

Felicitas Eugenia Hengel  
Dr. med.

## **Mechanics, Molecular Elasticity and Functional Modulation of Recombinant Mouse Tip Link Protein Protocadherin-15 of Inner Ear Hair Cells**

Fach: Physiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas Draguhn

Haarzellen, die sensorischen Rezeptorzellen des auditorischen und vestibulären Systems, weisen apikal ein mechanosensitives, von calciumreicher Endolymphe umspültes Haarbündel auf, welches aus stufenartig angeordneten Stereozilien besteht. Jedes Stereozilium ist über ein feines Filament, genannt *tip link*, mit dem nächstgrößeren Stereozilium verbunden. Der *tip link* setzt sich aus zwei dimeren Proteinen zusammen: Protocadherin-15 und Cadherin-23. Beide Proteine sind atypische Mitglieder der Cadherin-Familie, Calcium-abhängiger Adhäsionsproteine. Die Stimulus-induzierte Deflektion des Haarbündels spannt die *tip links* und öffnet direkt mechanosensitive Ionenkanäle. Der darauffolgende Kationeneinstrom depolarisiert die Haarzelle, welche das elektrische Signal zum Gehirn weiterleitet. Um die Deflektion des Haarbündels in eine kanalöffnende Kraft, welche je nach Deflektionsgrad die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals graduell erhöht, umzusetzen, ist ein mechanisches Element in Form einer Feder nötig: die *gating spring*. Die Federkonstante der *gating spring* wurde auf etwa 0.5 - 4 mN/m geschätzt – das molekulare Korrelat wurde jedoch bisher nicht gefunden. Der *tip link* wurde nach seiner molekularen Identifikation als mögliche *gating spring* ausgeschlossen, da Cadherine als zu steif angesehen wurden. Jedoch könnten (a)typische extrazelluläre Cadherin-Domänen oder Calciumbindende Regionen Protocadherin-15 sowie Cadherin-23 elastische Eigenschaften verleihen. Elastizität könnte auch aus der Umlagerung einzelner Domänen zueinander sowie aus der Ent- und Rückfaltung individueller Domänen resultieren. Die direkte Bestimmung der nanomechanischen Eigenschaften des *tip links* ist daher essentiell, um seinen elastischen Beitrag zur *gating spring* und damit die Rolle des *tip links* im Mechanotransduktionsprozess zu verstehen.

Dazu wurde in dieser Arbeit die Nanomechanik einzelner monomerer Protocadherin-15-Moleküle mithilfe einer hoch-präzisen optischen Falle direkt gemessen. Mit einem hochspezifischen, eigens für diese Untersuchung konzipierten biochemisch-biophysikalischen Verfahren wurde die Kraft-abhängige Dehnung sowie Federkonstante der Ektodomäne von Protocadherin-15 unter physiologisch relevanten Kräften ermittelt. Weiterhin wurde das Ent- und Rückfaltungsverhalten des Proteins bestimmt. Die gemessene Federkonstante stieg bei physiologischer Calciumkonzentration mit zunehmender Kraft von 0.2 mN/m (bei 6 pN angelegter Kraft) auf etwa 6 mN/m (bei 47 pN) an. Obwohl die gemessenen Werte nicht ohne Weiteres auf den ganzen, dimeren *tip link* übertragen werden können, spricht die Größenordnung der Messergebnisse für eine relevante Beteiligung des *tip links* an der gesuchten *gating spring*. Des Weiteren wurden reversible Ent- sowie Rückfaltungen bei angelegter Kraft entdeckt. Entfaltungseignisse führen zu einer

sprunghaften Ausdehnung des zuvor gefalteten Proteins und können über die damit einhergehende Zunahme der Konturlänge  $L_0$  klassifiziert werden. Entfaltungseignisse der Klasse  $U_1$  waren durch eine Konturlängenzunahme von  $\Delta L_0 = (3 \pm 0.3)$  nm charakterisiert, Klasse  $U_2$  durch  $\Delta L_0 = (14 \pm 1)$  nm und Klasse  $U_3$  durch  $\Delta L_0 = (32 \pm 1)$  nm (MW  $\pm$  SEM). Rückfaltungen (Klasse  $R_1$ ) dagegen verkürzten die Konturlänge des Proteins um  $\Delta L_0 = (-5 \pm 1)$  nm. Entfaltungen der Klasse  $U_3$  erwiesen sich als calciumabhängig: sie traten nur unter physiologisch niedrigen Calciumkonzentrationen von  $20 \mu\text{M Ca}^{2+}$  auf und wurden unter einer Konzentration von  $3 \text{ mM Ca}^{2+}$ , welche die Calciumbindungsstellen des Proteins sättigt, nicht beobachtet. Die Konturlängenzunahme von  $(32 \pm 1)$  nm in Klasse  $U_3$  weist auf die Entfaltung einer gesamten extrazellulären Cadherin-Domäne hin, welche durch die Entropiezunahme des entfaltenden Proteinanteils zu einer Reduktion der Steifheit (Federkonstante) von Protocadherin-15 führt. In diesem Sinne könnte die Entfaltung einzelner Cadherin-Domänen einen Entspannungsmechanismus unter großer Belastung darstellen und als Sicherheitsvorrichtung die Schädigung der *tip links* bei großen Stimuli verhindern. Zusätzlich wurde der nanomechanische Einfluss einer mit humaner Taubheit assoziierten Deletion einer Aminosäure in der 7. Cadherin-Domäne von Protocadherin-15 untersucht. Das mutierte Protein zeigte trotz sättigender Calciumkonzentration ungewöhnliche Entfaltungseignisse mit einer Konturlängenzunahme von  $L_0 = 33$  nm, welche auf die mutationsbedingte Destabilisierung der 7. Cadherin-Domäne hinweist und somit einen möglichen Erklärungsansatz für den pathologischen Phänotyp beim Menschen liefert.