil der Spontanentladungsrate jedes Neurons ist subtrahiert. Die gestrichelten Kurven sind freihändig gezeichnete untere Begrenzungen der Antwortflächen. Sie stellen die Schwellenkurven über die Frequenz (Tuningkurven) der Neurone dar. Die Tuningkurve des hochfrequenten Neurons ist schmaler als die des tieffrequenten Neurons. LB: lineare Bandbreite (in Hz).

Die Entladungsrate steigt mit der Schallintensität an und wird sowohl durch die Spontanaktivität als auch die Maximalentladungsraten des jeweiligen Neurons begrenzt. Unterhalb von 2 kHz antworten die auditorischen Neurone phasengekoppelt (phaselocking), d. h. ein Aktionspotential tritt zwar nicht unbedingt in jeder Periode, aber nur in einem eng umschriebenen Bereich einer Periode des Reizes auf. Phaselocking kann im Vogel bis zu 30 dB unter der Schwelle der Ratenerhöhung beobachtet werden (Gleich und Narins, 1988; Hill et al., 1989a). Die Fähigkeit der auditorischen Neurone zur Synchronisation der Auslösung der Aktionspotentiale mit den Schalldruckschwankungen am Trommelfell und die hohe Körpertemperatur (41 C°) bestimmen die sehr hohen Maximalentladungsraten von bis zu 700 AP/s (Köppel, 1997).

1.2.4 Signaltransduktion (Verarbeitung des Schallsignals)

Die Auslenkung der Basilarmembran führt zu einer Relativbewegung zwischen der Tektorialmembran und den Zilien der Haarzellen und so zu einer Abbiegung der Zilien. Durch die Abbiegung der Zilien kommt es zu einer Änderung des Membranpotentials der Haarzellen. Dabei bestimmt die Richtung und Abscherung der Zilien die Größe und Richtung der Membranpotentialänderung (Flock, 1965; Hudspeth und Corey, 1977; Ohmori, 1987). Bei Abscherung der Zilien in erregender Richtung fließen überwiegend Kaliumionen aus der kaliumreichen Endolymphe durch die apikal gelegenen Ionenkanäle in die Haarzelle und führen so zu deren Depolarisation und der Entstehung des Rezeptorpotentials. Hierbei ist die treibende Kraft für den Ioneneinstrom die Potentialdifferenz zwischen Endolymphe (+10 mV) und dem Zellinneren der Haarzelle (Pickles, 1988; Voßieck und Klinke, 1990). Die Depolarisation der Haarzellen durch den Kaliumstrom führt über die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Somit kommt es zu einer Freisetzung von Transmittersubstanz und zu einer Aktivierung der auditorischen Nervenfasern (Koyano und Ohmori, 1996).

1.2.5 Neurotransmission

Es konnte gezeigt werden, daß Glutamat im Zentralnervensystem eine zentrale Funktion als Neurotransmitter bei der schnellen exzitatorischen Informationsübertragung spielt (Fonnum, 1984; Ottersen et al., 1994). Ebenso gibt es Hinweise, daß Glutamat oder eine verwandte exzitatorische Aminosäure als schneller Neurotransmitter zwischen den Haarzellen und den afferenten Nervenendigungen im Innenohr des Säugers dienen (Klinke und Oertel, 1977; Klinke, 1986; Godfrey et al., 1986; Eybalin, 1993; Puel, 1995). Während Glutamat bzw. die Expression von Glutamatrezeptoren am Innenohr des Säugers in zahlreichen immunozytochemischen, pharmakologischen und exzitotoxischen Studien nachgewiesen werden konnte (z. B. Bledsoe et al., 1981, 1988; Pujol et al., 1985; Juis et al., 1989; Kuriyama et al., 1994; Matsubara et al., 1996; Niedzielskie und Wenthold, 1995; Niedzielski et al., 1997; Ottersen et al., 1998; Puel et al., 1991), liegen beim Vogel wenig Untersuchungen vor (Yamaguchi und Ohmori, 1990; Kataoka und Ohmori, 1994, 1996; Raman et al., 1994; Reng et al., 1999a-e; Sun et al., 2000).

Wird Glutamat durch Exozytose von den Haarzellen freigesetzt, diffundiert es durch den synaptischen Spalt und trifft an den postsynaptischen Endigungen der afferenten Nervenfasern auf die Glutamatrezeptoren. Die Glutamatrezeptoren können in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Es wird hierbei die Familie der ionotropen Rezeptortypen von der Familie der metabotropen Rezeptortypen unterschieden (Watkins et al., 1981; Sommer et al., 1992; Hollmann et al., 1994). Die ionotropen Rezeptortypen, die durch die Anlagerung des Ligandens (Glutamat) direkt geöffnet werden und für monovalente Kationen durchlässig sind, beinhalten drei verschiedene funktionelle Rezeptorsubtypen: Den α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA)-Rezeptor, den Kainat-Rezeptor und den N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-Rezeptor. Als vierten Subtyp der ionotropen Rezeptoren ist der Deltarezeptor zu nennen, für den aber noch keine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte. Jeder dieser Rezeptorsubtypen besteht wiederum aus mehreren Untereinheiten, die als Pentamer zusammengesetzt einen funktionsfähigen Rezeptor bilden. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt die spezielle Funktion der Rezeptoren. Der AMPA-Rezeptor ist vor allem für die schnelle synaptische Übertragung zuständig. Der NMDA-Rezeptor hingegen ist für die langsameren Antworten verantwortlich, da sein Kanal durch Magnesiumionen blockiert wird. Erst wenn die Zelle genügend stark depolarisiert wird – z. B. durch intensive Aktivierung von non-NMDA-Rezeptoren – treibt die Änderung des Membranpotentials das Magnesiumion aus dem Kanal des NMDA-Rezeptors, so daß Strom hindurchfließen kann (Mayer und Westbrook, 1987). Der NMDA-Rezeptor ist grundsätzlich für Ca^{2+} -Ionen permeabel, während der AMPA-Rezeptor diese Eigenschaft nur bei fehlender Untereinheit GluR2 besitzt (Hollmann et al., 1991). Der Kainat-Rezeptor ist ebenfalls für die schnelle Informationsübertragung verantwortlich, kann aber nicht so schnell wie der AMPA-Rezeptor desensitiviert werden (Abbildung 4).

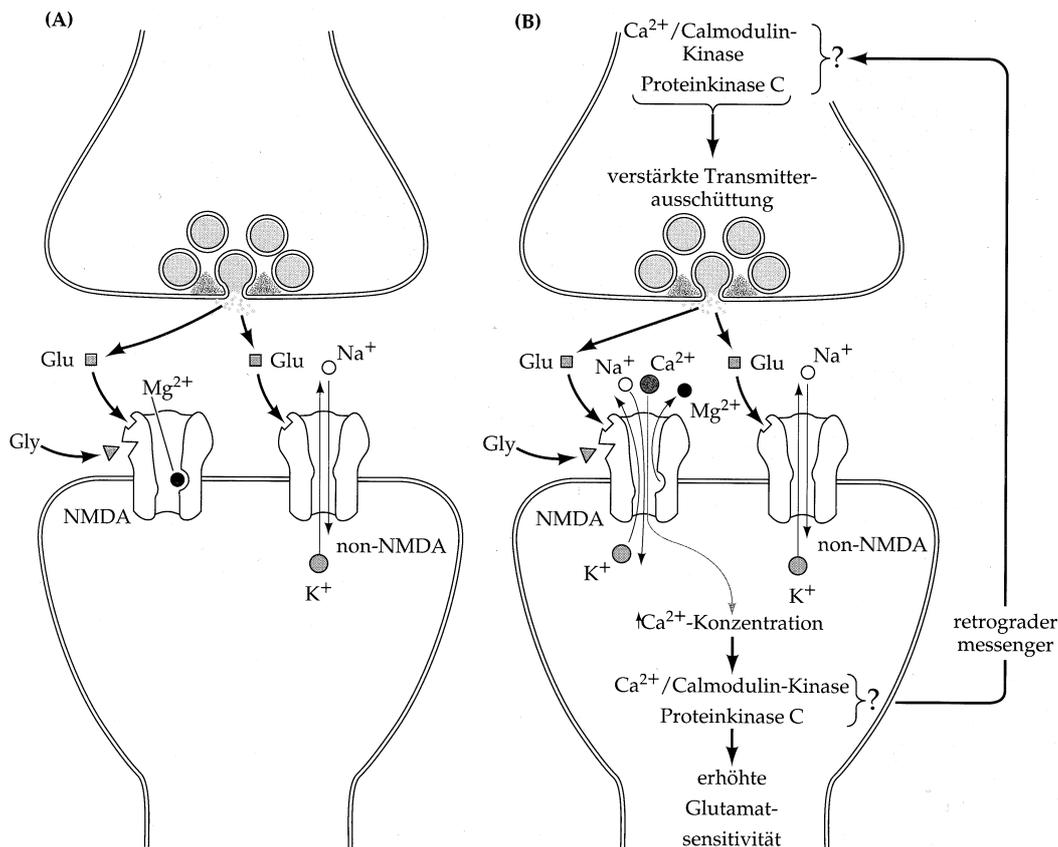


Abbildung 4: NMDA- und NON-NMDA-Glutamaterezeptoren. NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren sind direkt gekoppelte, ligandenaktivierte Kanäle, die permeabel für Kationen sind. (A) Wenn sich die Neuronen an ihrem Ruhepotential oder nahe daran befinden, fließt Strom durch die glutamataktivierten non-NMDA-Rezeptoren. Die glutamataktivierten NMDA-Rezeptoren führen jedoch nur wenig Strom, da die Kanäle durch Magnesiumionen blockiert sind. (B) Wird die Zelle genügend stark depolarisiert, treibt die Änderung des Membranpotentials das Magnesiumion aus dem Kanal des NMDA-Rezeptors. (Nach Kandel et al., 1991).

Obwohl die metabotropen Glutamaterezeptoren auch auf Glutamat reagieren, unterscheiden sie sich grundlegend von den ionotropen Glutamaterezeptoren. Sie sind Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie und haben eine völlig andere Struktur, andere physiologische und pharmakologische Eigenschaften und eine andere Funktion. Sie wirken modulierend und kommen sowohl prä- als auch postsynaptisch vor. Im Gegensatz hierzu kommen die ionotropen Glutamaterezeptoren vor allem postsynaptisch vor.

Neben seiner Rolle als Neurotransmitter kann Glutamat auch exzitotoxisch wirken (z. B. Rothman und Olney, 1986; Kiedrowski, 1998; Übersicht siehe Olney und Ishimaru, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß im Zentralnervensystem die Freisetzung eines Übermaßes an Glutamat bzw. sein verzögerter Abtransport in die Gliazellen zu einer verlängerten Depolarisation der ionotropen postsynaptischen Glutamaterezeptoren führt. Die damit

verbundenen längeren Öffnungszeiten der Ionenkanäle führen zu einem übermäßigen Na^+ -Einstrom und einem gleichzeitigen passiven Cl^- -Einstrom, was wiederum einem vermehrten Wassereinstrom in die Nervenzellen bewirkt. Das hierdurch hervorgerufene osmotische Ungleichgewicht, aber auch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, führt zu einer akuten Schwellung und eventuellen chronischen (irreversiblen) Defekten der postsynaptischen Nervenzelle (z. B. Olney, 1986; Rothman, 1985).

Die exzitotoxische Wirkung von Glutamat und seiner Agonisten NMDA, AMPA und Kainat konnte auch in der Cochlea des Säugers beobachtet werden. Es wurde eine dramatische Schwellung mit darauffolgender Zerstörung der afferenten Nervenendigungen unter den inneren Haarzellen festgestellt. Trotzdem konnte aber in den meisten Fällen innerhalb von wenigen Tagen eine Neubildung der terminalen Dendriten und eine funktionelle Restitution beobachtet werden (Pujol et al., 1985; 1991; Puel et al., 1991, 1995).

1.3 Fragestellung

Im Gegensatz zum Säuger geht beim Vogel die Regenerationsfähigkeit des Sinnesepithels während der Ontogenese nicht verloren. Traumata im Innenohr des Vogels, die durch Schall oder ototoxische Substanzen hervorgerufen werden, können somit zu Haarzellverlusten mit nachfolgender Haarzellregeneration führen (Übersicht siehe Cotanche, 1994 und 1999; Smolders, 1999). Die zerstörten und abgestoßenen Haarzellen werden durch neue ersetzt, die von proliferierenden und sich differenzierenden Stützzellen gebildet werden (Warchol und Corwin, 1996; Stone et al., 1996). Der durch die Gabe von ototoxischen Substanzen bzw. durch Schalltraumata hervorgerufene Hörverlust ist zwar nur vorübergehend, aber die Restitution des Hörvermögens bleibt trotz spontaner Regeneration der Haarzellen unvollständig. Als mögliche Ursachen kommen ein verändertes Innervationsmuster, eine eingeschränkte synaptische Verbindung zwischen Haarzellen und Nervenfasern sowie eine eingeschränkte Funktion der neuen Haarzellen in Betracht.

Aufgrund der Haarzellverluste degeneriert auch ein Teil der afferenten Nervenfasern und ein Teil dieser Afferenzen geht trotz Regeneration der Haarzellen verloren (Ryals et al., 1989; Hoidis et al., 1999). Dennoch werden die neugebildeten Haarzellen von afferenten und efferenten Nervenfasern kontaktiert und bilden mit diesen innerhalb von 10 Tagen neue

synaptische Kontakte aus (Ryals und Westbrook, 1994; Ofsie et al., 1997; Hennig und Cotanche; 1998). Allerdings scheint die Zahl der Synapsen und die Größe der synaptischen Kontakte reduziert zu bleiben (Ryals und Dooling, 1996). Nach schwerem Schalltrauma konnte bei der Taube beobachtet werden, daß eine bis mindestens vier Jahre nach dem Trauma fortschreitende Degeneration der Ganglienzellen stattfindet (Hoidis et al., 1999). Eine offene Frage ist aber, ob es Unterschiede in der Degeneration der Afferenzen nach Schalltrauma bzw. nach Aminoglykosid Behandlung gibt. Es konnte festgestellt werden, daß es nach Haarzellverlusten durch Aminoglykosidschädigung zu einem Verlust der synaptischen Kontakte zu den Haarzellen kommt, das Verteilungsmuster der Fasern aber entlang der Papilla bestehen bleibt. Bei schwerem Schalltrauma degenerieren auch die Nervenfasersfortsätze (Ofsie und Cotanche, 1996; Ofsie et al., 1997). Die Neubildung der efferenten Synapsen nach Haarzellregeneration ist nach Aminoglykosidtrauma langsamer als nach moderatem Schalltrauma (Wang und Raphael, 1996; Henning und Cotanche, 1998). Ob dies auch für die afferenten Kontakte gilt, ist jedoch nicht bekannt, da es bislang keine Marker für die afferenten Terminalen gibt (Ofsie et al., 1997).

Um die Frage zu beantworten, ob die Degeneration und Regeneration der Nervenfasern nach Schädigung des Innenohres beim Vogel von der vorübergehenden Abwesenheit der Haarzellen abhängt, bzw. ob die nach Haarzellschädigung und Regeneration beobachtete unvollständige Restitution des Hörvermögens bei alleiniger Nervenfaserschädigung ausbleibt, sollte in der vorliegenden Arbeit die exzitotoxische Wirkung von AMPA, einem Glutamat-Agonisten, ausgenutzt werden. Durch die Applikation von AMPA in das Innenohr kann eine selektive Schädigung der afferenten Nervenfasern erzielt werden, wie beim Säuger bereits gezeigt werden konnte (z. B. Puel, 1995). Ausgegangen wurde hierbei von der Annahme, daß Glutamat oder eine verwandte excitatorische Aminosäure ebenso wie beim Säuger (Altschuler, 1989; Klinke, 1986; Eybalin, 1993) der afferente Neurotransmitter der Haarzellen im Innenohr des Vogels ist und für die Erregungsübertragung an den afferenten Nervenendigungen verantwortlich ist. Um einen indirekten Nachweis für den nicht bekannten Neurotransmitter zu führen, wurde in einem ersten Schritt mittels immunhistochemischen Methoden untersucht, ob AMPA-Rezeptoruntereinheiten im Innenohr der Taube vorkommen. Der zweite Schritt bestand darin, die afferenten Hörnervenfasern durch Applikation von AMPA in den Recessus scalae tympani zu schädigen und die Hörverluste bzw. die Erholung des Hörvermögens durch Messung der Hörschwellenkurven und Einzelfaserableitungen zu ermitteln. Als letzter Schritt wurde durch die Erstellung von elektronenmikroskopischen Bildern die Physiologie mit der Morphologie korreliert.

II. Methoden

2.1 Das Versuchstier

Für die durchgeführten Experimente wurden Tauben (*Columba livia*) beiderlei Geschlechts in einem Alter von 0,5 bis 3 Jahren verwendet. Die Tiere, die von Züchtern aus Deutschland stammten, wogen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung zwischen 240 g und 610 g. Insgesamt wurden für die Experimente und die Entwicklung der verschiedenen Methoden 97 Tauben verwendet. Der Vorteil dieser Vogelart gegenüber anderen Arten wie z. B. dem Hühnchen oder Star liegt darin, daß sowohl Morphologie als auch die grundlegende Physiologie des Taubenohres bereits eingehend beschrieben worden sind (Takasaka und Smith, 1971; Sachs et al., 1974). Einen Tag vor der Versuchsdurchführung wurden die Tiere von den restlichen Tauben getrennt, um eine Nahrungsaufnahme vor der Narkose zu verhindern. Wasser wurde ad libitum gegeben.

2.2 Narkose und Beatmung

Bei allen durchgeführten Versuchen wurden die Tiere etwa 10 Minuten vor Einleitung der Narkose mit 0,2 mg/kg Atropinsulfat i.m. (0,5 mg/ml, Braun) prämediziert. Für die routinemäßig durchgeführten Audiogrammessungen mit den für Langzeitmessungen vorgesehenen Tieren, wurden die Tauben mit einer Mischung aus 20 mg/kg Xylazin (Rompun[®] 2 %, Bayer) und 62,5 mg/kg Ketamin-Base (Ketavet[®] 50 mg/ml, Parke-Davis) narkotisiert. Die Narkose mußte hierfür nur ein bis zwei Stunden anhalten. Falls nötig, wurden noch 20 % der Initialdosis injiziert.

Die Tiere, die direkt nach dem Versuch getötet wurden bzw. die über den Zeitraum von bis zu 10 Stunden in Narkose gehalten werden sollten, wurden mit Pentobarbital (Nembutal[®], Sanofi 4 mg i.m.) betäubt. Während der Pentobarbitalnarkose ist eine künstliche Beatmung notwendig. Zu diesem Zweck wurden die Tauben nach Einleitung der Narkose (durch das gleiche Rompun/Ketanest-Gemisch wie oben beschrieben) tracheotomiert. Nachdem zwei Abflußröhrchen in die abdominalen Luftsäcke eingeführt worden waren, wurde die Lunge mit einem angefeuchteten Gasgemisch (96% O₂, 4% CO₂, 0,25 l/min) durchströmt (Schermuly und Klinke, 1982). Der Beatmungsdruck wurde über ein Manometer überwacht.

Da die Lunge der Vögel nicht blind geschlossen ist, sondern als Röhrenlunge ausgebildet ist, konnte nach Eröffnung der abdominalen Luftsäcke auf eine Wechselbeatmung verzichtet werden (Schermyly und Klinke, 1982; Powell, 1983). Als Erhaltungsdosis der Narkose wurde den Tieren 20 % der Ausgangsdosierung gegeben.

Um die Narkosetiefe zu überprüfen, wurde von Zeit zu Zeit der Schmerzreflex durch Zwicken im Zwischenzehbereich überprüft. Durch das angeschlossene EKG wurde zusätzlich der Allgemeinzustand sowie die Tiefe der Narkose der Tiere überwacht. Hierfür wurden je ein isolierter Silberdraht in der Haut oberhalb des Brustmuskels und am linken Fußballen befestigt. Zur Erhaltung der Körpertemperatur wurden die Tauben auf ein Heizkissen von 40,5 °C gelegt.

2.3 Präparation

Den Tauben, bei denen die Messung der Summenaktionspotentiale des Hörnervens nur für einige Stunden durchgeführt werden sollte und die danach sofort getötet wurden, wurden zwei Silberdrahtelektroden implantiert (0,125 mm). Dafür wurde die Kopfhaut des in einem Kopfhörer fixierten Schädels entfernt und die darunterliegende Halsmuskulatur vom Schädel abpräpariert. Dann wurde der Schädel am Os occipitale über dem Mittelohr mit Hilfe feiner Pinzetten und Skalpelle geöffnet, so daß die Elektroden auf das sichtbar gewordene runde Fenster gelegt und mit Histoacryl (Braun) an der Schädeldecke befestigt werden konnten.

Bei den Tauben, bei denen die CAP (Compound action potential) Audiogramme über einen längeren Zeitraum (3 - 4 Monate) hinweg gemessen werden sollten, wurde ein kleiner Stecker (0,7 g) auf den rostralen Teil des Frontalbeins geschraubt. Für diese Langzeitmessungen wurden statt Silberdrahtelektroden Golddrahtelektroden (0,125 mm) implantiert. Die Elektroden wurden an den Stecker gelötet und sowohl das Loch im Os occipitale als auch der Stecker selbst wurden zum Abschluß der Präparation mit Paladur[®] (Heraeus) geschlossen bzw. befestigt. Danach wurde die Haut mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (2metric, 3-0 USP, Resorba) geschlossen. Zur Infektionsprophylaxe bekamen die Tiere drei Tage lang 0,5 ml Ampicilin i.m. (Binotal[®], Grünethal, 50 mg/0,5ml) appliziert.

Für die Applikation der verschiedenen Lösungen in das Innenohr der Taube wurde eine kleine Öffnung (0,3 mm) in die dorsolaterale Wand des Recessus Scala tympani präpariert und die

unter dem Knochen liegende häutige Auskleidung vorsichtig entfernt. Dieses Loch wurde nach Infusion der Lösungen wieder mit Paladur[®] geschlossen.

Für die Einzelzelleableitungen aus dem Ganglion cochleare wurde der Stecker vorsichtig vom Kopf der Tiere gelöst und ein Kopfhalter auf der gesäuberten Schädeloberseite mit Histoacryl und Zahnzement befestigt. Daraufhin wurden die alten Wunden geöffnet, so daß der Recessus Scalae tympani sichtbar wurde. Die Öffnung in dem Recessus wurde jetzt aber deutlich erweitert (0,6 - 0,8 mm), um möglichst viel Fläche für die Einführung der Ableitelektroden zu bekommen. Das Ganglion cochleare wurde nach dieser Präparation aufgrund der Myelinisierung der Fasern als weißes Band in der Tiefe sichtbar.

2.4 Messung der Summenaktionspotentiale der Hörnervenfasern (CAP's)

2.4.1 Akustische Reizung

Für die CAP-Audiogrammermittlung wurden als Schallreize gaußförmige Tonpulse mit einer festen spektralen Bandbreite von 2/3 Oktaven und einer Trägerfrequenz zwischen 0,125 und 8 kHz benutzt. Die gesamte Schwellenkurve wurde mit jeweils 3 Frequenzpunkte pro Oktave ermittelt. Bei der Bestimmung der Intensitätskennlinien, d. h. bei der Bestimmung der Amplitude der Summenaktionspotentiale bei unterschiedlicher Reizintensität wurde eine Intensitätsauflösung von 5 dB ausgewählt. Die Trägerfrequenz lag hier zwischen 0,125 und 5,656 kHz mit einer Auflösung von einem Schritt pro Oktave. Pro Frequenz und Intensität wurden 500 ms lange Tonbursts angeboten. Die Schallintensität lag zwischen 20 und 140 dB SPL.

Die akustischen Reize wurden über einen Kopfhörer (Beyer DT 48) gegeben, an den ein konischer Adapter angebracht war, um direkt mit dem Gehörgang der Taube in Verbindung zu stehen. Das Signal wurde von einem Signalgenerator (DSP-Prozessor) erzeugt und mit Hilfe eines D/A Wandlers (Tucker Davies) ausgegeben. Es konnte über einen Abschwächer in seiner Intensität reguliert und durch einen Verstärker verstärkt werden.

Alle Messungen wurden in einer schallisolierten Kammer durchgeführt.

2.4.2 CAP-Ableitung

Über die CAP-Elektrode am runden Fenster wurde die Reizantwort zu einem Verstärker geleitet. Hier wurde die Antwort um bis zu 80 dB (Faktor 10.000) auf ca. 0,1 V verstärkt und im Frequenzbereich von 0,3 bis 3 kHz gefiltert. In diesem Frequenzbereich liegt die Hauptenergie des Summenaktionspotentials. Mit Hilfe eines A/D-Wandlers in einem Personal Computer wurden die Signale mit einer Abtastrate von 20 kHz digitalisiert.

Die durch einen gegebenen Schallreiz hervorgerufene Aktivität des Hörnervens wurde mit der Aktivität des Hörnervens verglichen, bei der kein Schallreiz gegeben wurde. Dafür wurde die Aktivität des Hörnervens in zwei Zeitfenstern mit einer jeweiligen Dauer von 20 ms von dem Rechner aufgenommen. Im ersten Reizfenster befand sich die Reizantwort auf den Schallreiz und das Rauschen, im zweiten Fenster nur das Rauschen. Als Rauschen werden spontane neuronale Aktivitäten aus dem Hörnerv, sowie körpereigene Geräuschquellen des Tieres und externe Geräuschquellen bezeichnet. Verglichen wurden die maximalen Amplituden der Signale in den beiden Fenstern. Bei Auftreten eines Summenaktionspotentials war die Amplitude im Reizantwortfenster größer als diejenige im Fenster ohne Antwort. Dieser Vergleich wurde bei verschiedenen Frequenzen und Schallintensitäten durchgeführt.

Zur Elimination der Mikrofonpotentiale (ein durch den Rezeptorstrom in den Haarzellen verursachtes Potential) wurde jeder Reiz zweifach angeboten, einmal mit normaler Polarität und einmal invertiert. Durch Addition der beiden Reizantworten wurden die Mikrofonpotentiale aus der Antwort eliminiert. Somit blieb nur das Summenaktionspotential und das Grundrauschen übrig. Bei gegebener Reizträgerfrequenz wurde nun die Reizintensität so lange verändert, bis in 75 % der Fälle die CAP-Antwort größer war als das Grundrauschen (gemessenen ohne Reiz). Mittels einem speziellen Suchalgorithmus (PEST, Taylor und Creelman, 1967) wurde für jede gegebene Frequenz ausgehend von einem beliebigen Schalldruckpegel bestimmt, ob eine Reizantwort vorhanden war oder nicht. Hierfür wurde der Schalldruck in 12 dB-Schritten erhöht bzw. erniedrigt, bis der Reiz überschwellig bzw. unterschwellig wurde. Dann wurde die Schrittgröße halbiert und die Messung in entgegengesetzter Richtung fortgeführt, bis die Reizantwort unterschwellig bzw. überschwellig wurde. Bei jeder Schwellenüberschreitung wurde die Schrittgröße weiter halbiert und die Schrittrichtung gewechselt. Die Messung wurde beendet, wenn die Schrittgröße von 1 dB halbiert werden sollte. Somit wurde die Hörschwelle für die entsprechende Frequenz definiert.

Mit Hilfe eines sequentiellen statistischen Tests (Wald, 1947), bei dem nicht eine feste Zahl von Stichproben gemessen wird, sondern nach jeder Ziehung die Signifikanz der Aussage getestet wird und der Test abgebrochen wird, wenn die vorausgestellte Signifikanz (in unserem Fall 10 %) erreicht wird, wurde die Zahl der benötigten Reize, und somit die Meßzeit minimiert (siehe auch Smolders, 1995).

2.5 Einzelfaserableitungen aus dem Ganglion cochleare

2.5.1 Akustische Reizung

Zum Auffinden der Hörnervenfasern wurden weiße Rauschpulse mit ca. 80 dB SPL von einem Rauschgenerator (Noise Generator, Brüel & Kjar Type 1405) auf den Lautsprecher übertragen. Über eine Torschaltung (Eigenbau) wurde die Pulsdauer sowie die An- und Abstiegszeit moduliert. Wurde eine Faser gefunden (s. u.), wurde ihre charakteristische Frequenz audiovisuell bestimmt, manuell über einen Sinus-Frequenz-Generator (Signal Source, Brookdeal Type 471) eingestellt und die Frequenzabstimmkurven rechnergesteuert ermittelt. Zur Ermittlung der Frequenzabstimmkurven wurde ein reiner Sinustonpuls von 50 ms mit einer Taktdauer von 170 ms generiert (Rockland Frequency Synthesizer 5100, Wavetek). Durch einen Signalgenerator (Arbitrary Waveform Generator 75A, Wavetek) wurde der Ton moduliert (\sin^2) und die An- und Abstiegszeit auf jeweils 2 ms festgelegt.

Als Lautsprecher wurde ein invers betriebenes ½ Zoll Kondensatormikrofon (Brüel & Kjaer Typ 4166) über einen Kuppler mit dem äußeren Gehörgang verbunden. Der Schalldruck wurde mit Hilfe eines zweiten Mikrophons (Sennheiser, KE 4-211), dessen Frequenzbereich zwischen 0,02 und 20 kHz lag, und einer 12 mm langen Sonde ca. 1 mm vor dem Trommelfell gemessen. Um Resonanzmaxima und –minima gering zu halten, wurde diese Sonde mit Baumwollfasern akustisch gedämpft. Über einen Verstärker wurde der gemessene Schalldruck an ein Schallanalyse-Gerät (Spectral Analyzer Stanford Research 760) weitergeleitet. Dieser stellte mit Hilfe der Fast-Fourier-Transformation die Spannung des Mikrophons zwischen 0 und 12,5 kHz dar. Die Sensitivität des Mikrophons wurde vor Beginn der Versuchsreihe anhand eines Pistophons (Brüel & Kjaer Typ 4220) mit kalibrierten Schalldruck (123,8 dB) bestimmt. Sie betrug 9,98 mV/Pa. Mit Hilfe dieses Wertes ließ sich

der aufgezeichnete Schalldruck aus der Dimension mV/Pa in mV/dB SPL umrechnen und der Schalldruck des Systems in Abhängigkeit der Frequenz bestimmen.

2.5.2 Ableitung der neuronalen Aktivität von Einzelfasern

Die Ableitung der Aktivität von Einzelfasern aus dem Ganglion cochleare erfolgte mit Glaskapillarelektroden (Aluminiumsilikat \varnothing 1,5mm/1 mm, Sutter Instruments Co.). Die Elektroden wurden mit Hilfe eines „Zeitz Puller“ (München) gezogen und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der Widerstand der gefüllten Elektroden lag bei 30 - 60 M Ω . Die Elektroden wurde an einem Mikromanipulator befestigt, mit dem sie in X-Y-Z-Richtung bewegt werden konnten. Die X- und Y-Richtung wurde manuell eingestellt und der Vortrieb in Z-Richtung durch einen Mikrostepper (Piezo Manipulator, PM10) bedient. Die Penetrationsstelle wurde visuell bestimmt. Als indifferente Elektrode diente ein Silberdraht, der mit Ringerlösung getränkter Gaze umwickelt war. Dieser lag subcutan über der Halsmuskulatur. Die Antworten der Neurone wurden über einen Mikroelektrodenverstärker (BA-1SF, npi) um das 10-fache verstärkt. Über einen direkten Ausgang wurde die Membranpotentialänderung auf dem Oszilloskop sichtbar gemacht. Über einen zweiten Ausgang wurde die Reizantwort zwischen 0,1 und 3,3 kHz gefiltert, auf das Oszilloskop übertragen und dort nochmals verstärkt. Mit Hilfe eines Fensterdiskriminators (Eigenbau) wurde das analoge Signal in TTL-Pulse (technische Impulse) umgewandelt, um die Aktionspotentiale zählen zu können. Die Triggerschwelle konnte manuell auf die Amplitude der jeweiligen Aktionspotentiale eingestellt werden. Die technischen Impulse wurden an einen Computer zur Datenaufnahme und -analyse weitergeleitet.

Ermittelt wurde die über 10 Sekunden gemittelte Spontanentladungsrate der Neurone. Anschließend wurde die schallevozierte Aktivität und die Frequenz-Intensitäts-Antwort aufgenommen. Die Entladungsrate während eines 50 ms Tonburstreizes wurde jeweils absteigend in der Frequenz und aufsteigend in der Intensität für jedes Frequenz-Intensitäts-Paar gemessen. Hier lag die Frequenzauflösung bei 6 oder 12 Schritten pro Oktave, die Intensitätsauflösung bei 2 oder 5 dB. Während des Versuchs wurde ebenfalls die charakteristische Frequenz (CF), die Schwelle bei der CF sowie die Frequenzabstimmungskurve (Tuningkurve, d. h. die Reizschwelle des Neurons in Abhängigkeit der Reizfrequenz) des Neurons mit einem dafür angefertigten Computerprogramm bestimmt. CF bezeichnet die Frequenz, bei der mit geringster

Schallintensität noch eine Erhöhung der Entladungsrate auftrat. Dieser minimale Schalldruckwert wird die Schwelle des Neurons genannt.

2.6 AMPA-, NMDA- und Hanks-Applikation

Die Infusion von Lösungen in die Scala tympani geschah über eine Öffnung im Recessus Scalae tympani. Verwendet wurden insgesamt drei verschiedene Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Zum einen wurde künstliche Perilymphe infundiert (Hanks, Sigma). Zum zweiten wurde (S)-AMPA (Tocris-Neuramin) gelöst in Hanks als 0,1mM, 0,5 mM, 1mM und 10mM Lösung in den Recessus scalae tympani infundiert und als dritte Lösung 10mM NMDA (Sigma) ebenfalls in Hanks gelöst. Die jeweiligen Lösungen wurden als 10mM Stocklösung bei – 20°C aufbewahrt und erst direkt vor Versuchsbeginn aufgetaut und auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Infusion mittels eines Perfusers (Harvard Apparatus) erfolgte für alle Lösungen mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 µl/min und dauerte 15 Minuten. Vor und nach der Infusion wurde mit einem zurechtgeformten Papiertuch etwas Perilymphe abgesaugt, um die Verteilung der infundierten Lösung in dem Recessus zu verbessern, bzw. um das Loch im Recessus nach der Infusion besser mit Paladur[®] verschließen zu können.

2.7 Immunhistochemische Methoden

2.7.1 Präparation, Fixierungsbedingungen und Herstellung von Gefrierschnitten für die Lichtmikroskopie

Für den Nachweis der Glutamat-Rezeptoruntereinheiten 1-4 (GluR1-4) mit immunhistochemischen Methoden wurden Gefrierschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Tiere dekapitiert, die Cochleae aus dem Felsenbein freipräpariert und für 20 min in 4 %igem Formaldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 4°C) fixiert. Die Feinpräparation, bei der die Cochlea aus der sie umgebenden Knochenwand gelöst wurde, erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) bei Raumtemperatur. Danach wurden die Cochleae gefriereschützt, indem sie 1 Stunde in 10 %iger Sucrose-Lösung (in 0,1 M PB), eine weitere Stunde in 20 %iger Sucrose-Lösung (in 0,1 M PB) bei Zimmertemperatur auf dem Schüttler aufbewahrt wurden und über Nacht in 30 %iger Sucrose-Lösung (in 0,1 M PB) bei 4°C

blieben. Die so behandelten Cochleae wurden anschließend zur Herstellung von Gefrierschnitte verwendet.

Nach 15 minütiger Inkubation im Einbettmedium (Tissuetec Freezing Medium, Reichert Jung) wurde die Cochlea mit einer geringen Menge Einbettmedium auf den Schneidetisch eines Kryostats (Leica 3000 CM) aufgefroren und entlang der dorsoventralen und mediolateralen Achse geschnitten (Schneidetemperatur -18°C). Die $20\ \mu\text{m}$ dicken Gefrierschnitte wurden auf gelatinierten Objektträgern (0,5 % Gelatine in destilliertem Wasser) gesammelt und, nachdem die Präparate eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet waren, bei -20°C bis zu ihrem Gebrauch gelagert.

2.7.2 Immunfärbung

Für die Durchführung der immunhistochemischen Reaktion wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem Fettstift umrandet und 3 x 10 Minuten in 0,1 M PB gespült. Anschließend wurden unspezifisch bindende Proteingruppen im Gewebe durch eine einstündige Inkubation in der Präinkubationslösung (10 % Ziegen Serum, 1 % Rinderalbumin, 0,5 % Triton X-100 in 0,01 M Phosphatpuffersaline (PBS)) abgesättigt und dann die Gefrierschnitte in Erstantikörperlösung (3 % Ziegen Serum, 1 % Rinderalbumin, 0,05 % Natriumazid, 0,5 % Triton-X-100 in 0,01 M PBS) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper waren wie folgt konzentriert: GluR1 (Chemicon) 1:100; GluR2/3 (Chemicon) 1:250 und 1:750, GluR4 (Chemicon) 1:500 und 1:1.000. Der Erstantikörper erkennt und bindet spezifisch an einen Teil der Aminosäuresequenz des gewünschten Proteins. Nach drei zehnminütigen Waschschrritten in PB wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern detektiert. Verwendet wurden hierfür Ziege gegen Kaninchen IgG's die an Cy3™ (Verdünnung 1:1.000, Carboxymethylindocyanine 3, rote Fluoreszenz, Dianova) oder ALEXA™ 594 (Verdünnung 1:500, rote Fluoreszenz, Molecular Probes) gekoppelt waren. Nach zwei Stunden Inkubation in dem Zweitantikörperserum (3 % Ziegen Serum, 1 % Rinderalbumin, 0,5 % Triton X-100 in 0,01 M PBS) wurden die Schnitte ein weiteres Mal 3 x 10 Minuten in 0,1 M PB gespült und dann in Mowiol (Hoechst) eingebettet.

Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit einem Zeiss Photomikroskop untersucht und photographiert (Axiophot, Zeiss), wobei x40, x63 und x100 Vergrößerungen und die

entsprechenden Fluoreszenzfilter gewählt wurden (Cy3/ALEXA BP „band pass“ 546; FT „filter transmission“ 580, LP „low pass“ 590, Wellenlänge in nm). Für die Schwarzweißaufnahmen wurde ein Kodak TMY 400 Film verwendet. Um ausschließen zu können, daß eine beobachtete Färbung nicht einer Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit bestimmten Strukturen innerhalb des Gewebes herrührt, wurden die einzelnen Färbungen zur Kontrolle auch ohne Erstantikörper durchgeführt. Diese Negativkontrollen ergaben bei keinem Färbeansatz unspezifische Markierungen.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit SDS-Acrylamidgelen. Zur Aufbereitung der Proben wurden die Cochleae und Cerebellum zügig entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Homogenisierungspuffer (0,242g 20 mM Tris, pH 8, 0,177g 137 mM NaCl, 1g 1 % NP-40, 10g 10 % Glycerol pro 100 ml) homogenisiert. Zu dem Homogenisierungspuffer wurde noch 2 mM Protease-Inhibitor (Pefabloc) hinzugefügt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 2000g und 4 °C wurde der Überstand erneut für 15 min bei 13.000g zentrifugiert. Das vor allem die Membranproteine enthaltende Pellet wurde in SDS-haltigem Probenpuffer (250 mM Tris/HCl, 25 % Glycerin, 12,5 % β -Mercaptoethanol, 7,5 % SDS, 0,25 mg/ml Bromphenolblau) resuspendiert und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Durch das Aufkochen der Proben in einem reduzierenden Puffer wurden diese denaturiert, reduziert und erhielten durch die Anlagerung von SDS eine vom Molekulargewicht abhängige negative Ladung. Somit konnten sie im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Die Auftrennung erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (4 % Sammelgel und 7,5 % Trenngel). Das Trenngel wurde nach Zugabe vom TEMED (Katalysator) und Ammoniumpersulfat (Radikalstarter) in die Gelgießkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurden das Sammelgel zugegeben und die Probetaschen eingesteckt. Es wurden je 5-10 μ g Protein/Spur für Cochlea und Cerebellum aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurden Proteine mit einem bekannten Molekulargewicht als Eichstandart mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x TGS-

Laufpuffer mit einer Spannung von 70 V für das Sammelgel, bzw. von 120 V für das Trenngel, durchgeführt.

2.8.2 Proteintransfer auf Membranen

Die Western-Immuno-Blot genannte Methode ermöglicht es, mittels der SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, um sie anschließend mit Hilfe von immunologischen Methoden zu analysieren. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine Lage in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Darauf kam ein in Transpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin in 20 % Methanol) getränktes Nitrozelluloseblatt, gefolgt von einer weiteren Lage getränktes Whatmanpapier. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotkammer (Trans-Blot-SD, Biorad) für ca. 50 min bei 200 mA.

2.8.3 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran konnten spezifisch Proteine mittels Primär- und Sekundärantikörper identifiziert werden. Die Transfermembranen wurde hierzu für eine Stunde bei RT in Blockpuffer (2 % Milchpulver und 0,1 % Tween20 in PBS, pH 7,4) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach wurde über Nacht bei 4 °C mit Erstantikörper in Blockpuffer inkubiert. Die Konzentration der Erstantikörper gegen die AMPA-Rezeptoruntereinheiten (Chemicon) betrug 1 µg/Protein/ml für die polyklonalen Antiseren (in PBS, 0,2 % Milchpulver, 0,1 % Tween20). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween20, pH 7,4) für jeweils 10-15 Minuten wurde der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper (BIO-RAD, Hercules, CA) in Blockpuffer (1: 10.000) zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST (10-15 Minuten) wurde abschließend mit TBS (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen (5 Minuten), um Detergentien zu entfernen. Zur Visualisierung der Antikörper wurde ein Chemolumineszenzverfahren (DuPont, NEN, Boston, MA) verwendet. Das Enzym Meerrettich Peroxidase setzt hierbei ein Substrat um, welches bei diesem Vorgang Licht emittiert. Das emittierte Licht konnte durch

Auflegen eines Röntgenfilms (Kodax Biomax) nachgewiesen werden. Als weitere Kontrolle für die Spezifität der Antikörper wurde parallel zu diesem Westernblot unter den selben Bedingungen ein Westernblot mit dem Cortischen Organ der Ratte durchgeführt.

2.8.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford und wurde mit einem fertigen Proteinbestimmungs-Kit für detergentienfreie Proteinlösungen (Bio-Rad Protein Assay) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.5 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde nach Barker und Shooter (1994) durchgeführt, wobei 10 - 50 µg Protein pro Antigen-Nachweis verwendet wurde. Die Proteinkonzentration der verwendeten Cochleae wurde nach einer Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die Antigen-Antikörper Komplexe wurden mit Agarose konjugiertem Ziege gegen Kaninchen IgG (Sigma, St. Louis, MO) gefällt. Die Auftrennung und Detektion der Immunopräzipitate erfolgte nach der gleichen Methode, wie sie bei den Westernblots verwendet wurde. Sowohl bei dem Westernblot als auch bei der Immunpräzipitation wurde in einem weiteren Experiment der Erstantikörper weggelassen, um zu überprüfen, ob eine unspezifische Färbung durch die Zweitantikörper auftritt.

2.9 Elektronenmikroskopische Methoden

2.9.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Korrelation der physiologischen Daten mit den morphologischen Veränderungen des Innenohrs wurden von den Tieren, deren Ohren mit AMPA infundiert worden waren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infusion (Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14) Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie angefertigt. Zusätzlich wurden von den Ohren zweier unbehandelter Tiere Kontrollpräparate angefertigt. Hierfür wurden die Cochleae aus dem Felsenbein herauspräpariert und über Nacht in Fixativ (2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB, pH 7,4) bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Cochleae in 0,1 M PB

feinpräpariert und dann eine Stunde in 2 % Osmiumtetroxid unter dem Abzug oxidiert. Nach dem Waschen in 0,1 M PB wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% Ethylalkohol dehydriert und in EPON (Epoxidharz) eingebettet. Das Einbettungsmedium wurde nach einem Standardrezept gemischt (6g EPON 812, 3,3g DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid) und 1-2 g DMP-30 (2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol). Bei einigen Präparaten wurde zu dem 70 %igem Alkohol noch Uranylacetat für eine stärkere Kontrastierung zugesetzt. Die dehydrierten Präparate wurden nacheinander für 2 x 20 Minuten in Propylenoxid, für 12-16 Stunden in Mischung I (Propylenoxid zu Harz 1:1), für 4-6 Stunden in Mischung II (Propylenoxid zu Harz 1:3) und für 2-4 Stunden in reinem Harz bei Raumtemperatur eingebettet. Die Aushärtung für mindestens 48 Stunden erfolgte in einer Gelatine kapsel bei 60 °C.

Es wurden jeweils einige Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 50-70 nm von der Basis, der Mitte und dem Apex der Cochlea am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert) angefertigt, um einen Überblick über das Ausmaß der Schädigung in den verschiedenen Bereichen der Cochlea zu erhalten. Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 CKR) untersucht und fotografiert. Von einem Teil der Schnitte wurden auch computergesteuerte digitale Aufnahmen gemacht.

2.9.2 Scanningelektronenmikroskopie (SEM)

Um einen Gesamtüberblick zu erhalten, wie die Oberfläche der Basilarmembran 14 Wochen nach der AMPA-Behandlung aussah, wurden die Cochleae von drei Tieren nach den Einzelfaserableitungen für die Scanningelektronenmikroskopie präpariert. Hierfür wurden die Cochleae aus dem Felsenbein herauspräpariert und über Nacht in Fixativ (2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB, pH 7,4) bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Cochleae in 0,1 M PB gewaschen und dann eine Stunde in 2 % Osmiumtetroxid unter dem Abzug oxidiert. Nach dem Waschen in 0,1 M PB wurden der Knochen überhalb der Scala vestibuli, das Tegmentum vasculosum und die Tektorialmembran entfernt. Daraufhin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% Ethylalkohol dehydriert und mit der „Kritischen-Punkt-Methode“ in CO₂ getrocknet (Pelco CPD2). Alle Cochleae wurden auf einen Aluminiumblock aufgeblockt und mit einem Gold/Paladium Gemisch beschichtet. Die Präparate wurden mit einem Hitachi S500 Scanning Elektronenmikroskop untersucht und fotografiert. Es wurden jeweils 5 bis 6 Bilder erstellt,

die mittels eines Softwareprogramms zu einer Oberflächenansicht der Basalmembran zusammengesetzt wurden.

2.10 Statistische Auswertung

Statistische Test wurden auf einem Computer mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes MS Excel 97 (Microsoft GmbH) ausgeführt. Für die statistische Auswertung aller Daten wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung errechnet. Die Daten wurden zunächst mit dem F-Test (Sachs, 1999) auf dem 10% Niveau auf Varianzgleichheit geprüft. Zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwertunterschieden nicht verbundener (unpaariger) Daten (Frequenzpunkte der behandelten und unbehandelten Gruppe) wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Bei gleichen Varianzen wurde der homoskedastische t-Test und bei ungleichen Varianzen der heteroskedastische t-Test durchgeführt.

Zur Berechnung der Abhängigkeit von SR, Q_{10dB} und Schwelle sowie der Zeitkonstante wurde eine lineare Regressionsanalyse (least-square fit) durchgeführt (Sachs, 1999).

Für den Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften der auditorischen Neurone der Kontrollgruppe mit denen der AMPA-Tieren wurde der gleitende Mittelwert als Funktion der CF berechnet. Hierfür wurden die Werte der Neurone, deren charakteristische Frequenz in einem Fenster von 0,5 Oktaven über bzw. unter dieser CF lagen ohne Gewichtung gemittelt. Diese Mittelung wurde mit einer Schrittweite von 0,3 Oktaven über den gemessenen Frequenzbereich durchgeführt und die Mittelwerte gegen die charakteristische Frequenz aufgetragen. Für jedes Frequenzfenster wurde die Standardabweichung berechnet und ein unpaariger heteroskedastischer t-Test zum Vergleich der Werte des gleitenden Mittelwertes unbehauelter und behauelter Tiere durchgeführt.

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$: schwach signifikant) und 1 % ($p < 0,01$: signifikant) angenommen.

III. Ergebnisse

3.1 Glutamatrezeptornachweis in Gefrierschnitten der Vogelcochlea

3.1.1 Nachweis der Glutamatrezeptoruntereinheiten 1-4 (GluR1-4)

Zur besseren Orientierung ist in Abbildung 5 ein schematischer Querschnitt durch die Papilla basilaris abgebildet.

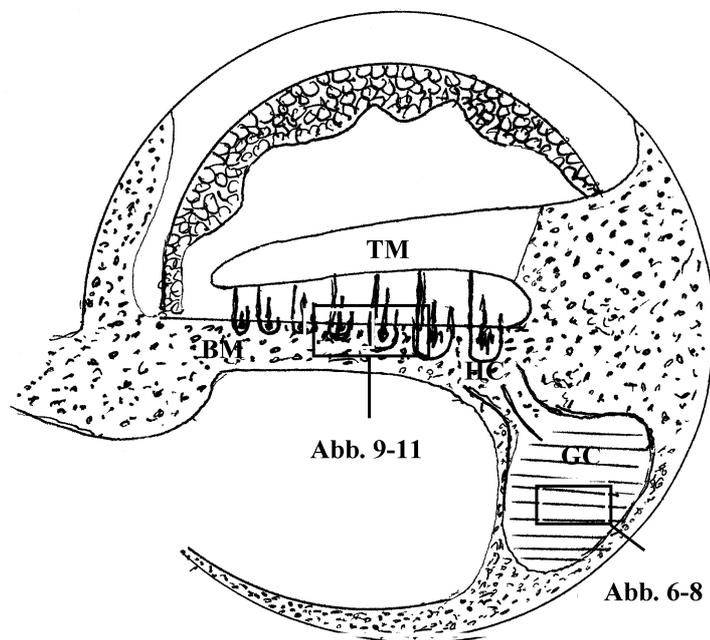


Abbildung 5: Schematische Abbildung eines Querschnitts der Papilla basilaris der Taube. BM: Basilarmembran; GC: Ganglienzellen; HC: Haarzellen; TM: Tektorialmembran.

Die immunhistochemische Färbung der AMPA-Rezeptoruntereinheiten an vertikalen Gefrierschnitten der Taubencochlea ist in den Abbildungen 6 - 10 dargestellt. Abbildung 11 zeigt einen horizontal angeschnittenen Schnitt. Deutliche Immunreaktivität für die Rezeptoruntereinheiten GluR2 und GluR3 konnte auf den Ganglienzellen gefunden werden. In Abbildung 5 ist ein Ausschnitt aus dem Ganglion mit vielen einzelnen Zellen zu sehen. Die Zellkörper weisen eine deutliche punktförmige Rezeptormarkierung auf. Am Rande der Bildausschnitte ist eine homogene, viel hellere Färbung der Zellkörper zu sehen. Diese kommt durch die gewählte Focusebene zustande. Abbildung 7 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 6.

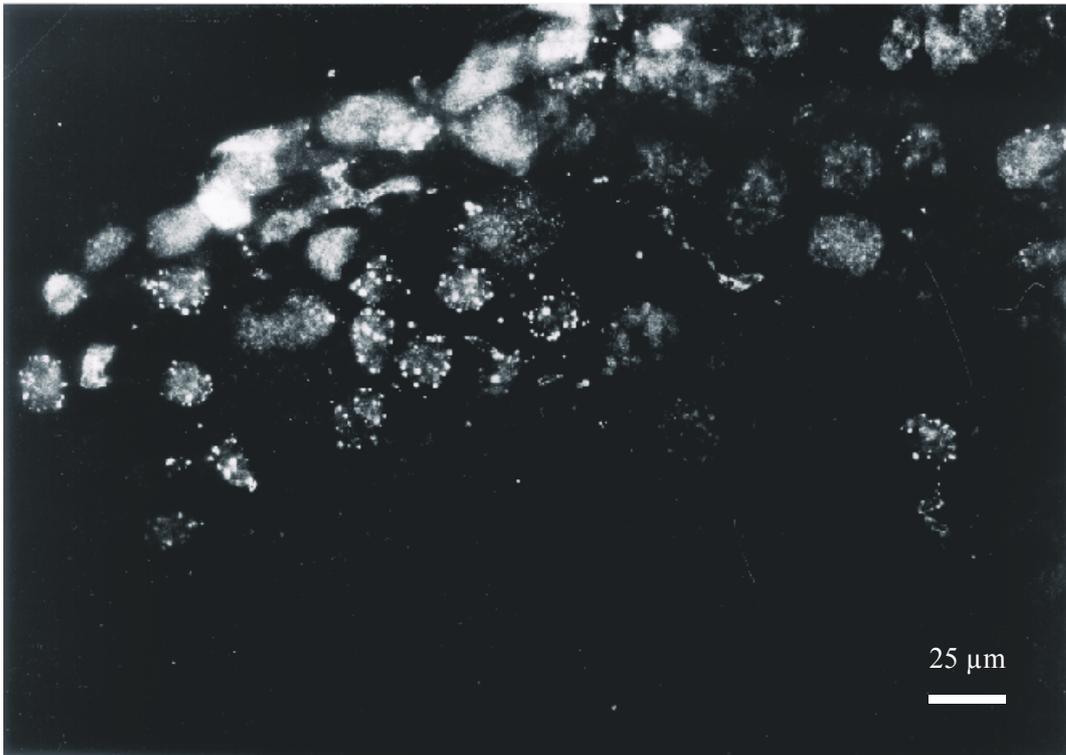


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme von vertikalen Gefrierschnitten durch die Cochlea der Taube. Der Schnitt wurden mit Antiseren gegen die AMPA-Rezeptoruntereinheit 2 und 3 inkubiert. Deutlich zu erkennen sind die punktförmig angefärbten Zellkörper der Ganglienzellen.

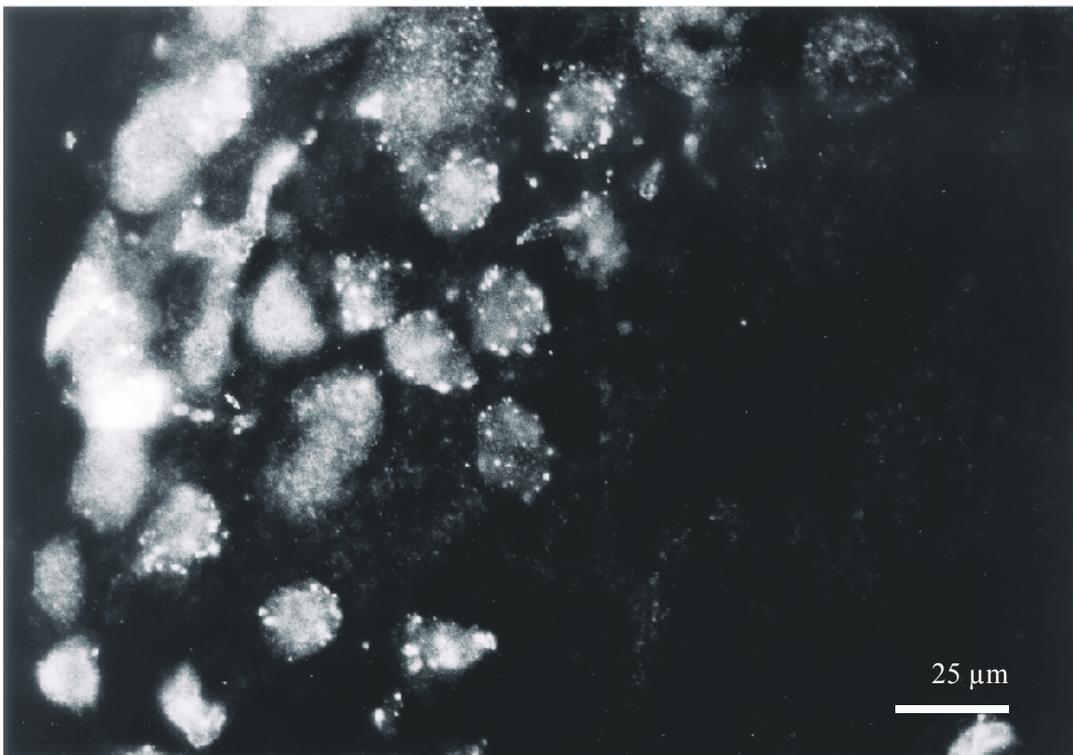


Abbildung 7: Abbildung 7 ist eine Vergrößerung der Abbildung 6.

Auch für die Rezeptoruntereinheit GluR4 konnte eine deutliche Immunreaktivität auf den Ganglienzellen nachgewiesen werden. Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt aus dem Ganglion

der Taube. Zu erkennen ist wiederum die punktförmige Rezeptormarkierung auf den Zellkörpern der Ganglienzellen. Beim Vergleich der immunhistochemischen Rezeptormarkierung für GluR2/3 und GluR4 auf den Ganglienzellen fällt die unterschiedliche Verteilung der Markierung auf. Schnitte, die mit dem anti-GluR4 Antiserum inkubiert wurden, zeigen eine gleichmäßig auf dem Zellkörper verteilte Färbung (Abb. 8), während bei mit GluR2/3 inkubiertem Gewebe die Färbung am Rande der Zellmembran lokalisiert ist (Abb. 9).

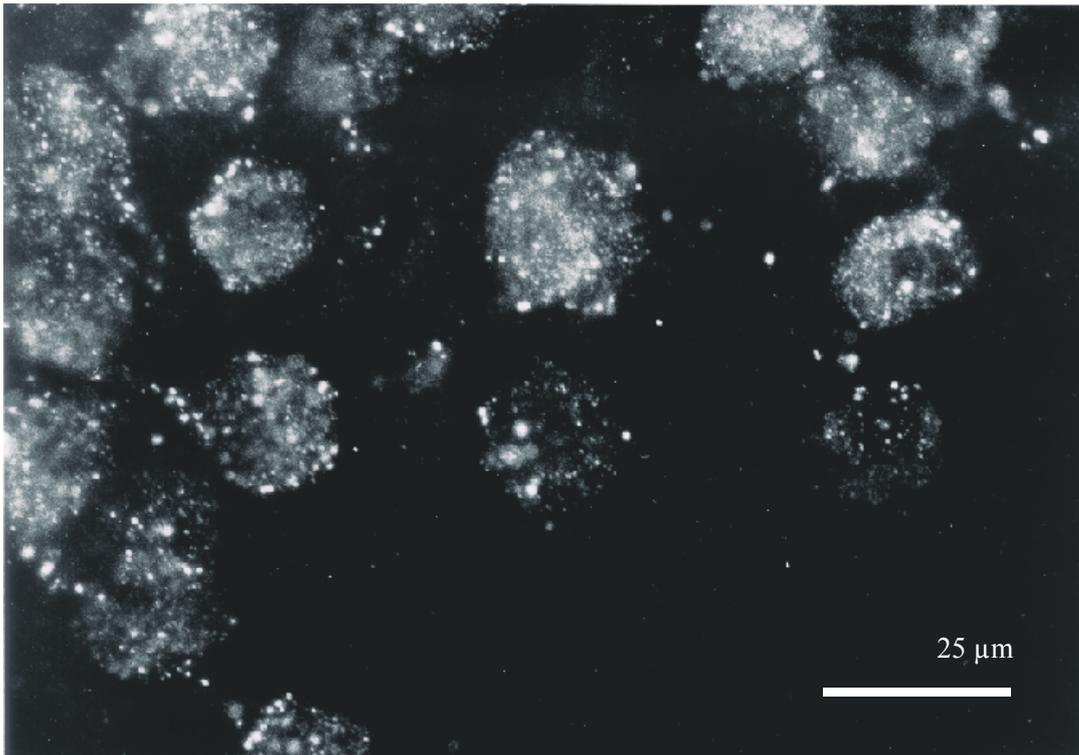


Abbildung 8: Darstellung der immunpositiven Färbung der Ganglienzellen für GluR 4.

Nicht nur auf den Ganglienzellen, sondern auch auf deren terminalen Dendriten konnte eine deutliche Immunreaktivität für GluR2/3 und GluR4 nachgewiesen werden. In Abbildungen 9 und 10 ist die deutlich punktförmige immunpositive Färbung der afferenten Nervenendigungen für GluR2/3 direkt unter den kaum zu erkennenden Haarzellen abgebildet. Zu sehen ist außerdem, daß die Zahl der punktförmigen immunreaktiven markierten Nervenendigungen von abneural (am rechten Bildrand) nach neural zunimmt. Abbildung 10 ist eine Vergrößerung von Abbildung 9. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, daß der Großteil der afferenten Nervenfasern THCs innerviert, die vor allem auf der neuralen Seite der Papilla basilaris sitzen (Tanaka und Smith, 1978; Fischer, 1992; Smolders et al., 1995).

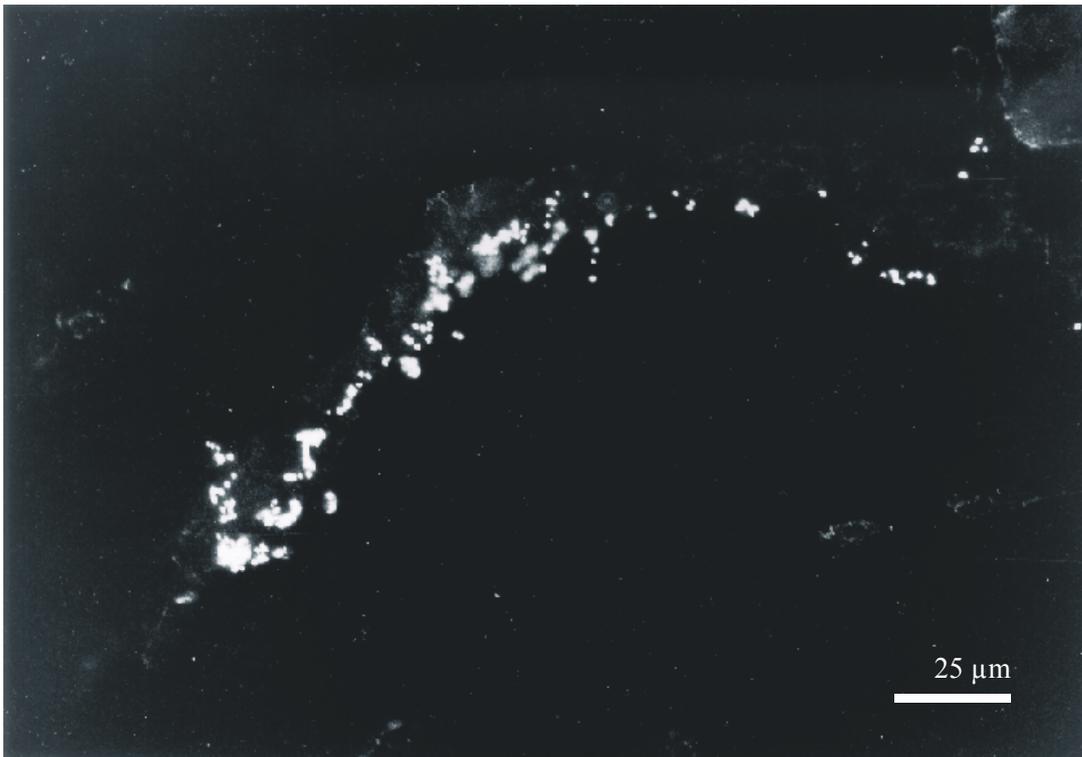


Abbildung 9: Die Glutamat-Rezeptoruntereinheit 2/3 ist auch auf den afferenten terminalen Dendriten der Hörmervenfasern der Taube zu finden.

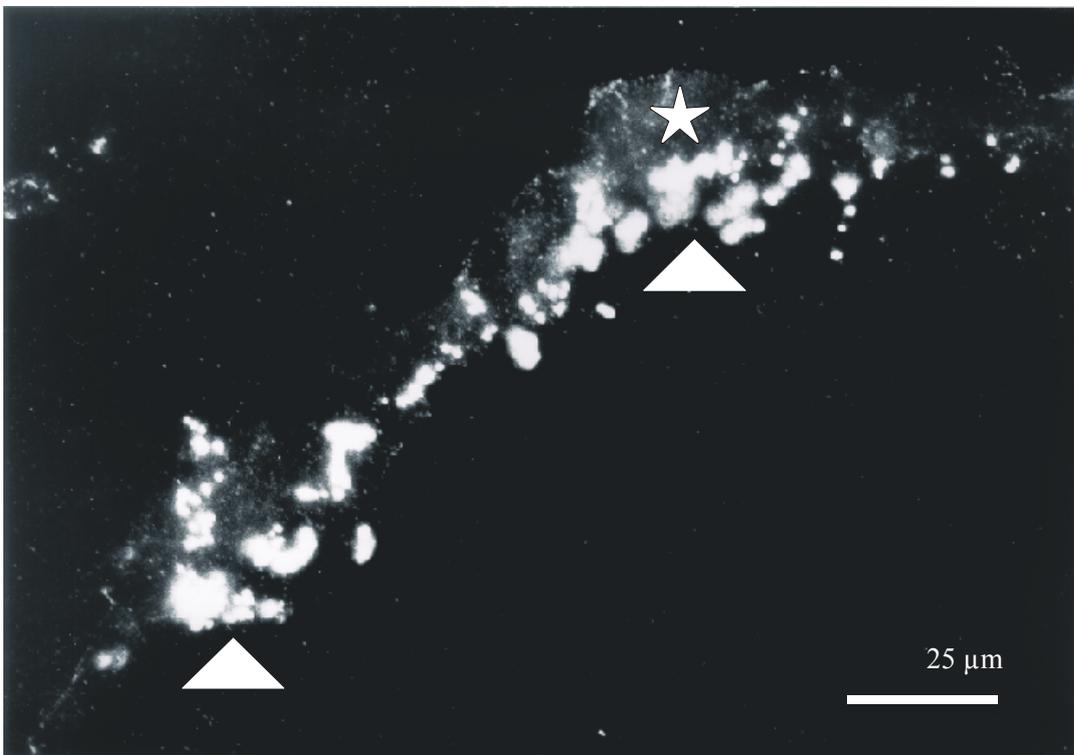


Abbildung 10: (Legende siehe nächste Seite).

Abbildung 10: In dieser Abbildung ist eine stärkere Vergrößerung von Abbildung 9 zu sehen. Auch hier sind die angefärbten Nervenendigungen unterhalb der kaum erkennbaren Haarzellen zu erkennen. (Pfeil: terminale Dendriten, Sternchen: Haarzellen).

Auf den Haarzellen selbst konnte nur für die Untereinheit GuR4 eine immunreaktive Färbung nachgewiesen werden, nicht aber für GluR2/3. In Abbildung 11, die einen horizontalen Schnitt durch die Papilla basilaris zeigt, ist die diffuse immunreaktive Färbung des Zellsomas der Haarzellen für GluR4 zu erkennen. Daneben sind aber auch punktförmige Markierungen rund um die angeschnittenen Haarzellen zu finden. Diese Punkte stellen die auch für GluR4 immunpositiven terminalen Dendriten dar.

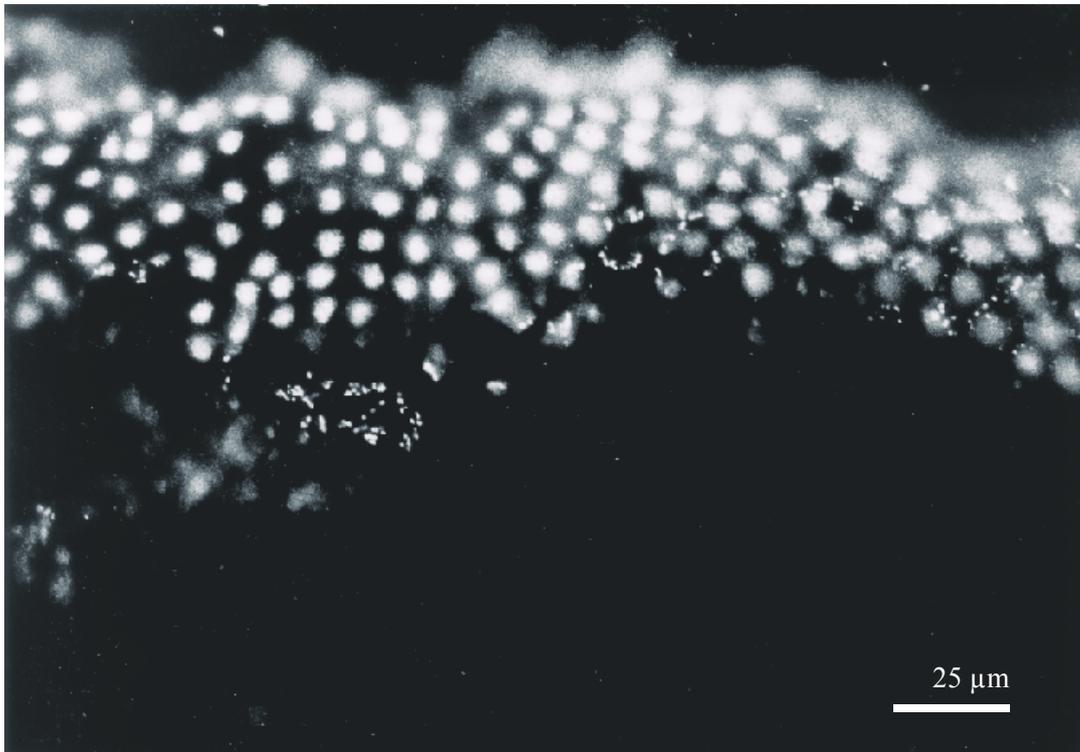


Abbildung 11: Die Haarzellen und die afferenten terminalen Dendriten weisen eine immunpositive Färbung für GluR4 auf. Diese Abbildung stellt einen horizontalen Schnitt durch die Taubencochlea dar, so daß die Haarzellkörper zu erkennen sind.

Auf anderen in der Cochlea lokalisierten Strukturen konnte keine immunreaktive AMPA-Rezeptorfärbung gefunden werden. Die ebenfalls zum AMPA-Rezeptor gehörende Untereinheit GluR1 konnte weder in den Ganglienzellen noch in sonst einer Struktur des Innenohres nachgewiesen werden. In Kontrollexperimenten, bei denen der Erstantikörper weggelassen und nur das normale Serum benutzt wurde, war keine Immunreaktivität auf den Schnitten zu sehen.

3.1.2 Detektion der AMPA-Rezeptoruntereinheiten mittels Immunoblotanalyse und Immunopräzipitation

Die Immunoblotanalyse (Abb. 12 A) und die Immunopräzipitation (Abb. 12 B) der Papilla basilaris mit den Antiseren gegen GluR1, GluR2/3 und GluR4 der Firma Chemicon zeigten deutlich gefärbte Banden bei dem spezifischen Molekulargewicht von ca. 100 kDa (Hollmann und Heinemann, 1994). Die Bande für GluR2/3 war schwächer als die Bande für GluR4. Auch die Bande für GluR1 war stärker als die für GluR2/3, obwohl GluR1 mit der Immunfluoreszenzmethode nicht nachgewiesen werden konnte. Die ebenfalls mit dem Westernblot und der Immunopräzipitation detektierten zusätzlichen kreuzreaktiven Polypeptide könnten Proteolyse-Produkte darstellen. In einem Kontrollexperiment bei dem die Erstantikörper weggelassen wurden, konnte keine Bande mit dem spezifischen Molekulargewicht von 100 kDa nachgewiesen werden (Abb. 12 B, Control). Bei der parallel zu dem „Tauben-Westernblot“ durchgeführten Immunoblotanalyse der Rattencochlea (Daten nicht gezeigt) mit den gleichen Antikörpern und unter den gleichen Bedingungen zeigte sich, daß auch hier die Banden für GluR2/3 und GluR4 bei 100 kDa erschienen. Zusätzlich zu den in der Immunhistochemie durchgeführten negativen Kontrollexperimenten (siehe 3.1.1) konnte mit dem durchgeführten Westernblot und der Immunopräzipitation ausgeschlossen werden, daß die für den immunhistochemischen Nachweis der AMPA-Rezeptoruntereinheiten verwendeten Antikörper unspezifisch an andere Proteine binden.

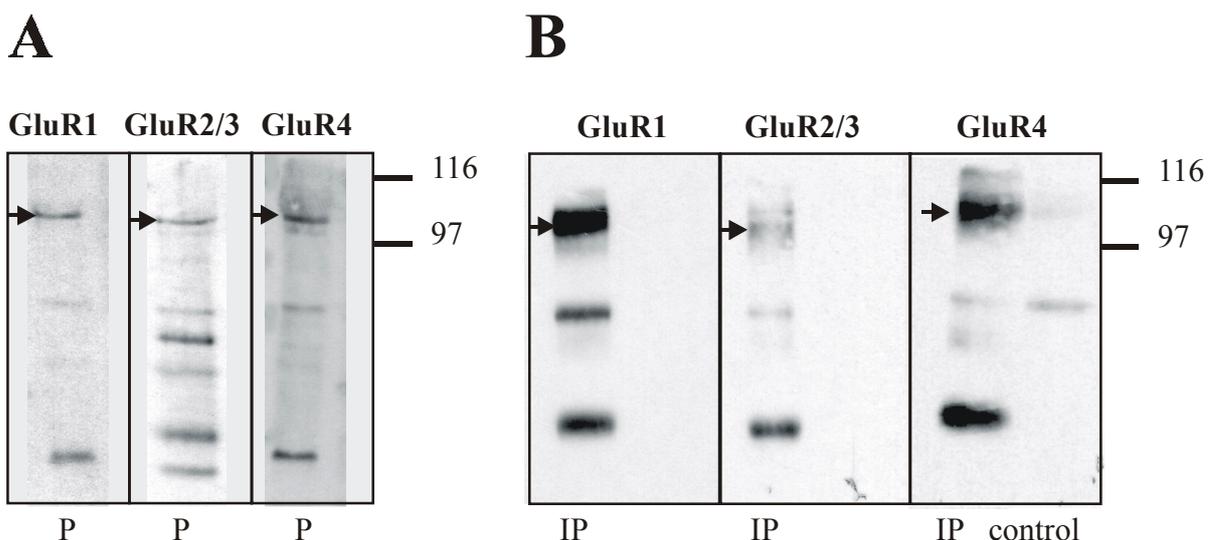


Abbildung 12: Westernblot (A) und Immunopräzipitationanalyse (B) des Innenohres der Taube, bei dem die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR1-4 nachgewiesen wurden. Bei allen drei Rezeptoruntereinheiten zeigte sich eine Bande bei einem Molekulargewicht von 100 kDa. Die Bande für GluR2/3 ist schwächer als die für GluR1 und GluR4. (P: Papilla basilaris, IP: Immunopräzipitation; Control: ohne Erstantikörper).

3.2 CAP- Schwellenkurven

3.2.1 Veränderung der CAP-Schwellenkurven durch die intracochleäre Gabe von AMPA

A) Hörverluste nach AMPA

Durch die frequenzabhängige Messung der Summe der neuralen Aktivität der Hörnervenfasern (Summenaktionspotential, dem sogenannten Compound action potential (CAP)) kann eine Aussage über den Funktionszustand des Innenohres gemacht werden. Sind die ermittelten Schwellen im für diese Tierart ermittelten Normalbereich, ist auch das Innenohr intakt. Eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Versuchstieres führt rasch zu einer Empfindlichkeitsabnahme des Ohres. Weiterhin lassen sich mit der Registrierung der Summenaktionspotentiale Schädigungen einzelner Bereiche auf der Basilarmembran feststellen, da auf einen Reiz mit einer bestimmten Wellenlänge (Frequenz) nur diejenigen Nervenfasern antworten, die für diese Frequenz sensitiv sind. Somit ist es möglich, anhand der CAP-Audiogramme die Auswirkungen der intracochleäre AMPA-Gabe auf die verschiedenen Frequenzgebiete der Cochlea zu untersuchen.

Die mittleren Schwellen der Summenaktionspotentiale (d. h. die sogenannten Hörschwellenkurven) vor und nach intracochleärer Applikation von AMPA sind in Abbildung 13 dargestellt (n = 34). Die Schwellen wurden bei drei Frequenzpunkten pro Oktave in einem Frequenzbereich von 0,125 bis 8 kHz gemessen. Die niedrigsten CAP-Schwellen der Kontrolltiere (dargestellt durch die Kurve mit schwarzen Kreisen) lagen zwischen 1 und 2 kHz, wobei die niedrigste Schwelle mit 51 dB SPL und einer Standardabweichung von ± 11 dB bei 1,58 kHz lag. Durch die intracochleäre Gabe von 1 mM AMPA konnte bei allen gemessenen Frequenzen eine signifikante Schwellenanhebung (Hörverlust) - direkt nach der Applikation erzielt werden (t-Test; $p < 0,01$). Die mittleren Schwellen nach AMPA-Gabe lagen dabei in einem Bereich von 105 bis 127 dB SPL. Die niedrigste Schwelle nach AMPA-Gabe lag bei 1,26 kHz mit einem Wert von 105 dB SPL und einer Standardabweichung von ± 16 dB. Im Mittel kam es zu einer Schwellenanhebung von 35 dB mit einer Standardabweichung von 15 dB, wobei die größte mittlere CAP-Schwellenanhebung bei einer Frequenz von 2 kHz 58 dB ± 11 dB betrug. In dem Frequenzbereich zwischen 0,79 und 4 kHz lagen die CAP-Schwellenanhebungen über 40 dB, während sie sowohl bei den tieferen als auch bei den höheren Frequenzen zwischen 10 und 39 dB lagen.

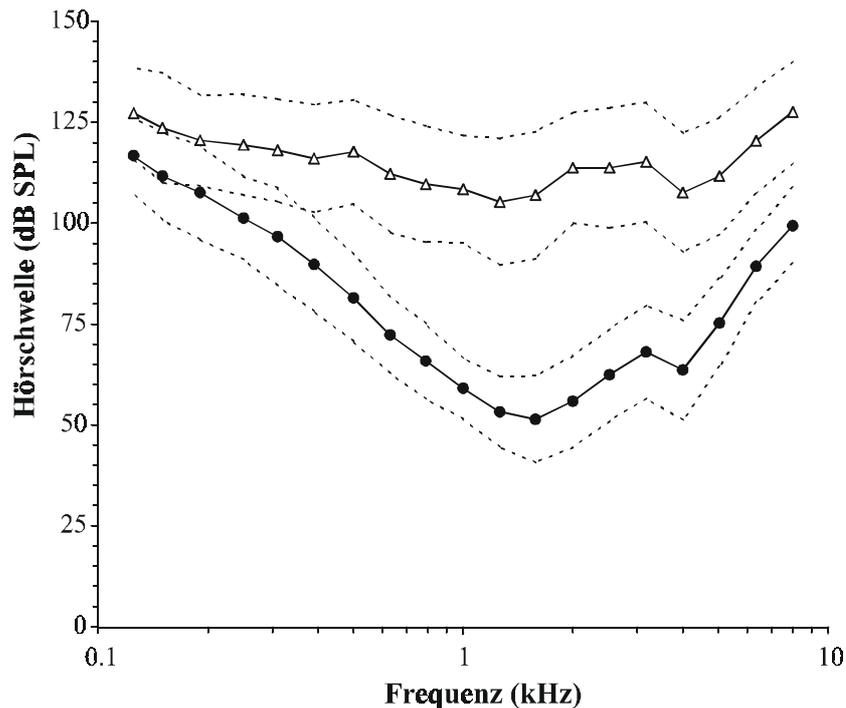


Abbildung 13: Verlauf der mittleren CAP-Schwellenkurve vor der intracochleären Applikation von 1 mM AMPA (ausgefüllte Kreise) und direkt nach der Applikation von 1 mM AMPA (leere Dreiecke). Die gestrichelten Linien geben die jeweils einfache Standardabweichung nach oben und unten wieder (n = 34). Der Unterschied zwischen den beiden CAP-Schwellenkurven ist deutlich signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

Bei der als Kontrollversuch durchgeführten Infusion von künstlicher Perilymphe („Hanks“, Sigma) in das Innenohr der Taube zeigten sich keine Veränderungen der CAP-Schwellen (Abbildung 14). Lediglich für die Frequenzpunkte 0,25 und 1,58 kHz konnte eine signifikante Schwellenanhebung beobachtet werden ($p < 0,01$). Auch hier lagen die Frequenzen mit den niedrigsten Schwellen sowohl vor als auch nach der Infusion zwischen 1 und 2 kHz. Der beste mittlere CAP Schwellenwert lag bei der Frequenz von 1,58 kHz und betrug vor der Infusion $44 \text{ dB SPL} \pm 3 \text{ dB}$. Nach der Infusion bzw. gemittelt über den Zeitraum von drei Wochen betrug er $54 \text{ dB SPL} \pm 7 \text{ dB}$ (n = 3). Der Vergleich der Daten der mit künstlicher Perilymphe behandelten Tiere mit den Kontrollwerten aller gemessenen Tauben (n = 34) zeigte jedoch keine signifikante Schwellenanhebung.

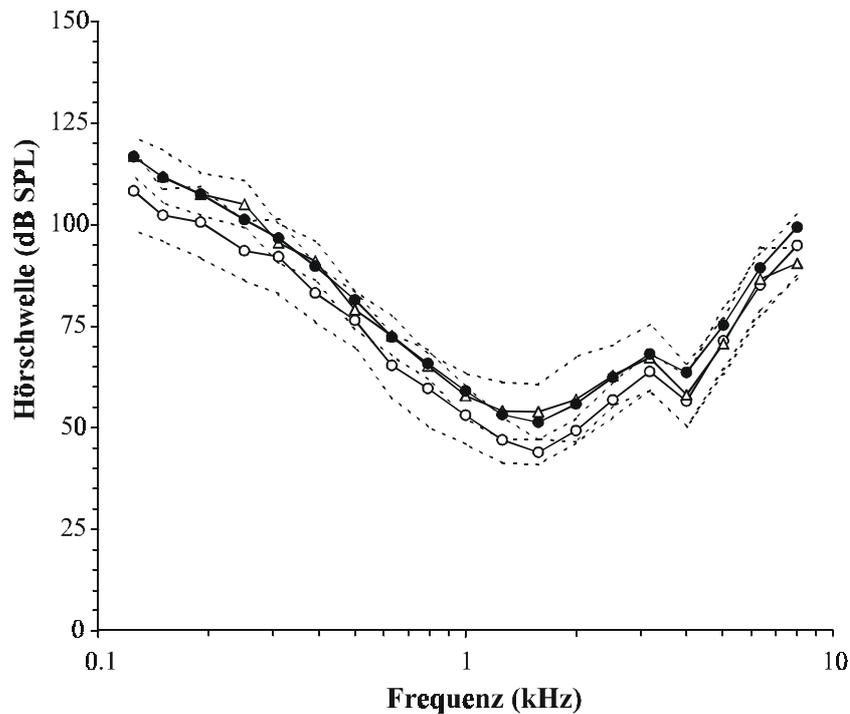
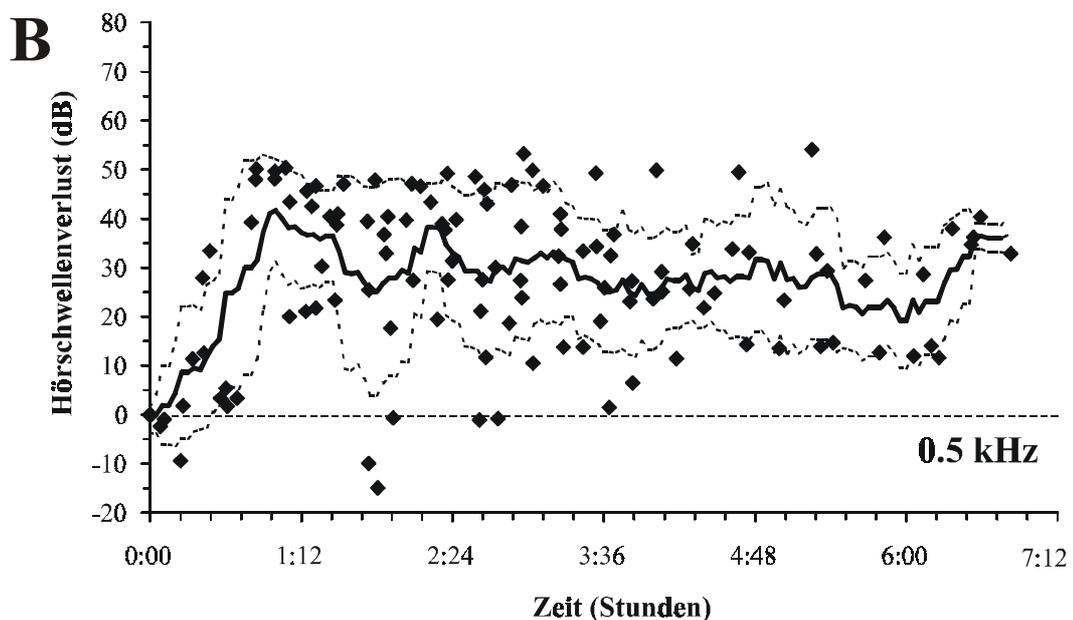
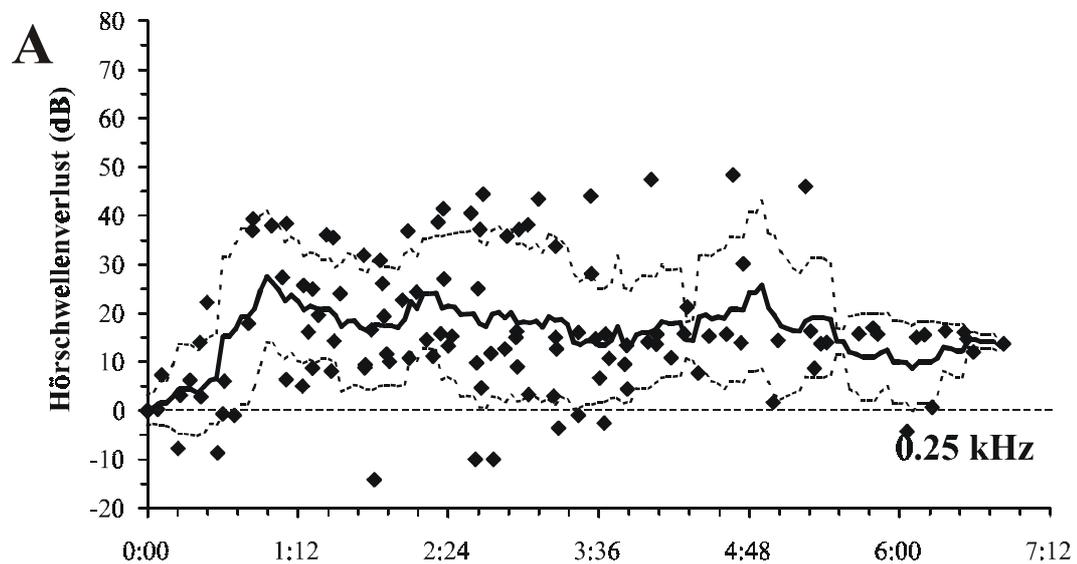


Abbildung 14: Verlauf der mittleren CAP-Schwellenkurven vor der intrascalären Applikation von künstlicher Perilymphe (leere Kreise) und danach bzw. über den Zeitraum von drei Wochen gemittelt (leere Dreiecke) ($n = 3$). Die dritte Linie (ausgefüllte Kreise) zeigt den mittleren CAP-Schwellenverlauf der Kontrollwerte aller ausgewerteten Tauben ($n = 34$). Die gestrichelten Linien geben die jeweils einfache Standardabweichung nach oben und unter wieder.

B) Zeitverlauf der Hörschwellenkurven

Die nach der intracochleären Gabe von 1mM AMPA auftretenden Veränderungen der CAP-Schwellenkurven wurden über den Zeitraum von einem Tag mit hoher Auflösung ($n = 9$, Abb. 15) und danach über einen Zeitraum von 2 Monaten ($n = 25$, Abb. 16, 17 u. 18) gemessen. In Abbildung 15 A-E ist der gleitende Mittelwert der CAP-Schwellenverluste getrennt nach Frequenzen über einen Zeitraum von 7 Stunden nach Applikation von AMPA aufgetragen. Die Werte der dargestellten fünf Frequenzpunkte wurden sowohl in Abb. 16 als auch in Abb. 18 aus den Mittelwerten von jeweils drei Frequenzen ermittelt, die sich bei einer logarithmischen Skalierung je 0,66 Oktaven pro Schritt zentriert um die jeweils dargestellte Frequenz herum befanden. Zu erkennen ist, daß der Schwellenverlust bei den zwei hohen Frequenzen von 4 und 2 kHz (Abb. 15 A, B) und bei der mittleren Frequenz von 1 kHz (Abb. 15 C) nahezu konstant über 7 Stunden bestehen bleibt, während es bei den beiden tiefen Frequenzen von 0,5 und 0,25 kHz zu einer leichten Schwellenverbesserung von 10 bis 15 dB kommt. Bei der Frequenz von 4 kHz wird eine Stunde nach Applikation von AMPA eine mittlere Schwellenanhebung von 38 dB erreicht, die über die nächsten 6 Stunden zwischen 38 und 48 dB konstant bleibt. Bei 2 kHz ist die mittlere Schwellenanhebung im Vergleich zu den anderen vier Frequenzen am höchsten. Hier wird eine Stunde nach AMPA-Gabe eine mittlere

Schwellenanhebung von 56 dB erreicht, die im weiteren Verlauf zwischen 44 und 64 dB schwankt. Bei der Frequenz von 1 kHz sind die Schwellenanhebungen ähnlich groß wie bei 2 kHz. Hier schwankt die Schwellenanhebung zwischen Werten von 35 und 56 dB, wobei nach einer Stunde eine Anhebung der Schwelle auf 56 dB ermittelt werden kann. Während bei 0,5 kHz die Schwellenanhebung nach einer Stunde 41 dB beträgt, ist bei 0,25 kHz nur eine mittlere Anhebung auf 27 dB festzustellen. Bei 0,5 kHz bleibt die Schwellenanhebung auf Werten zwischen 25 und 41 dB bestehen, wobei im Verlauf über den Zeitraum von 7 Stunden insgesamt eine leichte Verbesserung festzustellen ist. Bei 0,25 kHz liegt die CAP-Schwellenanhebung zwischen 27 und 14 dB und auch hier ist über den Zeitraum von 7 Stunden eine leichte Verbesserung der Schwellenwerte zu erkennen.



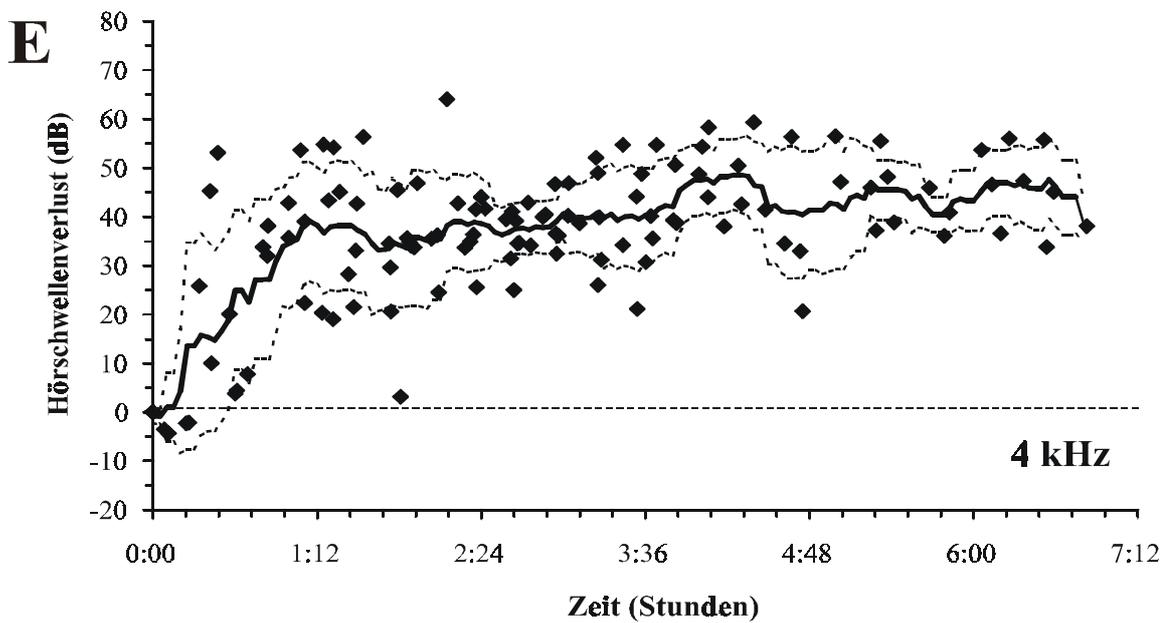
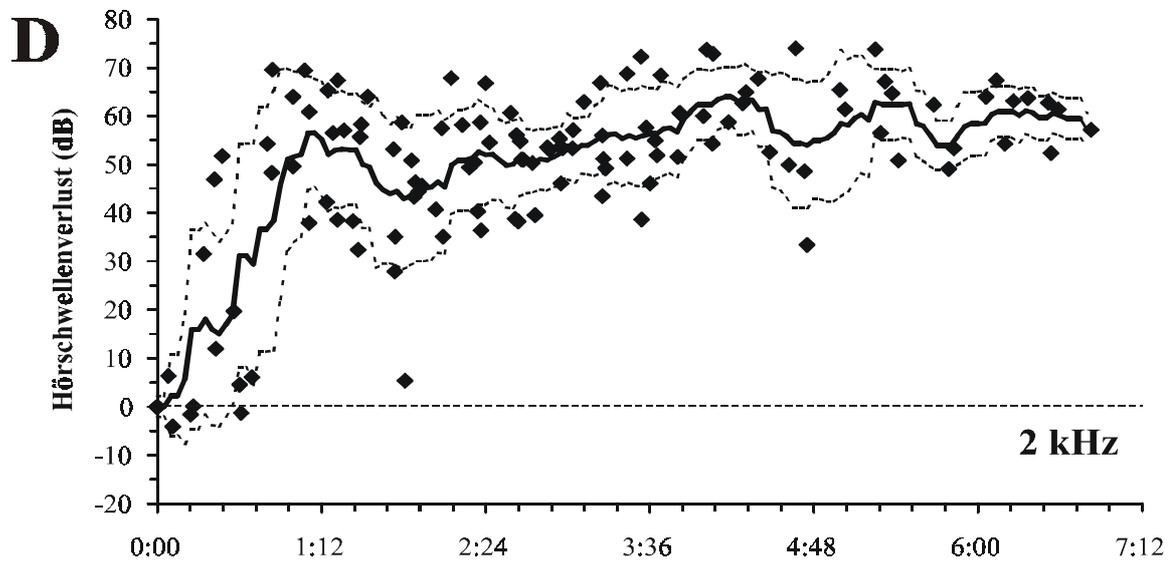
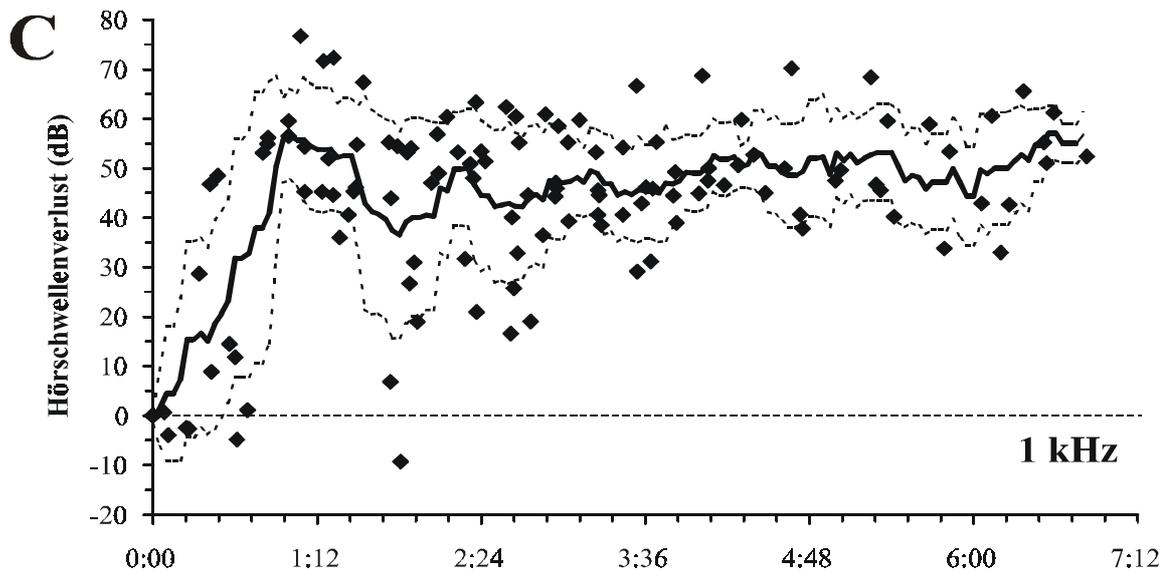


Abb. 15 A-E: (Legende siehe nächste Seite).

Abbildung 15 A-E: Darstellung der CAP-Schwellenverluste für fünf Reizfrequenzen über mehrere Stunden nach Gabe von AMPA. Die durchgezogenen Linien geben den gleitenden Mittelwert (Fensterbreite = 6 min.) mit einfacher Standardabweichung (gestrichelte Linien) an. Die aufgetragenen Hörverluste sind relativ zu den Kontrollaudiogrammen der Tiere vor der AMPA-Gabe ($t = 0$) berechnet worden ($n = 9$).

C) Erholung

Bei der Messung der CAP-Audiogramme über einen längeren Zeitraum hinweg (2 Monate) konnte festgestellt werden, daß sich die Schwellen im Verlaufe der Zeit deutlich erholen. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß der durch AMPA verursachte Schaden zumindest teilweise reversibel ist.

In Abbildung 16 A-C (bei logarithmischer Zeitachse) ist die funktionelle Erholung des Hörvermögens über den Zeitraum von 60 Tagen exemplarisch für drei verschiedene gefundene Erholungstypen anhand einzelner Tiere (CPGN 316, CPGN 270; CPGN 308) dargestellt. CPGN 316 (Abb. 16 A) zeigt eine schnelle Erholung. Nach drei Tagen sind die ursprünglichen CAP-Schwellenwerte fast wieder erreicht und nach sieben Tagen ist die funktionelle Erholung nahe zu vollständig. Nur für die Frequenzen 4 und 2 kHz bleiben die Schwellen auch nach sieben Tagen leicht erhöht. Bei CPGN 270 (Abb. 16 B) ist ein langsamerer Verlauf der Erholung zu erkennen, bei der im Frequenzbereich von 1-4 kHz auch nach 70 Tagen noch Verluste von 10 bis 20 dB bestehen. Bei 0,5 und 0,25 kHz werden die ursprünglichen CAP-Schwellen erst nach 10 bis 14 Tagen erreicht. Bei CPGN 308 (Abb. 16 C) bleibt ein deutlicher hochfrequenter Schaden von 30 bis 35 dB bestehen. Hier kann eine ausgeprägte Verschlechterung der CAP-Schwellen bei 4 und 2 kHz zwischen Tag 10 und 14 beobachtet werden, obwohl in dem Zeitraum von einer Woche die CAP-Schwellen ihre Ausgangswerte nahezu erreicht hatten. Der größte Teil der ausgewerteten Tauben zeigte einen der hier beschriebenen Kurvenverläufe.

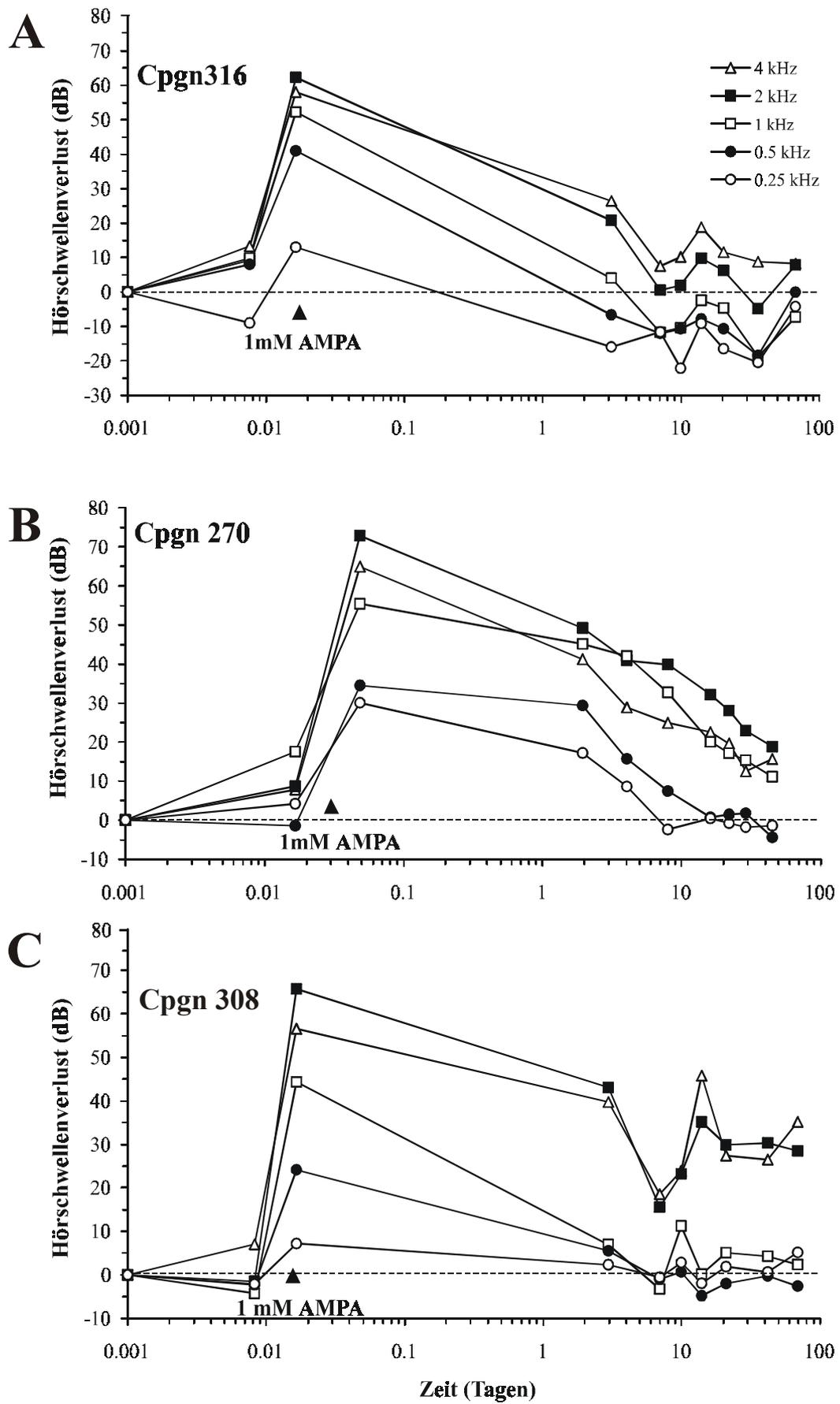


Abbildung 16 A-C: (Legende siehe nächste Seite).

Abbildung 16 A-C: Typische Zeitverläufe der funktionellen Erholung nach intrascalärer AMPA-Gabe bei drei unterschiedlichen Tieren. Die Hörverluste sind als Funktion der Zeit in Tagen für fünf verschiedene Frequenzen dargestellt. Die Werte der dargestellten fünf Frequenzpunkte wurden aus den Mittelwerten von jeweils drei Frequenzen ermittelt, die sich bei einer logarithmischen Skalierung je 0,66 Oktaven pro Schritt zentriert um die jeweils dargestellte Frequenz befanden.

Abbildung 17 A zeigt die funktionelle Erholung nach intrascalärer AMPA-Gabe in einem Zeitraum von 60 Tagen (2 Monaten) gemittelt für 25 Tiere (bei linearer Zeitachse). Bei allen fünf dargestellten Frequenzen ist zu erkennen, daß die Erniedrigung der CAP-Schwellenverluste innerhalb der ersten drei Tage am größten ist und innerhalb von drei Wochen nahezu ihren endgültigen Wert annimmt. In dem Zeitraum von drei bis acht Wochen kommt es nur noch zu minimalen Veränderungen der Schwellen (Schwellenveränderungen von 1 bis 3 dB, mit Ausnahme von 1 kHz, wo es 10 dB sind). Im Frequenzbereich von 4 und 2 kHz bleibt ein deutlicher Hörverlust von 17 bzw. 18 dB bestehen. Bei den drei anderen Frequenzen 1, 0,5 und 0,25 kHz beträgt der Hörverlust nach 60 Tagen noch 5 dB. Bei 4 kHz kam es innerhalb der ersten drei Tage zu einer Verbesserung der Schwellen um 17 dB, während es in dem Zeitraum danach bis zum Tag 21 nur noch zu einer Verbesserung von 11 dB kam. Bei 2 kHz betrug die Schwellenverbesserung in den ersten drei Tagen 18 dB und in den darauffolgenden 18 Tagen bis zum 21. Tag nur noch 17 dB. Bei den Frequenzen 1 kHz, 0,5 kHz und 0,25 kHz kam es innerhalb der ersten drei Tage zu einer Schwellenverbesserung von 16 dB, 12 dB bzw. 4 dB und in den darauffolgenden 18 Tagen zu weiteren Verbesserungen von 16 dB, 14 dB und 7 dB.

Um den Zeitverlauf der residualen Erholung zu quantifizieren, wurde die Zeitkonstante für die fünf Frequenzen für den Zeitraum zwischen Tag 3 und Tag 14 bestimmt. Der Zeitraum zwischen Tag 3 und Tag 14 wurde deshalb ausgewählt, weil nur hier bei logarithmischer y-Achse ein linearer Zusammenhang zu erkennen war, also nur hier eine einfache exponentielle Abnahme des Schwellenverlustes mit der Zeit auftrat ($T = e^{-t/\tau}$, Abb. 16 B). Die mittlere Zeitkonstante der beiden hohen Frequenzen (4 kHz und 2 kHz) betrug 18,2 Tage, während die Zeitkonstante der mittleren und niedrigen Frequenzen (1, 0,5 und 0,25 kHz) mit 11,9 Tagen deutlich kleiner war (t-Test, $p < 0,05$). Abb. 17 B veranschaulicht auch, daß die Erholung nach dem 14.Tag nochmals erheblich langsamer verläuft.

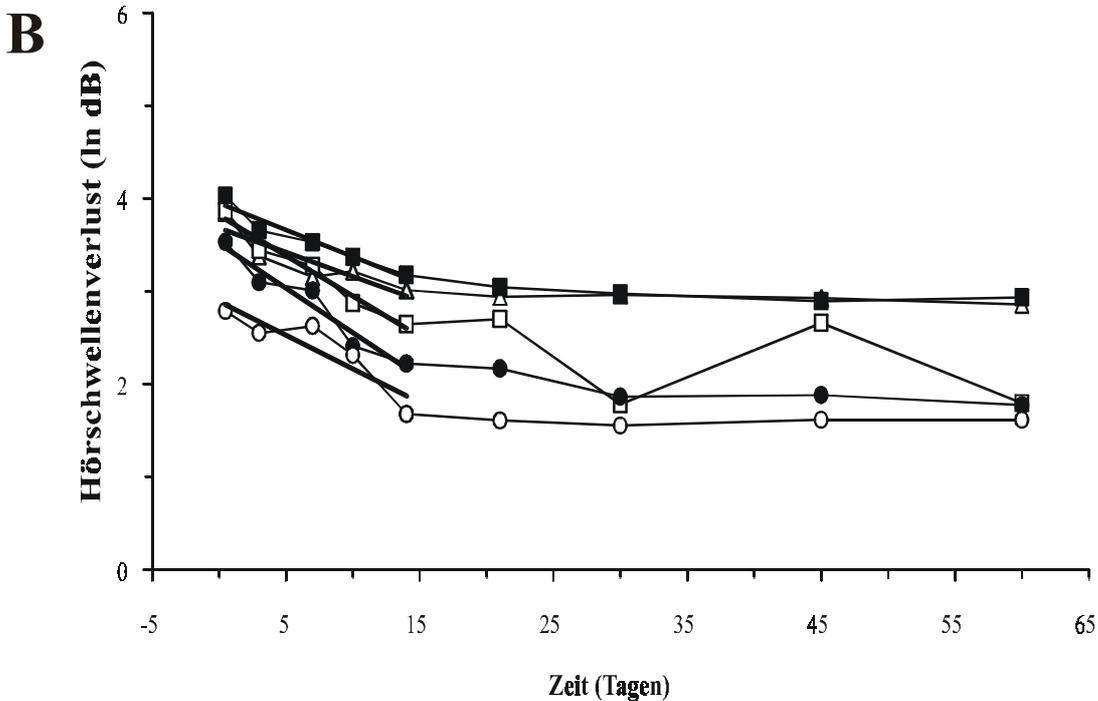
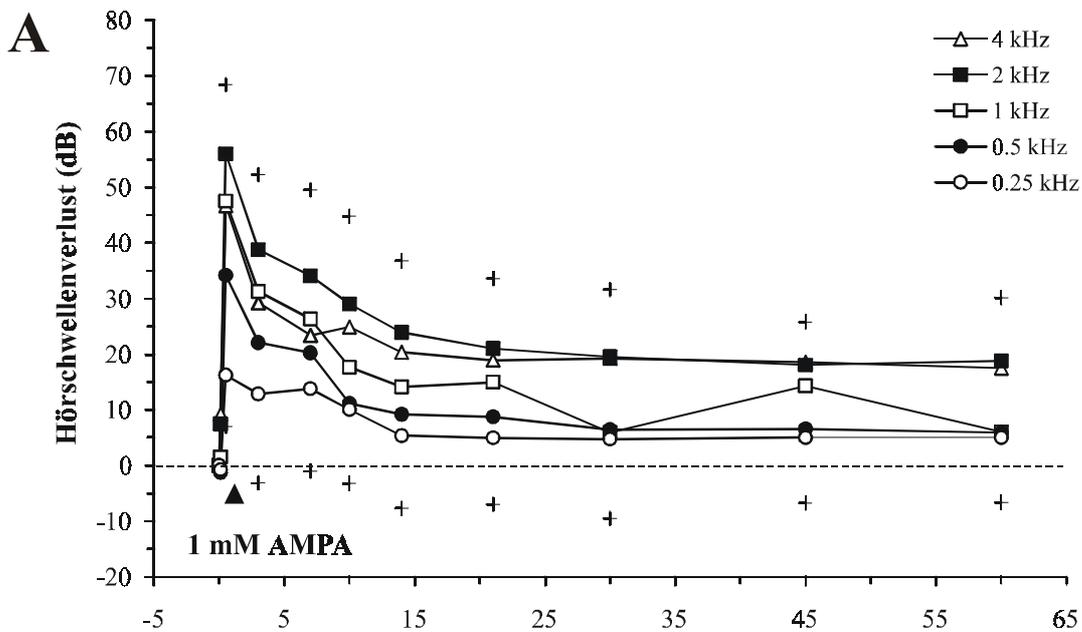


Abbildung 17: (A) Mittlere Erholung nach intrasclärer AMPA-Applikation als Funktion der Zeit bei fünf Frequenzen ($n = 25$). Die Hörverluste sind relativ zu den CAP-Schwellenwerten der Kontrollmessungen der unbehandelten Tiere aufgetragen. Da nicht die Hörschwellen aller Tiere am gleichen Tag gemessen werden konnten, wurden die Mittelwerte in einem 3-Tage-Fenster berechnet. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurde nur je eine Standardabweichung von 2 bzw. 0,25 kHz aufgetragen (Kreuze). (B) CAP-Schwellenverlust (Daten aus A) dargestellt im logarithmischen Maßstab (Ordinate). Die fett dargestellten Geraden sind lineare Regressionsgeraden auf dem Intervall 3-14 Tage entsprechend der Funktion $(\ln_y = -1/\square * t + \ln_a)$.

Der auch nach 60 Tagen noch bestehende mittlere Hörverlust ist in Abbildung 18 noch einmal für jede Frequenz als Anhebung der CAP-Schwellen dargestellt. Die bleibende Anhebung der

Schwellen ist für den Frequenzbereich zwischen 6,35 und 1 kHz signifikant (t-Test, $p < 0,01$). Die bleibende Schwellenanhebung gemittelt für alle Frequenzen beträgt $8 \text{ dB} \pm 5 \text{ dB}$.

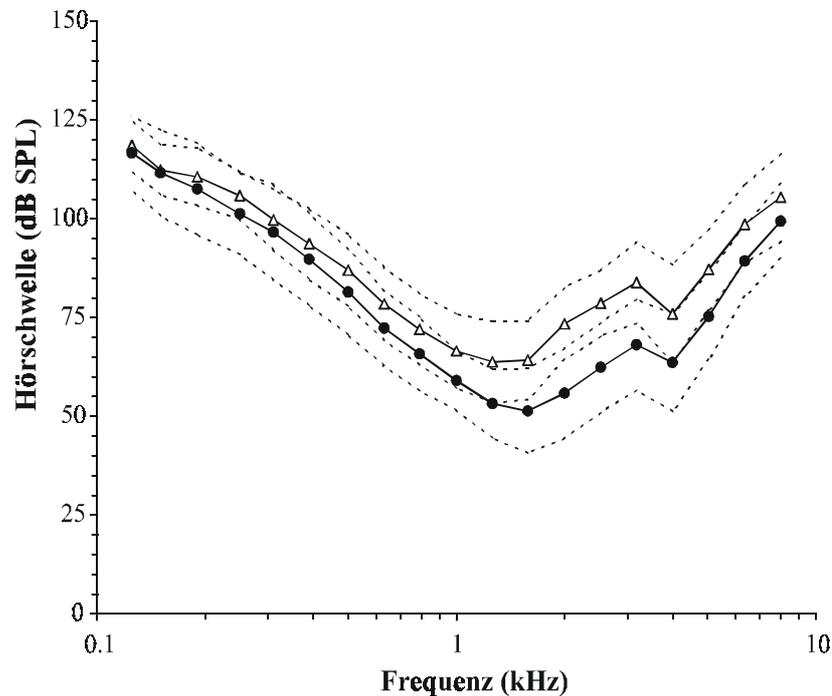


Abbildung 18: CAP-Schwellenkurve vor der intracochleären Applikation von 1 mM AMPA (ausgefüllte Kreise) und nach maximaler Erniedrigung der Schwellen nach der Applikation von 1 mM AMPA in dem Zeitraum von 60 Tagen (leere Dreiecke). Die gestrichelten Linien geben die jeweils einfache Standardabweichung nach oben und unten wieder ($n = 21$). Die Schwellenanhebung zwischen den beiden CAP-Schwellenkurven ist für den Bereich zwischen 6,35 und 1 kHz signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

3.2.2 Keine Veränderung der CAP-Schwellenkurven durch die intracochleäre Gabe von NMDA

Versuche mit NMDA, einem weiteren Glutamat-Agonisten, das die NMDA-Rezeptoren, nicht aber die AMPA-Rezeptoren aktivieren kann, zeigten keinerlei Effekt auf den Verlauf der Hörschwellenkurven. Hierfür wurde bei zwei Tauben 10 mM NMDA unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen in den Recessus Scala tympani appliziert. Wie in Abbildung 19 A und B zu erkennen ist, konnte durch die Gaben von 10 mM NMDA kein Hörverlust erzielt werden. Die bei der Taube Apgn114 (Abb. 19 A) gefundene leichte Verbesserung der Hörschwellen konnte in einem weiteren Versuchen nicht mehr beobachtet werden (Abb. 19 B).

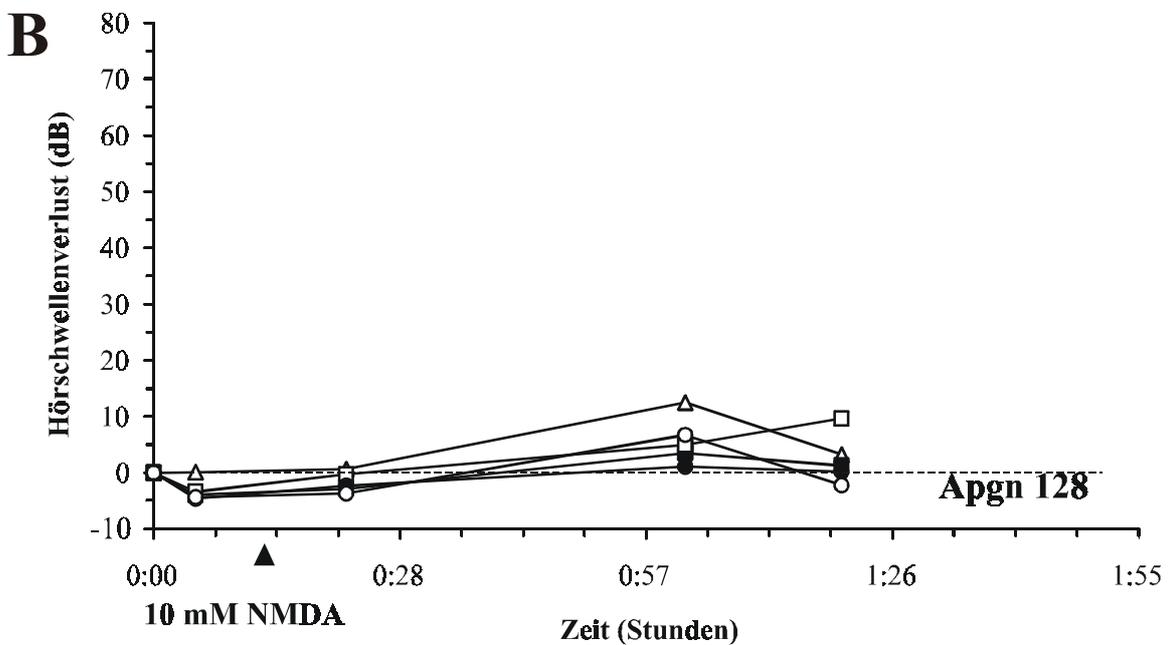
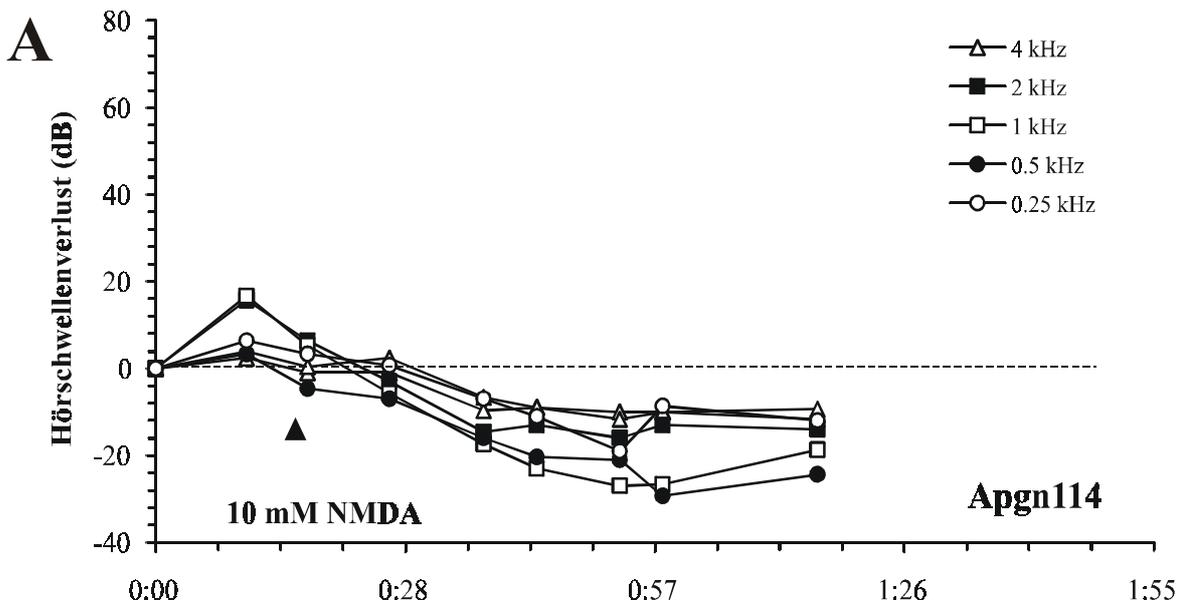


Abbildung 19: Zwei Versuche mit 10 mM NMDA mit ausbleibendem Effekt, intrascalär appliziert. Die Hörverluste sind als Funktion der Zeit in Stunden für 5 verschiedene Frequenzen dargestellt. Die Werte der dargestellten 5 Frequenzpunkte wurden aus den Mittelwerten von jeweils drei Frequenzen ermittelt, die sich bei einer logarithmischen Skalierung je 0,66 Oktaven pro Schritt zentriert um die jeweils dargestellte Frequenz befanden.

3.3 CAP-Intensitätskennlinien

3.3.1 Veränderung der CAP-Intensitätskennlinien durch AMPA

Während man durch die Bestimmung der CAP-Schwellenkurven vor allem eine Aussage über die Sensitivität der Nervenfasern erhält, wird durch die Ermittlung der CAP-Amplituden bei unterschiedlicher Reizintensität indirekt eine Aussage über die Anzahl der beteiligten Nervenfasern getroffen (Chen et al., 1993). Abbildung 20 A–B zeigt die normale CAP-Wellenform eines Tieres bei einer Reizfrequenz von 2,282 kHz und Reizintensitäten von 21 bis 136 dB SPL vor und nach der Applikation von AMPA. Die CAP-Welle ist bei ausreichend hoher Reizintensität durch eine negative Welle (N1) und eine direkt folgende positive Welle (P1) charakterisiert. Je geringer die Reizintensität ist, desto kleiner wird die Amplitude der Antwort, um so flacher wird die Welle und desto größer die Latenz (d. h. der Abstand der Antwort zu dem Zeitpunkt des Reizes). In Abbildung 20 A ist zu sehen, daß eine Reizintensität von 51 dB SPL ausreicht, um eine erste Antwort zu erzielen. In Abbildung 20 B hingegen ist zu erkennen, daß nach der Gabe von AMPA erst eine Reizintensität von 106 dB SPL zu einer Antwort führt. Die Höhe der CAP-Amplituden ist neben der Reizintensität auch von der Frequenz abhängig, mit der gereizt wird.

Abbildung 21 A-E veranschaulicht auf den folgenden Seiten, daß der Verlauf der CAP-Amplituden mit ansteigender Reizintensität fast linear ist (bei einer logarithmischen Amplituden-Achse) und die CAP-Amplitude bei maximaler Reizung bei 1,414 kHz am größten und bei 0,353 kHz am kleinsten ist. In den Diagrammen wurden die Werte von 14 unbehandelten Tieren gemittelt.

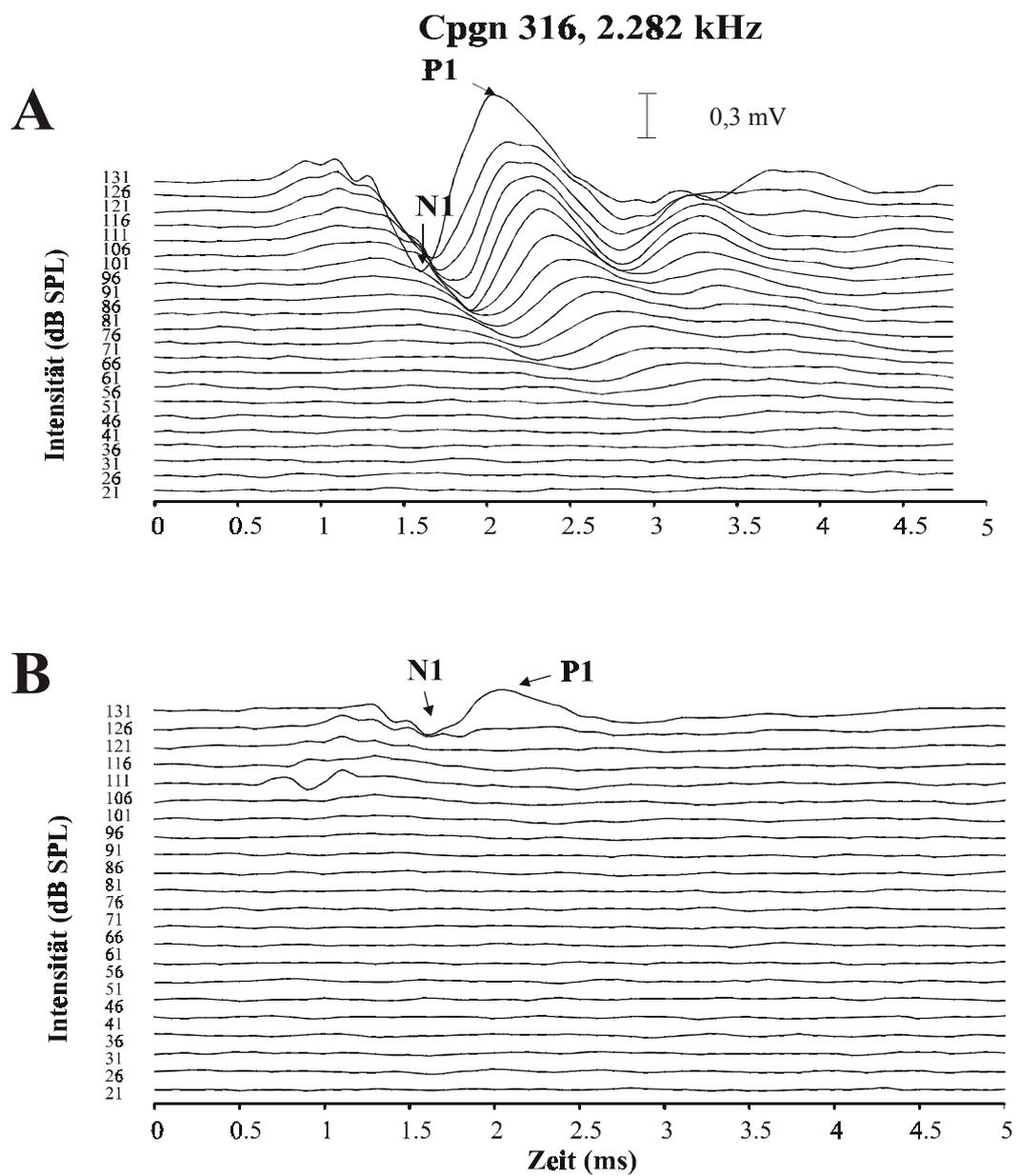
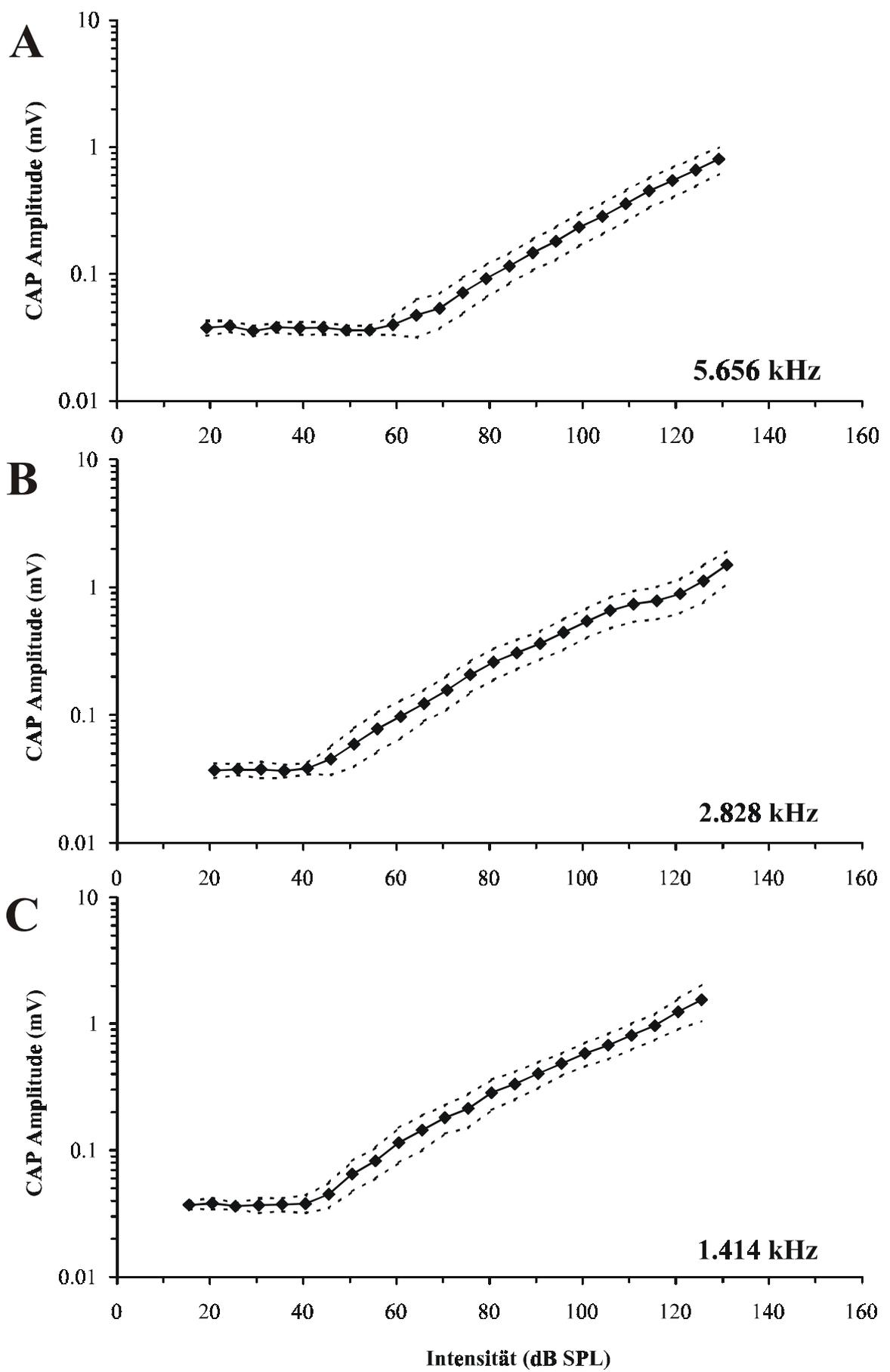


Abbildung 20: Darstellung einer Serie von CAP-Wellen bei einer Frequenz von 2,828 kHz bei einem Tier vor der Applikation von AMPA (A) und nach der Applikation von AMPA (B). Die CAP-Wellen sind durch einen negativen (N1) und einen positiven Anteil (P1) charakterisiert. Gereizt wurde mit einer Intensität von 20 bis 131 dB SPL.



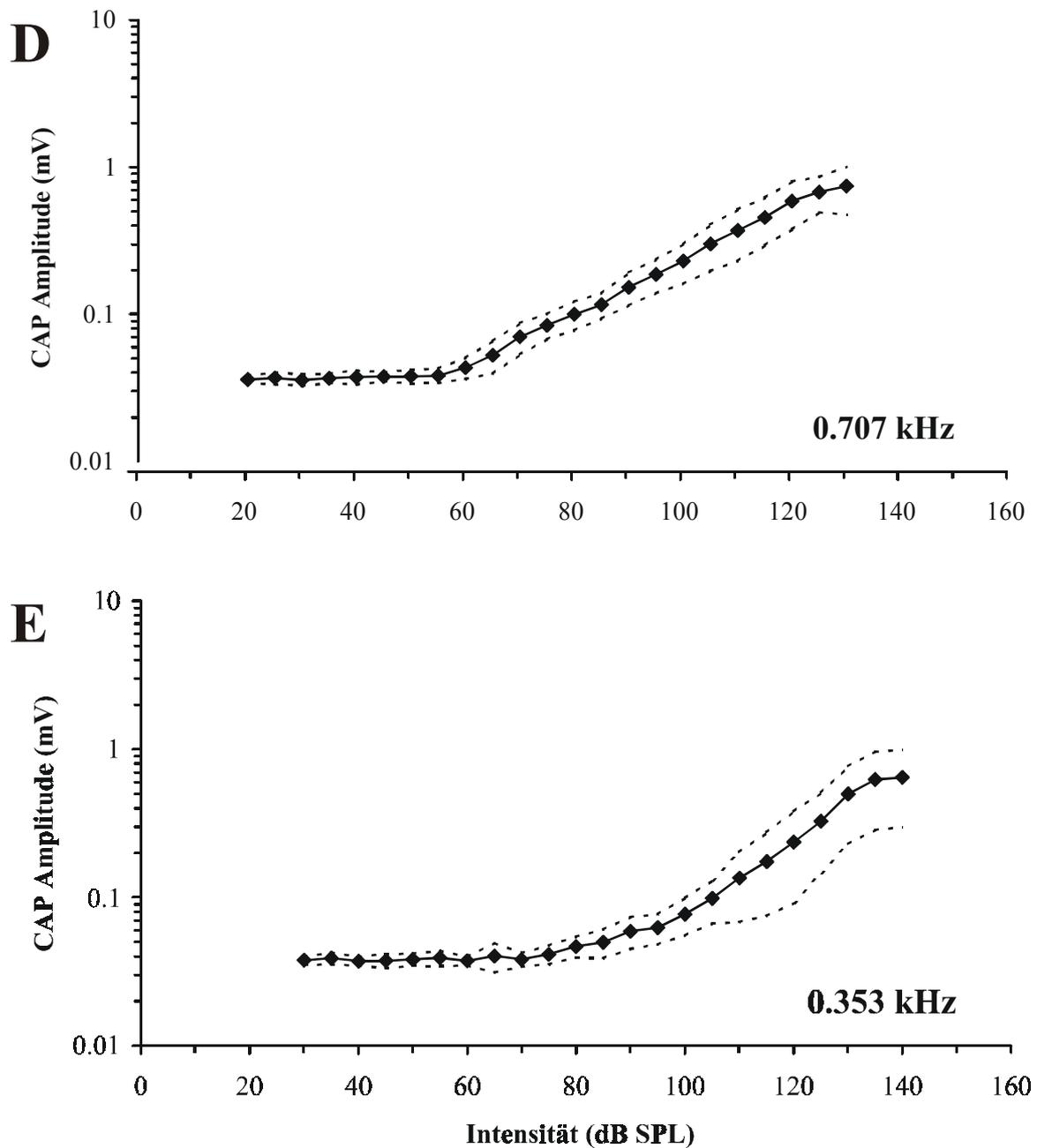


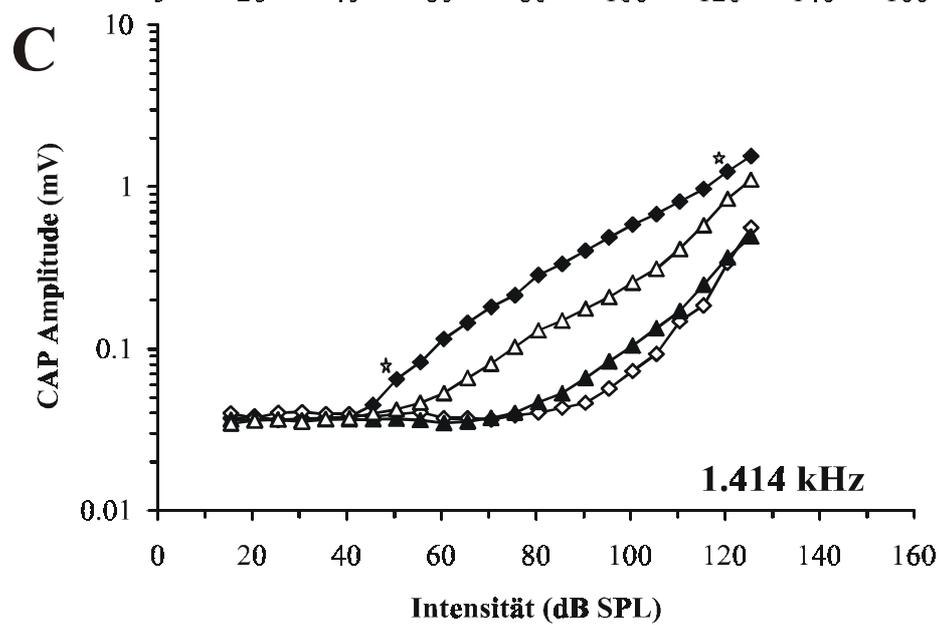
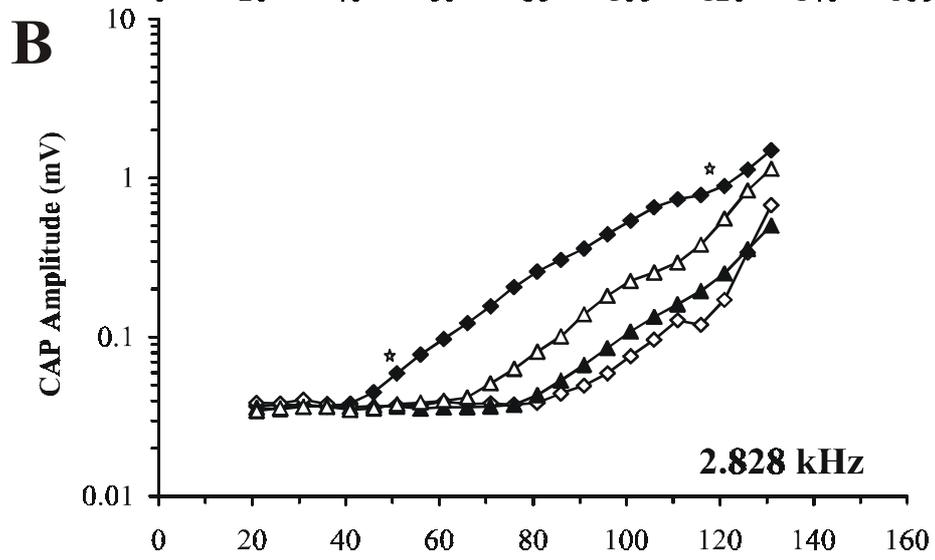
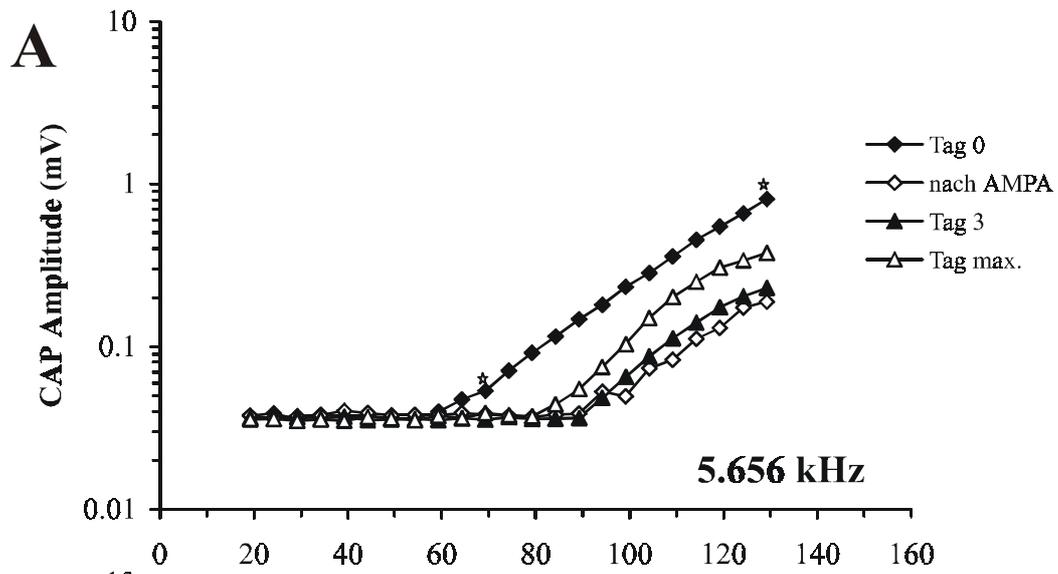
Abbildung 21 A–E: Verlauf der CAP-Intensitätskennlinien bei fünf unterschiedlichen Frequenzen. Die durchgezogene Linie stellt den Mittelwert, die gestrichelten Linien die einfache Standardabweichung dar. Ermittelt wurden die CAP-Amplituden von 14 unbehandelten Tieren.

Nach der intrascalären Applikation von AMPA waren bei allen gemessenen Tieren ($n = 14$) die Amplituden im Vergleich zu den Amplituden der unbehandelten Tiere in ihrer Größe signifikant reduziert ($p < 0,01$). In der nachstehend gezeigten Abbildung 22 A–E sind die Veränderungen in der Größe der CAP-Amplituden als eine Funktion der Reizintensität zu vier verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Zu sehen ist der Zeitpunkt vor der Gabe von AMPA, direkt nach der Gabe von AMPA, drei Tage später und der Zeitpunkt der maximalen Erholung (Tag max.) der CAP-Amplituden, der bei den einzelnen Tieren zwischen zwei und sechs

Wochen nach der Applikation von AMPA lag. Drei Tage nach der AMPA-Gabe ist kaum ein Anstieg der Amplituden zu erkennen. Zum Teil sind diese Amplituden bei den höchsten Reizintensitäten im Vergleich zu den Amplituden direkt nach der AMPA-Gabe sogar leicht verringert (bei 1,414 und 2,282 kHz). Bei keiner der fünf dargestellten Frequenzen erholten sich die Amplituden in den nächsten zwei bis acht Wochen auf den Ausgangswert. Bei der höchsten Reizintensität war die Erholung bei der Frequenz von 0,707 kHz auf 83 % des Ausgangswertes am größten. Bei 5,656 kHz war sie mit 47 % im Vergleich zum Ausgangswert am geringsten. Bei der Frequenz von 2,828 kHz betrug die Erholung der CAP-Amplitude 76 %, bei 1,414 kHz 72 % und bei 0,353 kHz 53 %.

Neben der bleibenden Verringerung der Amplitude konnte eine dauerhafte Schwellenverschiebung ermittelt werden. Bei den fünf dargestellten Frequenzen blieb die Schwellenverschiebung direkt nach AMPA-Gabe sowie am Tag drei nach AMPA-Gabe in voller Breite bestehen. Bei der Frequenz von 5,656 kHz war die Schwellenverschiebung mit 40 dB am größten. Während bei den Frequenzen von 2,828 kHz und 1,414 kHz die Verschiebung nach rechts 35 dB betrug, waren es bei 0,707 kHz und 0,353 kHz 25 dB. Nach maximaler Erholung der Amplituden konnte bei den Frequenzen von 5,656 kHz, 2,828 kHz und 1,414 kHz eine bleibende Schwellenverschiebung von 30 dB, 25 dB bzw. 10 dB festgestellt werden. Nur bei den tiefen Frequenzen von 0,707 dB und 0,353 kHz blieb keine Schwellenverschiebung zurück. Bei der Frequenz von 0,707 dB fand die weitgehendste Erholung statt. Hier blieb in der Größe der Amplitude nur ein Verlust von 17 % bestehen und die Schwellenverschiebung war vollständig reversibel. Bei 5,656 kHz blieben die größten Verluste zurück. Es blieben 30 dB Schwellenverschiebung und eine Reduzierung der Amplitude um 53 % bestehen.

Um zu untersuchen, ob die bleibende Reduzierung der Amplituden im Vergleich zu den Normalfunktionen signifikant war, wurde zusätzlich ein t-Test durchgeführt. Bei der Frequenz von 5,656 kHz war der Unterschied zwischen den Amplituden im Bereich von 69 bis 129 dB SPL signifikant ($p < 0,01$). Bei 2,828 kHz war der Bereich von 50 bis 120 dB SPL signifikant verschieden ($p < 0,01$). Ebenfalls von 50 bis 120 dB SPL waren die Amplituden bei einer Frequenz von 1,414 kHz signifikant ($p < 0,01$) reduziert. Bei 0,707 kHz ging der signifikante Bereich von 80 bis 120 dB SPL. Für die fünfte Frequenz 0,353 kHz lag der signifikante Bereich zwischen 105 bis 110 und 125 bis 140 dB.



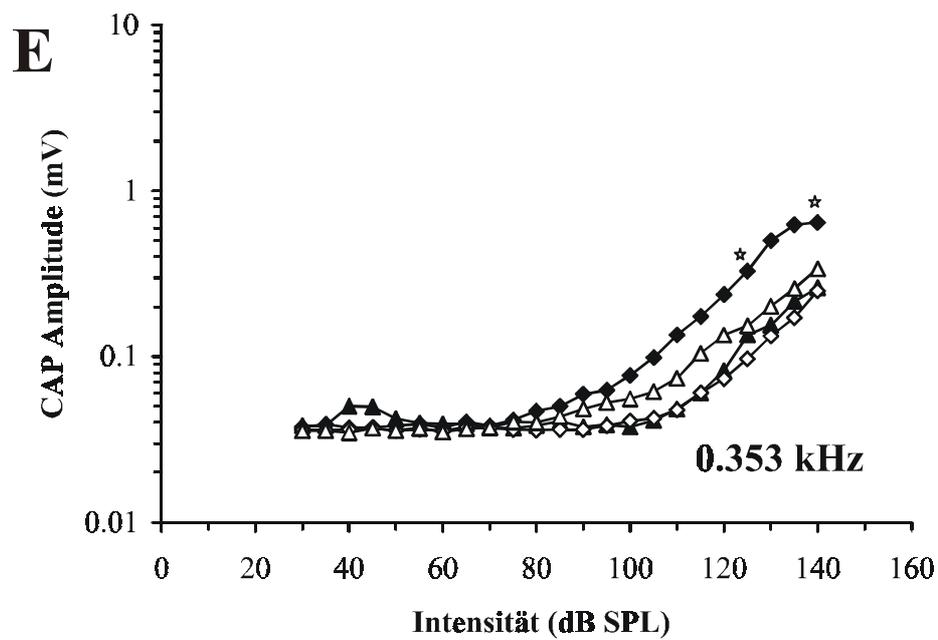
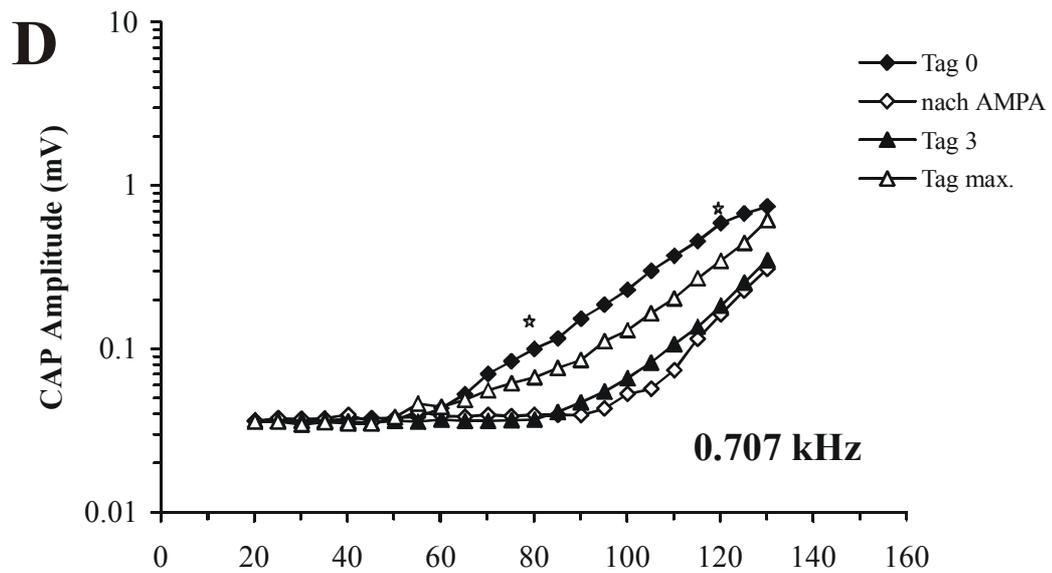


Abbildung 22 A–E: Dargestellt sind die mittleren CAP-Intensitätskennlinien als Funktion der Schallintensität für fünf verschiedene Frequenzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($n = 14$). Die Sterne geben den Signifikanzbereich ($p < 0,01$) im Vergleich von Tag 0 und Tag max. (Tag der maximalen Erholung) an.

3.4 Neuronale Aktivität der auditorischen Neurone von „AMPA-Tieren“ im Vergleich zu Kontrolltieren

Die nachfolgend dargestellten elektrophysiologischen Eigenschaften wurden von 211 primären auditorischen Neuronen aus 8 Tauben ermittelt. Die Daten wurden 14 Wochen nach der Applikation von AMPA in das Innenohr erhoben. Sämtliche aufgezeichneten Neurone waren spontan aktiv, d. h. auch ohne akustische Stimulation zeigten sie Aktionspotentiale. Sie waren alle durch akustische Reize erregbar. Bei Beantwortung eines überschwelligeren Reizes kam es zu einer Erhöhung der Entladungsrate. Eine Frequenzabstimmung konnte ebenfalls bei allen aufgezeichneten Neuronen gefunden werden. Als Kontrollgruppe wurden schon früher publizierte Daten von unbehandelten Tieren ($n = 262$ Neurone) verwendet (Müller et al., 1996; Müller und Smolders, 1999), mit denen die Daten der AMPA-Tiere verglichen wurden.

3.4.1 Spontanaktivität

Sowohl die Kontrollgruppe als auch die AMPA-Gruppe zeigten eine große Streuung in ihren mittleren Spontanentladungsraten (Abbildung 24 A). Der Mittelwert aller untersuchten Neurone der AMPA-Tiere betrug $101 \text{ AP/s} \pm 49 \text{ AP/s}$, während der Mittelwert der Kontrolltiere $59 \text{ AP/s} \pm 37 \text{ AP/s}$ betrug. Die Verteilung der Spontanentladungsrate war in dem CF-Bereich von 0,07 bis 1,5 kHz bei beiden Gruppen asymmetrisch, wobei sich bei den AMPA-Tieren eine deutliche Häufung im Bereich zwischen 70 und 100 AP/s mit deutlich weniger Neuronen im darunterliegenden und darüberliegenden Bereich zeigte. Die Verteilung bei der Kontrollgruppe zeigte eine deutliche Häufung im Bereich zwischen 10 und 80 AP/s und deutlich weniger Neuronen bei höheren Spontanentladungsraten (Abbildung 23).

Obwohl die Variationsbreite der Spontanentladungsraten bei beiden Gruppen sehr groß war, zeigte sie eine deutliche Abhängigkeit mit der charakteristischen Frequenz der Neurone. Neurone mit tiefer CF wiesen im Mittel eine hohe, solche mit hoher CF eine niedrige Spontanentladungsrate auf, so daß die Spontanentladungsrate mit steigender CF abnahm, wobei die mittlere Spontanaktivität der AMPA-Gruppe fast um das Doppelte höher war als die der Kontrollgruppe (Abbildung 24 B, C). Abgebildet ist der gleitende Mittelwert der Spontanentladungsraten als eine Funktion der charakteristischen Frequenz. Hierfür wurde jeweils die Spontanentladungsrate jedes Neurons mit den charakteristischen Frequenzen derjenigen Neurone gemittelt, deren CF in einem Fenster von 0,5 Oktaven über bzw. unter

dieser charakteristischen Frequenz lagen. Diese Mittelung wurde mit einer Schrittweite von 0,3 Oktaven über den gesamten gemessenen Frequenzbereich durchgeführt. Die Mittelwerte wurden danach gegen die charakteristische Frequenz aufgetragen. Der Anstieg der mittleren Spontanentladungsrate bei den AMPA Tieren ab einer Frequenz von 0,75 kHz und bei den Kontrolltieren ab 1 kHz ist primär darauf zurückzuführen, daß bei den höher gelegenen Frequenzen kaum Neurone gefunden werden konnten. Aus der Abbildung 24 C ist ersichtlich, daß der Unterschied zwischen der mittleren Spontanentladungsrate der AMPA-Tiere und der Kontrolltiere ab einer Frequenz von 0,165 bis zu einer Frequenz von 0,967 kHz signifikant (t-Test, $p < 0,01$) ist.

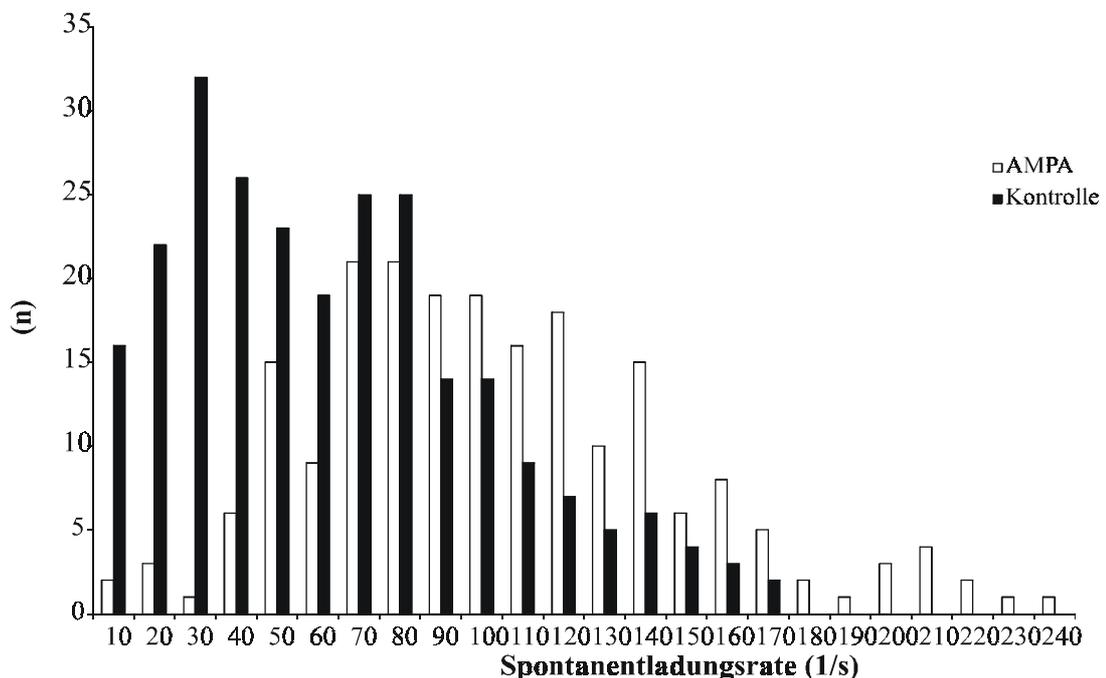


Abbildung 23: Histogramm der Spontanentladungsrate von den Neuronen der AMPA-Tiere (weiße Balken) und der Kontrollgruppe (schwarze Balken). Die charakteristische Frequenz beider Gruppen von Neuronen lagen im Bereich von 0,07 bis 1,5 kHz.

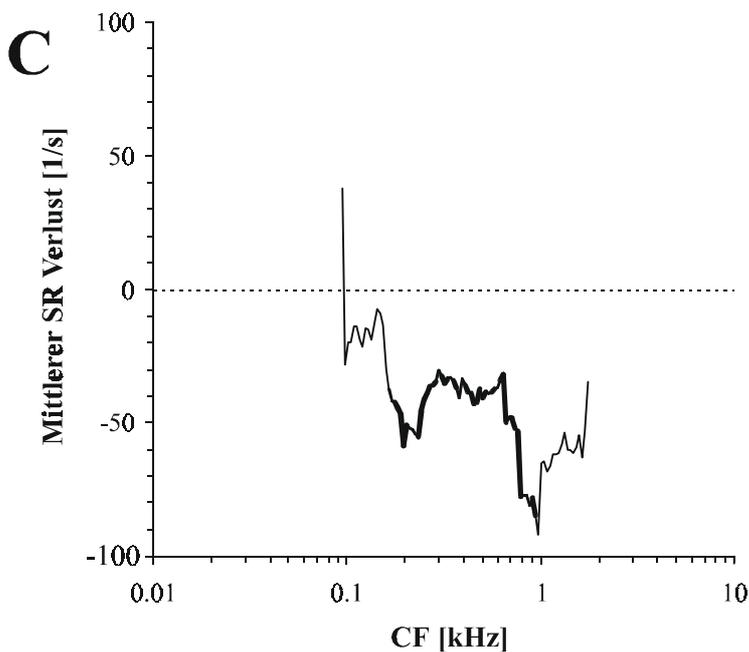
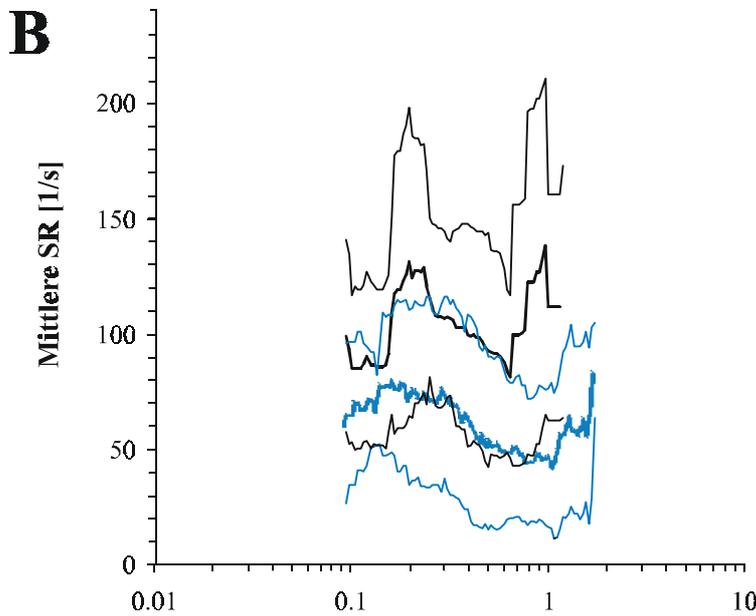
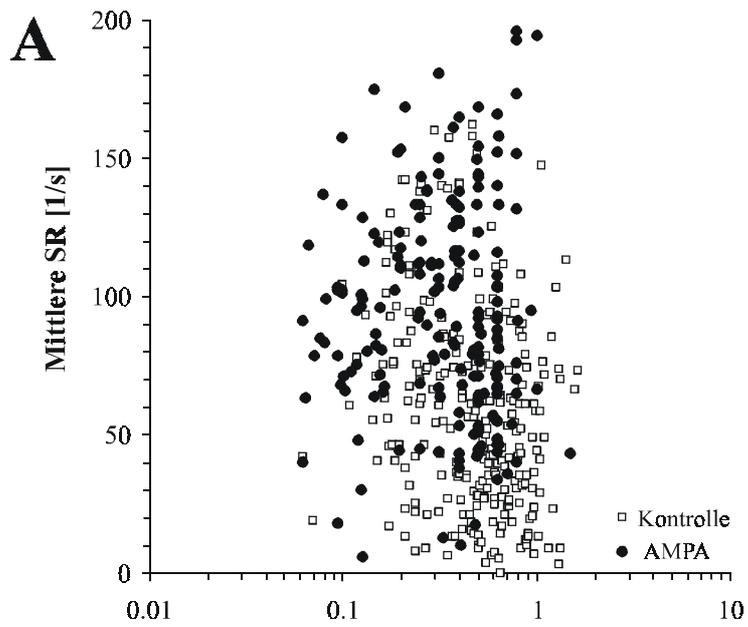


Abbildung 24: (A) Dargestellt ist die mittlere Spontanladungsrate als Funktion der Frequenz. Die vollen Kreise symbolisieren die AMPA-Tiere und die offenen Quadrate die Kontrolltiere. In B ist der gleitende Mittelwert, für den eine Schrittweite von 0,3 Oktaven gewählt wurde, der in A gezeigten Daten dargestellt (Schwarze dicke Linie: AMPA-Tiere, blaue dicke Linie: Kontrolle, dünne Linien: einfache Standardabweichung). C gibt die Differenz zwischen den beiden gleitenden Mittelwerten an. Die dicke Linie gibt den signifikanten Bereich wieder (t-Test, $p < 0,01$).

3.4.2 Schallevozierte Aktivität

3.4.2.1 Frequenzabstimmkurven (Tuningkurven)

In Abbildung 25 sind einige typische Tuningkurven von Tauben nach 14 Wochen Erholung von der AMPA-Gabe zu sehen. Ausgewählt wurden Neurone mit relativ niedrigen CF-Schwellen, um eine Aussage über eventuelle Formveränderungen der Tuningkurven bei vergleichsweise guten CF-Schwellen machen zu können. Zu erkennen ist, daß die tieffrequenten Neurone breitere Tuningkurven als die hochfrequenten Neurone haben. Generell aber sind die Tuningkurven von den Tauben 14 Wochen nach der AMPA-Gabe breiter als die der Kontrollgruppe und zeigen zum Teil nicht mehr die typische V-Form. Sie sind leicht asymmetrisch.

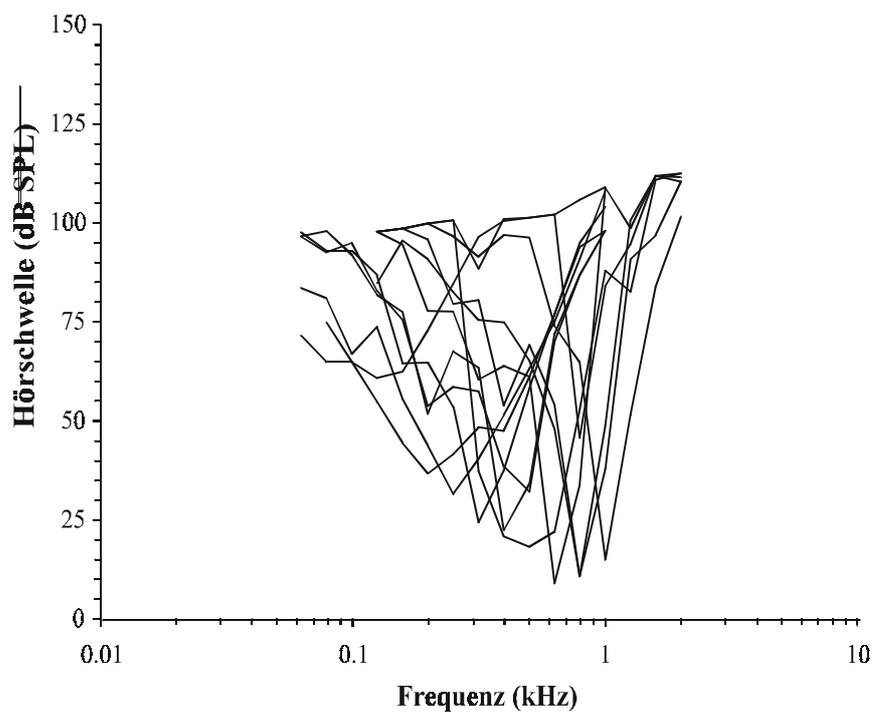


Abbildung 25: Beispiele von Frequenzabstimmkurven mit unterschiedlichen charakteristischen Frequenzen der AMPA-Tiere nach 14 Wochen Erholung von der AMPA-Gabe (n = 13).

3.4.2.2 Schwelle bei der charakteristischen Frequenz

Die Schwellen der cochleären Ganglienzellen der AMPA-Tiere liegen 14 Wochen nach der AMPA-Applikation im Vergleich zu den Schwellen der Kontrolltiere höher (Abbildung 26 A-C). Die niedrigsten Schwellen der Kontrolltiere befinden sich in einem Frequenzbereich von 0,5 bis 1,5 kHz. In diesem Bereich können sogar einzelne Neurone mit Schwellen unter 0 dB SPL gefunden werden.

Bei den AMPA-Tieren lagen die CF-Werte in einem Frequenzbereich von 0,065 bis 1,5 kHz. Oberhalb von 1,5 kHz konnten bei keinem der 8 Tiere Antworteigenschaften der Einzelfasern abgeleitet werden. Die niedrigsten Schwellen lagen hier zwischen 0,3 und 1 kHz. In diesem Frequenzbereich konnten auch bei den AMPA-Tieren einige Neurone mit Schwellen zwischen 0 und 15 dB gefunden werden. In Abbildung 26 B ist der gleitende Mittelwert der Einzelfaserschwellen als eine Funktion der CF Werte abgebildet. Deutlich zu erkennen ist die Frequenzabhängigkeit der CF-Werte beider Gruppen. In dem tiefen Frequenzbereich von 0,1 bis 0,35 kHz liegen die mittleren Schwellen beider Gruppen zwischen 30 bis 60 dB SPL, wobei die mittlere Schwelle der AMPA-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Schwellenanhebung von 5 bis 10 dB SPL zeigt (Abb. 26 C). In dem mittleren Frequenzbereich von 0,5 bis 1 kHz beträgt die Schwellenanhebung der AMPA-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren 10 bis 15 dB SPL. Die mittleren Schwellen der Kontrollgruppe liegen zwischen 15 und 30 dB SPL und die der AMPA-Tiere zwischen 30 und 40 dB SPL. Die niedrigsten mittleren Schwellen liegen bei beiden Gruppen im Bereich von 1 kHz, wobei die AMPA-Gruppe den niedrigsten Schwellenwert von 32 dB SPL bei 1 kHz hat und die Kontrolltiere den niedrigsten mittleren Schwellenwert von 15 dB SPL bei 1,3 kHz aufweisen. Abbildung 26 C zeigt den Unterschied des gleitenden Mittelwertes zwischen der Kontrollgruppe und der AMPA-Gruppe, d. h. den bleibenden Schwellenverlust nach Erholung. In dem Frequenzbereich von 0,3 bis 1 kHz ist der mittlere residuale Schwellenverlust signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

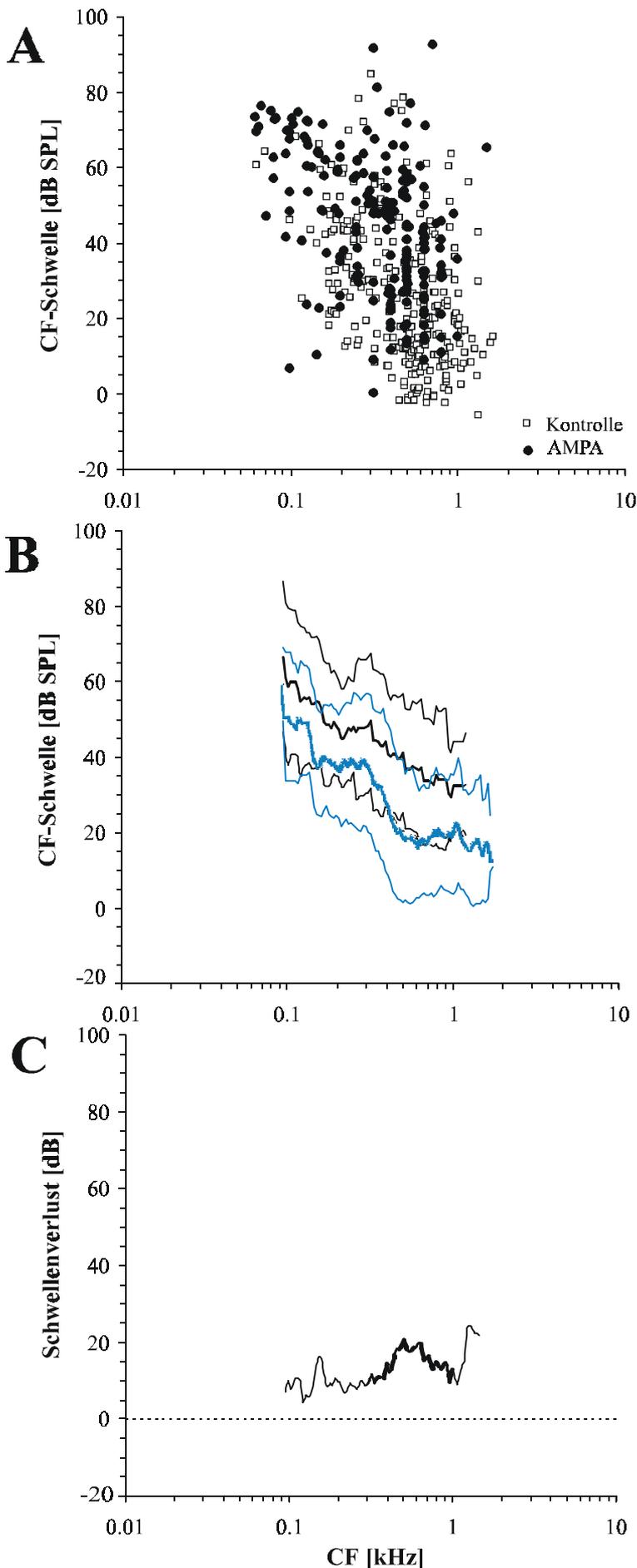


Abbildung 26: (A) Darstellung der Wechselbeziehung zwischen Schwelle und charakteristischer Frequenz. Die vollen Kreise symbolisieren die AMPA-Tiere, die leeren Quadrate die Kontrolltiere. In B ist der gleitende Mittelwert der in A gezeigten Daten aufgetragen (schwarze Linie: AMPA-Tiere, blaue Linie: Kontrolle, dünne Linien: einfache Standardabweichung). C zeigt den CF Schwellenverlust gerechnet als die Differenz zwischen den gleitenden Mittelwerten beider Gruppen. Die signifikanten Werte sind durch die dicke schwarze Linie dargestellt (t-Test, $p < 0,01$).

3.4.2.3 Abstimmsschärfe der Tuningkurven ($Q_{10\text{dB}}$ -Wert)

Für die Abstimmsschärfe der Tuningkurven wird der Begriff $Q_{10\text{dB}}$ verwendet.

$$Q_{10\text{dB}} = CF/\Delta F_{10\text{ dB}}$$

“ $Q_{10\text{dB}}$ ” wird definiert als CF geteilt durch die Bandbreite “ ΔF ” der Tuningkurve bei 10 dB über der Schwelle (Kiang und Moxon, 1974; siehe auch Abb. 3).

Der mittlere $Q_{10\text{dB}}$ -Wert der Kontrolltiere lag bei $3,61 \pm 2,07$ und war damit fast doppelt so hoch wie der $Q_{10\text{dB}}$ -Wert der AMPA-Tiere mit $2,07 \pm 1,55$. Während die $Q_{10\text{dB}}$ -Werte der Kontrollgruppe gemessen an ihren CF-Werten stark variieren, ist die Variationsbreite bei den AMPA-Tieren nach 14 Wochen der Regeneration geringer.

Bei den unbehandelten Kontrolltieren stiegen die höchsten $Q_{10\text{dB}}$ -Werte im jeweiligen Frequenzbereich von unter 1 bei den niedrigsten CF-Werten auf über 8 bei der Frequenz von 1,7 kHz. Bei den AMPA-Tieren war nach einer Erholungszeit von 14 Wochen ein Anstieg des größten jeweiligen $Q_{10\text{dB}}$ -Wertes von unter 1 auf 6 in einem Frequenzbereich von 0,065 bis 1,2 kHz zu beobachten (Abbildung 27 A). Der größte einzelne $Q_{10\text{dB}}$ -Wert, der gefunden werden konnte, betrug 9,8 bei einem CF-Wert von 0,63 kHz. Ebenso wie für die Schwellen bei CF wurde der gleitende Mittelwert für die $Q_{10\text{dB}}$ -Werte als Funktion der CF berechnet (Abbildung 27 B). Der gleitende Mittelwert für die $Q_{10\text{dB}}$ -Werte blieb ab einer Frequenz von 0,4 kHz im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich niedriger. Für die CF Werte über 0,36 kHz waren die mittleren $Q_{10\text{dB}}$ -Werte der AMPA-Tiere statistisch signifikant niedriger als die der Kontrolltiere (t-Test, $p < 0,01$). Der höchste mittlere Wert, der erreicht wurde, lag bei einer CF von 1,2 kHz bei 3 und war damit 2/3 kleiner als der $Q_{10\text{dB}}$ -Wert der Kontrollgruppe bei der entsprechenden Frequenz. In Abbildung 27 C ist der mittlere Verlust der Abstimmsschärfe der Tuningkurven nach 14 Wochen Erholung, gerechnet als die Differenz der gleitenden Mittelwerte beider Gruppen, aufgetragen. Die dicke Linie zeigt den signifikanten Bereich. Zu erkennen ist, daß der Verlust der mittleren $Q_{10\text{dB}}$ -Werte mit steigender CF immer größer wird.

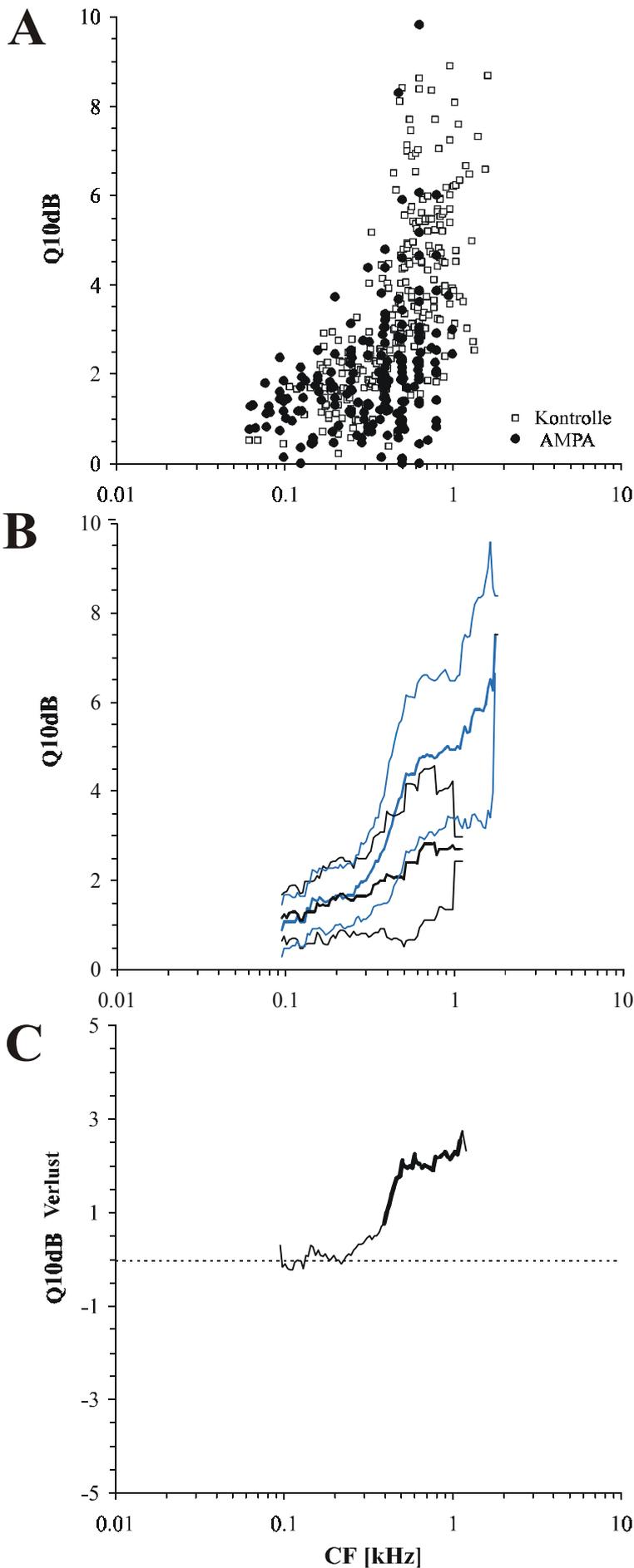


Abbildung 27: (A) Darstellung der Wechselbeziehung zwischen Abstimmstärke der Tuningkurven und charakteristischer Frequenz. Die vollen Kreise symbolisieren die AMPA-Tiere, die leeren Quadrate die Kontrolltiere. In B ist der gleitende Mittelwert der in A gezeigten Daten aufgetragen (schwarze Linie: AMPA-Tiere, blaue Linie: Kontrolle, dünne Linien: einfache Standardabweichung). C zeigt den Q_{10dB} Schwellenverlust gerechnet als die Differenz zwischen den gleitenden Mittelwerten beider Gruppen. Die signifikanten Werte sind durch die dicke schwarze Linie dargestellt (t-Test, $p < 0,01$).

3.4.2.4 Zusammenhang der Parameter der Aktivität von Hörnervenfaser gleich charakteristischer Frequenz

Um herauszufinden, ob bei den Neuronen der mit AMPA behandelten Tiere und denen der Kontrollgruppe unterschiedliche Wechselbeziehungen zwischen den Parametern Spontanentladungsrate, Q_{10dB} und Schwelle bestehen, wurden diese Parameter unabhängig von der charakteristischen Frequenz für beide Tiergruppen aufgetragen. Ausgewählt wurde hierfür beispielhaft der Frequenzbereich zwischen 0,707 und 1,414 kHz ($1 \text{ kHz} \pm 0,5$ Oktaven). Die Auswahl des entsprechenden Frequenzbereichs stellt einen Kompromiß dar zwischen dem Erhalt einer möglichst großen Anzahl von Daten in einem empfindlichen CF Bereich der Tauben und dem Bestreben, einen sehr kleinen Frequenzbereich einzugrenzen, um die Abhängigkeit der Parameter von der charakteristischen Frequenz so gering wie möglich zu halten.

In Abbildung 28 A ist zu erkennen, daß bei der Kontrollgruppe ein signifikant linearer Zusammenhang zwischen der Spontanentladungsrate und der Schwelle besteht ($r = -0,45$; $p < 0,05$; $n = 70$). Mit steigender Schwelle, d. h. mit Abnahme der Empfindlichkeit des Neurons bei gleicher charakteristischer Frequenz, sinkt die Spontanentladungsrate. Da bei den AMPA-Tieren die Streuung in dem vorgegebenen Frequenzbereich zu groß war (Abb. 28 A-C) konnte keine signifikante Korrelation für die Wechselbeziehungen zwischen den untersuchten Parametern gefunden werden. Untersucht werden konnte so lediglich, ob sich die Mittelwerte beider Gruppen bei Elimination der CF-Abhängigkeit signifikant voneinander unterscheiden. Die mittlere Spontanrate beider Gruppen war in dem gewählten Frequenzbereich signifikant unterschiedlich (t-Test; $p < 0,01$). Während die Spontanrate bei der AMPA-Gruppe 127 ± 75 AP/s betrug, lag die mittlere Spontanrate der Kontrollgruppe bei 49 ± 30 AP/s (schwarze Pfeile).

Die Wechselbeziehung zwischen den Q_{10dB} -Werten und den Schwellen wird in Abbildung 28 B dargestellt. Bei der Kontrollgruppe konnte wiederum eine signifikante Korrelation zwischen Q_{10dB} und der Schwelle festgestellt werden. Die Abstimmstärke der Hörnervenfaser sinkt mit steigender Schwelle ($r = -0,37$, $p < 0,05$; $n = 70$). Die mittleren Q_{10dB} -Werte betragen bei den AMPA-Tieren $2,6 \pm 1,4$ und bei der Kontrollgruppe $5,0 \pm 1,9$ und waren signifikant unterschiedlich (t-Test; $p < 0,01$; schwarze Pfeile).

Bei dem Vergleich des Q_{10dB} -Wertes mit der Spontanentladungsrate scheint ebenfalls eine Abhängigkeit zu bestehen, die aber sowohl bei den Kontrolltieren als bei den AMPA-Tieren nicht signifikant ist (Abbildung 28 C). Die Abhängigkeit von Q_{10dB} und Spontanentladungsrate ist deutlich schwächer als die Abhängigkeit der beiden Parameter mit der Schwelle bei der charakteristischen Frequenz. Der Q_{10dB} scheint mit steigender Spontanentladungsrate zuzunehmen. Die Parameter sind allerdings durch die Schwelle als Parameter bedingt, da eine niedrige Schwelle mit einer hohen Spontanentladungsrate und einer großen Abstimmstärke einhergeht (Smolders et al., 1995). Die Wechselwirkung zwischen niedriger Schwelle, hoher Spontanentladungsrate und großer Abstimmstärke ist bei den Kontrolltieren und bei den AMPA-Tieren zu sehen.

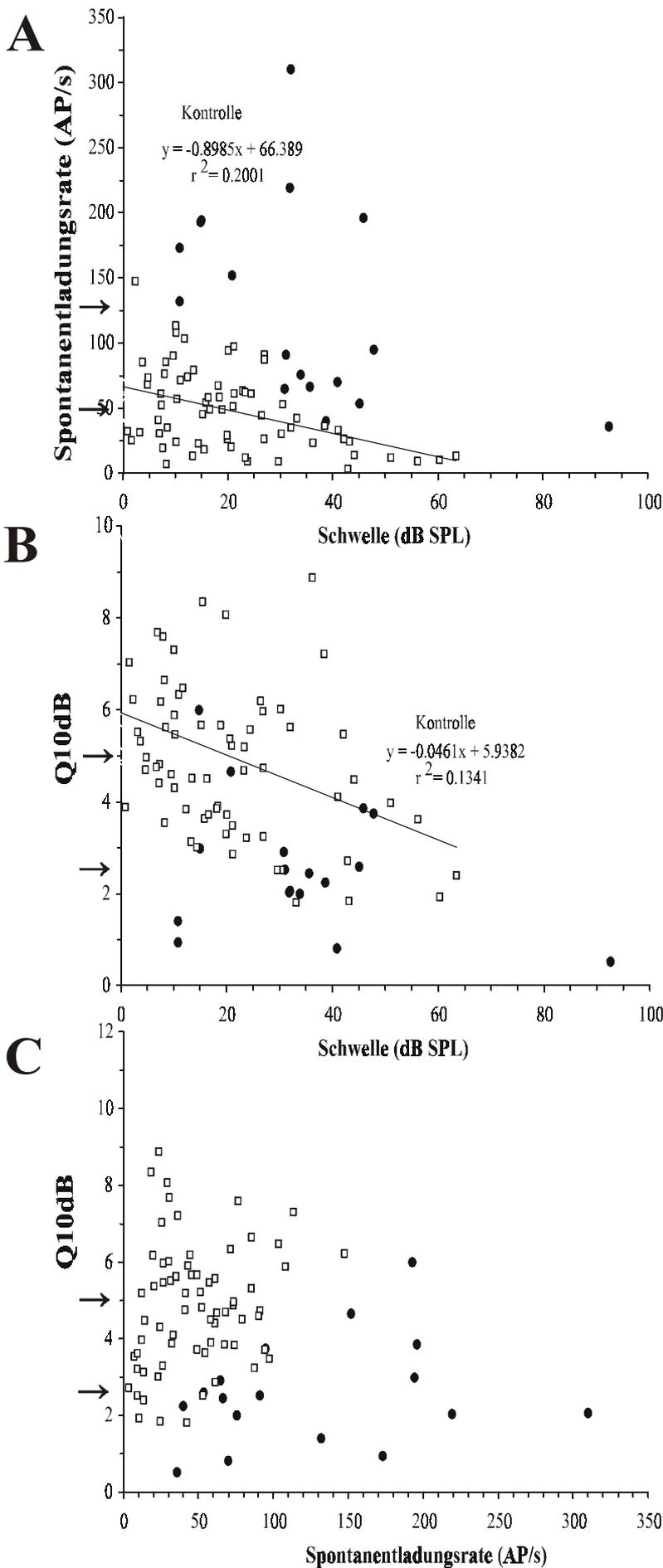


Abbildung 28: Abhängigkeit der Eigenschaften der Hörnervenfaser der Taube mit CF in einem Bereich von 0,707 und 1,414 kHz. (A) Mittlere Spontanentladungsrate der Hörnervenfaser als Funktion der Schwelle bei der charakteristischen Frequenz (CF). (B) Abstimmstärke als Funktion der Schwelle bei der charakteristischen Frequenz. (C) Abstimmstärke als Funktion der Spontanentladungsrate. (AMPA Tiere: $n = 17$ volle Kreise; Kontrolle: $n = 70$, leere Quadrate). In den Abbildungen sind die jeweiligen Regressionsgeraden und die Mittelwerte (schwarze Pfeile) beider Gruppen eingefügt.

3.4.2.5 Intensitätsabhängigkeit der Entladungsrate

Die Intensitätsabhängigkeit der Entladungsrate bei Reizung mit Tönen, die der CF des Neurons entsprechen, wurde nur an 20 Neuronen von AMPA-Tieren untersucht, so daß eine statistisch signifikante Aussage über die Abhängigkeit der Entladungsrate von der Schallintensität nur bedingt möglich war. In Abbildung 29 A ist die maximale schallevozierte Entladungsrate der AMPA-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren dargestellt. Zu erkennen ist, daß bei beiden Gruppen die maximale Rate auf bis zu 700 Aktionspotentiale/s bei einer CF von 0,65 kHz ansteigt und sich somit die maximale Aktivität der Neurone nicht unterscheidet. In Abbildung 30 sind vier Einzelbeispiele für Intensitätskennlinien von Einzelfasern nach 14 Wochen Erholung dargestellt. Die Frequenz ist jeweils die CF der Faser. Bei den hier gezeigten Neuronen reicht die Reizintensität aus, um die maximale Aktivität des Neurons hervorzurufen. Dieser Kurvenverlauf wird als „saturating“ bezeichnet. Zu erkennen ist außerdem, daß die Schwelle und die maximale Entladungsrate von der charakteristischen Frequenz abhängig ist.

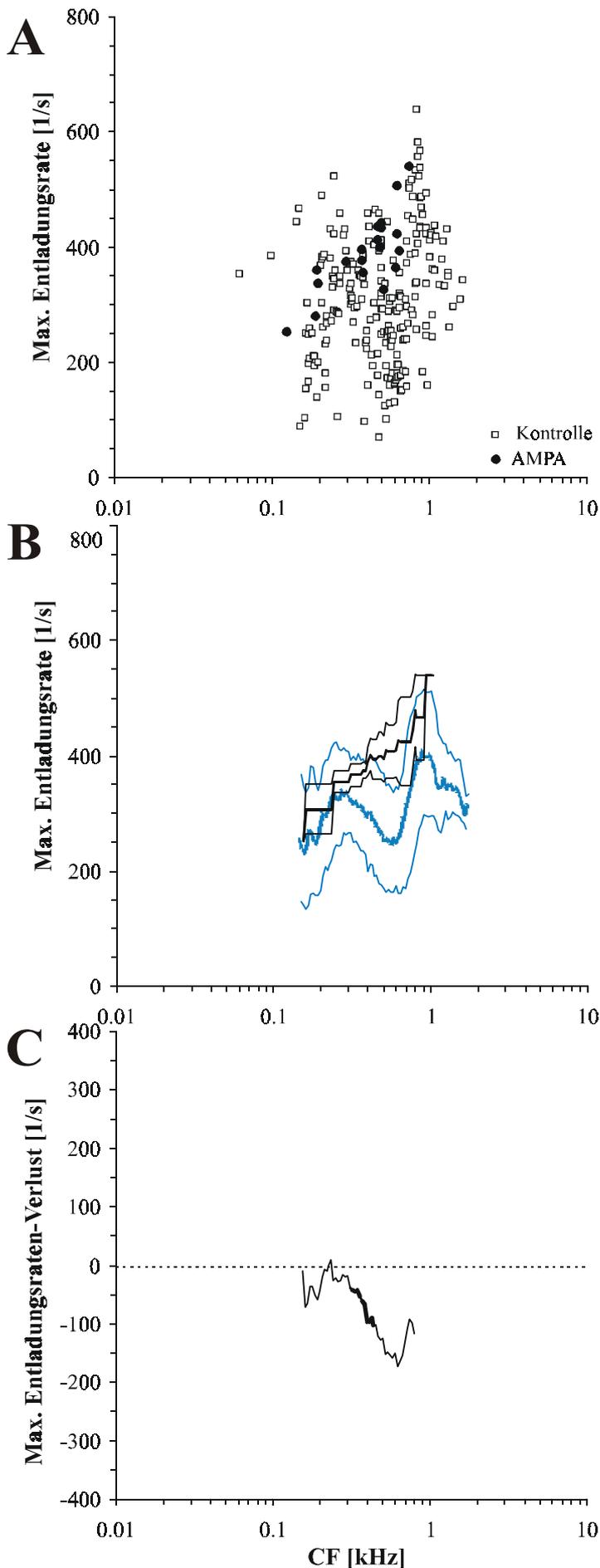


Abbildung 29: (A) Darstellung der Wechselbeziehung zwischen maximaler schallevozierter Entladungsrate und charakteristischer Frequenz. Die vollen Kreise symbolisieren die AMPA-Tiere, die leeren Quadrate die Kontrolltiere. In B ist der gleitende Mittelwert der in A gezeigten Daten aufgetragen (schwarze Linie: AMPA-Tiere, blaue Linie: Kontrolle, dünne Linien: einfache Standardabweichung). C zeigt den Verlust der maximalen Entladungsrate gerechnet als die Differenz zwischen den gleitenden Mittelwerten beider Gruppen. Die signifikanten Werte sind durch die dicke schwarze Linie dargestellt (t-Test, $p < 0,01$).

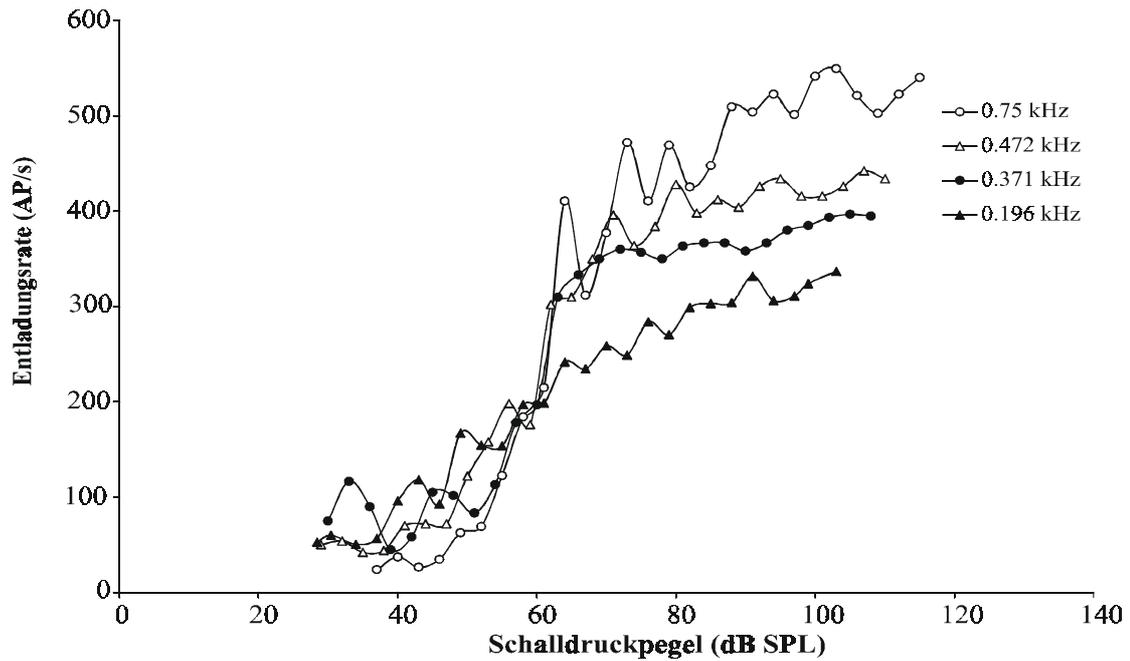


Abbildung 30: Vier Beispiele für Intensitätskennlinien von primären Fasern 14 Wochen nach Regeneration von der intrascalären AMPA-Applikation. Dargestellt ist die Entladungsrate (AP/s) bei den charakteristischen Frequenzen der Fasern. Zu erkennen ist die Abhängigkeit der Entladungsratenänderung der Neurone (in AP/s) von der Intensitätsabschwächung und die Abhängigkeit der maximalen Entladungsrate von der CF.

3.5 Histologische Auswertung (TEM und SEM)

3.5.1 TEM

3.5.1.1 Präparate unbehandelter Tauben

Um einen morphologischen Vergleich zu den mit AMPA behandelten Papillen zu haben, wurden insgesamt vier Papillen von zwei unbehandelten Kontrolltauben untersucht. Abbildung 31 A und B zeigen einen Ausschnitt aus dem apikalen und medialen Bereich der Basilarmembran. Zu erkennen sind die verschieden großen Haarzellen, die THCs, ImHCs und SHCs. Zwischen den Haarzellen liegen die Stützzellen, die auch den Platz zwischen Basilarmembran und den Haarzellen ausfüllen. Die Haarzellen selbst berühren die Basilarmembran nicht, die auf den beiden Bildern auch nicht zu sehen ist. Die Nervenendigungen, die an der Basis der Haarzellen liegen, sind bei dieser Vergrößerung kaum zu erkennen.

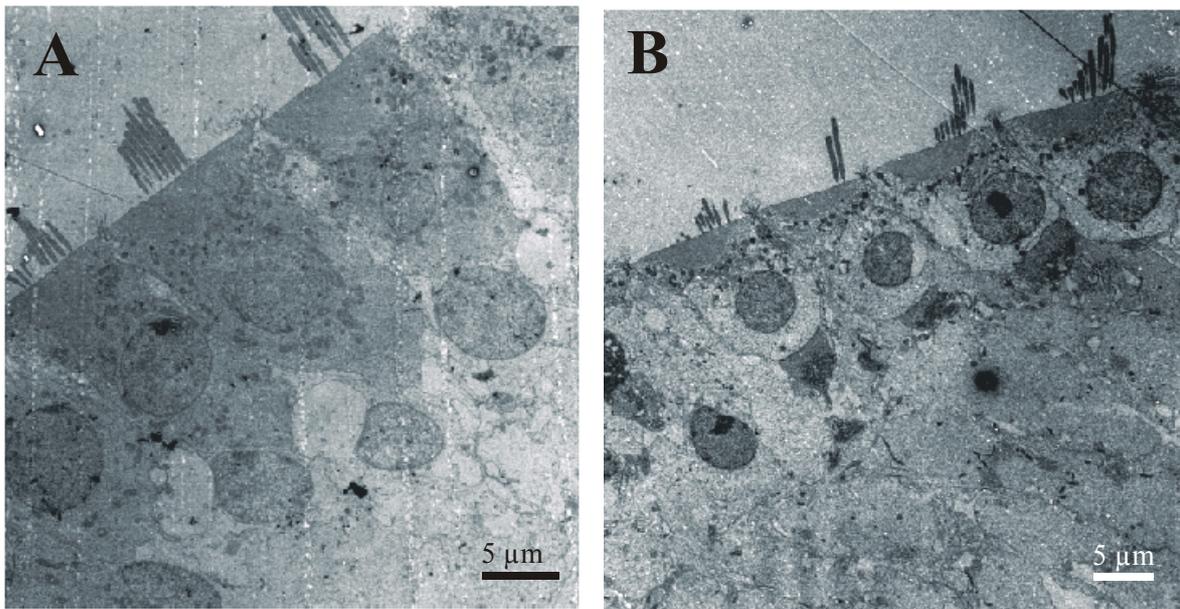
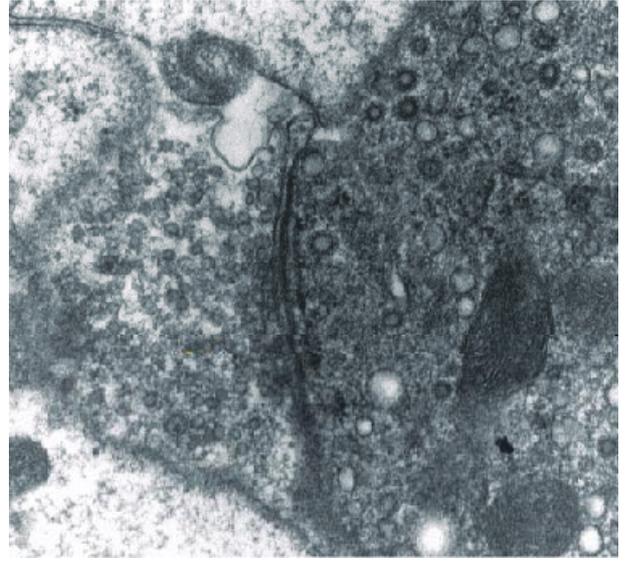
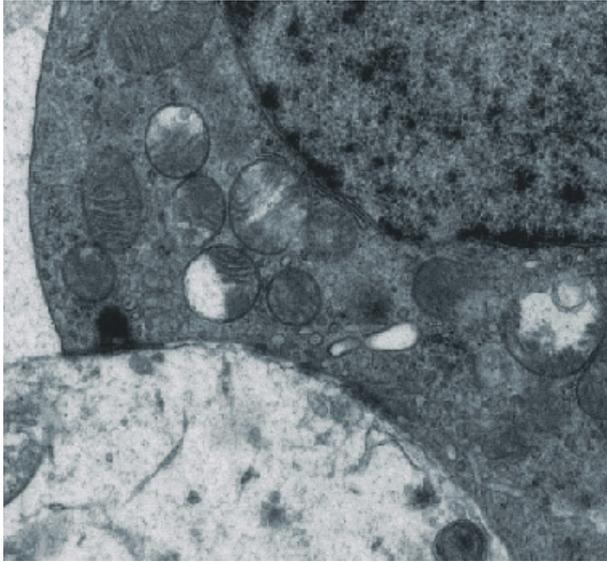


Abbildung 31: Darstellung eines Ausschnittes aus dem apikalen (A) und medialen (B) Bereich der unbehandelten Papilla basilaris. Zu erkennen sind die unterschiedlich großen Haarzellen und die dazwischen liegenden Stützzellen. Über den Stereozilien ist noch ein Teil der Tektorialmembran zu sehen.

In Abbildung 32 A und B sind der basale Teil einer Haarzelle und die angrenzenden Nervenendigungen dargestellt. Der afferente terminale Dendrit besitzt eine sogenannte „cup like“ Form (Stern). Deutlich zu sehen ist der präsynaptische Körper (Pfeil, in Abb. 32 A) mit den darumliegenden Vesikeln (\varnothing 20-30 nm), der sowohl bei Säugern als auch bei Vögeln und Amphibien typisch für die afferente Synapse der Haarzellen ist (Gleisner et al., 1973; Hama und Saito, 1977; Hashimoto et al., 1990; Friedmann und Ballantyne, 1984). Diese Form der Synapse wird „ribbon synapse“ genannt. Direkt unterhalb des präsynaptischen Körpers ist sowohl prä- als auch postsynaptisch elektronendichtes Material zu sehen. Die efferenten Nervenendigungen sind im Vergleich zu den afferenten Nervenendigungen meist elektronendichter, da sie vollständig mit Vesikeln angefüllt sind. Typisch für die efferenten terminalen Dendriten sind außerdem die subsynaptische Zisterne (Pfeil, in Abb. 32 B) und die länglichen Mitochondrien, die auf diesem Bild allerdings nicht zu erkennen sind (Abbildung 32 B).



anfälliger für Sauerstoffmangel während der Präparation bzw. Fixation ist. Die Haarzellen und die Stützzellen befinden sich in deutlich schlechterem Zustand als im apikalen Teil. Dies läßt sich an dem insgesamt schlechteren Zustand des Präparates erkennen.

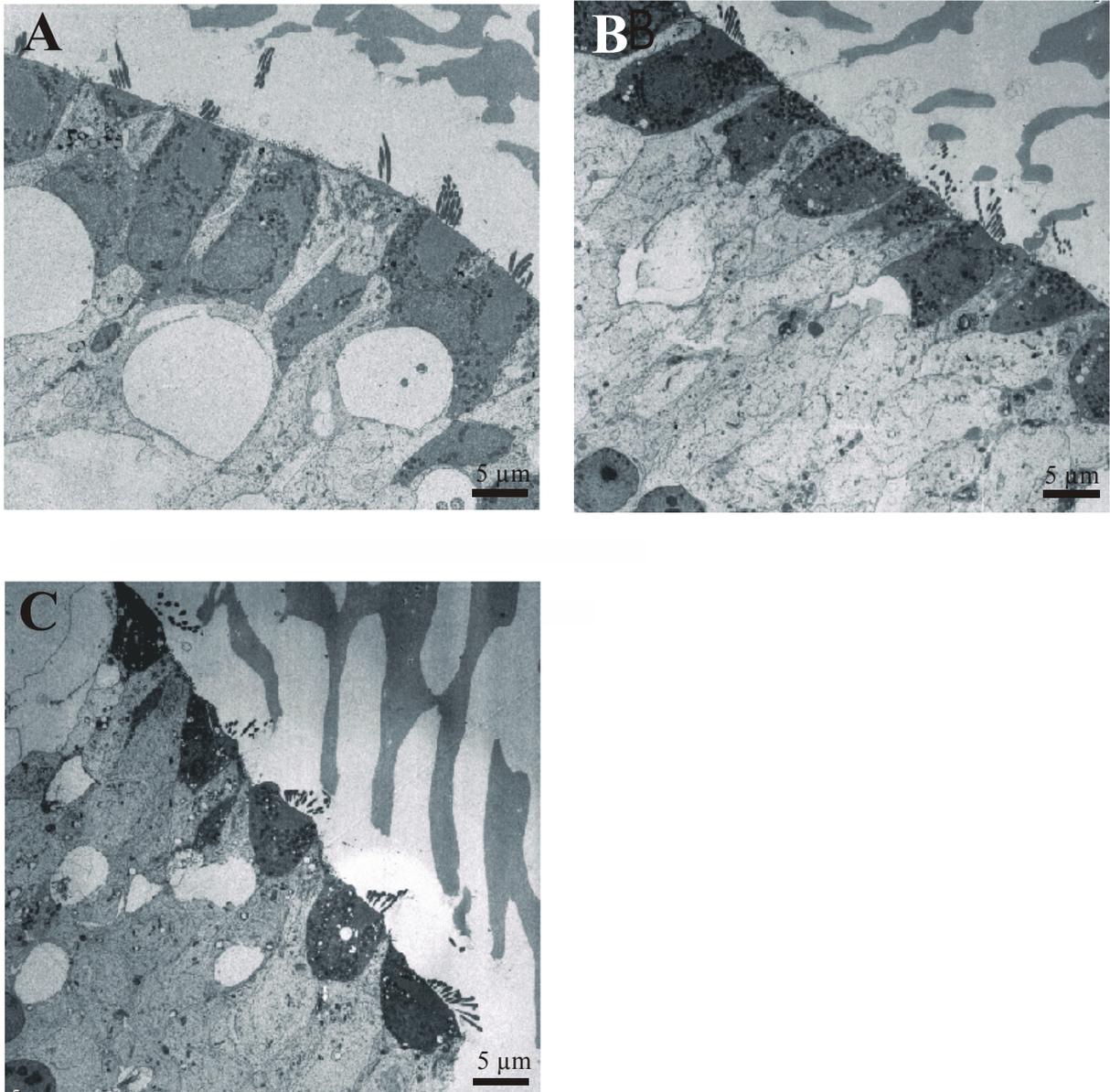


Abbildung 33: Darstellung eines Ausschnittes aus dem apikalen (A), medialen (B) und basalen (C) Bereich der Papilla basilaris nach intrascalärer Infusion von 1 mM AMPA. Zu erkennen sind die unterschiedlich großen Haarzellen und die dazwischen liegenden Stützzellen. Über den Stereozilien ist noch ein Teil der Tektorialmembran zu sehen. Besonders auffällig sind die großen Vakuolen, die direkt unter den Haarzellen liegen und zerstörte afferente terminale Dendriten darstellen.

In Abbildung 34 ist der basale Teil einer Haarzelle mit den darunter liegenden Vakuolen zu sehen. Es ist zu erkennen, daß der Zellkern und andere in Haarzellen vorkommende Organellen keine Veränderungen aufweisen. Der präsynaptische Körper (Pfeil) mit den darum liegenden Vesikeln und die präsynaptische Membran sind ebenfalls intakt. Auf der

postsynaptischen Seite ist zu erkennen, daß ein Teil der postsynaptischen Membran noch erhalten ist, im Dendritenkörper selbst aber nur noch Zelldebris zu finden ist. Die efferenten Nervenendigungen wurden nicht beschädigt. Neben dem zerstörten Dendrit ist noch eine intakte efferente Nervenendigung zu finden (siehe auch Abbildung 34 B).

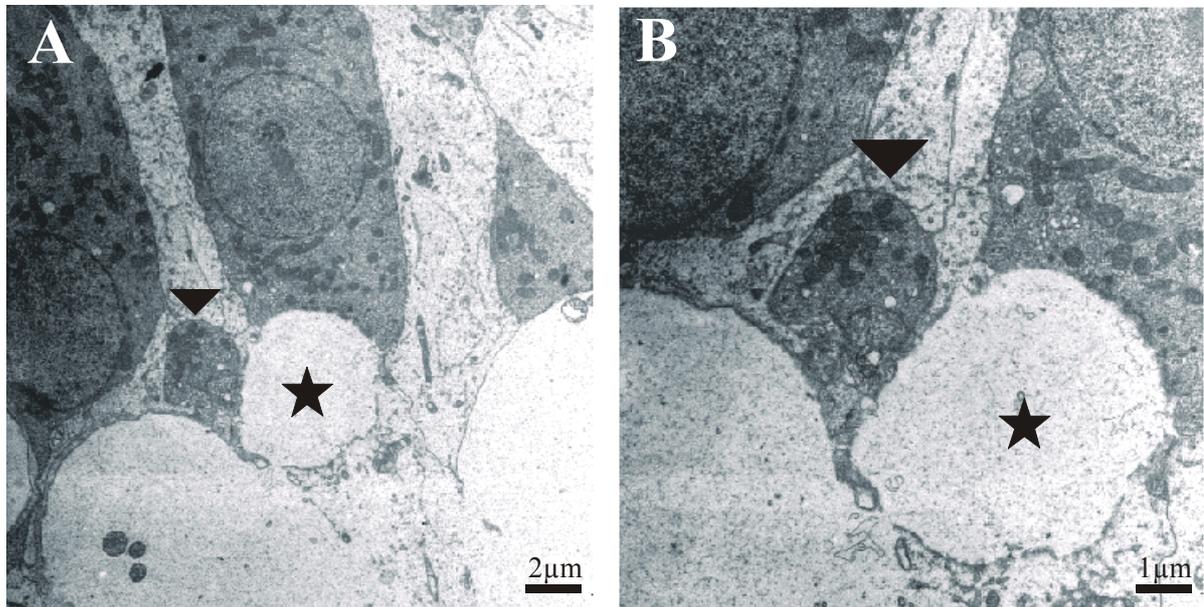


Abbildung 34: Basaler Teil einer Haarzelle mit darunterliegendem zerstörten afferenten terminalen Dendriten (Stern) und danebenliegendem intaktem efferenten terminalen Dendriten (Pfeil). (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von A.

Bei den am Tag 3, 7 und 14 nach AMPA-Infusion durchgeführten histologischen Untersuchungen konnten im Vergleich zu den Kontrollpapillen ab dem 14. Tag keine Veränderungen in Struktur und Form der Haarzellen bzw. der Nervenendigungen gefunden werden. Lediglich an Tag 3 und 7 waren noch einige vereinzelte nicht intakte afferente Nervenendigungen zu finden (Abbildung 35).

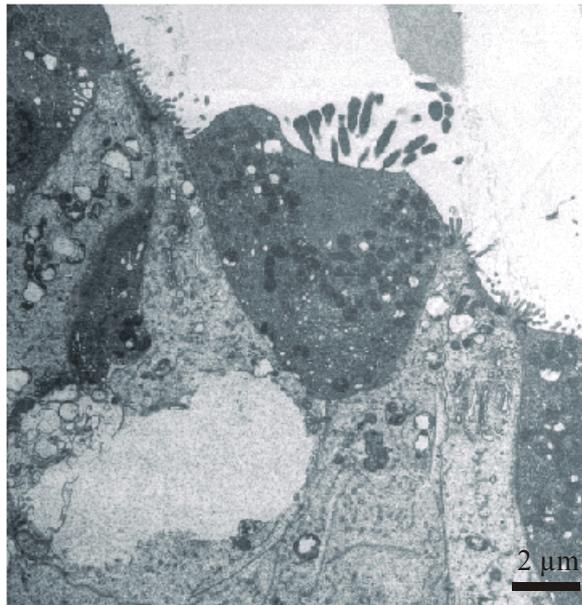


Abbildung 35: Intakte Haarzelle mit zum Teil zerstörter afferenter Nervenendigung.

3.5.2 SEM

In den Abbildungen 36 A und B sind beispielhaft die Papilla basilaris eines unbehandelten Ohres und eines Ohres 14 Wochen nach der intrascalären AMPA-Applikation dargestellt. Zu sehen ist, daß sich die Oberflächen der Papilla basilaris von dem unbehandelten Ohr und dem behandelten Ohr 14 Wochen nach der intrascalären AMPA-Applikation in ihrem Erscheinungsbild nicht unterscheiden. Beide SEM-Oberflächenaufsichten stammen von dem gleichen Tier. Das linke Ohr dient als Kontrolle. Wie an den Stereozilienbündeln, die auf den Haarzellen sitzen, zu erkennen ist, liegen die Haarzellen umgeben von den Stützzellen gleichmäßig verteilt auf der gesamten Basilarmembran. Die Dichte der Haarzellen scheint am neuralen Rand größer als am abneuralen Rand zu sein (Abbildung 36 A und B). Dies liegt aber daran, daß die SHCs, die vor allem am abneuralen Rand sitzen, einen größeren Oberflächendurchmesser haben als die THCs, die mehr neural sitzen. Der Abstand zwischen den Stereozilienbündeln, die auf den Haarzellen sitzen, scheint so am abneuralen Rand größer zu sein. Die Stereozilienbündel selbst zeigen keine Veränderungen in ihrer Struktur (Abb. 36 C). Die Gesamtzahl der Haarzellen und somit ihre Dichte nimmt von basal nach apikal zu. Insgesamt wurden die Cochleae von drei Tieren untersucht und bei allen sechs SEM-Oberflächenaufsichten konnten die gleichen Befunde erhoben werden.

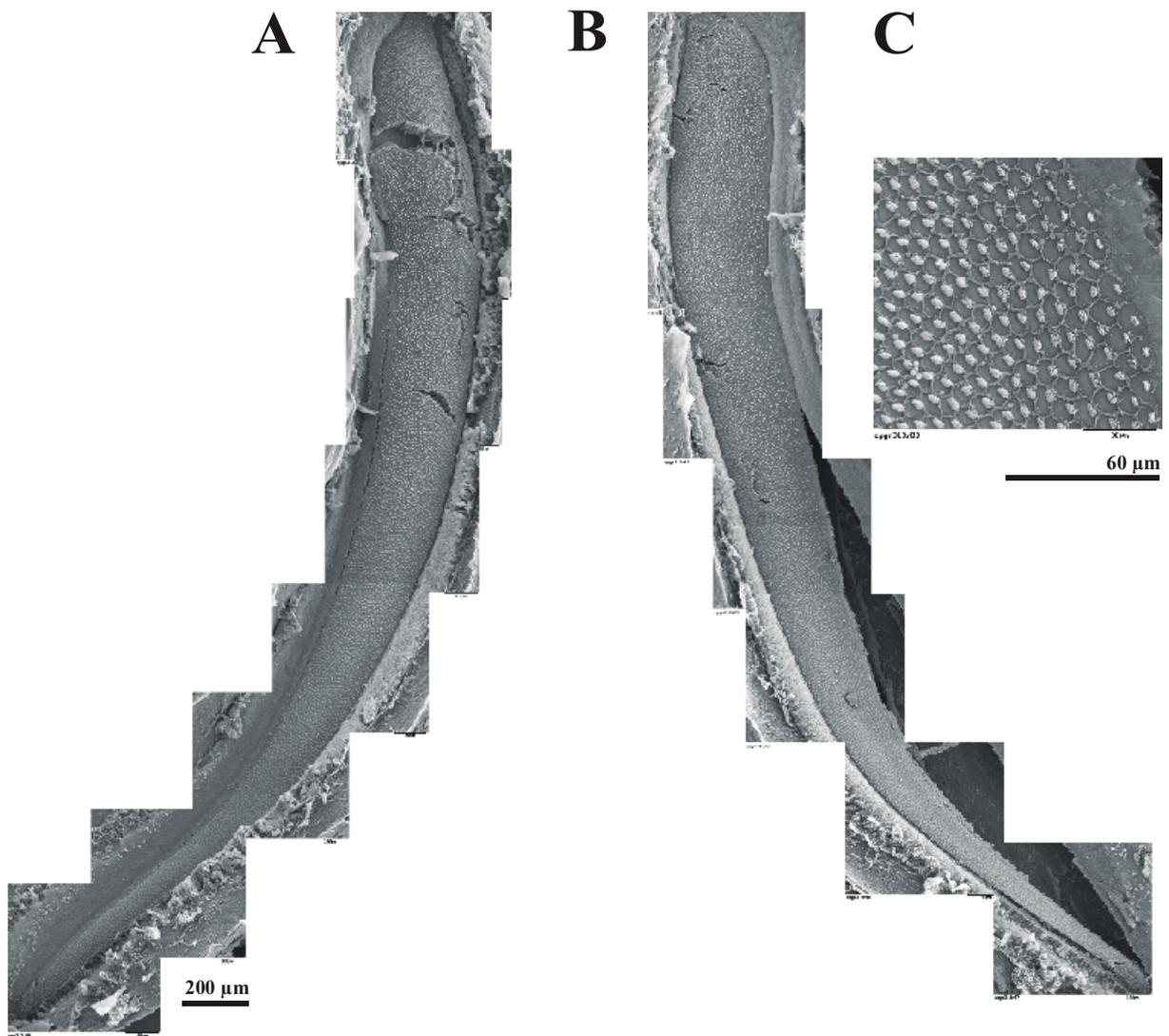


Abbildung 36: (A) SEM Aufnahmen von einer unbehandelten Cochlea. Die Tektorialmembran wurde entfernt, um einen ungestörten Anblick auf die Haarzellen zu erhalten. Die Haarzellen zeigen eine gleichmäßige Anordnung. An den Stereozilienbündeln sind ebenfalls keine Veränderungen zu erkennen. (B) SEM Aufnahmen von der Papilla basilaris einer Taube 14 Wochen nach intrascalärer AMPA-Applikation. Auch hier wurde die Tektorialmembran entfernt. Die Haarzellen sind ebenso wie in der Kontrollcochlea gleichmäßig angeordnet. Auch die Stereozilienbündel zeigen keine morphologischen Veränderungen. (C) zeigt eine Vergrößerung aus B. Gut zu erkennen sind die einzelnen Haarzellen, die von den Stützzellen hexagonal umgeben sind und die einzelnen Stereozilien, die auf den Haarzellen sitzen und das Stereozilienbündel bilden.

IV. Diskussion

4.1 Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheiten (GluR1-4) im Innenohr von Vogel und Säuger

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 und GluR4 in den auditorischen Ganglienzellen der Taube exprimiert werden. Diese Ergebnisse ergänzen die Untersuchungen von Schneider (1994). Er konnte mittels *in situ* Hybridization die mRNA's, die für GluR2 und GluR4 kodieren, im Ganglion cochleare des Hühnchens detektieren. Im Spiralganglion des Säugers konnten die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 und GluR4 ebenfalls in zahlreichen immunhistochemischen Untersuchungen, *in situ* Hybridizationen und RT-PCR Analysen nachgewiesen werden (Safieddine und Eybalin, 1992; Kuriyama et al., 1993; Kuriyama et al., 1994; Niedzielski und Wenthold, 1995; Usami et al., 1995; Matsubara et al., 1996). Aufgrund der vorliegenden Arbeit und den vorstehend genannten Arbeiten kann geschlossen werden, daß beim Säuger und beim Vogel die gleichen AMPA-Rezeptoruntereinheiten von den primären auditorischen Ganglienzellen exprimiert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Neurotransmission zwischen Haarzelle und Hörnerv bei beiden Spezies von Glutamat bzw. einer verwandten exzitatorischen Aminosäure vermittelt wird (Klinke und Oertel, 1977; Bledsoe et al., 1981; Klinke, 1986; Altschuler et al., 1989; Hunter et al., 1992; Eybalin, 1993; Kataoke und Ohmori, 1994 und 1996; Shero et al., 1998).

Starke Immunreaktivität für GluR2/3 und GluR4 konnte nicht nur auf den auditorischen Ganglienzellen der Taube nachgewiesen werden, sondern auch unterhalb der Haarzellen. Dieser Befund zeigt, daß der AMPA-Rezeptor in der synaptischen Verbindung zwischen Haarzelle und den primären afferenten Nervenfasern vorkommt. Im Innenohr des Säugers konnte die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR2/3 und GluR4 ebenfalls auf den afferenten Nervenendigungen nachgewiesen werden, wobei es für die Expression von GluR2/3 widersprüchliche Befunde gibt. Kuriyama et al. (1994) konnten keine Immunreaktivität für GluR2/3 an der Basis der Haarzellen feststellen, während Usami et al. (1995) eine diffuse immunhistochemische Färbung unterhalb der Haarzellen nachweisen konnten. Mit der hochauflösenden „postembedding immunogold“ Elektronenmikroskopie konnte bei der Ratte gezeigt werden, daß sowohl GluR2/3 als auch GluR4 spezifisch auf der postsynaptischen Seite der afferenten Haarzellsynapse exprimiert werden (Matsubara et al., 1996). Es scheint

also, daß GluR2/3 und GluR4 sowohl beim Säuger als auch beim Vogel auf den afferenten Hörnervenfaserendigungen exprimiert werden. Die für den AMPA-Rezeptor im Innenohr des Säugers postulierte Funktion einer schnellen Informationsübertragung zwischen Haarzelle und afferenter Nervenfaser (Puel et al., 1991; Puel et al., 1994; Ruel et al., 1999) kann somit auch für den AMPA-Rezeptor des Vogels angenommen werden.

Die auf den Haarzellen gefundene diffuse immunreaktive Markierung für GluR4 kann verschiedene Ursachen haben. Eine Ursache kann sein, daß die Rezeptoren extrasynaptisch vorkommen oder daß eine zytoplasmatische Markierung von Rezeptoren vorliegt, die gerade zu den synaptischen Endigungen transportiert bzw. abtransportiert werden. In der quantitativen Immunogoldanalyse der AMPA-Rezeptorverteilung im Cortischen Organ der Ratte konnten Matsubara et al. (1996) zeigen, daß einige der Goldpartikelchen mit der präsynaptischen Membran assoziiert sind. In anderen elektrophysiologischen und ultrastrukturellen Studien konnte nachgewiesen werden, daß die vestibuläre Typ I Haarzelle des Meerschweinchens bzw. der Ratte ebenfalls präsynaptische Glutamatrezeptoren einschließlich des AMPA-Rezeptors besitzt (Devau et al., 1993; Matsubara et al., 1999). Es wird angenommen, daß die präsynaptischen AMPA-Rezeptoren als Autorezeptoren fungieren. In isolierten Haarzellen des Froschs konnte festgestellt werden, daß Glutamat über Autorezeptoren die afferente synaptische Transmission modulieren kann (Valli et al., 1985; Guth et al., 1991; Zucca et al., 1992). Um zu klären, ob es im Innenohr der Taube ähnliche Feedback-Mechanismen von Glutamat gibt, die über AMPA-Rezeptoren vermittelt werden, müßten allerdings neue Studien durchgeführt werden.

Die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 konnte weder in den Ganglienzellen, noch in den Haarzellen oder in einer anderen Struktur der Papilla basilaris der Taube nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Detektion der mRNA der AMPA-Rezeptoruntereinheiten beim Hühnchen (Schneider, 1994). Auch hier konnte die mRNA für GluR1 nicht nachgewiesen werden. Im Innenohr des Säugers konnte GluR1 in einem Großteil der publizierten Arbeiten ebenfalls weder durch immunhistochemische noch durch *in situ* Studien gezeigt werden (Ryan et al., 1991; Kuriyama et al., 1994; Matsubara et al., 1996). Lediglich Usami et al. (1995) konnten eine sehr schwache Immunreaktivität für GluR1 in den Spiralganglienzellen von Ratte, Meerschwein und Affe nachweisen. Mittels DNA Amplifikation (RT-PCR Analyse) konnte gezeigt werden, daß die DNA sowohl von GluR2/3 und GluR4 als auch von GluR1 im Innenohr des Säugers vorkommt (Doi et al., 1992; Ryan et al., 1993). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Westernblot- und

Immunopräzipitationsanalyse der Papilla basilaris der Taube zeigte eine deutlich Bande bei ca. 100 kDa für GluR1, GluR2/3 und GluR4, was dem normalen Proteingewicht der Rezeptoruntereinheiten entspricht (Hollmann und Heinemann, 1994). Somit konnte gezeigt werden, daß die Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden, in der Lage sind, neben GluR2/3 und GluR4 auch GluR1 zu detektieren, wenn es in ausreichender Menge bzw. in denaturierter Form vorliegt (Schneider et al., 1992; Schneider, 1994; siehe auch Theiss et al., 1998). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß GluR1 im Innenohr des Säugers und des Vogels exprimiert wird, wenn auch in geringerer Menge als GluR2/3 und GluR4 (Ravindranathan et al., 2000).

Die im Innenohr des Säugers und Vogels gefundenen Ähnlichkeiten bei dem Vorkommen und der Verteilung der AMPA-Rezeptoruntereinheiten zeigen, daß es trotz unterschiedlicher Evolutionsebenen einen hohen Grad an evolutionärer Konservierung bei der Expression von Mitgliedern der ionotropen AMPA-Rezeptorfamilie gibt (Ottiger et al., 1995; Ravindranathan et al., 1996).

4.2 Effekte der durch AMPA erzielten exzitotoxischen Schädigung auf das Innenohr des Vogels im Vergleich zum Säuger

Der in dieser Arbeit erhobene Befund, daß die intrascaläre Gabe von 30 µl 1 mM AMPA zu einem reversiblen Hörverlust bei der Taube führt, steht im Einklang mit einer Vielzahl von Untersuchungen im Innenohr des Säugers. Auch hier konnte durch die Applikation von AMPA ein reversibler Hörverlust erzielt werden (Puel et al., 1991; Puel et al., 1994; Puel et al., 1995; D'Aldin et al., 1997). Puel und seine Arbeitsgruppe konnten 1991 nachweisen, daß die Gabe von AMPA in einer Konzentration von 20 – 80 µM ausreicht, um eine signifikante Verringerung der CAP-Amplitude zu erzielen. Bei der Applikation einer 100 bzw. 200 µM AMPA-Lösung wurde die Summenantwort der Hörnervenfasern vollständig unterdrückt. Als Ursache für die Unterdrückung des CAPs wurde ein vorübergehender Anstieg in der Spontanaktivität der Hörnervenfasern durch die erhöhte Glutamat-Rezeptoraktivierung, gefolgt von einer postexzitatorischen Depression vorgeschlagen. Durch weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen und durch die Gabe des AMPA-Antagonisten DNXQ (Puel et al., 1994) konnte jedoch gezeigt werden, daß die Unterdrückung des CAPs vor allem auf die exzitotoxische Wirkung von AMPA zurückzuführen ist, d. h. auf eine exzessive Glutamat-Rezeptorhyperaktivierung. In Folge dessen kommt es zu einem

vermehrten Na^+ -Ein- und Cl^- -Ausstrom. Das daraus folgende osmotischen Ungleichgewicht in der Zelle bzw. und die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führen zu einer Zerstörung der Nervenfaserverendigungen.

Der Unterschied in der Dosis bzw. Konzentration von AMPA, mit der eine Suppression des CAPs in der hier vorliegenden Arbeit und im Vergleich zu den Arbeiten von Puel et al. (1991) erzielt werden konnte, ist vor allem auf die unterschiedliche Art der Applikation zurückzuführen. Während in der hier vorliegenden Arbeit bei der Taube aus anatomischen Gründen nur ein Loch in den Recessus scalae tympani gebohrt werden konnte, konnte beim Meerschweinchen sowohl ein Loch in die Scala tympani als auch ein weiteres in die Scala vestibuli gebohrt werden (Puel et al., 1995). Somit konnte beim Meerschweinchen ein wirklicher Austausch der Perilymphe durch Perfusion der künstlichen Perilymphe gewährleistet werden, während dies bei der Taube nicht möglich war. Hier konnte vor der Infusion nur eine geringe Menge der Perilymphe entfernt werden, um eine bessere Verteilung der AMPA-Lösung zu ermöglichen. Die tatsächliche Konzentration der AMPA-Lösung, die zu der Papilla basilaris bzw. zu den synaptischen Verbindungen zwischen Haarzelle und Nervenfaserverendigungen gelangte, war also mit hoher Wahrscheinlichkeit geringer als die angesetzte 1 mM Konzentration (Shehata-Dieler et al., 1994). Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß die afferenten Nervenfaserverendigungen der Taube unempfindlicher gegenüber exzitotoxischen Ereignissen als die terminalen Dendriten des Säugers sind.

Ein zweiter wesentlicher Unterschied zwischen den in der vorliegenden Arbeit und den von Puel et al. durchgeführten Untersuchungen liegt in dem zeitlichen Verlauf der Erholung. Eine vollständige Erholung der cochleären Potentiale konnte bei Puel et al. (1995) nach 5 Tagen beobachtet werden. Es wurden hierbei ABRs (auditorisch evozierte Hirnstammpotentiale) und keine CAPs ermittelt. Einen Tag nach der Applikation von 200 μM AMPA betragen die Amplituden der ABRs bereits wieder 30 % des Ausgangswertes (Puel et al., 1997). Die bei der Taube ermittelten CAP-Amplituden zeigten jedoch auch noch nach sechs bis acht Wochen eine dauerhafte Verringerung der Amplitudengröße bei überschwelliger Reizung. Bei den ermittelten CAP-Hörschwellenkurven blieb ebenfalls eine permanente Schwellenerhöhung vor allem in den hohen Frequenzen bestehen. Die unterschiedlichen Resultate könnten mehrere Ursachen haben. Puel et al. reizten mit kurzen Schallimpulsen, sog. „Klicks“. Durch diesen kurzdauernden transienten Reiz werden die Antworten der Einzelfasern zeitlich synchronisiert. Nachteil der Benutzung von Klick-Reizen ist ihre spektrale Breitbandigkeit.

Klickreize enthalten im Prinzip alle Frequenzen, so daß alle Bereiche der Cochlea und alle Hörnervenfaser gleichzeitig gereizt werden. Mit Hilfe solcher Reize kann man deshalb nur generelle Schädigungen der Cochlea aufdecken. In der vorliegenden Arbeit wurden sog. gaussförmige Tonpips, d. h. schmalbandige Reize mit einer bestimmten Trägerfrequenz verwendet. Somit konnten Informationen darüber erhalten werden, ob und wann welcher Teil der Cochlea geschädigt wurde. Bei der Methode von Puel et al. (1995) könnten eventuelle funktionelle Defizite eines Teils der Hörnervenfaser in den verschiedenen Frequenzbereichen der Cochlea nicht erfaßt worden sein. Um zu einer genaueren Aussage über die Anzahl der beteiligten Nervenfaser bei der Antwort auf einen gegebenen akustische Reiz einer bestimmten Frequenz zu kommen, ist die Ermittlung von CAP-Intensitätskennlinien besser geeignet, da hier die Summenantwort der Hörnervenfaser getrennt für die verschiedenen Frequenzen bei verschiedenen Reizintensitäten bestimmt wird. Des weiteren könnten aber auch die verschiedenen Konzentrationen der verwendeten AMPA-Lösung für den unterschiedlichen Verlauf der Regeneration verantwortlich sein. Die Neurotoxizität der verwendeten 1 mM AMPA-Lösung könnte so hoch sein, daß sie zu einer teilweisen irreversiblen Schädigung der Nervenfaserendigungen mit nachfolgender Degeneration des Ganglion cochleare führt (Juiz et al., 1989).

Die Beobachtung, daß es nach der Applikation von AMPA in das Innenohr des Vogels und des Säugers zu einer Reduzierung bzw. einem völligen Ausbleiben des Summenaktionspotentials des Hörnervens kommt, konnte bei einem weiteren Glutamat-Agonisten, dem Kainat, und bei Glutamat selbst ebenfalls gemacht werden (Bledsoe et al., 1981; Coyle, 1983; Kusakari et al., 1984; Pujol et al., 1985; Dolan et al., 1990; Janssen et al., 1991; Zheng et al., 1996; Zheng et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Bledsoe (1981) konnte eine vollständige Reduzierung der CAP-Amplitude nach Kainat-Perfusion in die Scala tympani erreichen. Bei Zheng et al. (1997) kam es zu einer signifikanten Reduzierung der auditorischen Potentiale, die vom Colliculus inferior abgeleitet wurden. Hier wurde das Kainat jedoch nicht intracochlear, sondern auf das runde Fenster appliziert. Die Diskrepanz zwischen den beschriebenen Ergebnissen kann wieder mit der unterschiedlichen Applikationsart und den unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Kainat-Lösungen erklärt werden. Bei der Applikation von Kainat auf das runde Fenster des Chinchillas wird es nach Penetration der runden Fenster Membran gemäß seines Gradienten von der basalen zu der apikalen Windung der Cochlea diffundieren, so daß ein Konzentrationsgefälle zwischen basaler und apikaler Windung entsteht (Zheng et al., 1997). Tatsächlich konnte bei den basal wahrgenommenen hohen Frequenzen (4, 8 und 16 kHz) eine

größere Hörschwellenanhebung festgestellt werden als bei den apikal wahrgenommenen tiefen Frequenzen (1 und 2 kHz). Dieses Resultat steht ebenfalls in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit erhobenen Befund, bei dem der erzielte Hörschaden nach AMPA-Applikation im basalen Bereich der Papilla basilaris deutlich größer ist als der im apikalen Bereich. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die Ursache darin besteht, daß der basale Teil der Cochlea bzw. Papilla basilaris einfach nur empfänglicher für exzitotoxische Effekte ist als der apikale Teil (Schweitzer et al., 1991; Crofton et al., 1994).

Bei der Applikation von 10 mM NMDA in das Innenohr der Taube konnte keine Anhebung der CAP-Hörschwellen festgestellt werden. Dieser Befund stimmt mit den ersten beim Säuger erhobenen Daten überein. Hier konnte weder mit NMDA-Agonisten noch mit Antagonisten eine Veränderung des CAP-Audiogramms erzielt werden (Fex und Martin, 1980; Bobbin et al., 1984; Jenison et al., 1986). Allerdings wurde bei den drei genannten Arbeiten nur mit niedriger Intensität akustisch gereizt, bzw. bei der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht überschwellig gereizt. Durch die akustische Reizung mit großer Intensität (> 86 dB SPL) direkt nach der NMDA-Applikation in das Innenohr konnten Puel et al. (1991a) eine signifikante Unterdrückung der CAP-Amplitude von 30-32 % erzielen. Dieses Experiment trägt der Überlegung Rechnung, daß der NMDA-Rezeptorkanal im Ruhezustand von Mg^{2+} blockiert wird und erst bei wiederholter und starker neuronaler Depolarisation aktiviert werden kann (Herron et al., 1986; Collingridge et al., 1988). Ob bei der Taube bei Reizung mit großer Intensität ebenfalls Veränderungen der cochleären Potentiale beobachtet werden könnten, wenn direkt nach der NMDA-Applikation mit großer Intensität gereizt würde, muß noch untersucht werden.

Die hier vorgestellten elektrophysiologischen Daten lassen den Schluß zu, daß auch beim Vogel die ionotropen AMPA-Rezeptoren eine Rolle bei der synaptischen Übertragung zwischen Haarzelle und den primären auditorischen Neuronen im Innenohr spielen. Während der AMPA-Rezeptor vor allem für die schnelle Informationsübertragung verantwortlich zu sein scheint, konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsdurchführung weder gezeigt, noch ausgeschlossen werden, daß der NMDA-Rezeptor ebenso wie beim Säuger für die langsamere Informationsübertragung bei nachhaltiger Reizung verantwortlich ist (Puel et al., 1995).

4.3 Defizite in der funktionellen Erholung des Hörvermögens

Die Erholung der Antworteigenschaften der Hörnervenfasern mit neugebildeten synaptischen Endigungen bleibt unvollständig. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor schon anhand der Summenantworten der Hörnervenfasern getroffene Aussage, daß es beim Vogel im Gegensatz zum Säuger nach AMPA-Instillation in das Innenohr zu einer unvollständigen funktionellen Erholung kommt. Schließt man einen schlechteren Allgemeinzustand der Tiere aus, kann die dauerhafte Schwellenerhöhung und die Reduzierung der CAP-Amplituden auf eine geringere Sensitivität der Neurone oder eine verminderte Anzahl von Hörnervenfasern zurückgeführt werden. Zu bedenken ist aber auch, daß das CAP nur indirekt die Aktivität der afferenten Nervenfasern widerspiegelt, da nur die synchrone Entladung der Nervenfasern ermittelt werden kann. Kommt es zu einer verminderten Synchronisation der Entladung der einzelnen Nervenfasern, führt dies genauso zu einer verminderten CAP-Amplitude und einer Schwellenverschiebung wie eine Verringerung der Entladungsrate der Nervenfasern (Chen et al., 1993; Puel, 1995a). Eine stichhaltige Aussage über die Ursachen der beobachteten Defizite in der funktionellen Erholung nach AMPA-Applikation kann deshalb unter alleiniger Berücksichtigung der Resultate der Audiogrammessungen nicht getroffen werden. Da nach Ablauf von drei Wochen keine wesentliche Verbesserung der CAP-Schwellenkurven mehr beobachtet werden konnte, ist es unwahrscheinlich, daß es nach dem für die Einzelfaserableitungen ausgewählten Zeitpunkt von 13-15 Wochen nach AMPA-Applikation noch zu Veränderungen der Antworteigenschaften kommt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß 13-15 Wochen nach der Gabe der neurotoxischen Substanz AMPA nur die im apikalsten Teil der Papilla basilaris gelegenen Nervenfasern mit sehr niedrigen CF-Werten eine fast vollständige Erholung zeigen. Die Antworten dieser Neurone sind denen der Neurone von unbehandelten Tauben ähnlich. Bei den auditorischen Nervenfasern mit höheren CF-Werten können bleibende funktionelle Defizite bzw. Veränderungen gefunden werden. Die Beobachtung, daß nahezu alle afferenten Nervenfaserverendigungen nach AMPA-Gabe zerstört werden, korreliert mit dem Befund, daß im Mittel alle ausgewerteten Neurone eine verschlechterte Funktion haben. Allerdings ist das Ausmaß der Verschlechterung bei den empfindlicheren Neuronen im mittleren bis höheren Frequenzbereich größer als bei den unempfindlicheren Neuronen im sehr tiefen Frequenzbereich. Diese beobachteten funktionellen Veränderungen in der Aktivität und Sensitivität der auditorischen Neurone weisen darauf hin, daß es bei der Wiederherstellung

der Verbindung zwischen Haarzelle und neuraler Synapse zu dauerhaften Schäden auf der prä- oder postsynaptischen Seite kommt.

Der durch die physiologischen Daten erhobene Befund, daß die funktionelle Erholung vor allem in den mittleren und hohen Frequenzen unvollständig ist, steht allerdings in einem klaren Widerspruch zu den morphologischen Daten. Hier konnte auf elektronenmikroskopischer Ebene gezeigt werden, daß zwei Wochen nach der AMPA-Applikation keine strukturellen Veränderungen mehr an den Nervenfaserverbindungen zu finden sind und daß die Papilla basilaris nicht von unbehandelten Papillen zu unterscheiden ist. Welche Faktoren für die bestehende Diskrepanz zwischen Funktion und Struktur verantwortlich sein könnten soll nachfolgend erörtert werden.

Die Spontanentladungsraten und die Sättigungsentladungsraten der Hörnervenfasern waren 14 Wochen nach der AMPA-Applikation noch immer erhöht. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Fähigkeit der afferenten Nervenfasern, Aktionspotentiale zu generieren, nach Regeneration ihrer synaptischen Verbindungen nicht verlorengegangen ist. Ebenfalls festgestellt werden konnte, daß die Menge an Transmitterstoff, die von der Haarzelle in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, ausreicht, um eine maximale Antwort bei den Nervenfasern zu erzielen.

Für die erhöhte Spontanrate bzw. Sättigungsrate kann ein Umbau der verschiedenen Glutamat-Rezeptoruntereinheiten auf der postsynaptischen Seite während bzw. nach der Neubildung der Synapsen verantwortlich sein. In der Ratte konnte beobachtet werden, daß es während der postnatalen Entwicklung und Reifung des peripheren Hörsystems zu einer graduell verminderten Expression von GluR2/3-Rezeptoren und einer vermehrten Expression von GluR4-Rezeptoren kommt, welche sich hinsichtlich ihrer schnelleren Desensitivierung von GluR2/3 unterscheiden (Mosbacher et al., 1994; Geiger et al., 1995). Ebenso kann sich die Dichte der NMDA-Rezeptoren auf den afferenten terminalen Dendriten bzw. Ganglienzellen erhöht haben, und somit eine veränderte Rezeptorkinetik bzw. eine vergrößerte Erregbarkeit der Neurone entstanden sein. Die größere elektrische Erregbarkeit könnte als trophisches Signal für die Bildung neuer Synapsen dienen. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß vor allem der NMDA-Rezeptor für die Kontrolle axonaler und synaptischer Neubildungs- und Reinnervationsprozesse verantwortlich ist (Shatz, 1990; Lipton und Kater, 1989; Cramer und Sur, 1995). Beim Meerschwein konnte eine vorübergehende Überexpression der NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR 1) nach Zerstörung der afferenten

Nervenendigungen im Innenohr durch AMPA beobachtet werden (D'Aldin et al., 1997). Durch die Gabe von NMDA-Antagonisten konnte die funktionelle und strukturelle Regeneration verzögert werden. Ebenfalls am Säuger konnte gezeigt werden, daß es während der kritischen Phase in der postnatalen Entwicklung des Innenohres bei der Ratte zu einer vorübergehenden Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2a auf den Haarzellen kommt (Knipper et al., 1997). Weitere molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß es während Umbauvorgängen im Gehirn elektrophysiologische Unterschiede der NMDA-Rezeptoren im adulten bzw. sich entwickelnden Gehirn gibt (Pellegrini et al., 1991). Es konnte nachgewiesen werden, daß durch unreife NMDA-Rezeptoren größere Kalziumströme als durch reife NMDA-Rezeptoren fließen (Burnashev et al., 1992; Cha et al., 1994). Somit kann die auch nach Ablauf von 14 Wochen nach der Gabe von AMPA noch deutlich erhöhte Spontanentladungsrate auf vorübergehende oder dauerhafte Plastizitätsvorgänge der für die Neurotransmission verantwortlichen Rezeptorsubtypen zurückzuführen sein.

Die bleibende Erhöhung der Schwellen und der Verlust der Abstimmsschärfe können durch diese Vorgänge allerdings nicht erklärt werden. Der Anstieg der Spontanentladungsrate bei gleichzeitiger Erhöhung der Schwellen ist noch dazu ein sehr erstaunliches Phänomen, da bei unbehandelten Tieren die Spontanrate der Hörnervenfasern mit ihrer Schwelle korreliert ist, d. h. höhere Schwellen in Verbindung mit einer niedrigeren Spontanrate auftreten (Smolders, 1995). Diese am unbehandelten bzw. normal funktionierendem Innenohr gefundene Abhängigkeit von Schwelle, Abstimmsschärfe und Spontanentladungsrate scheint für die mit AMPA behandelten Papillen nicht mehr zu gelten.

Die bleibende Erhöhung der Schwellen und der gleichzeitige Verlust der Abstimmsschärfe müssen durch Veränderungen auf der präsynaptischen Seite verursacht worden sein, da diese beiden Parameter vor allem durch elektrophysiologische Eigenschaften der Haarzelle bestimmt werden. Wird die Abhängigkeit der Schwelle und der Abstimmsschärfe voneinander bei gleicher charakteristischen Frequenz betrachtet, ist zu erkennen, daß es einen Zusammenhang zwischen der Abstimmsschärfe und der Schwelle gibt (siehe auch Abb. 28 B). Neurone der gleichen charakteristischen Frequenz, die eine niedrige Schwelle haben, besitzen eine hohe Abstimmsschärfe und umgekehrt. Die Sensitivität der Neurone wird durch einen mikromechanischen oder elektrochemischen Abstimmechanismus der Haarzellen zusätzlich zur breit abgestimmten Basilarmembranmechanik bestimmt (Ding et al., 1990, 1991; Smolders et al., 1992, Fettiplace und Fuchs, 1999). Da die intrascaläre Applikation von

AMPA eine selektive Schädigung der afferenten Nervenfasern bewirkt, sind Veränderungen in den mikromechanischen Eigenschaften der Zilienbündel der Haarzellen und in den mit ihnen verbundenen Deckstrukturen (der Tektorialmembran) sowie Veränderungen der Basilarmembranmechanik eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher sind Umbauvorgänge der für die elektrischen Filtereigenschaften der Haarzelle verantwortlichen spannungsabhängigen Kalzium- und Kaliumkanäle in der basolateralen Membran der Haarzelle. Diese Umbauvorgänge könnten durch das vorübergehende Fehlen der postsynaptischen afferenten terminalen Dendriten an der Basis der Haarzelle nach AMPA-Applikation induziert worden sein. Bekannt ist, daß es infolge einer Depolarisierung der Haarzelle zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit der basolateralen Membran für Kalziumionen kommt, so daß Kalzium vermehrt in die Zelle einströmen kann (Übersichtsarbeiten siehe Ashmore, 1991; Pickles und Corey, 1992). Durch die erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle werden wiederum die kalziumsensitiven Kaliumkanäle aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Kaliumleitfähigkeit an der basolateralen Membran und vermehrtem Ausstrom von Kalium in den Perilymphraum, so daß die Haarzelle repolarisiert wird. Die Rückkopplung von repolarisierendem und depolarisierendem Strom führt zu einer mehr oder weniger gedämpften Resonanz (Hudspeth und Corey, 1977; Fuchs et al., 1988). Durch die Oszillationen des Membranpotentials kann die Haarzelle selbst eine Schmalbandfilterung des Reizes vornehmen. Die Frequenz der Membranpotentialschwankungen entspricht der charakteristischen Frequenz und die Dauer der Oszillationen der Schärfe der Frequenzabstimmung (Crawford und Fettiplace, 1981, 1985). Der Verlust von Ionenkanälen sowie die Veränderungen in der Anordnung der Ionenkanäle in der basolateralen Membran nach Zerstörung der postsynaptischen Strukturen können die dauerhaft schlechteren Schwellen und Abstimmshäufigkeiten bewirken. Dieser Mechanismus der Frequenzabstimmung könnte auch nach der Reinnervation der Haarzellen gestört bleiben.

4.4 Morphologische Unterschiede unbehandelter und mit AMPA behandelter Innenohren der Taube (TEM und SEM)

Bei der ultrastrukturellen Untersuchung der mit AMPA behandelten Ohren konnte eine klare Verteilung der Zerstörung der afferenten Nervenendigungen entlang der Papilla basilaris gefunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß AMPA eine selektive Schädigung der afferenten Nervenfasereindigungen von apikal nach basal sowie von neural nach abneural abnehmend auf der Papilla verursacht. Das geschädigte Areal scheint zum großen Teil mit der

Fläche übereinzustimmen, auf der die THCs sitzen und auf dem die meisten afferenten Synapsen enden (Tanaka und Smith, 1978; Fischer, 1992). Shero und ihre Kollegen (1998) beobachteten beim Huhn nach Applikation von 65 mM Kainat auf das runde Fenster ebenfalls eine selektive Zerstörung der afferenten Nervenendigungen. Auch sie stellten fest, daß der Ort der Schädigung mit dem Gebiet korreliert, auf dem die THCs und die afferenten Synapsen sitzen. Allerdings konnten sie bei einer quantitativen Auswertung des geschädigten Areals feststellen, daß sich auf dem äußerst basal gelegenen Teil der Papilla (20 % von der Gesamtfläche) keinerlei Anzeichen der Zerstörung von afferenten synaptischen Nervenfasern fanden. Da Shero et al. (1998) keinen Effekt von Kainat auf die äußerst basal gelegenen Nervenfasern finden konnten, schlossen sie daraus, daß die afferenten Nervenfasern, welche die SHCs kontaktieren, ebenso wie die Typ-II-Afferenzen des Säugers akustisch nicht reizbar sind.

Aufgrund ihres Innervationsschemas wird zwischen den kurzen und den langen Haarzellen des Vogels bzw. den inneren und äußeren Haarzellen des Säugers eine funktionelle Übereinstimmung postuliert (Manley et al., 1989; Manley, 1990; Manley und Gleich, 1992). Beim Vogel innervieren ca. 80 % der afferenten Dendriten THCs und nur 20 % kontaktieren die SHCs. Im Cortischen Organ des Säugers teilt man die Afferenzen in zwei Subtypen ein. Die myelinisierten Typ-I-Afferenzen, die sog. radiären Afferenzen, die 90-95 % der afferenten Population stellen, ziehen zu den inneren Haarzellen (Spoendlin, 1973). Die nicht myelinisierten Typ-II-Afferenzen, die sog. Spiralaferenzen, ziehen ausschließlich zu den äußeren Haarzellen und sind akustisch nicht erregbar (Robertson, 1984). Durch die Gabe von exzitotoxischen Stoffen, aber auch durch klinisch relevante Ereignisse wie Schalltraumen oder Ischämie werden nur die Typ-I-Afferenzen geschädigt, während die Typ-II-Afferenzen intakt bleiben (Übersicht siehe Puel, 1995). Ein Vergleich der Ergebnisse mit der in dieser Arbeit erzielten Wirkung von AMPA und dem von Kainat im Hühnchen zeigt, daß die große Mehrheit der afferenten Nervenendigungen im Vogel ähnlich auf die Gabe von AMPA oder Kainat reagieren. Sie werden ebenso wie die Typ-I-Neurone im Innenohr des Säugers zerstört. Da die afferenten Nervenendigungen auf dem äußerst basal gelegenen Teil der Papilla, der vor allem von SHCs besiedelt ist, scheinbar nicht durch Kainat und eventuell auch nicht durch AMPA geschädigt werden, stellt sich die Frage, ob von diesem Teil der Papilla basilaris überhaupt Informationen an das Zentralnervensystem weitergeleitet werden. Allerdings gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die gegen diese These sprechen. Ding (1992) untersuchte mittels Einzelfasermarkierungsexperimenten das Antwortverhalten von SHCs im basalen Bereich der Papilla basilaris der Taube. Sie konnte dabei feststellen, daß die SHC-

innervierenden afferenten Neurone auf Schallreize reagieren, normale Spontanentladungsraten und normale Frequenz-Intensitäts-Antworten haben. Außerdem haben sie niedrigere Schwellen aber breitere Tuningkurven als die THC-innervierenden afferenten Neurone im ähnlichen Frequenzbereich (Klinke et al., 1992; Smolders et al., 1992). Die schlechtere Abstimmbarkeit wurde durch den bei hohen Frequenzen nicht mehr so gut funktionierenden Resonanzfilter und durch die unterschiedliche Innervation im Vergleich zu den THCs erklärt. Die SHC-innervierenden Afferenzen spalten sich in zwei bis vier Äste und innervieren bis zu 6 SHCs (Takasaka und Smith, 1971; von Düring et al., 1985). Wahrscheinlich ist die von Shero et al. postulierte Hypothese, daß die Frequenzkarte der Taube bzw. des Hühnchens unter Berücksichtigung der eventuell inaktiven basal gelegenen afferenten Nervenfasernpopulation noch einmal neu zu überarbeiten ist, nicht zutreffend (Chen et al., 1994; Smolders et al., 1995). Es ist eher zu vermuten, daß im äußerst basalen Teil deshalb keine Vakuolenbildung zu finden ist, weil zu wenig Afferenzen vorhanden sind. In den Arbeiten von Fischer (1992, 1994) und Manley und Gleich (1992) konnte bei einigen extrem abneural gelegenen kurzen Haarzellen sogar gar keine afferenten Synapsen gefunden werden.

4.5 Vergleich der durch AMPA erzielten funktionellen Schädigung des Vogellinnenohres mit der Schädigung des Innenohres durch Schall und ototoxische Substanzen

Ein Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, den durch AMPA erzielten Hörverlust und die darauffolgende Erholung beim Vogel mit den Hörverlusten und der funktionellen Regeneration zu vergleichen, die durch Beschallung oder Gabe von ototoxischen Substanzen auftreten. Durch die Applikation von AMPA in das Innenohr kommt es zu einer selektiven Zerstörung der afferenten Nervenendigungen (siehe auch Kapitel 5.4). Im Gegensatz dazu wird durch die Gabe von ototoxischen Substanzen bzw. durch Beschallung vor allem das Rezeptorsinnesepithel, die Haarzellen, zerstört (Übersichtsarbeiten siehe bei: Rubel et al., 1991; Corwin et al., 1991; Cotanche et al., 1991; Corwin, 1991; Cotanche et al., 1994; Cotanche, 1997; Stone et al., 1998; Cotanche, 1999).

A) Schalltrauma

Durch Beschallung mit hohen Schalldruckpegeln über einen Zeitraum von mehreren Stunden werden die Haarzellen auf dem abneuralen frei beweglichen Teil der Basilarmembran zerstört, während die mehr neural sitzenden THCs das Schalltrauma zum Großteil überleben.

Je nach Frequenzbereich, mit dem beschallt wird, liegt der Hauptbereich der Haarzellzerstörung mehr apikal oder mehr basal auf der Papilla basilaris (Rubel und Ryals, 1982; Saunders und Tilney, 1982; Cotanche et al., 1987).

Bei Beschallung mit sehr hohen Schalldruckpegeln, bei dem auch ein Teil der THCs zerstört wird, bleibt eine permanente Schwellenanhebung von im Schnitt 20 dB bestehen, die auch nach 8 Monaten noch meßbar ist (Müller et al., 1996). Lediglich die Schwellen, die Spontanentladungsrate und die Abstimmsschärfe der Einzelfasern, deren CF unterhalb der Beschallungsgrundfrequenz liegt, weisen vergleichbare Werte mit den Kontroll-Tieren auf (Müller et al., 1996, 1997; Ding-Pfennigdorff et al., 1998). Die bei einem Großteil der Tiere beobachtete mangelhafte Restitution des Hörvermögens kann durch mehrere Faktoren verursacht worden sein. Ein möglicher Grund ist, daß die zerstörten THCs zwar durch neue von den Stützzellen gebildeten Haarzellen ersetzt werden, diese aber Defizite in der Funktion haben. Ebenso könnte die neugebildete synaptische Innervation fehlerhaft sein. Ein weiterer Faktor kann sein, daß die Erneuerung der ebenfalls zerstörten Tektorialmembran im Bereich der zerstörten Haarzellen unvollständig bleibt und die durch schwere Schalltrauma zerstörten SHCs nicht mehr ersetzt werden (Cotanche et al., 1995; Chen et al., 1996b; Müller et al., 1996, 1997; Ding-Pfennigdorff et al., 1998; Smolders, 1999).

Bei der Beschallung mit niedrigen Schalldruckpegeln werden vor allem die SHCs zerstört (Chen et al., 1996a, b; Saunders et al., 1996a, b; Plontke et al., 1999). Der Schaden, der hierbei erzielt wird, beträgt über einen großen Frequenzbereich mindestens 30 - 60 dB. Allerdings kommt es hier innerhalb eines kurzen Zeitraums zu einer fast vollständigen funktionellen Erholung des Hörvermögens. Lediglich die maximale Entladungsrate und die Steigung bzw. Sättigung der Intensitätskennlinien-Funktionen der Neurone, die im Bereich der größten Schädigung liegen, bleiben erhöht.

Ein Vergleich der mit AMPA erzielten funktionellen Defizite mit den Regenerationsvorgängen nach moderatem Schalltrauma ist nur begrenzt möglich. Bei moderatem Schalltrauma werden die wesentlichen Rezeptorzellen (die neural gelegenen Haarzellen) und die entsprechenden Nervenendigungen nicht vernichtet. Sie überleben und eine nicht auf Regeneration zurückzuführende funktionelle Erholung tritt auf. Bei der Beschallung mit extrem hohen Schalldruckpegeln bleiben morphologisch nachweisbare irreversible Schäden am Sinnesepithel (Müller et al., 1996), der Tektorialmembran und der Innervation zurück (Ryals et al., 1989; Hoidis et al., 1999), obwohl auch dann noch neural

gelegene lange Haarzellen überleben. Eine Korrelation zwischen funktionellen und morphologischen Aspekten der Regeneration ist dadurch sehr schwierig, so daß auch hier ein Vergleich mit den funktionellen Defiziten in den Antworteigenschaften der auditorischen Neurone nach AMPA-Applikation schwer möglich ist.

Ein Resultat der vorliegenden Arbeit ist, daß Glutamat mit hoher Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitter der Haarzellen ist. Hieraus kann geschlossen werden, daß der durch die massive Transmitterausschüttung der Haarzellen verursachte exzitotoxische Effekt zum Teil verantwortlich ist für den durch ein Schalltrauma hervorgerufenen Hörverlust. Bei lang andauernder bzw. starker Beschallung werden nicht nur die Haarzellen angeregt, die direkt auf dem Frequenzbereich liegen, mit dem beschallt wird, sondern auch die benachbarten Rezeptorzellen. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Freisetzung von Glutamat. Dieser Effekt könnte den globalen Schwellenverlust bzw. die Erholung in Frequenzbereichen erklären, die außerhalb des direkt geschädigten Gebiets liegen (Spoendlin, 1971; Liberman und Mulroy, 1982; Robertson, 1983; Henry und Mulroy, 1995; Puel et al., 1998). Hierfür sprechen auch die sehr ähnlichen Zeitverläufe zwischen der Regeneration nach AMPA und nach Schall. Nach der Applikation von AMPA verläuft die funktionelle Erholung sehr schnell. Innerhalb von drei Tagen sind schon bis zu 50 % Erholung zu verzeichnen und innerhalb von zwei Wochen sind die vor der AMPA-Applikation bestehenden Werte fast erreicht. Weitere geringfügige Verbesserungen treten noch in der dritten Woche auf, danach bleiben die Hörschwellen nahezu konstant. Bei Schallschäden dauert die Erholungsphase ebenfalls nur drei Wochen, wobei der Großteil der Erholung während den ersten zwei Wochen stattfindet (Saunders und Tilney, 1982; McFadden und Saunders, 1989; Niemiec et al., 1994; Saunders et al., 1995; Müller et al., 1996). Dieser Befund deutet darauf hin, daß nicht nur wie bisher angenommen, die Wiederherstellung der Verbindung zwischen Tektorialmembran und den überlebenden Haarzellen für die schnelle funktionelle Erholung nach Schall verantwortlich ist, sondern auch die Regeneration der durch den oben erwähnten exzitotoxischen Effekt geschädigten Synapsen ein wichtige Rolle spielt.

B) Ototoxizität der Aminoglykoside

Aminoglykoside zerstören sowohl die THCs als auch die SHCs. Erste Anzeichen der Zerstörung treten zuerst im basalen Bereich der Papilla, d. h. bei den hohen Frequenzen, auf, und weiten sich in Richtung des apikalen Teils der Papilla mit zunehmender Dosis bzw. zunehmender Dauer der Behandlung aus (Cruz et al., 1987; Hashino et al., 1991, Lippe et al., 1991; Hashino et al., 1992b, 1995). Bei der Behandlung mit Aminoglykosiden wird die

Tektorialmembran nicht direkt geschädigt (Eppstein und Cotanche, 1995). Der beobachtete Hörverlust bzw. die Restitution des Hörvermögens ist vor allem an die Haarzellverluste bzw. -regeneration gekoppelt. Ein erstes Indiz hierfür ist der verzögerte und länger andauernde Verlauf der funktionellen Erholung, der mit der Regeneration bzw. Reifung der Haarzellen übereinstimmt (Duckert und Rubel, 1993; Bhave et al., 1995; Janas et al., 1995). Während die funktionelle Restitution im apikalen Bereich, wo ein Großteil der Haarzellen überlebt, nahezu vollständig ist, bleibt im basalen Teil trotz vollständiger Regeneration der Haarzellen ein funktioneller Hörverlust bestehen (Chen et al., 1993; Salvi, 1994; Müller und Smolders, 1998). Mehrere Faktoren können hierfür verantwortlich sein: Ein möglicher Faktor ist, daß die Haarzellen funktionelle Defizite zurückbehalten, eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die Haarzellbündel nicht mehr richtig in der Tektorialmembran verankert werden (Eppstein und Cotanche, 1995). Ein weiterer Faktor kann sein, daß die Bildung der neuen synaptischen Verbindungen zwischen Haarzellen und Nervenfasereindigungen fehlerhaft bzw. reduziert ist (Duckert und Rubel, 1990, 1993; Ryals und Westbrook, 1994; Ryals und Dooling, 1996; Henning und Cotanche, 1998).

Für die Taube wurde eine Methode entwickelt, mit der auf 85 % der Fläche der Papilla basilaris Schäden durch Aminoglykoside erzeugt werden können (Müller und Smolders, 1998, 1999). Somit war es möglich, nach erfolgter De- und Regeneration der Haarzellen zuverlässig von Neuronen abzuleiten, die regenerierte Haarzellen innervieren. Die Einzelfaserantworten zeigten für Hörnervenfasern mit CF-Werten unter 0,4 kHz eine vollständige Erholung der Antworteigenschaften. Dieser Frequenzbereich entspricht dem Teil der Papilla, auf dem nicht alle Haarzellen zerstört werden. Im Gegensatz dazu zeigten Nervenfasern mit CF-Werten über 0,4 kHz erhebliche funktionelle Verluste, trotz vollständiger Repopulation der geschädigten Bereiche mit Haarzellen. Die Schwellen der Hörnervenfasern, die diese regenerierten Haarzellen innervieren, waren um mehr als 40 dB erhöht, die Abstimmstärke und Filterflankensteigung sowie die Spontanentladungsrate waren stark reduziert. Die maximale Entladungsrate der Hörnervenfasern war als einzige unverändert.

Bei dem Vergleich der nach AMPA-Applikation erzielten Schwellenanhebung der Hörnervenfasern mit der Schwellenanhebung nach Gentamycinintoxikation fällt auf, daß es bei den AMPA-Tieren keine Zunahme der Schwellenverluste mit der CF der Neurone gibt. Die Zunahme der Schwellenverluste mit der CF könnte aber bei den Gentamycin-Tieren auf die Schwankungen im Grad der Schädigung der Papilla basilaris innerhalb der Gruppe

zurückzuführen sein (Müller und Smolders, 1999). Die Schwellenverluste und die Abstimmsschärfe sind bei den Gentamycin-Tieren ab einer CF von 0,4 kHz signifikant größer als bei den AMPA-Tieren. Da dieser CF-Bereich dem der regenerierten Haarzellen entspricht, läßt sich folgern, daß die im Bereich der neugebildeten Haarzellen der Gentamycin-Tiere auftretenden funktionellen Defizite zum Teil andere Ursachen haben als bei den AMPA-Tieren. Veränderungen im elektrochemischen Abstimmmechanismus durch eine veränderte Regulation der Ionenkanal-Expression der regenerierten Haarzellen (Navaratnam et al., 1995) sind bei den Gentamycin-Tieren nicht auszuschließen. Wahrscheinlich ist dies aber nicht die einzige Ursache für den residualen Hörverlust, da der elektrochemische Abstimmmechanismus bei den höheren Frequenzen eine geringere Rolle für die Sensitivität der Haarzellen spielt. Für eine bleibende Veränderung im Haarzelltuning sprechen allerdings die verschlechterten Abstimmsschärfen und die Schwellenverluste der Gentamycin-Tiere, die über das Haarzelltuning miteinander korreliert sind (Klinke et al., 1994; Smolders et al., 1995).

Henning und Cotanche (1998) konnten zeigen, daß die efferenten Nervenendigungen nach Gentamycingabe nicht völlig zerstört werden, sondern in veränderter Form weiterhin an ihrem Platz bleiben. Auch das Verteilungsmuster der Fasern über die Papilla bleibt unverändert (Wang und Raphael, 1996). Ob dies auch für die afferenten Kontakte gilt, ist nicht bekannt, da es für die afferenten Terminalen noch keinen Marker gibt (Ofsie et al., 1997). In ihrer Form veränderte, aber nicht zerstörte, synaptische Endigungen und die daraus resultierende verzögerte und eventuell fehlerhafte Neubildung der synaptischen Kontakte nach Haarzellregeneration könnten für die größeren funktionellen Defizite der Gentamycin-Tiere im Vergleich zu den AMPA-Tieren verantwortlich sein. Die dauerhaft niedrigeren Amplituden der CAP-Antworten, die Chen et al. (1993) nach Aminoglykosid-Behandlung messen konnten, sprechen ebenfalls für eine verminderte Anzahl an neugebildeten funktionstüchtigen Nervenfasereindigungen. Darüber hinaus können aber auch Faktoren wie die weniger systematische Anordnung der neugebildeten Haarzellen, oder der etwas andere Aufbau der Tektorialmembran, mitverantwortlich für die Differenz der funktionellen Defizite zwischen den AMPA- und den Gentamycin-Tieren sein (Epstein und Cotanche, 1995).

Auffällig ist ebenfalls, daß in beiden Fällen sowohl nach Erholung von Gentamycin als auch nach Erholung von AMPA die Spontanentladungsraten mit der charakteristischen Frequenz zwar korreliert sind, im Mittel aber die Spontanentladungsrate der „AMPA-Tiere“ deutlich höher liegt als die der „Gentamycin-Tiere“ und die der Kontrollen. Wie weiter oben bereits erwähnt, haben Untersuchungen an verschiedenen Vogelarten gezeigt, daß die

Spontanentladungsrate zum einen von der Temperatur abhängig ist (z. B. Smolders und Klinke 1977; Schermuly und Klinke, 1982; Klinke und Smolders 1984), zum anderen aber auch von der Sensitivität der Hörnervenfasern (Smolders, 1995). Daraus folgt, daß die Spontanrate mit den Schwellen bei der charakteristischen Frequenz der Einzelfasern korreliert und die Spontanentladungsraten der Neurone aus weniger empfindlichen Ohren insgesamt niedriger sind (Manley et al., 1985). Da die Schwellen und die Abstimmstärke der Neurone der Gentamycin-Tiere insgesamt schlechter als die der AMPA-Tiere waren, ist die geringere Spontanrate nicht weiter verwunderlich und wahrscheinlich auf die präsynaptische Schwellenanhebung zurückzuführen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die synaptische Übertragung der neugebildeten Haarzellen Defizite zeigt, bzw. daß es zu einer verringerten Transmitterausschüttung kommt, während es bei den AMPA-Tieren infolge der vermuteten Umstrukturierung der Glutamat-Rezeptorsubtypen (siehe Kapitel 4.3) zu einer vermehrten Transmitterfreisetzung kommt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle drei Arten der Schädigung des Vogelinnenohres zu einer Zerstörung bzw. Schädigung der terminalen Dendriten in der Papilla basilaris führen. Lange bevor es zu einer Restitution des Hörvermögens kommt, sind neugebildete synaptische Verbindungen unterhalb der Haarzellen zu finden (Duckert und Rubel, 1990; Wang und Raphael, 1996; Ofsie und Cotanche, 1996). Es ist daher nicht auszuschließen, daß ein Teil des bleibenden Hörverlustes durch eine mangelhafte bzw. veränderte Funktion der neugebildeten Synapsen zustande kommt. Die beobachtete Differenz in der Erholung nach AMPA- und nach Gentamycin-Applikation ist so allerdings nicht zu erklären. Während der residuale Hörverlust nach AMPA-Gabe vor allem auf ein verändertes Haarzelltuning und eine veränderte Glutamat-Rezeptorexpression zurückzuführen sein könnte, scheinen für den deutlich größeren funktionellen Hörverlust nach Gentamycin-Intoxikation eine Vielzahl von Faktoren im Bereich der Tektorialmembran, der neugebildeten Haarzellen und der Reinervation verantwortlich zu sein.

V. Zusammenfassung

Bei Nicht-Säugetern, speziell beim Vogel, kommt es nach einem durch Schall oder ototoxische Substanzen verursachten Innenohrtrauma, zu einer spontanen Regeneration der Haarzellen und weitreichender funktioneller Erholung des Hörvermögens. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß beim Vogel die funktionelle Erholung des Hörvermögens nach Innenohrtrauma, trotz spontaner Regeneration der Haarzellen, nicht vollständig ist. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die nach Haarzellschädigung und Regeneration beobachtete unvollständige Restitution des Hörvermögens nach alleiniger Nervenfaserschädigung ausbleibt.

In einem ersten Schritt wurde mit immunhistochemischen Methoden untersucht, ob AMPA-Rezeptoruntereinheiten im Innenohr der Taube exprimiert werden. Durch die Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4 konnte gezeigt werden, daß diese AMPA-Rezeptoruntereinheiten im Innenohr des Vogels exprimiert werden. Eine punktförmige immunreaktive Färbung konnte sowohl auf den Ganglienzellen als auch unterhalb der Haarzellen, in der Region der Synapsen, für GluR2/3 und GluR4, nicht aber für GluR1 festgestellt werden. Auf den Haarzellen selbst konnte eine immunreaktive Färbung für GluR4 nachgewiesen werden. Die Immunoblotanalyse zeigte für die Antikörper gegen GluR1, GluR2/3 und GluR4 Banden bei dem Molekulargewicht der Proteine von 100 kDa.

In einem zweiten Schritt wurden die Auswirkungen von AMPA auf die afferenten Hörnervenfaserendigungen morphologisch und physiologisch untersucht. Es zeigte sich, daß die afferenten Hörnervenfaserendigungen durch Applikation von AMPA in den Recessus scalae tympani (30µl/15 min.) geschädigt wurden. Der Verlauf der CAP (Compound action potential)-Hörschwellenkurven wurde sowohl über einen Zeitraum von 8 Stunden, als auch über einen Zeitraum von mehreren Monaten ermittelt. In ebenfalls durchgeführten Kontrollversuchen, bei denen künstliche Perilymphe ohne AMPA infundiert wurde, traten keine Hörverluste auf. Somit konnte eine Schädigung des Innenohres bzw. Hörverluste durch den operativen Eingriff oder durch die Infusion ausgeschlossen werden. Die beobachteten Hörverluste sind also spezifisch auf die Wirkung von AMPA zurückzuführen. Bei der Applikation von 1 mM AMPA-Lösung konnte eine Erhöhung der Hörschwellen um bis zu 80 dB im hochfrequenten Bereich und bis zu 30 - 40 dB im tieffrequenten Bereich über den Zeitraum von mehreren Stunden beobachtet werden. Am dritten Tag nach der AMPA-Applikation zeigten alle untersuchten Tiere eine Verbesserung der Hörschwellen um 20 - 40 dB. Weitere Messungen über den Zeitraum von zwei bis drei Monate zeigten, daß bei einigen Tieren innerhalb von 7 - 21 Tagen die Hörschwellenkurven die Ausgangswerte des

unbehandelten Ohres erreichten, daß aber bei der Mehrheit der Tiere eine Anhebung der Hörschwellen von ca. 20 – 30 dB im hochfrequenten Bereich bestehen blieb. Die mittlere bleibende Schwellenanhebung, gemittelt für alle Frequenzen, betrug $8 \text{ dB} \pm 5 \text{ dB}$. Bei den Tieren, bei denen ein hochfrequenter Verlust bestehen blieb, erreichten auch die ermittelten CAP-Amplituden bei den hohen Frequenzen ihre Ausgangswerte nicht mehr.

Zusätzlich zu den CAP-Schwellenkurven wurden 13 - 15 Wochen nach AMPA-Instillation die Antworteigenschaften einzelner Hörnervenfasern erhoben. Fasern, deren charakteristische Frequenz (CF) über 0,3 kHz lag, zeigten signifikant erhöhte CF-Schwellen. Für Fasern mit CF-Werten über 0,4 kHz wurden verminderte $Q_{10\text{dB}}$ -Werte gefunden, während die Spontanentladungsrate für Fasern mit CF-Werten über 0,18 kHz erhöht war. Die maximale Entladungsrate war bei allen Fasern, für die dieser Wert ermittelt wurde ($n = 20$), ebenfalls erhöht. Neurone, deren CF über einem Wert von 1,5 kHz lag, konnten, methodisch bedingt, nicht untersucht werden. Diese beobachteten funktionellen Veränderungen in der Aktivität und Sensitivität der auditorischen Neurone weisen darauf hin, daß es bei der Wiederherstellung der Verbindung zwischen Haarzelle und neuraler Synapse zu dauerhaften Schäden kommt.

Mittels elektronenmikroskopischer Darstellung konnten bei den Tieren, die direkt nach der Infusion (nach 10 min.) der AMPA-Lösung dekapitiert wurden, große vakuolisierte afferente Terminalien unterhalb der Haarzellen gefunden werden. Die efferenten Nervenendigungen waren nicht beschädigt. Während im apikalen Bereich der Papilla basilaris sehr viele Vakuolen bzw. zerstörte afferente Nervenfasereendigungen zu sehen waren, konnten deutlich weniger Vakuolen im medialen Teil und nur sehr wenige Vakuolen im basalen Teil gefunden werden. Dieser Befund korreliert mit der Verteilung der afferenten Nervenfasern entlang der Papilla basilaris. Bei Tieren, die zwei Wochen nach der AMPA-Applikation dekapitiert wurden, konnten keine morphologischen Veränderungen mehr gefunden werden. Die untersuchten Papillen waren von den Kontrollohren nicht mehr zu unterscheiden. Dies zeigt, daß auf struktureller Ebene scheinbar eine vollständige Rekonstitution der Verbindung zwischen Haarzelle und Synapse stattfindet. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den elektrophysiologisch erhobenen Daten.

Festzuhalten bleibt, daß auch bei ausschließlicher Schädigung der afferenten Nervenendigungen und trotz deren Neubildung ein residualer Hörverlust bestehen bleibt. Als Ursache für die mangelhafte funktionelle Erholung des Hörvermögens könnten durch die längere Abwesenheit der Nervenfasereendigungen hervorgerufene Veränderungen der Eigenschaften der Haarzellen oder eine veränderte Expression und Funktion der Glutamatrezeptoren in Frage kommen.

VI. Summary

Hair cells in the inner ear of birds regenerate after destruction by acoustic trauma or ototoxic drugs. There is a significant functional recovery from hearing loss, but small residual deficits remain, possibly as a result of incomplete reestablishment of the hair cell-neural synaptic contacts. To study functional recovery associated with the reinnervation process independent of hair cell loss and regeneration it was investigated if AMPA, a glutamate agonist with excitotoxic effects, can be used to cause disruption of the hair cell neural synapses in birds.

It was shown by immunohistochemical studies using polyclonal antibodies directed against subunit GluR1, GluR2/3 and GluR4 (Chemicon) that AMPA receptor subunits are expressed in the avian basilar papilla. Cy3-linked antirabbit IgG's were used as the secondary antibody. Cryostat sections (20 μ m) of paraformaldehyde fixed inner ears showed specific punctuate immunoreactive staining of auditory ganglion cell bodies and at the level of the base of the hair cells. Staining was positive for subunits GluR 2/3 and GluR4 but not for GluR1. Immunoreactive staining was also observed at the hair cell level for subunit GluR4. Immunoblot analysis with antibodies to GluR2/3 and GluR4 recognized molecular weight proteins of approximately 100 kDa. In spite of the immunohistochemical result a polypeptide band could be detected using Anti-GluR1.

We examined the effect on inner ear physiology by applying (S)-AMPA (Tocris-Neuramin) to the perilymph of the pigeon tympanic recess. Compound action potential (CAP) responses to tone bursts were used to determine hearing thresholds. They were recorded by round window electrodes chronically implanted before drug application. Functional recovery was studied for up to 4 months after trauma using CAP audiograms recorded at regular intervals from the same animal. The properties of single auditory nerve fibers were analyzed after 3 to 4 months of recovery. AMPA was perfused for 15 min with a total of 30 μ l (1mM) through a small hole in the tympanic recess. This method led to immediate abolition of CAP thresholds. Control solution (30 μ l Hanks) had no effect on the CAP thresholds. Preliminary results indicate that NMDA another glutamate agonist, has no effect on the CAP thresholds, using the same method. There was little recovery of thresholds up to 8 hours after application of AMPA. Partial recovery was observed after one day. After perfusion, recovery proceeded over 2-3 weeks. High frequency thresholds did not reach control values in this period.

The response properties obtained 12 to 14 weeks after AMPA treatment showed the following characteristics when compared to control data: CF-thresholds (CF = characteristic frequency) were elevated in units with CF above 0.3 kHz, sharpness of tuning ($Q_{10\text{dB}}$) was reduced in units with CF above 0.4 kHz, spontaneous firing rate was elevated in units with CF above 0.18 kHz and the maximum discharge rate was also elevated.

Anatomical alteration of the dendrites as a function of AMPA treatment between day 0 and 14 was assessed using transmission electron microscopy. The nerve endings went through a sequence of swelling, degeneration and recovery, over a 3 to 7 day period. This process of neo-synaptogenesis was completed at day 14 post exposure.

The results show that AMPA receptor subunits are expressed by the auditory afferent nerve fibers in the avian inner ear and that the glutamate agonist AMPA causes reversible abolition of auditory nerve responses to sound. However, small residual functional deficits remain. These findings are strong evidence for a role of glutamate or a related excitatory amino acid as the afferent transmitter in the avian inner ear. This suggests also that despite structural regeneration of the basilar papilla, functional recovery of the auditory periphery is incomplete at the level of the hair cell or the hair cell-afferent synapse.

VII. Literatur

- Altschuler, R.A., Sheridan, C.E., Horn, J.W. und Wenthold, R.J. (1989) "Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea." *Hear. Res.* **42**: 167-174.
- Ashmore, J.F. (1991) "The electrophysiology of hair cells." *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 465-476.
- Barker, P.A. und Shooter, E.M. (1994) "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptors p75LNTFR reduces NGF binding to trkA on PC12 cells." *Neuron* **13**: 201-215.
- Bhave, S.A., Stone, J.S., Rubel, E.W. und Coltrera, M.D. (1995) "Cell cycle progression in gentamicin-damaged avian cochleas." *J. Neurosci.* **15**: 4618-4628.
- Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P. und Chihal, D.M. (1981) "Kainic acid: Evaluation of its action on cochlear potentials." *Hear. Res.* **41**: 189-198.
- Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P. und Puel, J.L. (1988) "Neurotransmission in the inner ear" Jahn A.F., Santos-Sacchi J.R. (eds.). In: Physiology of hearing. New York, *Raven Press*, pp 385-406.
- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C. und Jenison, G.L. (1984) "Neurotransmitters of the cochlea and lateral line organ. In: Hearing Sciences: Recent advances, (ed.) C. I. Berlin. *College Hill Press*: San Diego, pp. 159-180.
- Boord, R.L. und Rasmussen, G.L. (1963) "Projection of cochlear and lagenar nerves on the cochlear nuclei of the pigeon." *J. Comp. Neurol.* **120**: 463-471.
- Bradford, M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Burnashev, N., Schoepfer, R. und Monyer, H. (1992) "Control by asparagine residues calcium permeability and magnesium blockade in NMDA receptors." *Science* **257**: 1415-1419.
- Cha, J.H., Kinsman, S.L. und Johnston, M.V. (1994) "RNA editing of a glutamate receptor subunits." *Mol. Brain Res.* **22**: 323-328.
- Chen, L., Salvi, R.J. und Hashino, E. (1993) "Recovery of CAP threshold and amplitude in chickens following kanamycin ototoxicity." *Hear. Res.* **69**: 15-24.
- Chen, L., Trautwein, P.G., Shero, M. und Salvi, R.J. (1996a) "Tuning, spontaneous activity and tonotopic map in chicken cochlear ganglion neurons following sound-induced hair cell loss and regeneration." *Hear. Res.* **98**: 152-164.
- Chen, L., Trautwein, P.G., Shero, M. und Salvi, R.J. (1996b) "Correlation of hair cell regeneration with physiology and psychophysics in adult chickens following acoustic trauma." Salvi, R.J., Henderson, D., Fiorino, F. und Colletti, V. (eds.). In: Auditory system plasticity and regeneration. New York, *Thieme Medical Publishers*, pp 43-61.
- Collingridge, G.L., Herron, C.E. und Lester, R.A.J. (1988) "Frequency-dependent N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus." *J. Physiol.* **399**: 301-312.
- Corwin, J.T. (1992) "Regeneration in the auditory system." *Exp. Neurol.* **115**: 7-12.
- Corwin, J.T., Jones, J.E., Katayama, A., Kelly, M.W. und Warchol, M.E. (1991) "Hair cell regeneration: The identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues." *Ciba Found Symp.* **160**:103-130.

- Cotanche, D.A. (1997) "Hair cell regeneration in the avian cochlea." *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **106**: Suppl. Part 2, 9-15.
- Cotanche, D.A. (1999) "Structural recovery from sound and aminoglycoside damage in the avian cochlea." *Audiol. Neurootol.* **4**: 271-285.
- Cotanche, D.A., Cotton, C.U., Gatzky, J.T. und Sulik, K.K. (1987) "Ultrastructural and electrophysiological maturation of the chick tectum vasculosum." *Hear. Res.* **25**: 125-139.
- Cotanche, D.A., Lee, K.H., Stone, J.S. und Picard, D.A. (1994) "Hair cell regeneration in the bird cochlea following noise damage or ototoxic drug damage." *Anat. Embryol. (Berl.)* **189**: 1-18.
- Cotanche, D.A., Messana, E.P. und Ofsie, M.S. (1995) "Migration of hyaline cells into the chick basilar papilla during severe noise damage." *Hear. Res.* **91**: 148-159.
- Cotanche, D.A., Petrell, A. und Picard, D.A. (1991) "Structural reorganization of hair cells and supporting cells during noise damage, recovery and regeneration in the chick cochlea." *Ciba Found Symp.* **160**: 131-150.
- Coyle, J.T. (1983) "Neurotoxic action of kainic acid." *J. Neurochem.* **41**: 1-11.
- Cramer, K.S. und Sur, M. (1995) "Activity-dependent remodeling of connections in the mammalian visual system." *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 106-111.
- Crawford, A.C. und Fettkaplan, R. (1981) "An electrical tuning mechanism in turtle cochlear hair cells." *J. Physiol.* **312**: 377-412.
- Crawford, A.C. und Fettkaplan, R. (1985) "The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells." *J. Physiol. (London)* **364**: 259-380.
- Crofton, K.M., Janssen, R., Prazma, J., Pulver, S. und Barone, S. (1994) "The toxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage." *Hear. Res.* **80**: 129-140.
- Cruz, R.M., Lambert, P.R. und Rubel, E.W. (1987) "Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea." *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **113**: 1058-1062.
- D'Aldin, C.G., Ruel, J., Assie, R., Pujol, R. und Puel, J.L. (1997) "Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and neofunctionalization of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea." *Int. J. Dev. Neurosci.* **15** (4-5): 619-629.
- Devau, G., Lehouelleur, J. und Sans, A. (1993) "Glutamate receptors on type I vestibular hair cells of guinea-pig." *Eur. J. Neurosci.* **5**: 1210-1217.
- Ding-Pfenigdorff, D. (1992) "Farbstoffmarkierungen identifizierter Neurone aus der Vogelcochlea." Ph.D. Thesis J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Ding-Pfenigdorff, D., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1990) "Frequency mapping on the basilar membrane of the pigeon." *Pflüg. Arch. Suppl.* **414**: 103.
- Ding-Pfenigdorff, D., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1991) "Primary auditory afferents in pigeon originating from short and intermediate hair cells show sensitive tuned responses to sound." In: N. Elsner und H. Penzlin (Eds.) Synapse-Transmission modulation. *Proceedings of the 19th Göttingen Neurobiology Conference. Abstr.* 102.

- Ding-Pfenigdorff, D., Smolders, J.W.T., Müller, M. und Klinke, R. (1998) "Hair cell loss and regeneration after severe acoustic overstimulation in the adult pigeon." *Hear. Res.* **120**: 109-120.
- Doi, K., Yokotani, N., Hunter, C., Wada, K. und Wenthold, R.J. (1992) "DNA amplification of subunits of the AMPA selective glutamate receptor family of the rat and guinea pig cochlea." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.*, pp. 19.
- Dolan, D.F., Nuttall, A.L. und Avinash, G. (1990) "Asynchronous neural activity recorded from the round window." *J. acoust. Soc. Am.* **87**: 2621-2627.
- Duckert, L.G. und Rubel, E.W. (1990) "Ultrastructural observations on regenerating hair cells in the chick basilar papilla." *Hear. Res.* **48**: 161-182.
- Duckert, L.G. und Rubel, E.W. (1993) "Morphological correlates of functional recovery in the chicken inner ear after gentamycin treatment." *J. Comp. Neurol.* **331**: 75-96.
- Epstein, J.E. und Cotanche, D.A. (1995) "Secretion of a new basal layer of tectorial membrane following gentamicin-induced hair cell loss." *Hear. Res.* **90**: 31-43.
- Eybalin, M. (1993) "Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea." *Physiol. Rev.* **73**: 309-373.
- Fettiplace, R. und Fuchs, P.A. (1999) "Mechanisms of hair cell tuning." *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 809-834.
- Fex, J. und Martin, M.R. (1980) "Lack of effect of DL-alpha-aminoadipate, an excitatory amino acid antagonist, on cat auditory nerve responses to sounds." *Neuropharmacology* **19**: 809-811.
- Firbas, W. und Müller, G. (1983) "The efferent innervation of the avian cochlea." *Hear. Res.* **10**: 109-116.
- Fischer, F.P. (1992) "Quantitative analysis of the innervation of the chicken basilar papilla." *Hear. Res.* **61**: 167-178.
- Fischer, F.P. (1994) "General pattern and morphological specialization of the avian cochlea." *Scanning Microsc.* **8**: 351-364.
- Flock, Å. (1965) "Transducing mechanisms in the lateral line canal organ receptors." L. Frisch (ed.) In: *Sensory Receptors*, Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, *cold Spring Harbor*, L.I., New York, pp. 133-145 .
- Fonnum, F. (1984) "Glutamate: a transmitter in mammalian brain." *J. Neurochem.* **42**: 1-11.
- Fuchs, P.A., Nagai, T. und Evans, M.G. (1988) "Electrical tuning in hair cells isolated from the chick cochlea." *J. Neurosci.* **8**: 2460-2467.
- Friedmann, I. und Ballantyne, J. (1984) "Ultrastructural atlas of the inner ear." *Butterworths*: London.
- Gaudin, E.P. (1968) "On the middle ear of birds." *Acta Otolaryngol. (Stockh)* **65**: 316-326.
- Geiger, J.R.P., Melcher, T., Koh, D.-S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P. und Monyer, H. (1995) "Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS." *Neuron* **15**: 193-204.
- Gleich, O. und Manley, G.A. (1988) "Quantitative morphological analysis of the sensory epithelium of the starling and pigeon basilar papilla." *Hear. Res.* **34**: 69-85.

- Gleich, O. und Narins, P.M. (1988) "The phase response of primary auditory afferents in a songbird (*Sturnus vulgaris* L.)" *Hear. Res.* **34**: 69-86.
- Gleisner, L., Flock, A. und Wersäll, J. (1973) "The ultrastructure of the afferent synapse on hair cell in the frog labyrinth." *Acta Otolaryngol.* (Stockh) **76**: 199-207.
- Godfrey, D.A., Carter, J.A., Berger, S.J. und Matschinsky, F.M. (1976) "Levels of putative transmitter amino acids in the guinea-pig cochlea." *J. Histochem. Cytochem.* **24**: 468-470.
- Godfrey, D.A., Wiet, G.J. und Ross, C.D. (1986) "Quantitative histochemistry of the cochlea." *Raven Press*: New York.
- Gross, N.B. und Anderson, D.J. (1976) "Single unit responses recorded from the first order neuron of the pigeon auditory system." *Brain Res.* **101**: 209-222.
- Gummer, A.W. (1991) "First order temporal properties of spontaneous and tone-evoked activity of auditory afferent neurons in the ganglion of the pigeon." *Hear. Res.* **55**: 143-166.
- Gummer, A.W., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1987) "Basilar membran motion in the pigeon measured with the Mössbauer technique." *Hear. Res.* **29**: 63-92.
- Gummer, A.W., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1989) "Mechanics of a single-ossicle ear: I. The extra-stapedius of the pigeon." *Hear. Res.* **39**: 1-14.
- Guth, P.S., Aubert, A., Ricci, A.J. und Norris, C.H. (1991) "Differential modulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release from hair cells: some novel hypotheses." *Hear. Res.* **56**: 69-78.
- Hama, K. und Saito, K. (1977) "Fine structure of the afferent synapse of the hair cells in the saccular macula of the goldfish, with special reference to the anastomosing tubules." *J. Neurocytol.* **6**: 361-373.
- Hashimoto, S., Kimura, R.S. und Takasaka, T. (1990) "Computer-aided three-dimensional reconstruction of the inner hair cells and their nerve endings in the guinea pig cochlea." *Acta Otolaryngol.* (Stockh) **109**: 228-234.
- Hashino, E., Tanaka, Y., Salvi, R.J. und Sokabe, M. (1992) "Hair cell regeneration in the adult budgerigar after kanamycin ototoxicity." *Hear. Res.* **59**: 46-58.
- Hashino, E., Tanaka, Y. und Sokabe, M. (1991) "Hair cell damage and recovery following chronic application of kanamycin in the chick cochlea." *Hear. Res.* **52**: 356-368.
- Hashino, E., Tinhan, E.K. und Salvi, R.J. (1995) "Base-to-apex gradient of cell proliferation in the chick cochlea following kanamycin-induced hair cell loss." *Hear. Res.* **88**: 156-168.
- Hennig, A.K. und Cotanche, D.A. (1998) "Regeneration of cochlear efferent nerve terminals after gentamycin damage." *J. Neurosci.* **18**: 3282-3296.
- Henry, W.R. und Mulroy, M.J. (1995) "Afferent synaptic changes in auditory hair cells during noise-induced temporary threshold shift." *Hear. Res.* **84**: 81-90.
- Herron, C.E., Lester, R.A.J., Coan, E.J. und Collingridge, G.L. (1986) "Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: A novel synaptic mechanism." *Nature* **322**: 265-268.
- Hill, K.G., Stange, G. und Mo., J.W. (1989a) "Temporal synchronisation in the primary auditory response in the pigeon." *Hear. Res.* **39**: 63-74.

- Hill, K.G., Mo, J.W. und Stange, G. (1989) "Excitation and suppression of primary auditory nerve fibers in the pigeon." *Hear. Res.* **39**: 37-48.
- Hoidis, S., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999) "Ongoing degeneration of auditory ganglion cells after regeneration from severe acoustic trauma in the pigeon." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* **22**: 127.
- Hollmann, M., Hartley, M. und Heinemann, S. (1991) "Ca²⁺ permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition." *Science* **252**: 851-853.
- Hollmann, M. und Heinemann, S. (1994) "Cloned glutamate receptors." *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 31-108.
- Hudspeth, A.J. und Corey, D.P. (1977) "Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2407-2411.
- Hunter, C., Doi, K. und Wenthold, R.J. (1992) "Neurotransmission in the auditory system." *Otolaryngol. Clin. North Am.* **25**: 1027-1052.
- Janas, J.D., Cotanche, D.A. und Rubel, E.W. (1995) "Avian cochlear hair cell regeneration: Stereological analyses of damage and recovery from a single high dose of gentamicin." *Hear. Res.* **92**: 17-29.
- Janssen, R., Schweitzer, L. und Jensen, K.F. (1991) "Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea: Physiological and morphological approaches." *Brain Res.* **552**: 255-264.
- Jenison, G.L., Winbery, S. und Bobbin, R.P. (1986) "Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acids agonists on guinea-pig cochlear potentials." *Comp. Biochem. Physiol.* **84C**: 385-389.
- Juis, J.M., Rueda, J., Merchan, J. und Sala, M.L. (1989) "The effects of kainic acid on the cochlea ganglion of the rat." *Hear. Res.* **40**: 65-74.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. und Jessell, T.M. (eds.) (1991) "Principles of neural science." 3rd Ed. Elsevier, New York.
- Kataoka, Y. und Ohmori, H. (1994) "Activation of glutamate receptors in response to membrane depolarization of hair cells isolated from chick cochlea." *J. Physiol., (Lond.)* **477**: 403-414.
- Kataoka, Y. und Ohmori, H. (1996) "Of known neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear hair cells." *J. Neurophysiol.* **76**: 1870-1879.
- Kiedrowski, L. (1998) "The difference between mechanisms of kainate and glutamate excitotoxicity in vitro: osmotic lesion versus mitochondrial depolarization." *Restor. Neurol. Neurosci.* **12**: 71-79.
- Klinke, R. (1986) "Neurotransmission in the inner ear." *Hear. Res.* **22**: 235-243.
- Klinke, R., Müller, M., Richter, C.P. und Smolders, J.W.T., (1994) "Preferred intervals in birds and mammals: A filter response to noise?" *Hear. Res.* **74**: 238-246.
- Klinke, R. und Oertel, W. (1977) "Amino acids – putative afferent transmitter in the cochlea?" *Exp. Brain Res.* **30**: 145-148.
- Klinke, R., Richter, C.P., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1993) "Evoked preferred intervals in pigeon." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* **16**: 34.

- Klinke, R. und Smolders, J.W.T. (1984) "Hearing mechanisms in caiman and pigeon." Bolis, L., Keynes, R.D. und Maddrell, S.H.P. (Eds.). In: Comparative physiology of sensory systems, *Cambridge University Press*, Cambridge, pp. 195-211.
- Klinke, R. und Smolders, J.W.T. (1993) "Performance of the avian inner ear." *Prog. Brain Res.* **97**: 31-43.
- Klinke, R. Smolders, J.W.T. und Ding, D. (1992) "Afferent fibres from avian short hair cells do respond to sound stimuli." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* **15**.
- Knipper, M., Köpschall, I., Rohbock, K., Köpke, A.K.E., Bonk I., Zimmermann, U. und Zenner, H.P. (1997) "Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear." *Cell Tissue Res.* **287**: 23-41.
- Knipper, M., Bandtlow, C., Gestwa, L., Köpschall, I., Rohbock, K., Wiechers, B., Zenner, H.P. und Zimmermann, U. (1998) "Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function." *Development* **125**: 3709-3718.
- Köppl, C. (1997) "Phase locking to high frequencies in the auditory nerve and cochlear nucleus magnocellularis of the barn owl, *Tyto alba*." *J. Neurosci.* **17**: 3312-3321.
- Koyano, K. und Ohmori, H. (1996) "Cellular approach to auditory signal transmission." *Jap. J. Physiol.* **46**: 289-310.
- Kuriyama, H., Albin, R.L. und Altschuler, R.A. (1993) "Expression of NMDA-receptor messenger RNA in the rat cochlea." *Hear. Res.* **69**: 215-220.
- Kuriyama, H., Jenkins, O. und Altschuler, R.A. (1994) "Immunocytochemical localization of AMPA selective glutamate receptor subunits in the rat cochlea." *Hear. Res.* **80**: 233-240.
- Kusakari, J., Arakawa, E., Rokugo, M., Ohyama, K. und Inamura, N. (1984) "Effect of kainic acid upon N1 latency." *Laryngoskop.* **94**: 1365-1369.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227** (259): 680-685.
- Liberman, M.C. und Mulroy, M.J. (1982) "Acute and chronic effects of acoustic trauma: cochlear pathology and auditory nerve pathophysiology." Hamernik, P.R., Henderson, D., Salvi, R.J. (eds.) In: New perspectives on noise-induced hearing loss. New York, *Raven Press*, pp. 105-135.
- Lippe, W.R., Westbrook, E.W. und Ryals, B.M. (1991) "Hair cell regeneration in the chicken cochlea following aminoglycoside toxicity." *Hear. Res.* **56**: 203-210.
- Lipton, S.A. und Kater, S.B. (1989) "Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival." *Trends Neurosci.* **7**: 265-270.
- Manley, G.A. (1979) "Preferred intervals in the spontaneous activity of primary auditory neurons." *Naturwissenschaften* **66**: 582-584.
- Manley, G.A. (1990) "Peripheral hearing mechanisms in reptiles and birds." *Springer Verlag*, Berlin, New York.
- Manley, G.A., Gleich, O., Leppelsack, H.-J. und Oeckinghaus, H. (1985) "Activity patterns of cochlear ganglion neurones in the starling." *J. Comp. Physiol. (A)* **164**: 289-296.

- Manley, G.A., Kaiser, A., Brix, J. und Gleich, O. (1991) "Activity patterns of primary auditory-nerve fibres in chickens: Development of fundamental properties." *Hear. Res.* **57**: 1-15.
- Matsubara, A., Laake, J.H., Davanger, S., Usami, S. und Ottersen, O.P. (1996) "Organisation of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: A quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of corti." *J. Neurosci.* **16**: 4457-4467.
- Matsubara, A., Takumi, Y., Nakagawa, T., Usami, S., Shinkawa, H. und Ottersen, O.P. (1999) "Immunoelectron microscopy of AMPA receptor subunits reveals three types of putative glutamatergic synapse in the rat vestibular end organs." *Brain Res.* **819**: 58-64.
- Mayer, M.L. und Westbrook, G.L. (1987) "Cellular mechanisms underlying excitotoxicity." *Trends Neurosci.* **10**: 59-61.
- McFadden, E.A. und Saunders, J.C. (1989) "Recovery of auditory function following intense sound exposure in the neonatal chick." *Hear. Res.* **41**: 205-216.
- Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P.H. und Ruppertsberg, J.R. (1994) "A molecular refinement for submillisecond desensitization in glutamate receptors." *Science* **266**: 1059-1061.
- Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1998) "Hair cell regeneration after local application of gentamicin at the round window of the cochlea in the pigeon." *Hear. Res.* **120**: 25-36.
- Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999) "Responses of auditory nerve fibers innervating regenerated hair cells after local application of gentamicin at the round window of the cochlea in the pigeon." *Hear. Res.* **131**: 153-169.
- Müller, M., Smolders, J.W.T., Ding-Pfennigdorff, D. und Klinke, R. (1996) "Regeneration after tall hair cell damage following severe acoustic trauma in adult pigeons: Correlation between cochlear morphology, compound action potential responses and single fiber properties in single animals." *Hear. Res.* **102**: 133-154.
- Müller, M., Smolders, J.W.T., Ding-Pfennigdorff, D. und Klinke, R. (1997) "Discharge properties of pigeon single auditory nerve fibers after recovery from severe acoustic trauma." *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**: 401-416.
- Navaratnam, D.S, Escobar, L., Covarrubias, M. und Oberholtzer, J.C. (1995) "Permeation properties and differential expression across the auditory receptor epithelium of an inward rectifier K⁺ channel cloned from the chick inner ear." *J. Biol. Chem.* **270**: 19238-19245.
- Niedzielski, A.S., Safieddine, S. und Wenthold, R.J. (1997) "Molecular analysis of excitatory amino acid receptor expression in the cochlea." *Audiol. Neurootol.* **2**: 79-91.
- Niedzielski, A.S. und Wenthold, R.J. (1995) "Expression of AMPA, kainate and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia." *J. Neurosci.* **15**: 2338-2352.
- Niemiec, A.J., Raphael, Y. und Moddy, D.B. (1994) "Return of auditory function following structural regeneration after acoustic trauma: behavioural measures from quail." *Hear. Res.* **79**: 1-16.
- Ofsie, M.S. und Cotanche, D.A. (1996) "Distribution of nerve fibers in the basilar papilla of normal and sound-damaged chick cochleae." *J. Comp. Neurol.* **370**: 281-294.
- Ofsie, M.S., Hennig, A.K., Messana, E.P. und Cotanche, D.A. (1997) "Sound damage and gentamicin treatment produce different patterns of damage to the efferent innervation of the chick cochlea." *Hear. Res.* **113**: 207-223.

- Ohmori, H. (1987) "Gating properties of the mechano-electrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick." *J. Physiol.* **387**: 589-610.
- Olney, J.W. (1986) "Excitotoxic amino acids." *News Physiol. Sci.* **1**: 19-23.
- Olney, J.W. und Ishimaru, M.J. (1996) "Excitotoxic cell death." Koliatsos, V.E. und Ratan, R.R. (eds.) In: Cell death and diseases of the nervous system. *Humana Press Inc.* Totowa, NJ.
- Ottersen, O.P., Hjelle, O.P., Osen, K.K. und Laake, J.H. (1994) "Amino acid transmitters." In: The rat nervous system. 2nd edn, Ed. G. Paxinos. *Academic Press*: Orlando FL, pp. 1017-1037.
- Ottersen, O.P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A.S., Laake, J.H. und Usami, S. (1998) "Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear." *Prog. Neurobiol.* **54**: 127-147.
- Ottiger, H.P., Gerfin-Moser, A., Del Principe, F., Dutly, F. und Streit, P. (1995) "Molecular cloning and differential expression patterns of avian glutamate receptor mRNAs." *J. Neurochem.* **64**: 2413-2426.
- Pellegrini, G.D., Bennett, M. und Zukin, R.S. (1991) "Differential expression of three glutamate receptor genes in the developing rat brain: an in situ hybridization study." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 4157-4161.
- Pickles, J.O., Brix, J., Comis, S.D., Gleich, O., Köppl, C., Manley, G.A. und Osborne, M.P. (1989) "The organization of tip links and stereocilia on hair cells of bird and lizard basilar papillae." *Hear. Res.* **41**: 31-42.
- Pickles, J.O. und Corey, D.P. (1992) "Mechanoelectrical transduction by hair cells." *Trends Neurosci.* **15**: 254-259.
- Plontke, S.K.R., Lifshitz, J. und Saunders, J.C. (1999) "Distribution of rate-intensity function types in chick cochlear nerve after exposure to intense sound." *Brain Res.* **842**: 262-274.
- Powell, F.L. (1983) "Respiration." Abs, M. (ed.) In: Physiology and behaviour of the pigeon. *Acad. Press.*, London pp. 73-95.
- Puel, J.L. (1995) "Chemical synaptic transmission in the cochlea." *Prog. Neurobiol.* **47**: 449-476.
- Puel, J.L., D'Aldin, C., Ruel, J., Ladrech, S. und Pujol, R. (1997) "Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies." *Acta. Otolaryngol.* (Stockh.) **117**: 214-218.
- Puel, J.-L., Ladrech, S., Chabert, R., Pujol, R. und Eybalin, M. (1991a) "Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea." *Hear. Res.* **51**: 255-264.
- Puel, J.L., Pujol, R., Ladrech, S. und Eybalin, M. (1991) " α -amino-3-Hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea pig cochlea." *Neurosci.* **45**: 63-72.
- Puel, J.L., Pujol, R., Tribillac, F., Ladrech, S. und Eybalin, M. (1994) "Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity." *J. comp. Neurol.* **341**: 241-256.
- Puel, J.L., Ruel, J., D'Aldin, C.G. und Pujol, R. (1998) "Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss." *NeuroReport* **9**: 2109-2114.

- Puel, J.L., Saffiedine, S., D'Aldin, C.G., Eybalin, M. und Pujol, R. (1995) "Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea." *C.R. Acad. Sci.* **318**: 67-75.
- Pujol, R., Lenoir, M., Robertson, D., Eybalin, M. und Johnstone, B.M. (1985) "Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells." *Hear. Res.* **18**: 145-151.
- Pujol, R., Rebillard, G., Puel, J.L., Lenoir, M., Eybalin, M. und Recasens, M. (1991) "Glutamate neurotoxicity in the cochlea: A possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in aging." *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) suppl. **476**: 32-36.
- Raman, I., Zhang, S. und Trussell, L.O. (1994) "Pathway-specific variants of AMPA receptors and their contribution to neuronal signaling." *J. Neurosci.* **14**: 4998-5010.
- Ravindranathan, A., Donevan, S.D., Sugden, S.G., Greig, A., Rao, M.S. und Parks, T.N. (2000) "Contrasting molecular composition and channel properties of AMPA receptors on chick auditory and brainstem motor neurons." *J. Physiol.* **523** (3): 667-684.
- Ravindranathan, A., Parks, T.N. und Rao, M.S. (1996) "Flip and flop isoforms of chick brain AMPA receptor subunits: cloning and analysis of expression patterns." *Neuroreport* **7**: 2707-2711.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999a) "AMPA-type glutamate receptor subunits are expressed in the avian cochlear hair cells and ganglion cells." *Neuroreport* **10**: 2137-2141.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999b) "Glutamate receptor subunits and ototoxicity of AMPA in the pigeon ear." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* **22**: 91.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999c) "Functional recovery of hearing after damage to the hair cell-neural synapses in the pigeon." *Europ. J. Physiol.* **437**: Suppl. 5, O8-6.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999d) "Recovery of hearing after excitotoxicity of AMPA in the avian inner ear." *36th Workshop on Inner Ear Biology.*
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999e) "AMPA receptor subunits and ototoxicity of AMPA in the pigeon inner ear." *Proc. Göttingen Neurobiol. Conf.* **27**: 267.
- Robertson, D. (1983) "Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea." *Hear. Res.* **9**: 263-278.
- Robertson, D. (1984) "Horseradish peroxidase injection of physiologically characterised afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion." *Hear. Res.* **15**: 113-121.
- Rosenhall, U. (1971) "Morphological patterns of the organ of corti in birds." *Arch. Klin. Exp. Ohren-, Nasen-, Kehlkopfheilk.* **200**: 42-63.
- Rosowski, J.J. (1991) "The effects of external- and middle-ear liftering on auditory threshold and noise-induced hearing loss." *J. Acoust. Soc. Am.* **90** (1): 124-135.
- Rothman, S.M. (1985) "The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx." *J. Neurosci.* **5**: 1483-1489.
- Rothman, S.M. und Olney, J.W. (1986) "Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage." *Ann. Neurol.* **19**: 105-111.
- Rubel, E.W., Oesterle, E.C. und Weisleder, P. (1991) "Hair cell regeneration in the avian inner ear." *Ciba Found Symp.* **160**: 77-96.

- Rubel, E.W. und Ryals, B.M. (1982) "Patterns of hair cell loss in chick basilar papilla after intense auditory stimulation: Exposure duration and survival time." *Acta. Otolaryngol.* (Stockh) **93**: 31-41.
- Ruel, J., Chen, C., Pujol, R., Bobbin, R.P. und Puel, J.L. (1999) "AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig." *J. Physiol.* **518** (3): 667-680.
- Ryals, B.M. und Dooling, R.J. (1996) "Changes in innervation and auditory sensitivity following acoustic trauma and hair cell regeneration in birds." Salvi, R.J., Henderson, D., Fiorino, F. und Colletti, V. (eds.). In: Auditory system plasticity and regeneration. New York, *Thieme Medical Publishers*, pp 84-99.
- Ryals, B.M., Teneyck, B. und Westbrook, E.W. (1989) "Ganglion cell loss continues during hair cell regeneration." *Hear. Res.* **43**: 81-90.
- Ryals, B.M., Westbrook, E.W., Stoots, S. und Spencer, R.F. (1992) "Changes in the acoustic nerve after hair cell regeneration." *Exp. Neurol.* **115**: 18-22.
- Ryals, B.M. und Westbrook, E.W. (1994) "TEM analysis of neural terminals on autoradiographically identified regenerated hair cells." *Hear. Res.* **72**: 81-88.
- Ryan, A.F., Brumm, D. und Kraft, M. (1991) "Occurrence and distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the cochlea." *NeuroReport* **2**: 643-646.
- Ryan, A.F., Housley, G.D. und Harris, J.P. (1993) "Isolation of gene sequences from inner ear using PCR and cDNA library screening." *Abst. Assoc. Res. Otolaryngol.* **16**: 88.
- Sachs, L. (1999) "Angewandte Statistik." Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Sachs, M.B., Young, E.D. und Lewis, R. (1974) "Discharge patterns of single fibers in the pigeon auditory nerve." *Brain Res.* **70**: 431-447.
- Safieddine, S. und Eybalin, M. (1992) "Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptors mRNAs in cochlear neurons." *NeuroReport* **3**: 1145-1148.
- Salvi, R.J., Saunders, J.C., Hashino, E. und Chen, L. (1994) "Discharge patterns of chicken cochlear ganglion neurons following kanamycin-induced hair cell loss and regeneration." *J. comp. Physiol. (A)* **174**: 351-369.
- Salvi, R.J., Saunders, J.C., Powers, N.L. und Boettcher, F.A. (1992) "Discharge patterns of cochlear ganglion neurons in the chicken." *J. Comp. Physiol. (A)* **170**: 227-241.
- Saunders, J.C. (1985) "Auditory structure and function in the bird middle ear: An evaluation by SEM and capacitive probe." *Hear. Res.* **18**: 253-268.
- Saunders, J.C., Doan D.E., Cohen, Y.E., Adler, H.J. und Poje, C.P. (1996a) "Recent observations on the recovery of structure and function in the sound-damaged chick ear." Salvi, R.J., Henderson, D., Fiorino, F. und Colletti, V. (eds) In: Auditory system plasticity and regeneration. New York, *Thieme Medical Publishers*, pp 62-83.
- Saunders, J.C., Doan, D.E., Poje, C.P. und Fisher, K.A. (1996b) "Cochlear nerve activity after intense sound exposure in neonatal chicks." *J. Neurophysiol.* **76**: 770-787.
- Saunders, S.S., Salvi, R.J. und Miller, K.M. (1995) "Recovery of thresholds and temporal integration in adult chickens after high level 525-Hz pure tone exposure." *J. acoust. Soc. Am.* **97**: 1159-1164.

- Saunders, J.C. und Tilney, L.G. (1982) "Species differences in susceptibility to noise exposure." Hamernik, R.P., Henderson, D., Salvi, R. (eds.). In: New perspectives on noise-induced hearing loss. New York, *Raven Press*, 229-247.
- Schermuly, L. und Klinke, R. (1982) "Tuning properties of pigeon primary auditory afferents depend on temperature." *Pflug. Arch.* **394**: 63.
- Schermuly, L. und Klinke, R. (1990) "Origin of infrasound sensitive neurones in the papilla basilaris of the pigeon: An HRP study." *Hear. Res.* **48**, 69-78.
- Schneider, M.E. (1994) "AMPA receptors form the chick cochlear ganglion." *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* **17**: 139.
- Schneider, M.E., Niedzielski, A.S. und Wenthold, R.J. (1992) "AMPA receptors from the chick brain." *Soc. Neurosci. Abstr.* **18**: 259.
- Schwartzkopff, J. (1968) "Structure and function of the ear and of the auditory brain areas in birds." A.V.S. Dereuck und J. Knight (Eds.). In: Hearing mechanisms, *J.&A. Churchill*, London, pp. 41-59.
- Schwartzkopff, J. und Winter, P. (1960) "Zur Anatomie der Vogel-cochlea unter natürlichen Bedingungen." *Biologisches Zentralblatt* **79**: 607-624.
- Schweitzer, L., Jensen, K.F. und Janssen, R. (1991) "Glutamate neurotoxicity in rat auditory system: cochlear nuclear complex." *Neurotoxicol. Teratol.* **13**: 189-193.
- Shatz, C.J. (1990) "Impulse activity and the patterning of connections during CNS development." *Neuron* **5**: 745-756.
- Shehata-Dieler, W.E., Richter, C.P., Dieler, R. und Klinke R. (1994) "Effects of endolymphatic and perilymphatic application of salicylate in the pigeon. I. Single fiber activity and cochlear potentials." *Hear. Res.* **74**: 77-84.
- Shero, M., Salvi, R.J., Chen, L. und Hashino, E. (1998) "Excitotoxic effect of kainic acid on chicken cochlear afferent neurons." *Neurosci. Letters* **257**: 81-84.
- Smith, C.A. (1981) "Recent advances in structural correlates of auditory receptors." Autrum, H., Ottoson, D., Perl, E. und Schmidt, R.F. (eds.). In: Progress in Sensory Physiology, *Springer Verlag*, Berlin, New York.
- Smith, C.A., Konishi, M. und Schuff, N. (1985) "Structure of the barn owl's (*tyto alba*) inner ear." *Hear. Res.* **17**: 237-248.
- Smolders, J.W.T. (1995) "Das Gehörorgan der Vögel." Habilitationsschrift, J.W.G. Universität Frankfurt.
- Smolders, J.W.T. (1999) "Functional recovery in the avian ear after hair cell regeneration." *Audiol. Neurootol.* **4**: 286-302.
- Smolders, J.W.T., Ding-Pfennigdorff, D. und Klinke, R. (1992) "Normal tuning curves from primary afferent fibres innervating short and intermediate hair cells in the pigeon ear." *Adv. Biosci.* **83**: 197-204.
- Smolders, J.W.T., Ding-Pfennigdorff, D. und Klinke, R. (1995) "A functional map of the pigeon basilar papilla: Correlation of the properties of single auditory nerve fibers and their peripheral origin." *Hear. Res.* **92**: 151-169.

- Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1977) "Effect of temperature changes on tuning properties of primary auditory fibres in caiman and cat: Portmann, M. und Aran, J.M. (eds.). In: Inner ear biology, L'institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris, pp. 125-126.
- Sommer, B. und Seeburg, P.H. (1992) "Glutamate receptor channels: novel properties and new clones." *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 291-296.
- Spoendlin, H. (1971) "Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation." *Acta. Otolaryngol.* (Stockh) **71**: 166-176.
- Spoendlin, H. (1973) "Innervation of the cochlear receptor." Moller, A. (ed.). In: Basic mechanisms in hearing. Academic Press, New York, pp.185-230.
- Stebbins, W. (1970) "Studies of hearing and hearing loss in the monkey." Stebbins W. (ed.) In: Animal psychophysics. Appleton-Century-Crofts, New York, 153.
- Stone, J.S., Leano, S.G., Baker, L.P. und Rubel, E.W. (1996) "Hair cell differentiation in chick cochlear epithelium after aminoglycoside toxicity: In vivo and in vitro observations." *J. Neurosci.* **16**: 6157-6174.
- Stone, J.S., Oesterle, E.C. und Rubel, E.W. (1998) "Recent insights into regeneration of auditory and vestibular hair cells." *Curr. Opin. Neurol.* **11**: 17-24.
- Sun, H., Salvi, R.J., Ding, D.L., Hashino, E., Shero, M. und Zheng, X.Y. (2000) "Excitotoxic effect of kainic acid on chicken otoacoustic emissions and cochlear potentials." *J. Acoust. Soc. Am.* **107** (4): 2136-21423.
- Takasaka, T. und Smith, C.A. (1971) "The structure and innervation of the pigeon's basilar papilla." *J. Ultrastruct. Res.* **35**: 20-65.
- Tanaka, K. und Smith, C.A. (1978) "Structure of the chickens inner ear: SEM and TEM study." *Am. J. Anat.* **153**: 251-272.
- Taylor, M.M. und Creelman, C.D. (1967) "PEST: Efficient estimates on probability functions." *J. Acoust. Soc. Am.* **41**: 782-787.
- Temchin, A.N. (1988) "Unusual discharge patterns of single fibres in the pigeons auditory nerve." *J. comp. Physiol. (A)* **163**: 99-115.
- Theiss, C., Hellmann, B. und Güntürkün, O. (1998) "The differential distribution of AMPA-receptor subunits in the tectofugal system of the pigeon." *Brain Res.* **785**: 114-128.
- Theurich, M., Langner, G. und Scheich, H. (1984) "Infrasound responses in the mibrain of the guinea fowl." *Neuroscience Letters* **49**: 81-86.
- Usami, S., Matsubara, A., Fujita, S., Shinkawa, H. und Hayashim, M. (1995) "NMDA (NMDAR1) and AMPA-type (GluR2/3) receptor subunits are expressed in the inner ear." *NeuroReport* **6**: 1161-1164.
- Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C. und Guth, P. (1985) "The effect of glutamate on the frog semicircular canal." *Brain Res.* **330**: 1-9.
- von Békésy, G. (1944) "Über die mechanische Frequenzanalyse in der Schnecke verschiedener Tiere." *Akust. Zeitschr.* **9**: 3-11.

- von Düring, M., Andres, K.H. und Simon, K. (1985) "The comparative anatomy of the basilar papilla in birds." *Fortschritte der Zoologie* **30**: 681-685.
- Voßieck, T. (1991) "Der Einfluß des endocochleären Potentials auf die Innenohrfunktion der Taube (*Columba livia*)." *Ph. D. Thesis* J.W. Goethe Universität, Fachbereich Medizin, Frankfurt am Main.
- Voßieck, T. und Klinke, R. (1990) "A method for changing the avian endocochlear potential by current injection." *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **248**: 11-14.
- Wald, A. (1947) "Sequential Analysis." *Dover Publications*, Inc. New York.
- Wang, Y. und Raphael, Y. (1996) "Re-innervation patterns of chick auditory sensory epithelium after acoustic overstimulation." *Hear. Res.* **97**: 11-18.
- Warchol, M.E. und Corwin, J.T. (1996) "Regenerative proliferation in organ cultures of the avian cochlea: Identification of the initial progenitors and determination of the latency of the proliferation response." *J. Neurosci.* **16**: 5466-5477.
- Warchol, M.E. und Dallos, P. (1987) "Single unit response to very low frequency sound in the avian auditory brainstem." *Assoc. Res. Otolaryngol.* **10**: 38-39.
- Watkins, J.C. und Evans, R.H. (1981) "Excitatory amino acid transmitters." *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**: 165-204.
- Yamaguchi, K. und Ohmori, H. (1990) "Voltage-gated and chemically gated ionic channels in the cultured cochlear ganglion neurone of the chick." *J. Physiol. (Lond.)* **420**: 185-206.
- Zheng, X.Y., Henderson, D., Hu, B.H. und Mc Fadden, S.L. (1997) "Recovery of structure and function of inner ear afferent synapses following kainic acid excitotoxicity." *Hear. Res.* **105** (1-2): 65-76.
- Zheng, X.Y., Wang, J., Salvi, R.J. und Henderson, D. (1996) "Effects of kainic acid on the cochlear potentials and distortion product otoacoustic emissions in chinchilla." *Hear. Res.* **95**: 161-167.
- Zucca, G., Botta, L., Milesi, V., Dagani, F. und Valli, P. (1992) "Evidence for L-glutamate release in frog vestibular organs." *Hear. Res.* **63**: 52-56.

VIII. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Klinke, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit am Zentrum der Physiologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchzuführen und mein Projekt während dieser Zeit unterstützte.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Diener für die Betreuung meiner Arbeit am Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Herr Dr. Jean Smolders unterstützte mich in allen Bereichen der Hörphysiologie. Seine Fähigkeit und seine Bereitschaft, mir schwierige Sachverhalte einfach verständlich zu erklären, erleichterten mir die Einarbeitung in diesem komplexen Forschungsbereich. Seine fundierten Kommentare sind an vielen Stellen der vorliegenden Doktorarbeit reflektiert. Herrn Dr. Marcus Müller möchte ich nicht nur für die Hilfe bei der Einführung in den experimentellen Teil meiner Arbeit, sondern auch für die große Hilfe bei technischen und fachlichen Problemen danken.

Besonderer Dank gilt Iris Hack, die mich mit sehr viel Geduld in die Grundlagen der Immunhistochemie einführte und jederzeit bereit war, einen Teil ihrer knappen Zeit für meine Einarbeitung und Fragen in diesem mir neuen Wissensgebiet zu opfern. Der Abteilung für Neuroanatomie von Prof. Dr. Heinz Wässle am Max-Planck-Institut danke ich für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung von Antikörpern zur Durchführung eines Teils meiner Experimente.

Silvi Hoidis war mir im histologischen Teil dieser Arbeit behilflich und brachte mir geduldig die Geheimnisse einer „perfekten Cochlea-Präparation“ bei. Frau Dr. Marlies Knipper stand mir bei der Durchführung der Western Blot Analysen am Institut für Biochemie an der Universität in Tübingen zur Seite. Ohne ihre Hilfe wären diese sicherlich nicht so schnell und reibungslos verlaufen. Herr Hofer erstellte für mich die Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung. Ihnen allen danke ich sehr.

Nicole Menger half mir bei der hoffentlich ansprechenden und verständlichen Darstellung dieser Dissertation und sorgte in freundschaftlicher Weise nicht nur für mein leibliches Wohl während eines langen Arbeitstages.