

Untersuchungen zur Hörphysiologie bei Complexin-Knockout-Mäusen

Nicola Strenzke, Darina Khimich, Kerstin Reim, Nils Brose, Tobias Moser

InnenOhrLabor, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universität Göttingen, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

Complexine (CPX) sind synaptische Proteine, die an den sogenannten SNARE-Komplex binden und so an der Regulation der Exozytose synaptischer Vesikels beteiligt sind. Auf diese Weise wird eine synchrone schnelle calciumgetriggerte Transmitterfreisetzung ermöglicht (Chen et al., 2002). Die elektrische Erregbarkeit von Nervenzellen, denen die beiden wichtigsten CPX-Isoformen, CPX-I und CPX-II fehlen, ist deutlich herabgesetzt (Reim et al., 2001). Die bisher noch weitgehend unerforschten CPX-Isoformen III und IV werden an den Bändersynapsen (Ribbon Synapsen) der Retina exprimiert. Auch die inneren Haarzellen weisen diese speziellen synaptischen Strukturen auf, die eine schnelle synaptische Transmission über längere Zeiträume erlauben.

In dieser Studie wollten wir mit Hilfe von akustisch evozierten Potenzialen, otoakustischen Emissionen sowie

immunhistochemischen und elektrophysiologischen Experimenten die bisher unbekannt Funktion von Complexinen im auditorischen System untersuchen. Von besonderem Interesse waren für uns die Complexine III und IV wegen ihrer zu vermutenden Expression an den Bändersynapsen der inneren Haarzellen.

Adulte CPX-I-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine pantonale Schwerhörigkeit von 40-50 dB auf (Tabelle 1). In der Klick-BERA waren die Latenzen der Wellen Jewett II-V signifikant verlängert (Tabelle 2) und die Amplituden deutlich kleiner. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Mäusen, denen CPX-II, CPX-III oder CPX-IV fehlten, weder eine Hörminderung (Tabelle 1) noch Veränderungen der Latenzen oder Amplituden (Tabelle 2).

	I ko	I wt	II ko	II wt	III ko	III wt	IV ko	IV wt
n	9	8	4	4	5	5	6	6
I	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0
II	2,4 ± 0,1*	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
III	3,3 ± 0,1*	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,8 ± 0,0
IV	4,5 ± 0,1**	3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,0
V	5,7 ± 0,1**	4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,0	4,5 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1

Tabelle 1: gemittelte Latenzen der FAEP-Wellen Jewett I-V bei Complexin I-IV-Knockout-Mäusen (ko) und gesunden Geschwistertieren (wt) nach Stimulation mit 80 dB Clickreizen im Freifeld bei 20 bzw. 90 Hz Stimulusrate. * / ** kennzeichnen signifikante ($p < 0,05$) bzw. hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen (Student's-t-test.)

Die DPOAE waren bei allen untersuchten Tieren (CPX-I-IV) normal. In immunhistochemischen Darstellungen konnte keine Expression von CPX-I und CPX-II Proteine an den Synapsen der inneren Haarzellen nachgewiesen werden. Färbungen für das synaptische Protein Bassoon und den postsynaptischen Glutamaterezeptor GluR2/3 zeigten eine normale Zahl und Anordnung der Bändersynapsen der inneren Haarzellen bei CPX-I-III-Knockout-Mäusen. Bei CPX-I-Knockout-Mäusen wurden auch Patch-Clamp-

Untersuchungen durchgeführt. Die Exozytosefunktion der inneren Haarzellen war hinsichtlich der Calciumströme und Membrankapazitätsänderung nach Stimulation normal.

Wegen der Kombination von pathologischer BERA bei normalen DPOAE könnte der ausgeprägte Hördefekt bei der CPX-I-Knockout Maus prinzipiell als auditorische Neuropathie/synaptische Audiopathie interpretiert werden. Nach unseren bisherigen Ergebnissen scheint die Hörminderung

jedoch nicht auf einer Funktionsstörung der Haarzellen oder ihrer afferenten Synapsen zu beruhen. Eine Störung der axonalen Reizweiterleitung erscheint aufgrund der synaptischen Lokalisation der untersuchten Proteine und der audiometrischen Befundkonstellation unwahrscheinlich. Mögliche Ursachen für die Hörstörung umfassen eine gestörte olivocochleäre (efferente) Regulation der Cochlea sowie eine gestörte afferente synaptische Transmission im zentra-

len Abschnitt der Hörbahn. Dagegen war das Hörvermögen der CPX-III- und CPX-IV-Knockout-Mäuse überraschenderweise normal. Hier stehen Untersuchungen zur Expression dieser Proteine an den Bändersynapsen der inneren Haarzellen ebenso wie audiometrische Tests an CPX-III/IV-Doppelknockout-Mäusen noch aus. Möglicherweise wird das Fehlen einer Isoform durch das Vorhandensein der anderen kompensiert.

	I ko	I wt	II ko	II wt	III ko	III wt	IV ko	IV wt
n	7	9	4	4	5	5	6	6
4 kHz	67 ± 4 **	39 ± 2	50 ± 0	48 ± 5	50 ± 6	47 ± 3	40 ± 3	40 ± 3
6 kHz	58 ± 5 **	30 ± 2	28 ± 3	33 ± 3	37 ± 3	37 ± 3	30 ± 0	28 ± 4
8 kHz	51 ± 5 **	20 ± 2	23 ± 5	23 ± 3	27 ± 3	33 ± 3	18 ± 2	18 ± 5
12 kHz	44 ± 4 **	10 ± 0	15 ± 3	15 ± 3	13 ± 3	17 ± 3	10 ± 0	10 ± 0
16 kHz	40 ± 3 **	11 ± 1	15 ± 3	18 ± 3	17 ± 3	20 ± 0	14 ± 2	14 ± 3
24 kHz	48 ± 4 **	17 ± 2	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	18 ± 2	20 ± 3
32 kHz	56 ± 7 **	18 ± 2	23 ± 3	25 ± 5	27 ± 3	27 ± 3	20 ± 3	28 ± 4
Klick	37 ± 3 **	17 ± 2	18 ± 3	18 ± 3	17 ± 3	23 ± 3	20 ± 0	16 ± 3

Tabelle 2: gemittelte Hörschwellen bei Complexin I-IV-Knockout-Mäusen (ko) und gesunden Geschwistertieren (wt). Die Stimulation erfolgte mit 12 ms tone bursts bzw. 0,3 ms Klicks im Freifeld, die Aufzeichnung der Antworten über subkutane Elektroden (LP 4 kHz, HP 400 Hz; Verstärkung 50000x, Aufzeichnungsrate 40 Hz, Tucker-Davis System II). Als Schwelle wurde jeweils der Schallpegel ermittelt, ab der in 2x2000 Mittelungen eine reproduzierbare Kurve ableitbar war. *** kennzeichnen signifikante ($p < 0,05$) bzw. hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zu entsprechenden Kontrollen (Student's-t-test.)

Literatur:

Chen X, Diana R, Tomchick DR, Kovrigin E, Arac D, Machius M, Südhof TC, Rizo (2002) Three-Dimensional Structure of the Complexin/SNARE Complex. *Neuron* 33: 397–409

Reim K, Mansour M, Varoqueaux FV, McMahon HT, Südhof TC, Brose N, Rosenmund C (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104: 71-81