Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner
Abteilung Allgemeine Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner

Funktionelle und molekulare Analyse des Innenohrs von Thyroidhormonrezeptor knock-out Mausmutanten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Matthias Ley
aus
Tübingen

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. M. Knipper
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Gülch

Berichte aus der Biologie

Matthias Ley

**Funktionelle und molekulare Analyse
des Innenohrs von Thyroidhormonrezeptor
knock-out Mausmutanten**

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Shaker Verlag
Aachen 2003

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Ley, Matthias:

Funktionelle und molekulare Analyse des Innenohrs von
Thyroidhormonrezeptorknock-out Mausmutanten/Matthias Ley.

Aachen: Shaker, 2003

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss.,

ISBN 3-8322-1055-5

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1055-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Hasta la victoria siempre
(Che Guevara)

meinen Eltern
und
Helmut Steinbauer

Abkürzungen

ÄHZ.....	äußere Haarzelle
BERA.....	Hirnstammaudiometrie (<i>brainstem evoked response audiometrie</i>)
DIG.....	Digoxigenin
DPOAEs.....	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
E.....	Embryonal
GEW.....	großer epithelialer Wulst
IHZ.....	innere Haarzelle
ISB.....	inneres Spiralbündel
I Sulc.....	innerer Sulcus
LSO.....	laterale obere olive (<i>lateral superior olive</i>)
MBP.....	<i>Myelin basic protein</i>
mRNA.....	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSO.....	mittlere obere olive (<i>medial superior olive</i>)
NF200.....	Neurofilament 200
P.....	postnataler Tag
P ₀	peripheres Myelinprotein P ₀
SB.....	Spiralbündel (cochleäre Nervenfasern)
SPL.....	Schalldruckpegel (<i>sound pressure level</i>)
TR.....	Thyroidhormonrezeptor
TRH.....	<i>thyrotropin releasing hormone</i>
TSH.....	Thyroidea stimulierendes Hormon
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Tetraiodthyronin (Thyroxin)
ZNS.....	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1.
1.1 Die Cochlea.....	2
1.2 Entwicklung der Cochlea.....	4
1.3 Reizleitung nach zentral.....	6
1.4 DPOAEs (Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen)	8
1.5 Thyroidhormon	8
1.5.1 Einfluss von Thyroidhormon auf die Funktion des Innenohrs	9
1.5.2 Thyroidhormon-Effekte auf die Struktur des Innenohrs	11
1.5.3 Einfluss von Thyroidhormon auf die efferente und afferente Innervation des Cortischen Organs	12
1.5.4 Einfluss von Thyroidhormon auf die Myelinisierung der cochleären Nervenfasern.....	12
1.5.5 Einfluss von Thyroidhormon auf Tectorin in der Cochlea	13
1.5.6 Einfluss von Thyroidhormon auf die aktive Cochleamechanik	13
1.6 Die Thyroidhormonrezeptoren.....	14
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Lösungen.....	17
2.1.1 Allgemeine Lösungen.....	17
2.1.2 Toluidinblaulösung	18
2.1.3 Lösungen für Immunhistochemie	18
2.1.4 Lösungen für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	19
2.1.5 Lösungen für RNA-Agarose-Gelelektrophorese	19
2.1.6 Lösungen für die Northern Blot-Technik	20

2.2	Generation von TR β (-/-) und TR $\alpha 1$ (-/-)/ β (-/-) Mäusen.....	21
2.3	Herstellung von Cryoschnitten.....	22
2.4	Toluidinblau-Färbungen von Cryoschnitten.....	23
2.5	Immunhistochemie an Cryoschnitten	23
2.5.1	Herstellung der Prestin-Antikörper	24
2.5.2	Herstellung der alpha-Tectorin- und beta-Tectorin-Antikörper	24
2.6	Herstellung von Riboproben für <i>in situ</i> -Hybridisierung und Northern Blot	25
2.7	<i>in situ</i> -Hybridisierung an Cryoschnitten	25
2.8	Northern Blot-Technik.....	26
2.8.1	Inaktivierung von RNAsen an Laborgeräten	26
2.8.2	Gewinnung des Gewebes zur mRNA-Isolierung.....	27
2.8.3	mRNA-Isolierung	27
2.8.4	mRNA-Agarose-Gelelektrophorese	27
2.8.5	Transfer der mRNA	27
2.8.6	Hybridisierung	28
2.8.7	Detektion mit Chemilumineszenz	28
2.9	Hirnstammaudiometrie	28
2.9.1	Anästhesie der Mäuse	28
2.9.2	Click-BERA und Latenzen.....	29
2.9.3	Frequenzabhängige BERA	29
2.9.4	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAEs).....	29
2.10	Messung der T ₃ - und T ₄ -Spiegel.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Funktion.....	31
3.1.1	Ermittlung der Hörschwellen bei Click-Stimuli in TR β (-/-) Mäusen und Kontrollen mit Hilfe der Hirnstammaudiometrie	31
3.1.2	Bestimmung der Hörschwellen bei unterschiedlichen Frequenzen	32

3.1.3 Messung der Zeitverzögerung bei Click-Stimuli entlang der zentralen Hörbahn (Latenzen)	34
3.1.4 Untersuchung der aktiven Cochleamechanik anhand von DPOAEs.....	34
3.2 Analyse der Struktur des Cortischen Organs	37
3.2.1 Struktur des Cortischen Organs adulter Kontroll- und TR β (-/-) Tiere.....	37
3.2.2 Untersuchung der Entwicklung des Cortischen Organs in Kontroll- und TR β (-/-) Tieren	40
3.3 Triiodthyronin- und Thyroxinmessungen	41
3.3.1 Analyse der T ₃ - und T ₄ -Spiegel im Serum.....	41
3.4 Analyse der Innervation der Cochlea	43
3.4.1 Untersuchung der Entwicklung von afferenten Projektionen	43
3.4.2 Untersuchung der Entwicklung von efferenten Projektionen	44
3.5 Myelinisierung der Nervenfasern.....	47
3.5.1 Nachweis der Myelinisierung auf Proteinebene	47
3.5.2 Verlauf der MBP-mRNA- und P ₀ -mRNA-Expression im Cortischen Organ.....	50
3.5.3 Quantifizierung der MBP-mRNA in Cochleae mit der Northern Blot-Technik.....	53
3.6 Untersuchung des Cortischen Organs auf alpha- und beta-Tectorin ..	43
3.6.1 Untersuchung des Verlaufs der mRNA-Expression von alpha- und beta-Tectorin.....	55
3.6.2 Immunhistochemischer Nachweis der Proteine alpha- und beta-Tectorin.....	60
3.7 Das Motorprotein Prestin in äußeren Haarzellen	63
3.7.1 Prestin auf mRNA-Ebene.....	63
3.7.2 Prestin-Protein während der Entwicklung	64
4 Diskussion.....	69
4.1 Hörschwellen.....	69

4.2 Struktur.....	70
4.3 T ₃ - und T ₄ -Spiegel während der postnatalen kritischen Phase.....	70
4.4 Latenzen, Synaptogenese und Myelinisierung.....	71
4.5 Aktive Cochleamechanik.....	73
5 Zusammenfassung.....	75
6 Literatur	77
7 Danksagung	85