

University of Groningen

Mechano- and electrophysiological studies on cochlear hair cells and lateral line cupulae

Dinklo, Theodorus

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Dinklo, T. (2005). *Mechano- and electrophysiological studies on cochlear hair cells and lateral line cupulae*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

SAMENVATTING

In dit proefschrift staat de mechanosensorische zintuighaarcel centraal die in het gewervelde dierenrijk voorkomen in verschillende mechanisch gevoelige zintuigsystemen. Deze zintuighaarcel dankt zijn naam aan de bundel van op haren gelijkende stereocilia aan de apicale zijde. Deze stereocilia, met actine gevulde pilaarvormige membraanuitstulpingen, staan netjes gerangschikt in rijen van oplopende grootte, en pivoteren bij mechanische stimulatie als een geheel om hun basis. In de toppen van de stereocilia zitten verbindingen, de zogenaamde *tip links* die verondersteld worden verbonden te zijn met het mechanotransductiekanaal. Deflecties van de bundel in de richting van de grootste stereocilia leidt tot een toename in de spanning van de *tip links* waardoor de mechanotransductiekanaalen op een directe mechanische wijze worden geopend en de conductantie voor cationen wordt vergroot. Een beweging in de tegenovergestelde richting veroorzaakt een afname van de spanning en sluiting van de kanalen. De transductiestroom resulteert in een verandering van de membraanpotentiaal waardoor voltage-afhankelijke calcium kanalen in de basolaterale membraan worden geopend. De influx van calcium induceert vervolgens neurotransmitter afgifte waardoor het signaal wordt doorgegeven aan zenuwcellen die de informatie transporteren en verder verwerken in ons centrale zenuwstelsel. Het binnenstromende Ca^{2+} induceert eveneens de openingen van kalium kanalen zodat door een efflux van K^{+} de membraan weer repolariseert.

De hierboven gegeven eenvoudige beschrijving van de zintuighaarcel is de basis vorm van de zintuighaarcellen die worden teruggevonden in verschillende zintuigsystemen. Allereerst in ons gehoororgaan waarmee we geluid waarnemen, maar ook in ons evenwichtsorgaan voor de detectie van lineaire en circulaire versnelling, en in het zijlijnorgaan waarmee vissen en amfibieën waterbeweging (snelheid en versnelling) in hun directe omgeving waarnemen. De essentiële stimulus voor de haarcel is de deflectie van de haarbundel. Het type beweging (verplaatsing, snelheid, acceleratie) evenals het frequentiebereik waarvoor deze zintuigsystemen gevoelig zijn wordt dan ook voornamelijk bepaald door de mechanische eigenschappen van de structuur waarin de haarcellen zich bevinden.

In dit proefschrift vindt u metingen aan deze structuren, maar ook aan individuelen haarcellen. Het meten aan mechanodetectoren is om verscheidene redenen experimenteel gezien een lastige klus. Ten eerste zijn mechanodetectiesystemen vaak moeilijk bereikbaar. Haarcellen uit het oor zitten bijvoorbeeld in een verbeend slakkenhuis op een lange strip van slechts enkele

cellagen dikte. Het onbeschadigd isoleren van de kwetsbare haarcellen vereist de nodige training. Het zijlijn orgaan biedt wat dat betreft meer mogelijkheden, omdat het zich bevindt aan de oppervlakte van de vis, of net daaronder in kleine kanaaltjes. Hierdoor is het mogelijk om in het levende organisme metingen te doen aan haarcellen.

Een tweede probleem volgt uit het feit dat deze cellen klein zijn en gevoelig voor verplaatsingen ordes van grootte kleiner dan hun eigen dimensie. Voor de visualisatie van de haarcellen moet gebruik worden gemaakt van een microscoop. De verplaatsingen waarvoor haarcellen gevoelig voor zijn, zijn echter zo klein dat ze zelfs met het microscoop niet zichtbaar zijn. Hiervoor werd het microscoop gemodificeerd tot een laser interferometer opstelling. Op basis van de Doppler verschuiving die plaats vindt als het laserlicht interactie heeft met het bewegend object, kan hiermee met nanometer ($\text{nm} = 10^{-9}$ meter) nauwkeurigheid de verplaatsing worden bepaald.

Naast de bundelbeweging moet ook nog de elektrische respons worden gemeten. Het gaat hierbij om kleine ionenstromen in de orde van tientallen tot honderden picoampères ($\text{pA} = 10^{-12}$ ampère) of potentiaalveranderingen in de orde van microvolts ($\mu\text{V} = 10^{-6}$ volt). De nadruk die wordt gelegd op de eenheden is bedoeld om aan te geven dat het hier om bijzonder kleine signalen gaat. Hetzelfde geldt voor de mechanische stimuli die moeten worden aangeboden. Het stimulusapparaat dat gebruikt wordt voor mechanische stimulatie van verscheidene mechanosensorische systemen is dan ook het eerste onderwerp dat uitvoerig wordt beschreven en bestudeerd in **hoofdstuk 2**.

Het vloeistofstimulus apparaat bestaat uit een met vloeistof gevulde kamer waarvan de achterwand door piëzoelektrisch materiaal heen en weer bewogen kan worden. De kamer mondt uit in een glazen pipet met een vernauwde tip van enkele (tientallen) micrometers. Beweging van de achterwand genereert drukverschillen die leiden tot een waterverplaatsing aan de tip van de glazen pipet. Op deze manier wordt een microscopisch kleine en gerichte vloeistofstimulus verkregen.

Om de karakteristieke eigenschappen van deze stimulus als functie van de tijd en als functie van frequentie te evalueren maakten we gebruik van een flexibele probe. Sinusoidale bewegingen van de probe (frequenties variërend van 1 tot 1000 Hz), geïnduceerd door het stimulus apparaat, werden nauwkeurig gedetecteerd met behulp van de laser interferometer. Zo werd informatie verkregen over de golfvorm van de waterverplaatsing, evenals de waterbeweging en fase als functie van de frequentie (frequentie respons).

Uit de metingen blijkt dat de grootte van de uitstroomopening in belangrijke mate bepalend is voor de karakteristiek van de gegenereerde waterbeweging. Een grote uitstroomopening resulteert in een constante waterverplaatsing als functie van de frequentie over een beperkt frequentiebereik (< 100 Hz). Een vernauwing tot enkele micrometers verandert de karakteristiek tot een snelheidsstimulus (een constante snelheid als functie van frequentie) over het gehele gemeten frequentiebereik (1-1000 Hz).

De gebruikte probes en de beschreven calibratie methode kunnen ook worden gebruikt bij metingen aan mechanodetectiesystemen om gemeten data te corrigeren voor frequentie afhankelijke karakteristieken van de geproduceerde vloeistofbeweging.

In **hoofdstuk 3** wordt de vloeistofstimulus gebruikt om de hydrodynamica van cupulae in oppervlakteneuromasten van jonge zebravissen (*Danio rerio*) te bestuderen. Zoals de naam het al aangeeft, bevinden deze mechanodetectie eenheden zich aan de oppervlakte van de vis. Ze bestaan uit een tiental haarcellen met elk een haarbundel en een lang kinocilium, overkoepeld door een pilaarvormige cupula. De hoogte van de cupula is beperkt tot enkele tientallen micrometers zodat, voor de frequenties waarvoor het systeem het meest gevoelig is (enkele tientallen Hz), de cupula geheel binnen de grenslaag van het epitheel blijft. De frequentierespons van deze oppervlakteneuromasten wordt dan ook niet enkel bepaald door de mechanische koppeling van de cupula aan het onderliggende weefsel, maar ook door de een frequentieafhankelijke demping van de vloeistofbeweging als gevolg van deze grenslaag. Cupulabeweging als functie van de vloeistofsnelheid, gemeten op enkele tientallen micrometer boven het epitheel, is vrijwel constant op lage frequenties (< 20 Hz), en laten een gevoeligheid zien in het bereik van 1-5 nanometer cupulaverplaatsing per micrometer/seconde vloeistofsnelheid. Metingen op verscheidene hoogtes laten zien dat de cupula buigt tijdens de stimulatie, waardoor aan de basis van de cupula, waar effectief de haarbundels bewogen worden, de geschatte gevoeligheid slechts 20-30% bedraagt ten opzichte van de bemeeten hoogte. Tot aan ongeveer 70 Hz neemt de verplaatsing als functie van de vloeistofstimulus af met ongeveer 10 dB/dec en op hogere frequenties met ongeveer 20 dB/dec.

Een eerder beschreven model dat de cupulaire mechanica van kanaalneuromasten beschrijft gaf geen adequate beschrijving van de metingen. Een uitbreiding van het model met de frequentie afhankelijke grenslaag verbetert de beschrijving aanzienlijk. De resultaten laten zien dat de stijfheidskoppeling van de

cupula aan de onderliggende haarcellen wordt gedomineerd door de buigzaamheid van de cupula.

Op basis van de hier gemeten cupulaire mechanica werd een vergelijking gemaakt tussen oppervlakteneuromasten van de zebravis en kanaalneuromasten van de schele pos (*Gymnocephalus cernuus*). Door hun lage stijfheid en het kleine aantal haarcellen bezitten de oppervlakteneuromasten een inferieure signaal-ruis verhouding over het gehele frequentiebereik.

Hoofdstuk 4 richt zich op de zintuighaarcellen uit het oor van zoogdieren, waarvoor de muis als modelsysteem werd gebruikt. De zintuigcellen zitten hier ingesloten in het slakkenhuis, een verbeende structuur die zijn naam dankt aan de opgekrulde vorm. Hierin bevindt zich de basilaire membraan met daarin drie rijen buitenste haarcellen en een rij binnenste haarcellen. Reeds bij de geboorte zijn deze haarcellen aanwezig en voorzien van een haarbundel en mechanotransductiekanalen. In dit hoofdstuk wordt echter niet gekeken naar de transductiestroom in de apicale membraan, maar naar de kinetiek van de kalium stroom, $I_{K,neo}$, in de basolaterale membraan, die gedurende de eerste week na de geboorte de grootste membraanstroom is. $I_{K,neo}$ wordt gekenmerkt door een trage voltage-afhankelijke activatie die eigenschappen bezit van het *delayed rectifier* type kalium kanalen. De stroom activeert bij membraanpotentialen groter dan -60 mV en is bepalend voor de rustmembraanpotential in deze cellen.

Om de kinetiek van $I_{K,neo}$ nader te bestuderen werden acute preparaten van het binnenoer van muizenpups gebruikt waaruit de de basilaire membraan werd geïsoleerd. Met behulp van een kleine glazen pipet werd de basolaterale membraan van individuele buitenste haarcellen ontdaan van naburige cellen en celresten. Op deze schone membraan werd vervolgens een glaselektrode geplaatst waarmee de membraanpotential van een individuele buitenste haarcel op de gewenste potential kon worden gehouden. Met dezelfde elektrode werd de voltage afhankelijke stroom over de totale celmembraan gemeten.

Een depolariserende stap in de membraanpotential leidt tot activatie (toename) van de stroom, gevolgd door een inactivatie (afname, ondanks een blijvende potentialverandering). De inactivatie wordt gekenmerkt door een snelle en een trage component en een niet-inactiverend deel. Ook de voltage-afhankelijkheid van de inactivatie laat twee componenten zien. Hoewel de voltage-afhankelijkheid van de activatie niet uit twee duidelijke componenten bestaat, lijkt een eenvoudige beschrijving van de activatie op basis van één kanaal niet voldoende. De conclusie uit de resultaten is dan ook dat er twee kalium kanalen ten

grondslag liggen aan $I_{K,neo}$, beide met een vergelijkbare voltage afhankelijke activatie, maar verschillende activatie kinetiek en inactivatie eigenschappen

In **hoofdstuk 5** wordt een eerste stap gezet om de nauwkeurigheid te bepalen waarmee het transductiekanaal binnenkomende signalen verwerkt. Hiervoor hebben we de signaal-ruis verhouding bepaald van de stroom door het mechanotransductiekanaal van buitenste haarcellen uit de muis. Als definitie voor het signaal hebben we de stroom als gevolg van een verandering in haarbundelpositie (de gevoeligheid) rond een zekere haarbundelpositie X genomen. De voornaamste bron van ruis is afkomstig van het intrinsiek stochastische karakter van het kanaal dat voortdurend van conformatie verandert tussen gesloten en open toestanden.

Met behulp van een dynamisch protocol bestaande uit een laagfrequente sinusoidale bundelbeweging met een grote amplitude en een hoogfrequente sinusoidale bundelbeweging met een kleine amplitude, kon direct de respons op lokale kleine bewegingen als een functie van bundelverplaatsing X worden bepaald. Om de kanaalruis te meten moest gebruik worden gemaakt van een statisch protocol waarbij op een aantal vaste haarbundelverplaatsingen de stroomruis werd bepaald over een periode van 50 ms. Om zowel het signaal en de ruis als functie van haarbundelverplaatsing te beschrijven werd een model voor het transductiekanaal gebruikt dat differentiële aangrijpingsposities van de gating spring op de verschillende conformatietoestanden van het kanaal veronderstelt. De verhouding van de energieniveaus van de verschillende conformaties (2 gesloten 1 open toestand) bepaalt hierin volledig de openkans van het kanaal. Specifiek aan dit model is dat het veronderstelt dat de gating spring (model beschrijving analoog aan een elastische tip link) pas een bijdrage levert aan de energetische toestand van het kanaal-gating-spring complex nadat de gating spring aangrijpt op het kanaal. Dus bij negatieve haarbundelverplaatsingen (< -50 nm), wanneer de gating spring niet meer aangrijpt op het kanaal, verandert de energietoestand van de verschillende conformaties niet meer, hetgeen leidt tot een eindige minimale openkans. Daarmee gaat ook de bijbehorende ruis niet naar nul, maar naar een vaste waarde, wat werd bevestigd door de metingen. Aangezien de respons op veranderingen in de haarbundelverplaatsing bij ontkoppeling van de gating spring ook niet meer tot een response leidt, gaat de signaal-ruis verhouding wel naar nul. In de evenwichtspositie staat de gating spring op lichte spanning en stroomt er een zogenaamde *silent current* van ongeveer 10-15% van de maximale stroom. Uit de signaal-ruis metingen blijkt dat rond deze rustpositie van de bundel een haar

bundelverplaatsing ongeveer 5.3 nm nodig is om de ruis te evenaren. De signaal-ruisverhouding is maximaal rond een vaste verplaatsing van ongeveer 40 nm, wanneer de helft van de kanalen open is. De haarbundel moet dan ongeveer 2.7 nm heen en weer worden bewogen (een hoekverplaatsing van slechts $\sim 0.03^\circ$!) om een signaal te genereren dat de ruis in amplitude evenaart. Aangezien de maximale respons wordt bereikt bij een haarbundelverplaatsing van ongeveer 150 nm betekent dit voor het transductiemechanisme een dynamische bereik van ongeveer 30 dB.

In **hoofdstuk 6** wordt de ondergrens van het signaaltransductie door het transductiekanaal in meer detail bepaald. Het transductieapparaat (complex van gating spring en transductiekanaal) wordt hierbij beschouwd als de schatter van de haarbundelverplaatsing die de informatie bevat over de binnenkomende geluidsgolven. De haarbundelverplaatsing zal door de schatter op basis van transductiestroom geschat worden met een variantie σ^2 . In dit hoofdstuk wordt de ondergrens van deze variantie, σ_{\min}^2 , afgeleid. De optimale nauwkeurigheid waarmee de bundelpositie kan worden geschat op basis van de stroom door een enkel transductiekanaal is 47 nm, en wordt bereikt wanneer de openkans van de transductiekanaal halfmaximaal is. De nauwkeurigheid van de schatting schaalst echter met de wortel uit het aantal kanalen (gemiddeld 80 per buitenste haarcel) en komt daarmee dus uit op ongeveer 5.3 nm per cel. Hierbij is echter net als in hoofdstuk 5 alleen rekening gehouden met de intrinsieke stochastische ruis van het kanaal. De nauwkeurigheid wordt echter op meer fronten gelimiteerd. Ook de gating spring is onderhevig aan Brownse fluctuaties, die doorgegeven worden aan het transductiekanaal en onafhankelijk bijdragen aan de mechanotransductieruis. Deze ruisbijdrage levert nog eens een onnauwkeurigheid van 24 nm per transductiekanaal op zodat de totale onnauwkeurigheid per haarcel uitkomt in de orde van 6.5 nm. In dit hoofdstuk leiden we af dat specifiek de moleculaire gating kracht bepalend is voor de nauwkeurigheid van het mechanotransductie proces. Door de gating kracht te verhogen is het transductiekanaal in staat de nauwkeurigheid van transductie te verbeteren. Dit gaat echter ten koste van het effectieve operationele bereik. Op basis van de gegevens uit de literatuur blijkt dan ook dat de meeste haarcellen hun kanaalruis hebben afgestemd op hun gating spring ruis. Het veel verder verlagen van de kanaalruis zou weinig nut hebben aangezien de onontkoombare gating spring ruis dan gaat domineren.

Aan de gehoordrempel lopen de schattingen over de haarbundelverplaatsing uiteen van enkele nanometers tot fracties van nanometers. Dat het gehoor deze

sublieme gevoeligheid kan behalen ondanks de fundamentele beperkingen in het transductieproces is te wel te begrijpen. Allereerst bezit het gehoor meer dan één haarcel, zodat gemiddeld kan worden over meer haarcellen. Daarnaast kan een gelimiteerde effectieve bandbreedte, door passief mechanisch of elektrisch filteren of actieve electromechanische terugkoppeling, tot een verbetering van de detectie drempel leiden.