

**Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde Tübingen
Abteilung Allgemeine Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit
Poliklinik**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. H.-P. Zenner
Sektion Sensorische Biophysik
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. A. W. Gummer**

**Identifizierung und Charakterisierung
thyroidhormonabhängiger Prozesse während der
kritischen Entwicklungsperiode des Innenohres**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Mete Cirali
aus
Reutlingen**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. M. Knipper

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Liebich

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie der Cochlea	2
1.2	Entwicklung der Morphologie und der Innervation der Cochlea . .	4
2	Material und Methoden	7
2.1	Materialien	7
2.1.1	Medikamente, Chemikalien	7
2.1.2	Medien und Puffer	9
2.2	Methoden	9
2.2.1	Tiere und die Induktion der Hypothyreose	9
2.2.2	Herstellung von Cryo-Schnitten	10
2.2.3	Immunohistochemie an Cryo-Schnitten	10
2.2.4	Hirnstammaudiometrie (BERA)	12
2.2.5	Statistische Auswertung und grafische Bearbeitung	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Kontrolle	15
3.1.1	Morphologie	15
	Überblick	15
	P75	15
3.1.2	Innervation	17

Trk B	17
Glutamat-Rezeptor Subtyp 2/3	19
3.1.3 Synaptogenese	22
3.2 Kompletter Hypothyreodismus	22
3.2.1 Morphologie	22
P75	22
3.2.2 Innervation	25
Trk B	25
Glutamat-Rezeptor Subtyp 2/3	26
3.2.3 Synaptogenese	27
3.3 Zeitlich begrenzter Hypothyreodismus	28
3.3.1 Morphologie	28
3.3.2 Innervation	30
TrkB	30
Neurofilament 200	30
Synaptophysin	31
3.3.3 Funktion	33
Hörschwellenmessungen an adulten Tieren mittels Klick- BERA	33
Auswertung von Latenzen in der Klick-BERA	40
Hörschwellenmessung an adulten Tieren mittels frequenz- abhängiger BERA	40
4 Diskussion	45
4.1 Entwicklungsverlauf der p75 ^{NGFR} -Expression während der Morphogenese	45
4.2 Rolle des Hypothyreoidismus auf die postnatale Entwicklung der Innervation	48

4.2.1	Entwicklungsverlauf der p75-Expression	48
4.2.2	Entwicklungsverlauf der TrkB-Expression	50
4.2.3	Entwicklungsverlauf der Afferenzen anhand von Glu 2/3 . .	53
4.2.4	Entwicklungsverlauf der Synaptogenese und Efferenzen . .	54
4.3	Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die p75 ^{NGFR} - Expression	57
4.4	Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die Inner- vation	58
4.5	Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die Hör- funktion	60
	Zusammenfassung	65
	Literaturverzeichnis	69
	Danksagung	87
	Lebenslauf	89

Abkürzungen

(Ohne gängige Maßeinheiten)

a	apikal
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser
b	basal
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (ein Neurotrophin)
BERA	brainstem evoked response audiometry (engl.) = Hirnstammaudiometrie
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CO	Cortisches Organ
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektro-Encephalogramm
fa-BERA	frequenzabhängige BERA
GAP-43	Growth-associated protein 43
Glu 2/3	Glutamat-Rezeptor Subtyp 2/3
GluR 2/3	= Glu 2/3
Glu 4	Glutamat-Rezeptor Subtyp 4
h	Stunde(n)
HZ	Haarzelle(n)
IGSB	Intraganglionäres Spiralbündel

IHC	Innere Haarzelle
ISB	Inneres Spiralbündel
ISulc	Innerer Sulcus
KöO	Köllikersches Organ
LOC	lateraler olivo-cochleärer Komplex
M	Molar
m	medial
mb	midbasal
mM	Millimolar
MMI	Methyl-Mercapto-Imidazol
MOC	medialer olivo-cochleärer Komplex
N.	Nervus
NF-200	Neurofilament 200
NGF	Nerve growth factor
NGFR	Nerve growth factor receptor
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophin 4/5
OHC	Äußere Haarzelle
OSB	Äußeres Spiralbündel
OSulc	Äußerer Sulcus
p0	Tag der Geburt, Alter der Tiere am Tag der Geburt
p1, p2, etc.	postnataler Tag eins, postnataler Tag zwei, etc.
p75	p75 ^{NGFR}
p75 ^{NGFR}	NGF-Rezeptor (niedrigaffiner Neurotrophinrezeptor)
pn0, pn1, etc.	gleichbedeutend mit p0, p1, etc.

Abkürzungen

PFA	Para-Formaldehyd
PTU	Propylthiouracil
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SG	Ganglion spirale
Sv	Stria vascularis
Syn	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TrkB	Tyrosinkinase-Rezeptor B (hochaffiner Neurotrophinrezeptor für BDNF)

Kapitel 1

Einleitung

Wir leben im Kommunikationszeitalter. Die Kommunikation stellt jedoch schon seit Gedenken der Menschheit einen essentiellen Bestandteil unseres Soziallebens dar. Für die Erlernung der verbalen Sprachfähigkeit ist eine regelrecht ablaufende Entwicklung des Hörvermögens Grundvoraussetzung. Genetische und erworbene Krankheiten können den Entwicklungsprozess im Innenohr stören und so zur Schwerhörigkeit verschiedenen Grades oder zum Ausbleiben der Schallempfindung führen. Es gibt während der Entwicklung der verschiedenen Organe und Organsysteme Zeitintervalle der besonderen Empfindlichkeit gegenüber Störeinflüssen. Diese Zeitintervalle werden kritische Phasen oder Perioden der Entwicklung genannt. In den genannten Phasen kommt es im neuronalen Gewebe zum kompetitiven Verhalten der einzelnen Neurone und Neuronengruppen unter- und gegeneinander. Durch die Konkurrenz kommt es zur Selektion von Neuronen und Axonen (Cyander, 1979), indem ausgewählte Synapsen sich stabilisieren und weiter persistieren können (Edelman, 1979).

Wie im visuellen System existiert auch für die Cochlea eine kritische Periode. Bei der Ratte erstreckt sich die Periode vom Tag der Geburt bis ca. 12. postnatalen Tag (pn12), an dem die Cochlea ihre Funktion aufnimmt (Rubel, 1978; Shah et al., 1978). An pn12 werden jedoch zunächst sehr hohe Schalldruckpe-

gel benötigt, um einen Reiz auszulösen. Weitere zwei Wochen müssen vergehen bis durch verstärkte Bildung von Myelinscheiden und Reifung zentral akustischer Regionen die Schallempfindungsfähigkeit von adulten Tieren erreicht wird (Rubel, 1978; Echterler et al., 1989). Während der kritischen Entwicklungsperiode der Cochlea kommt es durch eine erworbene Hypothyreose (Uziel, 1986) zu einer nachhaltigen Störung des Aufbaus der Cochlea. Diese Arbeit befasst sich mit dem Ablauf der morphogenetischen und neuronalen Entwicklungsschritte beim Gesunden und beim Hypothyreoten und mit der Untersuchung der Folgeschäden der Hypothyreose in der kritischen Entwicklungsperiode.

1.1 Anatomie der Cochlea

Das Innenohr befindet sich im Felsenbein und wird funktionell in zwei Einheiten aufgeteilt. Die eine Einheit stellt das Gleichgewichtsorgan (der Vestibularapparat) mit den Bogengängen, dem Utriculus und Sacculus dar. Die andere Einheit, die Cochlea oder die Schnecke, grenzt daran an und enthält das Hörorgan. Die knöcherne Achse, um die sich die Schnecke windet, ist der Modiolus. In ihm bündeln sich die Fasern, die aus der Cochlea kommen, zum Hörnerven (N. cochlearis). Die Schnecke windet sich bei der Ratte 2,5 Mal um den Modiolus, enthält das Spiralganglion und die drei Kompartimente Scala vestibuli, Ductus cochlearis und Scala tympani. Der Ductus cochlearis enthält Endolymphe und endet blind. Die beiden Scalae enthalten Perilymphe und sind über das Helicotrema an der Spitze der Schnecke miteinander verbunden. Bei einem Längsschnitt werden die vier sichtbaren Windungen basal, midbasal, medial und apikal benannt.

Das Hör- oder Cortische Organ liegt im Ductus cochlearis. Der Ductus cochlearis wird apikal durch die Reissnersche Membran, lateral durch das Spiralligament, basal durch die Spirallamina und die Basilarmembran begrenzt. Die dem Ductus cochlearis zugewandte Fläche des Spiralligaments bildet die Stria

1.1. ANATOMIE DER COCHLEA

vascularis. Die apikale Verdickung der Spirallamina nennt man Limbus. Der c-förmige innere Sulcus bildet mit seinem Epithel die laterale Begrenzung des Limbus. Zwischen dem inneren und äußeren Sulcus befindet sich das Cortische Organ. Das Hörorgan und der innere Sulcus werden durch die Tectorialmembran überspannt. Das Hörorgan selbst wird wiederum aus den Stützzellen und den sensorischen Haarzellen gebildet. Bei allen Säugetieren gibt es eine Reihe innere und drei Reihen äußere Haarzellen. Die Haarzellen erhielten ihren Namen durch die Stereozilienbündel, die mit der Tektorialmembran in Kontakt stehen. Die inneren und äußeren Haarzellen, getrennt durch innere und äußere Stützzellen, stehen im spitzen Winkel zueinander. Die Stützzellen oder auch Pfeilerzellen bilden zusätzlich die äußere Begrenzung des Cortischen Tunnels, der auch Perilymphe enthält. Neben der inneren Pfeilerzelle wird die innere Haarzelle (IHC) sonst von der inneren Grenzzelle und Phalangealzelle umgeben. Basal der IHC verläuft das innere Spiralbündel (ISB), in der die versorgenden Nervenfasern für die IHC verlaufen. Basal der äußeren Haarzellen (OHC) befinden sich die Deiters-Zellen und das äußere Spiralbündel (OSB), das die nervalen Fasern für das OSB enthält. Lateral der OHC befindet sich die äußere Grenzzelle.

Während die inneren Haarzellen die ankommenden Schallwellen nach Auslenkung der Stereozilien in elektrische Impulse wandeln, sind die OHC für die frequenzspezifische Verstärkung der Wanderwelle durch aktive Bewegung verantwortlich (Zenner, 1988; Corwin und Warchol, 1991). Die Innervation der Haarzellen erfolgt sowohl afferent (von den Haarzellen kommend), als auch efferent (zu den Haarzellen hinführend). Die Zellkörper der Afferenzen liegen im Spiralganglion. Die Ganglionzellen leiten die elektrischen Signale über ihre Axone weiter zentral in den Nucleus cochlearis im Stammhirn weiter. Es gibt zwei Typen von Afferenzen. Der Typ I ist myelinisiert und versorgt die IHC. Die Zellkörper des Typs I vertreten einen Anteil von 90% der Spiralganglienzellpopulation (Pujol et al., 1978; Sobkowicz, 1992). Die verbleibenden 10% gehören zu den Afferenzen des

Typs II und versorgen unmyelinisiert die OHC. Von der efferenten Innervation her verhält sich die Relation reziprok. Die Zellkörper der efferenten Neurone an die OHC liegen im medialen olivo-cochleären Komplex (MOC) des Stammhirns (Kikuchi und Hilding, 1965; Warr, 1975). Die Axone der Neurone sind myelinisiert und stellen einen Großteil der efferenten Fasern in der Cochlea dar. Ein sehr geringer Teil der efferenten Fasern innervieren die IHC und sind nicht myelinisiert. Die Zellkörper dieser Neurone liegen im lateralen olivo-cochleären Komplex (LOC) des Stammhirns (Warr, 1975; Merchan-Perez et al., 1993).

1.2 Entwicklung der Morphologie und der Innervation der Cochlea

Bevor die Hörfunktion beginnen kann, muss zunächst die Cochlea, insbesondere das Cortische Organ und seine Innervierung, reifen. Die Reifung erfolgt nicht parallel über die gesamte Cochlea, sondern in apikaler Richtung mit einer Zeitverzögerung von ca. zwei Tagen gegenüber der basalen Windung. Am augenfälligsten verändert sich die morphologische Struktur mit der Ausdifferenzierung der nicht-neuronalen Zellen der Cochlea (Uziel et al., 1985; Roth und Bruns, 1992a,b). Daneben kommt es bei der Entwicklung zur Selektion verschiedener Axone sowie zum Untergang von überschüssigen Synapsen (Pujol et al., 1978; Lenoir et al., 1980) und Neuronen (Rueda et al., 1987; Robertson et al., 1989). Bei der Umstrukturierung kommt es ferner zur Neubildung von Axonen und Synapsen (Knipper et al., 1995) und zur Myelinisierung der Afferenzen und Efferenzen (Romand und Romand, 1987; Moore et al., 1995; Knipper et al., 1998).

Bei der Ratte ist das Epithel, das sich später zum Cortischen Organ entwickelt, anfangs flach, kompakt und liegt auf der Basilarmembran (Roth und Bruns, 1992b). Etwa um pn7 und pn8 entwickelt sich zwischen den Pfeilerzellen der Cortische

1.2. ENTWICKLUNG DER MORPHOLOGIE UND DER INNERVATION DER COCHLEA

Tunnel. Der große epitheliale Wulst ändert seine Struktur von hochprismatischen in flache cuboide Zellen und wird invaginiert. Dadurch entsteht der innere Sulcus und so bekommt die Tectorialmembran seinen Abstand zu den Stereozilien der Haarzellen .

Bei Geburt sind bei der Ratte bereits die Afferenzen und Efferenzen angelegt. Sie unterliegen jedoch in den ersten zwei Lebenswochen einer Reorganisation (Rubel, 1978; Whitehead, 1986). Die Dendriten der Afferenzen Typ I retrahieren sich von den Haarzellen (Pujol et al., 1978; Lenoir et al., 1980) und es bilden sich neue Synapsen aus (Knipper et al., 1995). Die vorhandenen Afferenzen Typ I innervieren bis zu fünf IHC (Echteler, 1992) und haben Kollateralen, die an die OHC ziehen (Pujol und Marty, 1968; Perkins und Morest, 1975). Diese Kollateralen retrahieren sich bis pn6 (Echteler, 1992). Die Anzahl der Kollateralen an die IHC wird ebenfalls reduziert, sodass ein Neuron Verbindung nur noch mit eins bis zwei IHC hat (Berglund und Ryugo, 1987). Bei pn0 sind bereits Afferenzen vom Typ II im Bereich der OHC vorhanden. In den ersten sieben postnatalen Tagen sprossen diese Fasern unter die OHC zur Bildung des äußeren Spiralbündels (OSB) (Hafidi und Romand, 1989; Echteler, 1992). Das Dendritenwachstum der Afferenzen des Typs II endet mit der Ausbildung von synaptischen Verbindungen zu etwa 20 äußeren Haarzellen zwischen pn5 und pn8 (Echteler, 1992). Zwischen pn4 und pn6 sterben rund 22% der Spiralganglionneurone, sodass deren Anzahl auf die tatsächlich für die Funktion der Cochlea notwendigen reduziert wird (Rueda et al., 1987).

Die Efferenzen des LOCs an die IHC haben bereits bei neugeborenen Ratten Kontakt zum Zellkörper (Soma) ihrer Zielzellen (axosomatische Verbindung). Die axosomatischen Verbindungen werden gelöst und die Fasern retrahieren sich bis pn7, um Synapsen an den Dendriten der Afferenzen Typ I herzustellen (axodendritische Verbindungen) (Lenoir et al., 1980; Pujol, 1986; Emmerling et al., 1990; Sobkowicz, 1992). Die Efferenzen des MOC, die ihre Fasern in Richtung der OHC

projizieren, haben zunächst ihre synaptischen Verbindungen mit den Dendriten der Typ II-Afferenzen. Diese Efferenzen ändern im Verlauf ihr Verbindungsmuster so, dass sie auch axosomatische Verbindungen zu den OHC herstellen. Am Ende der zweiten postnatalen Woche verbleiben nur noch ausschließlich die axosomatischen Verbindungen (Lenoir et al., 1980; Pujol et al., 1978; Knipper et al., 1995). Ein möglicher Funktionsumfang des efferenten Systems besteht in der verbesserten Frequenzdiskriminierung, Ausblendung von Störgeräuschen, Adaptation und Stabilisierung der Schwellen (Rauber und Kopsch, 1994).

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Medikamente, Chemikalien

Ammersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig

Anti-Maus FITC

ASTA Medica AWD GmbH, Frankfurt

Favistan

Bayer, Leverkusen

Rompun 290

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Anti-Kaninchen-Antikörper

Braun Melsungen AG, Melsungen

Atropinsulfat

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Pefablock

Chemikon International Inc., Temecula, CA, USA

polyklonaler Antikörper Anti-GluR2/3, polyklonaler Anti-p75^{NGFR}

CuraMED Pharma GmbH

Ketamin 50 Curamed

Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

polyklonaler Anti-Synaptophysin-Antikörper

Delta-Pharma GmbH, Pfullingen

Isotone Natriumchlorid-Lösung

Dianova GmbH, Hamburg

Anti-Kaninchen-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Anti-Maus-Cy3

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Eppendorf Safe Lock 1,5ml, Eppendorf Safe Lock 2ml

Fisher Diagnostic, Fair Lawn, New Jersey, USA

Cal-ExTMII, Superfrost*/Plus Objektträger

Hoechst, Frankfurt

Mowiol

Interfauna, Tuttlingen

Wistar-Ratten

Kodak

T-Max 400 Pro für schwarz-weiß Fotos

Merck, Darmstadt

Essigsäure, Glycerol, Na₂HPO₄, NaCl, NaH₂PO₄, NaOH, Paraformaldehyd, Saccharose, Tris

Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, CA, USA

Tissue-Tek O.C.T. Compound

2.2. METHODEN

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

polyklonaler Antikörper Anti-TrkB

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Toluidinblau O

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

monoclonaler Anti-GAP43-Antikörper, EDTA,

Rinderserumalbumin (BSA), Triton X-100

Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Vectashield

2.1.2 Medien und Puffer

PBS, pH 7,4

Na₂HPO₄ 50mM

NaCl 150mM

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und die Induktion der Hypothyreose

Zur Gewinnung von Cochleapräparaten wurden Wistar-Ratten von Interfauna (Tuttlingen) geliefert. Zur Induktion des Hypothyreoidismus wurde Methyl-Mercapto-Imidazol (MMI; 0,02%; siehe Alvarez-Dolado et al. (1994)) in der pränatalen Phase der Jungtiere (in der Regel E17) im Trinkwasser der Muttertiere gelöst. Die Gabe erfolgte entweder bis zum Tage der Dekapitation unter CO₂-Anästhesie oder bis zu einem festgesetzten postnatalen Tag (maximal p12), um den zeitlich begrenzten hypothyreoiden Effekt in der postnatalen Phase zu untersuchen.

2.2.2 Herstellung von Cryo-Schnitten

Cryo-Schnitte zur Durchführung von immunhistologischen Untersuchungen wurden aus Cochleae von Wistar-Ratten hergestellt. Das Protokoll erfolgte wie in Knipper et al. beschrieben (1995, 1996, 1997). Für die Präparation wurden Tiere postnatalen Alters p3 bis p12 und adulte Tiere verwendet. Der Tag der Geburt wurde als p0 definiert. Nachdem die Cochleae präpariert wurden, wurden sie in 2% Paraformaldehyd und 25% Saccharose in PBS für zwei Stunden fixiert. Die Cochleae der Tiere älter als p10 wurden für ein bis drei Stunden in Cal-ExTMII (Fisher Diagnostic) oder 12 bis 48 h in 150 mM EDTA und 1 mM Pefablock (Boehringer Mannheim) in PBS entkalkt. Nach anschließender Inkubation über 12 h in 25% Saccharose in PBS bei 4°C wurden die Cochleae in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) eingebettet und bei -70°C aufbewahrt. Die Präparate wurden mit einer Leica CM 3000 Microtom-Cryostat parallel zum Modiolus in 10 µm dicke Schnitte sektioniert, auf Superfrost^{*}/Plus (Fisher) Objektträger aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Immunohistochemie an Cryo-Schnitten

Zur Lokalisation von Glu 2/3, NF-200, p75^{NGFR}, Synaptophysin-Proteinen und TrkB in den Cochleae erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-Immunhistologie. Dazu wurden die Cryo-Schnitte 30 min. bei RT getrocknet, mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 3 min permeabilisiert, 30 min mit 1% BSA in PBS geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in 0,5% BSA in PBS (Tab. 2.1 auf Seite 11) in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Cryo-Schnitte in PBS (3x10 min) gewaschen, in einer feuchten Kammer für 2 h in Raumtemperatur zur Detektion gebundener Antikörper mit entsprechenden Fluorescein-(FITS) bzw. Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern in 0,5% BSA in PBS inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift der Schnitte in PBS (3x10 min) wurden

2.2. METHODEN

Name		Firma	Verdünnung
Primärantikörper			
Anti-Gap43-AK	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-Glu2/3-AK	Maus		1:50
Anti-Glu4-AK	Kaninchen		1:50
Anti-Neurofilament 200 (Anti-NF-200-AK)	Kaninchen, polyklonal	Sigma	1:500
Anti-p75-AK	Maus, monoklonal (Klon 192)	Boehringer Mannheim	1:10
Anti-p75-AK	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:600
Anti-Synaptophysin-AK	Maus, monoklonal (Klon SVP-38)	Sigma	1:1000
Anti-TrkB-AK	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:400
Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen-Cy3		Dianova/Jackson	1:3000
Anti-Maus-Cy3		Dianova/Jackson	1:3000
Anti-Maus-FITC		Amersham	1:100

Tabelle 2.1: Beschreibung der in den immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzten Antikörpern

die Präparate mit Vectashield (Vector Laboratories) eingedeckelt. Die Färbung wurde mittels eines Olympus AX70 Fluoreszenzmikroskops analysiert und auf Kodak TMAX-400er schwarz/weiß Filmen (gepuscht auf 1600 ASA) fotografisch dokumentiert.

In Präabsorptionsexperimenten wurde die Spezifität der verwendeten Anti-Neurotrophin-Antikörper getestet. Dazu wurden diese Primärantikörper vor dem Auftragen der Cryo-Schnitte mit 100 ng/ml rhBDNF oder rhNT-3 für 3 h auf Eis präinkubiert.

2.2.4 Hirnstammaudiometrie (BERA)

Adulte Ratten (älter als 3 Monate) wurden durch eine i.m. Injektion von Ketamin/ Xylazin anästhesiert. Die Zusammensetzung der Ketamin/ Xylazin Injektionslösung war: Ketaminhydrochlorid $100 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Ketamin 50 Curamed, CuraMED), Xylazinhydrochlorid $15 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Rompun 290, Bayer) und Atropinsulfat $0,5 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Braun) in isotoner Natriumchlorid-Lösung (Delta- Pharma). Klick-Stimuli zunehmender Lautstärken wurden im Phasis II Tongenerator-Messsystem (Esaotebiomedica, Italien) in einer Bandbreite zwischen 30 Hz und 10 kHz generiert und in 5 dB SPL Schritten über einen Kopfhörer in das Ohr der Tiere geleitet. Nach einer Amplifizierung wurde das Signal von 500 Ableitungen gemittelt und auf den Bildschirm übertragen. Als Hörschwelle wurde die niedrigste Lautstärke definiert, bei der sich ein positives Signal ableiten ließ. Außerdem wurden die Latenzzeiten der Wellen I bis IV von 100 dB SPL bis zur Hörschwelle in 5 dB SPL Schritten protokolliert. Für die Messungen von Protektionseffekten wurden die Tiere anschließend 10 min einem Sinus-Ton von 90 dB SPL mit einer Frequenz von 10 kHz bzw. 3 kHz, monaural bzw. binaural exponiert. Nach 5 min wurde die Hörschwelle erneut bestimmt.

Zusätzlich wurden frequenzabhängige Hirnstimuli in abnehmender Lautstärke angefangen mit 95 dB SPL in 4 dB SPL Schritten und bei zunehmender Annäherung an die Hörschwelle in 1 dB SPL Schritten erzeugt. Um die richtige Lage des Frequenzerzeugers im Gehörgang zu erhalten, wurde sich einer Eichung durch ein Mikrofonsystem bedient. Es wurden die Frequenzen 4.000, 5.040, 6.350, 8.000, 10.079, 12.699, 16.000, 20.159, 25.398 und 32.000 Hz generiert. Nach einer Verstärkung wurde das Signal von 400 Ableitungen gemittelt und als Datentabelle zur weiteren Bearbeitung in Dateien abgespeichert.

2.2.5 Statistische Auswertung und grafische Bearbeitung

Statistische Auswertungen von den Hörschwellen und Latenzen wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) vorgenommen. Die grafische Bearbeitung erfolgte bei Bedarf mit dem Programm Gimp (graphical image manipulation program).

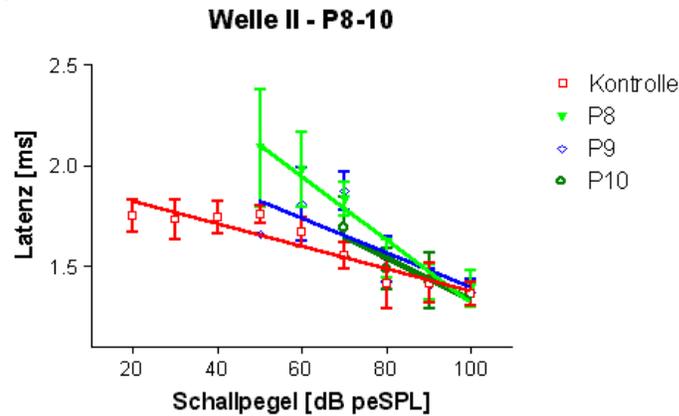


Abbildung 2.1: Eine Beispiel-Abbildung (Welle II, p8-10)

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Kontrolltiere bzw. Tiere, die nicht mit MMI behandelt worden sind

3.1.1 Morphologie des Cortischen Organs

Überblick über das ganze Organ

P75 — niedrig affiner Rezeptor des NGF

Für eine Einschätzung des Entwicklungsverlaufs der Neurotrophinrezeptorexpression wurden die Neurotrophinrezeptoren in Cochleaschnitten von Ratten zwischen pn3 bis pn7 immunhistochemisch lokalisiert.

Bei pn3 (Abb. 3.1 - Kontrolle) finden sich stark positive Signale am OSB und IGSB. Ein Signalnachweis ist am ISB nicht präsent. Die Pfeilerzellen sind positiv, jedoch befindet sich ein besonders starkes Signal im Apex. Lateral apikal der dritten OHC zeigt sich ein positives knopfförmiges Signal. Zum Letztgenannten verläuft ein Signal lateral apikal der dritten OHC vom dritten Schenkel des OSB in apikaler Richtung, die sich zum knopfförmigen Signal verdickt. Einen Tag

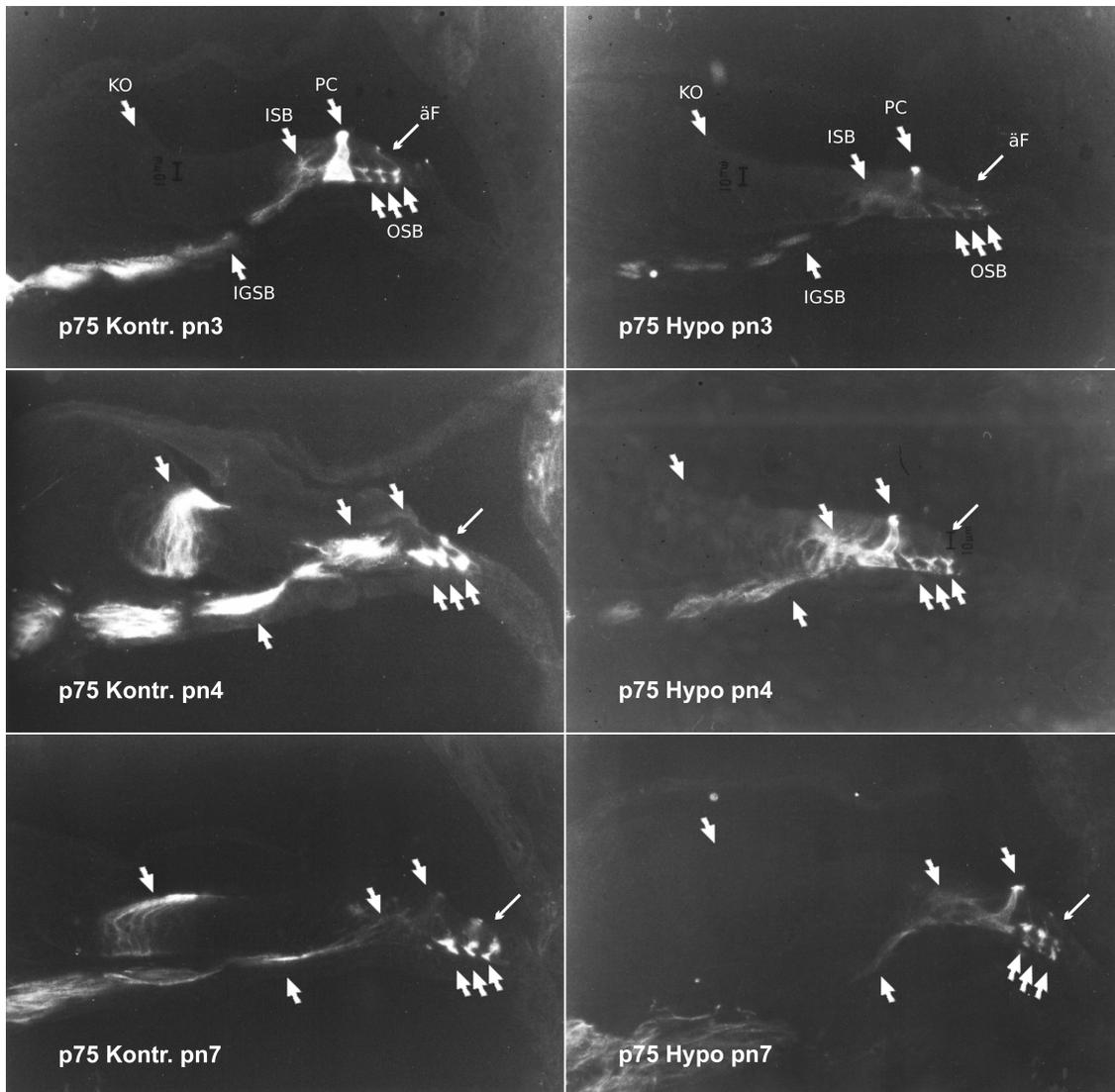


Abbildung 3.1: Färbung mit p75 — Linke Spalte: Kontrolle (pn3, pn4, pn7). Rechte Spalte: Hypothyreoid (pn3, pn4, pn7). Bei der Kontrolle ist an pn3 das IGSB, OSB, PC (Pfeilerzelle) und äF (Verlängerung des lateralen OSB entlang der lateralen Seite der lateralen OHC) positiv; an pn4 das IGSB, ISB, OSB, KO (Köllikersches Organ), äF und SV (Stria vascularis); an pn7 das IGSB, OSB, KO und äF. Beim Hypothyreoiden ist an pn3 und pn4 das IGSB, ISB, OSB und PC positiv, an pn3 jedoch schwächer; an pn7 nur die PC und äF

später in der Entwicklung zeigen sich bereits deutliche Unterschiede im Expressionsmuster (Abb. 3.1 - Kontrolle). Die Pfeilerzelle enthält keinen Hinweis mehr

3.1. KONTROLLE

auf ein p75-positives Signal. Dafür ist erkennbar, dass ein hochpositives Signal die axiale Seite des Köllikerschen Organs belegt. Das Intensitätsmaximum befindet sich an der apikalen Fläche und nimmt langsam in basaler Richtung ab. Das Signal setzt sich jedoch bis an die basale Grenze des Organs fort. Sowohl am inneren und äußeren Spiralbündel als auch am IGSB gibt es eine deutliche p75-Präsenz. Sogar die Faser mit der knopfförmigen Auftreibung an der lateralen Seite der äußersten OHC findet sich unverändert. Zusätzlich zeigen sich diffuse Signale an der cranialen Hälfte der Stria vascularis. Am äußeren Sulcus lässt sich kein p75 exprimieren. Die Signalgebung in der apikalen Windung an pn7 ist im Köllikerschen Organ ebenfalls sehr ausgeprägt. Sie kann vom apikalen, medialen Rand beginnend, zunächst caudo-medial, sich langsam auffächernd verlaufend verfolgt werden. Danach setzt sie sich ab etwa Hälfte der Höhe des Köllikerschen Organs senkrecht bis zur Basis desselben fort. Die senkrechte Komponente fächert sich dabei wie ein Schweif auf (Abb. 3.1 - Kontrolle). Ein p75-Signal der Fasern des ISB befindet sich erneut wie in pn3 unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Das OSB dagegen ist stark gefärbt. Man kann auch ein schwaches faserförmiges Signal lateral der dritten OHC ausmachen, welche dazwischen unterbrochen knopfförmig am apikalen Rand endet (siehe Pfeil in Abb. 3.1 - Kontrolle). Die Signalgebung am IGSB ist sehr stark ausgeprägt. Die Stria vascularis zeigt keinen Signalmuster mehr; so wie auch der äußere Sulcus an pn4.

3.1.2 Innervation

Trk B — Hochaffiner Rezeptor für BDNF

An pn3 zeigen sich positive Signale am OSB, ISB und dem IGSB (Abb. 3.2 - Kontrolle). Am sechsten Tag ist festzustellen, dass die Zellplasmen der äußeren und inneren Haarzellen homogen ebenfalls TrkB-positiv sind. Nur das Antwortverhalten der Fasern im IGSB lässt nach. Drei Tage später an pn9 erkennt man

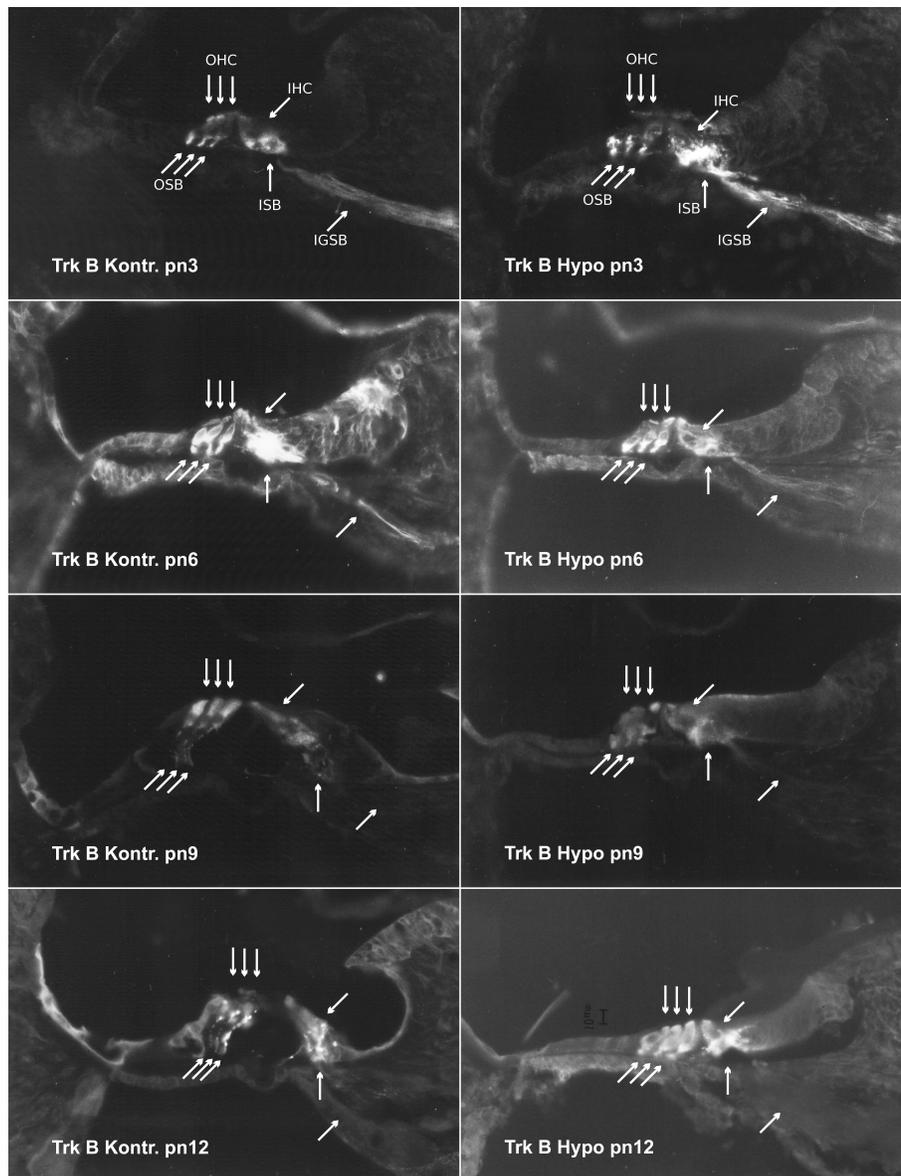


Abbildung 3.2: Färbung mit TrkB — Kontrolle und hypothyreoid an pn3, pn6, pn9 und pn12. Bei der Kontrolle ist an pn3 das IGSB, ISB und OSB positiv; an pn6 das IGSB, ISB, OSB, IHC und die OHC; an pn9 die IHC und OHC; an pn12 das ISB und OSB. Beim Hypothyreoiden ist an pn3 das IGSB, ISB und OSB positiv; an pn6 das ISB, OSB, IHC und die OHC; an pn9 und pn12 ist keine positive Antwort vorhanden.

ein ausgereiftes Cortisches Organ. Die OSB und ISB lassen sich im Vergleich

3.1. KONTROLLE

zu pn6 kaum mehr mit einem Signal belegen bzw. heben sich kaum mehr von der Umgebung ab. Am Antwortverhalten der Haarzellen hat sich nur geringfügig etwas verändert. Jedoch sind mittlerweile keine Fasern des IGSB mehr nachweisbar. Am pn12 können die inneren und äußeren Haarzellen ebenfalls nicht mehr mit einem positiven Signal belegt werden. Erstaunlicherweise zeigen die Fasern des OSB und ISB wieder ein immunreaktives Verhalten. Es zeigt sich jedoch im Vergleich zu sechs Tagen vorher eine wesentliche Änderung der Form und Intensität des ISB. Das Signal besitzt nicht mehr die hohe Intensität und große Fläche unmittelbar an der Basis der IHC. Es zeigt sich eine Verschiebung des Signalmaximums von unmittelbar an der Basis der IHC zu einer etwas zentripetalen und basaleren Richtung, auch wenn noch eine kelchähnliche Struktur caudal der Basis der IHC zu beobachten ist.

Glu 2/3 — Glutamat-Rezeptor Subtyp 2/3

Die Darstellung von afferenten Fasern in der Cochlea lässt sich durch Markierung der Glu 2/3 (Knipper et al., 1999) bewerkstelligen. Am dritten postnatalen Tag erhält man ein starkes breitbasiges Signal des ISB (Abb. 3.3 - Kontrolle). Das Signal erstreckt sich dabei auch an der lateralen Seite der IHC bis zu Hälfte der Höhe derselben. Dabei ist eine dünne Faser vorhanden, die sich bis an die apikale Spitze fortsetzt. Alle drei Anteile des OSB lassen sich mit einer weitaus geringeren Intensität bis zu den caudalen Grenzen der OHC verfolgen. Sie bilden jedoch im Gegensatz zur ISB keine Fasern aus, die an den jeweiligen Seiten der OHC in apikaler Richtung verlaufen. Der gesamte Verlauf des IGSB, d.h. hier vom Spiralganglion bis zur Basis des ISB, kann mit einem breiten und kräftigen Signal verfolgt werden. Bei den extraneuronalen Strukturen ist auffälliger Weise eine hohe Dichte der Glu 2/3-Rezeptoren im gesamten Limbus zu beobachten. Bis zum pn7 hat sich das Signalmuster im gesamten Cortischen Organ wesent-

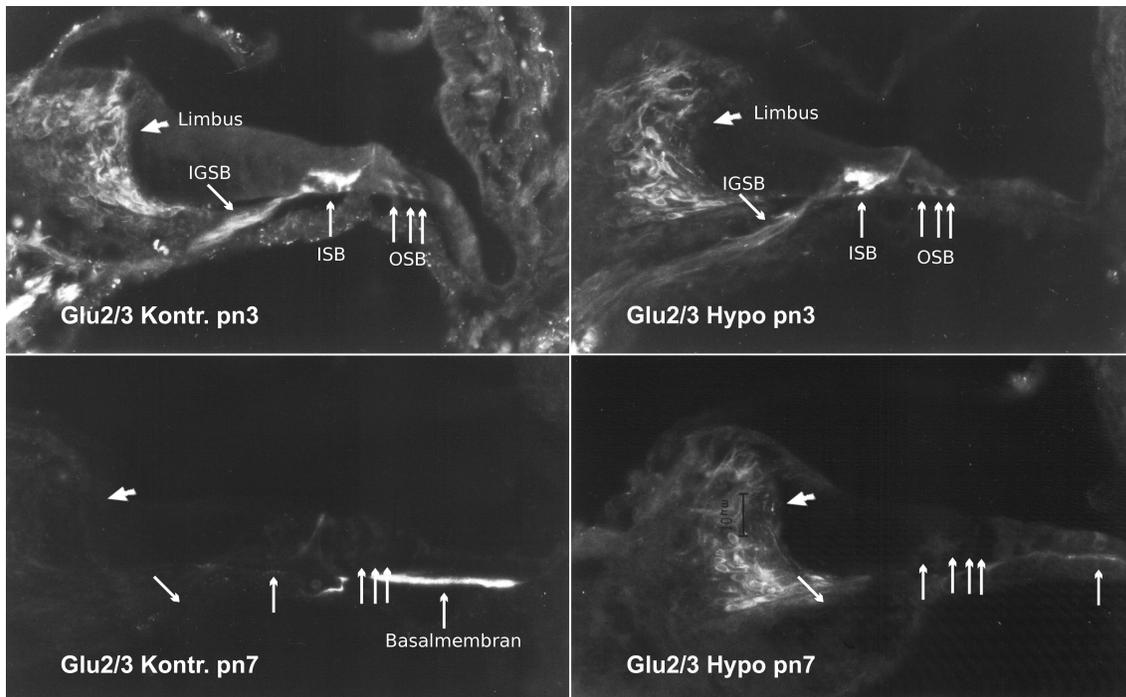


Abbildung 3.3: Färbung mit Glu 2/3 — Kontrolle und hypothyreoid an pn3 und pn7. Bei der Kontrolle ist das IGSB, ISB, OSB, Limbus und die Faser lateral der IHC positiv; an pn7 die Faser lateral der IHC und am Basalmembran. Beim Hypothyreoiden ist das IGSB, ISB, OSB, Limbus und die Faser lateral der IHC positiv; an pn7 nur der Limbus.

lich geändert. Besonders hervorzuheben ist, dass sich der ISB, die OSB und IGSB nicht darstellen lassen. Nur die Faser, die ab der halben Höhe der lateralen Seite der IHC zu erkennen war, kann noch gesehen werden. An der apikalen Spitze erfährt die Faser eine kleine Verdickung. Besonders auffällig erscheinen zwei hochpositive Signale. Eines davon verläuft knapp von unterhalb des lateralen Basisrandes der Pfeilerzelle bis zur caudalsten Stelle des darunter sitzenden Gefäßes. Das andere hochpositive Signal findet man entlang der Basalmembran, das sich vom mittleren Anteil des OSB bis zur lateralen Grenze des äußeren Sulcus erstreckt.

3.1. KONTROLLE

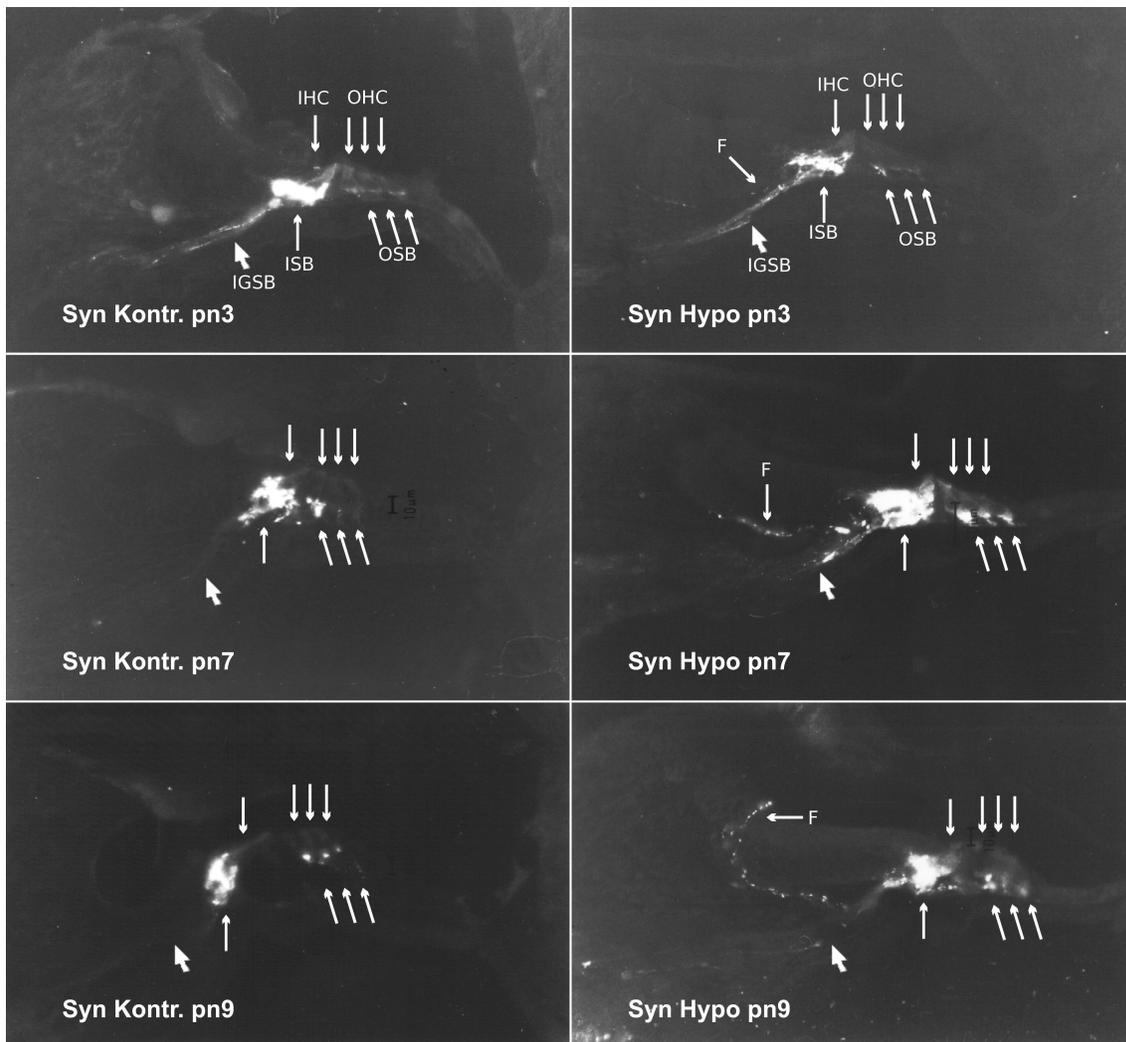


Abbildung 3.4: Färbung mit Synaptophysin — Kontrolle und hypothyreoid an pn3, pn7 und pn9. Bei der Kontrolle ist das IGSB und die Basis der IHC und OHC positiv; an pn7 und pn9 zeigt sich die IHC, das OSB und die Basis der OHC positiv, das Signal an der IHC verändert. Beim Hypothyreoiden ist das IGSB und die Basis der IHC schwächer positiv, jedoch genauso positiv das OSB mit der Basis der OHC; an pn7 und pn9 ist das IGSB, die Basis der IHC und OHC, das OSB positiv. Außerdem findet sich eine beginnende Faser ab dem ISB unterhalb des Köllikerschen Organs, und verlängert sich in pn7 und p9 weiter bis zum medioapikalen Stelle des Köllikerschen Organs.

3.1.3 Synaptogenese

Um den unterschiedlichen Verlauf der Synapsenbildung in der Cochlea von Kontrollen und hypothyreoiden Tieren festzustellen, ist die immunhistochemische Markierung des Synaptophysin gewählt worden.

Bei der Kontrolle an pn3 erkennt man an der Basis der IHC ein stark positives Signal, das geringfügig an der lateralen Seite ausläuft (Abb. 3.4 - Kontrolle). Ebenfalls positiv, jedoch nicht in derselben Intensität wie Erstgenanntes, sind sowohl die Basis der äußeren Haarzellen (sehr schwach) als auch einige Fasern des IGSB.

An pn7 verändert sich das Bild dahingehend, dass sich das Signal am IHC von der Löffelform in einen Becherform umgewandelt hat. Ferner findet sich ein deutliches Signal am modiularen Anteil des OSB und unterhalb der entsprechenden OHC.

An pn9 erkennt man am ausgereiften cortischen Organ im Vergleich zu pn7 erneut eine Veränderung der Becherform. Der Schwerpunkt hat sich weiter nach modiolar verlagert (Abb. 3.4 - Kontrolle). Weiterhin sind intensiv gefärbte Auftreibungen an der Basis der äußeren Haarzellen zu beobachten. Im Vergleich zu pn7 ist die Basis jeder OHC gefärbt. Es ist zu bemerken, dass die Färbung der OSB geringer ausgeprägt ist.

3.2 Kompletter Hypothyreodismus

3.2.1 Morphologie

P75 — niedrig affiner Rezeptor des NGF

Es ist schon seit längerem bekannt (Uziel et al., 1981, 1983a,b), dass sich die Morphologie der Cochlea bei postnatal komplett hypothyreoid gesetzten Tieren

3.2. KOMPLETTER HYPOTHYREODISMUS

nicht weiterentwickelt. Nachfolgend wird speziell der Entwicklungsverlauf des p75^{NGFR}-Signalmusters bei postnatal hypothyroiden Ratten dargestellt.

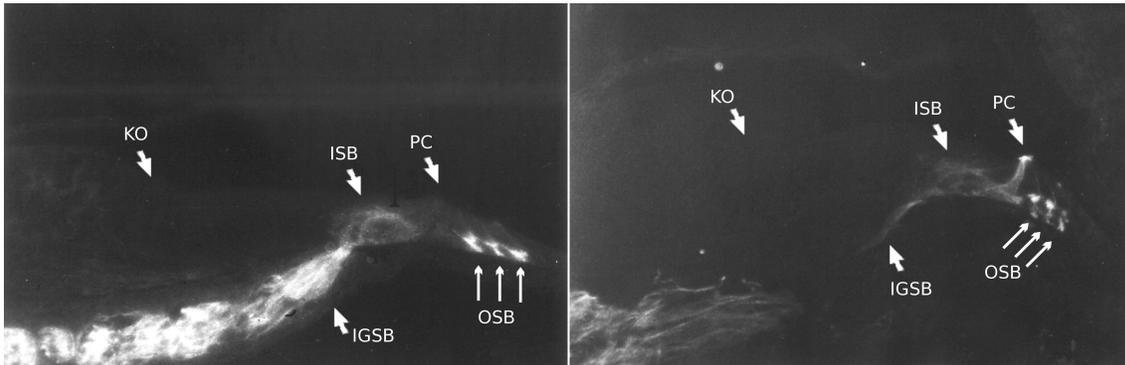


Abbildung 3.5: Schnitte bei hypothyroiden Tieren: p75-immunhistochemische Färbung an pn07. Links: midbasale Windung (Windung 2). Positiv sind das IGSB, ISB und OSB. Rechts: apikale Windung (Windung 4). Positiv sind die Pfeilerzelle und Faser an der lateralen Seite der lateralen OHC (ohne Pfeil, s. auch Abb. 3.1 - Hypo).

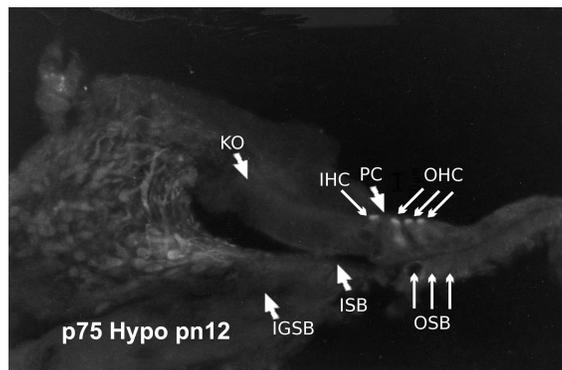


Abbildung 3.6: Färbung mit p75 — Hypothyroid an pn12. Positiv ist die IHC und OHC

An pn3 (Abb. 3.1 - Hypo) zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle, dass der OSB und IGSB ein schwaches Signal aussenden. Insgesamt gesehen ist das Signal deutlich schwächer als in der Kontrolle. Am gravierendsten ist der nahezu komplette Signalverlust in der Pfeilerzelle erkennbar. Nur am Apex findet sich eine intensi-

ve Signalgebung. Die Struktur, die faserförmig an der lateralen OHC verläuft und apikal knopfförmig endet, lässt sich nicht nachweisen.

Einen Tag später, an pn4, findet sich eine gesteigerte Signalmusterung in der Pfeilerzelle, wobei wie an pn3 in der Kontrolle auch das Intensitätsmaximum am apikalsten Punkt zu finden ist. Im Unterschied zur Kontrolle persistiert jedoch das Signal bzw. tritt zeitlich verzögert auf. Dafür fällt als weiterer Unterschied sofort das Fehlen der p75-Expression im Köllikerschen Organ auf. Wesentlich intensiver als am Vortag, jedoch nicht in der Größenordnung wie die Kontrolle, stellen sich das ISB, OSB und IGSB dar. Die Form des Signals am ISB stellt sich aber nicht in der Gestalt eines Bechers unter der IHC wie im Kontrollschnitt dar. Sie ist eher diffus anzusehen. Ein Signal findet sich am äußeren Sulcus wie am Pendant der Kontrolle ebenfalls nicht. Dazu gesellt sich das Fehlen des Signals an der Stria vascularis.

In der apikalen Windung an pn7 fällt immer noch auf, dass das Signal am Köllikerschen Organ weiterhin inexistent ist. Die Expression an der Pfeilerzelle im Gegensatz zur Kontrolle ist weiterhin mit einem Signal belegt. Sie hat jedoch gegenüber pn4 an Intensität eingebüßt. Außerdem verlaufen dünne Fasern von den zwei medialen OSB an der lateralen Seite der OHC in apikaler Richtung. Die an pn3 fehlende knopfförmige Struktur lässt sich zwar nachweisen, ist aber weniger intensiv gefärbt als in der Kontrolle. Eine Expression an der Stria vascularis lässt sich auch an pn7 nicht lokalisieren. Auch der Bereich einschließlich des äußeren Sulcus entzieht sich einer positiven Immunantwort.

In der midbasalen Windung (Abb. 3.5) jedoch ist die Entwicklung des p75-Musters weiter fortgeschritten. Die Signalexpression in der Pfeilerzelle lässt sich im Gegensatz zur Windung 4 nicht mehr nachweisen. Gleichzeitig aber tritt eine Immunantwort im Köllikerschen Organ, die wie an pn4 in der Kontrolle vorhanden war, nicht auf. Das Muster um den ISB, der OSB und IGSB bleibt im Wesentlichen gleich. Nur am OSB treten die Fasern deutlicher hervor. Die oben beschrie-

3.2. KOMPLETTER HYPOTHYREODISMUS

benen Fasern des OSB, die lateral der zwei medialen OHC geringfügig cranial ziehen, zeigen sich nicht auf dem Schnitt. Auch in diesem Schnitt existiert eine p75-positive Antwort, die sich erwarten ließe, in der Stria vascularis nicht. Die Erwartung resultiert, trotz der Latenz, durch den Vergleich mit den Kontrollschnitten und dem dortigen Auftreten des Signals in der Stria vascularis kurz nach bzw. überlappend mit dem Verschwinden des Signals in der Pfeilerzelle.

An pn12 (Abb. 3.6) sind nur Signale unmittelbar am Apex der IHC und der OHC vorhanden. Eine Immunantwort findet sich an der Pfeilerzelle nicht mehr; auch nicht am ISB, OSB und IGSB. Weiterhin ist kein Expressionsmuster am Kölliker-schen Organ vorhanden.

3.2.2 Innervation

Trk B — Hochaffiner Rezeptor für BDNF

Um das Innervationsmuster der Cochleae festsetzen zu können, wurde die TrkB mittels immunhistochemischer Färbung lokalisiert. Es konnten folgende Unterschiede herausgearbeitet werden:

An Tag drei zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied wie man an der starken Signalgebung an den OSB und ISB sowie IGSB erkennen kann (Abb. 3.2 - Hypo). Zum pn6 entwickeln sich die Signale derart, dass das Zellplasma der OHC und IHC positiv werden. In den Zellplasmen gibt es keinen Antwortgradienten. Die basalen Anteile sind genauso signalgebend wie die apikalen Anteile. Die Fasern des IGSB verlieren jedoch die Eigenschaft an diesem Tag. Am Tag 9 erkennt man außer der morphologischen Unterschiede auch eine Signaldifferenz. Die OHC und IHC lassen keinerlei TrkB-Expression erkennen. Wie auch bei der Kontrolle lässt sich hier die IGSB, ISB und OSB nicht mit einer Signalantwort belegen. Drei Tage später an pn12 hat sich am Antwortverhalten keine Änderung ergeben. Auch trat bis zu diesem Zeitpunkt kein positives Signal in den äußeren

Haarzellen auf. Es hätte durchaus sein können, dass durch den Hypothyroidismus das Signal nur verspätet auftritt. Im Gegensatz zur Kontrolle, wo man eine immunpositive Reaktion in den Spiralbündeln beobachten kann, findet man in den Spiralbündeln des hypothyroiden Tieres keine Reaktion.

Glu 2/3 — Glutamat-Rezeptor Subtyp 2/3

Im Präparat der Cochlea im hypothyroiden Stadium findet sich im Vergleich zur Cochlea der Kontrollgruppe kein wesentlicher Unterschied. Der ISB ist sehr kräftig an der Basis der IHC ausgeprägt. Nur eine deutliche Verlängerung an die laterale Seite der IHC kann nicht genau nachgewiesen werden. Die Faser, die bei der Kontrolle an der lateralen Seite der IHC bis zur apikalen Spitze verlief, strebt zwar nicht nahtlos vom ISB zum Apex der IHC, aber ein schwaches Signal ist an der lateralen Seite der IHC vorhanden. Die positiven Teile des OSB bilden an der Basis der OHC kelchförmige Erweiterungen. Ebenso schwach ausgeprägt ist die Nachweisbarkeit des IGSB. Nur wenige Fasern heben sich eindeutig vom Hintergrund hervor.

Das Signalmuster der hypothyreoiden Cochlea am postnatalen Tag 7 unterscheidet sich erheblich von pn3. Ein Unterschied im selben Grade ist auch bei der Kontrolle festzustellen. Die Nachweisbarkeit der ISB, OSB, IGSB, aber auch der lateral der IHC verlaufenden Faser ist nicht mehr vorhanden. Entlang der Basalmembran sind zwar positive Signale lokalisiert, aber eindeutig nicht so ausgeprägt wie in der Kontrolle. Ein Hauptaugenmerk im Vergleich ist die noch deutliche positive Signalverteilung im Limbus, die sich im Vergleich zu pn3 kaum verändert hat.

Fünf Tage später (pn12, Abb. 3.7) tritt erneut das OSB vom Hintergrund hervor —die IHC entzieht sich dieser Eigenschaft— mit ebenfalls kelchförmigen Auftreibungen an der Basis der OHC. Sonst als einzig signalpositive Struktur erkennt

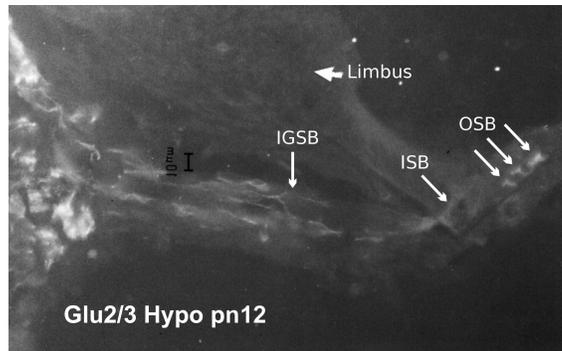


Abbildung 3.7: Färbung mit Glu 2/3 — Hypothyreoid an pn12. Positiv ist das IGSB und OSB

man distinkte Fasern des IGSB.

3.2.3 Synaptogenese

In diesem Abschnitt wird die Synaptophysinverteilung bei den hypothyroiden Tieren im Vergleich zu den Kontrollen behandelt.

An Tag 3 zeigt die Signalverteilung am IHC/ISB eine geringere Intensität als der Kontrollschnitt, wobei die Form unverändert geblieben ist. Die Expression an der Basis der OHC und am IGSB ist dieselbe geblieben, jedoch lassen sich Signale ebenfalls an den OSBs erkennen. Zu bemerken ist eine neue erkennbare faserförmige Struktur an der Basis des Köllikerschen Organs (Abb. 3.4 - Hypo).

Bis zum Tag 7 hat sich die Signalverteilung am IHC/ISB stark zum Positiven entwickelt. Man könnte es auch als Signalüberschuss bezeichnen, wobei die Struktur der IHC von den benachbarten Zellen kaum mehr abgrenzbar ist. Ebenfalls sind das OSB und die Basis der OHC intensiv gefärbt. Im Vergleich zur Kontrolle weist die Basis aller OHC ein positives Signal auf. Fasern des IGSB haben bis nur noch in unmittelbarer Nähe des ISB positive Signale aufzuzeigen. Die Signalgebung an der Basis des Köllikerschen Organs (KÖO) hat sich intensiviert.

Zwischen Tag 7 und Tag 9 sind keine großen Unterschiede bemerkbar. Die po-

sitiven Signale an IHC/ISB, OSB und OHC haben sich geringfügig vermindert, wobei die apikale Hälfte der IHC nicht gefärbt wurde. Es ist zu bemerken, dass im Vergleich zur Kontrolle noch eine extrem geringe Färbung des IGSB auftritt. Auch die Kelchform des ISB hat sich nicht zu einer deutlich abgrenzbaren Form entwickelt. Man erkennt auf jeden Fall, dass die Becherform wie in der Kontrolle hier nicht anzutreffen ist. Die Faser an der Basis des KöO hat sich entlang seiner medialen Grenze bis zu seiner apikalsten Stelle verlängert.

3.3 Auf peri- und postnatale Zeit begrenzter Hypothyreodismus

3.3.1 Morphologie

Bisher wurden Präparate von Tieren untersucht, die bis zu dem genannten Tag hypothyroid gesetzt waren, gleich dekapitiert und zur Anfertigung von Kryoschnitten präpariert wurden. Im Folgenden sind dagegen Cochleaschnitte von Ratten verwendet worden, die vorher unmittelbar postnatal in der kritischen Entwicklungsphase des Innenohrs unterschiedlich lang in hypothyroide Stoffwechsellage versetzt worden sind. Anschließend wurden diese einem euthyreoten Metabolismus bis zur Präparation im adulten Alter überlassen.

Die immunhistochemische Lokalisation von p75 im Cortischen Organ und IGSB zeigt einen Expressionzustand im adulten Kontrollpräparat, wo das ISB, OSB und IGSB ein positives Signal aufweist (Abb. 3.8 - Kontrolle). Ebenfalls sind am Limbus positive Zellen erkennbar. Überraschenderweise lassen sich in den Cochleae, die mit MMI bis pn8, pn10 und pn12 behandelt worden sind, keine Unterschiede ausmachen. Dies gilt sowohl in der Lokalisation als auch in der Form der Signale.

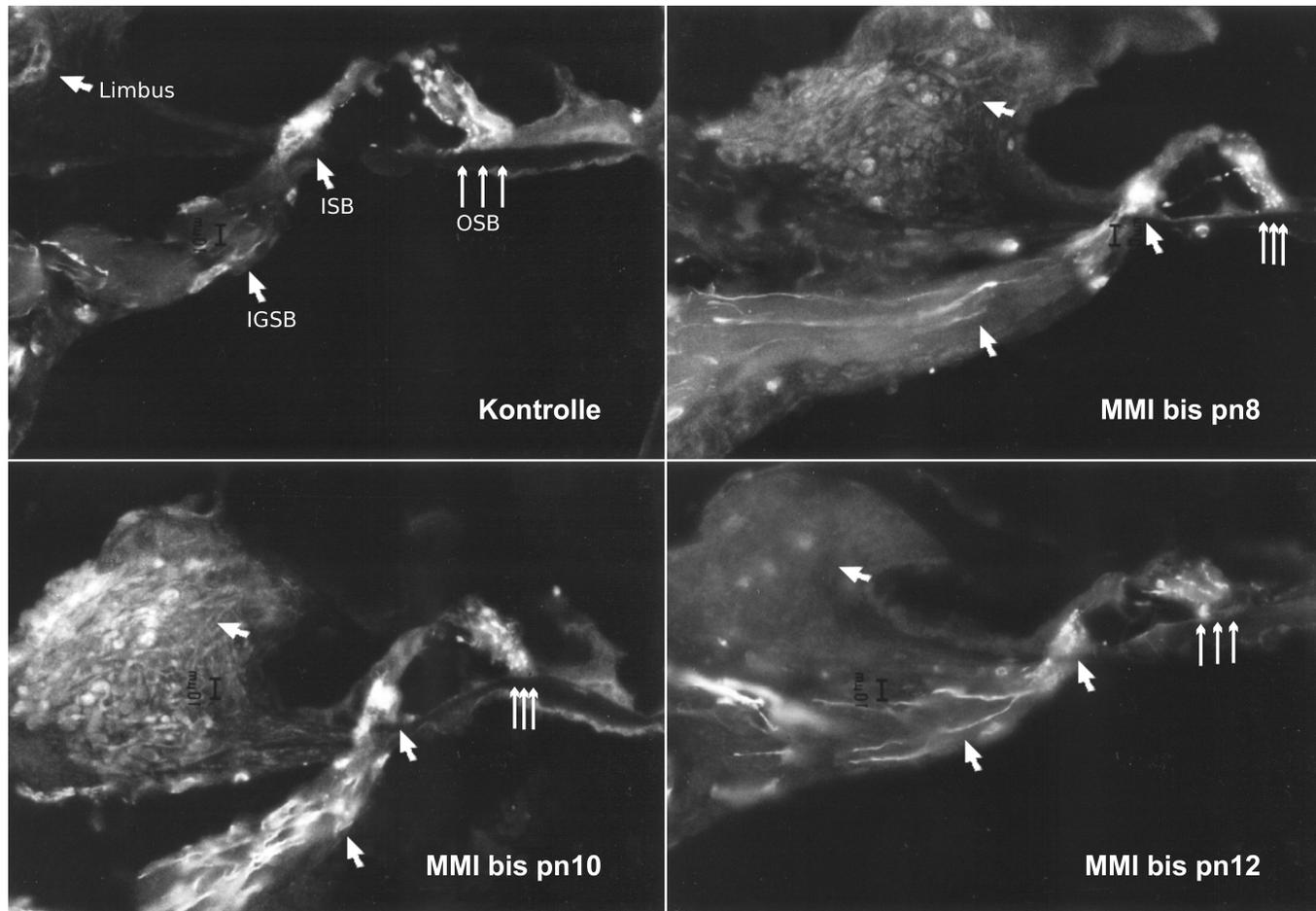


Abbildung 3.8: Färbung mit p75 — Kontrolle, MMI bis pn8, MMI bis pn10 und MMI bis pn12. Die folgenden Strukturen sind in allen Teilbildern positiv: IGSB, ISB, OSB und der Limbus

3.3.2 Innervation

Trk B

Im Vergleich zu den postnatalen Cochleae lässt sich in der adulten Cochlea kein Trk B lokalisieren. Genauso verhält es sich bei den intervallweise mit MMI behandelten Tieren. Es sind keine Signale nachweisbar, die von der Kontrollcochlea abweichen (Abb. 3.9).

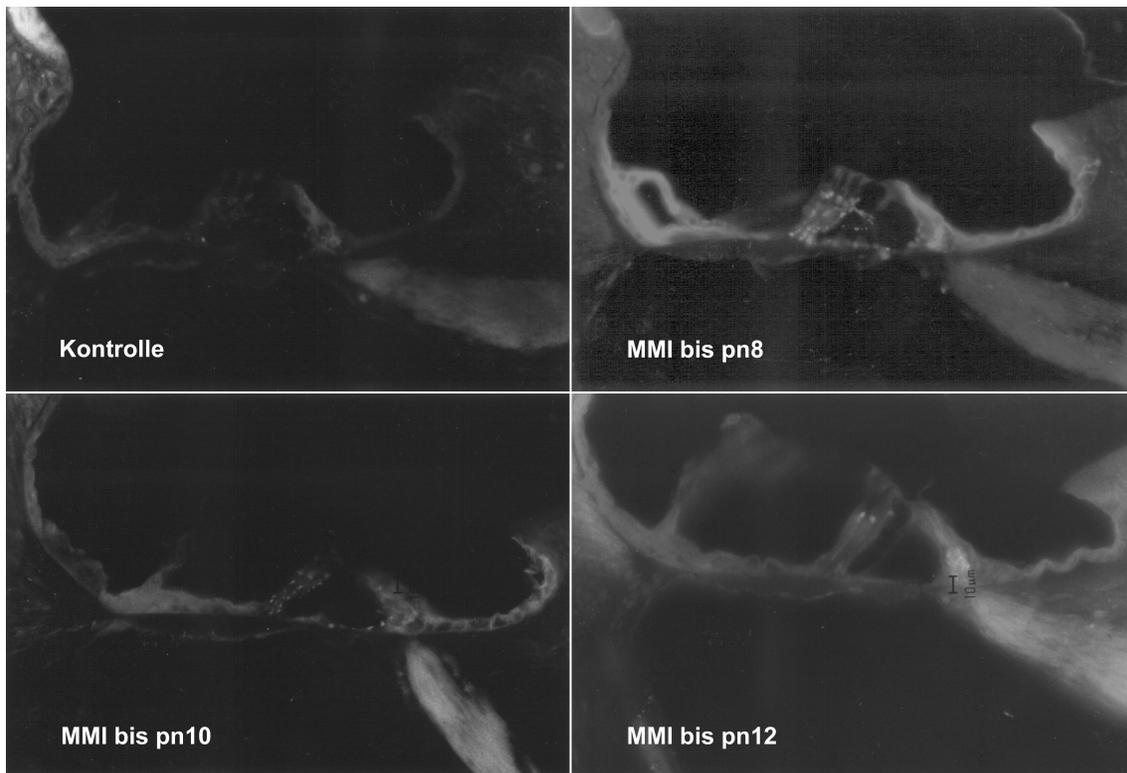


Abbildung 3.9: Färbung mit TrkB — Kontrolle, MMI bis p8, MMI bis p10 und MMI bis p12. Alle Teilbilder haben keinen positiven Signal

Neurofilament 200-Nachweis

Um das Expressionsmuster der Afferenzen im Cortischen Organ nachzuweisen, wurde die Färbung des Neurofilaments 200 (NF200) zu Hilfe genommen (Ber-

3.3. ZEITLICH BEGRENZTER HYPOTHYREODISMUS

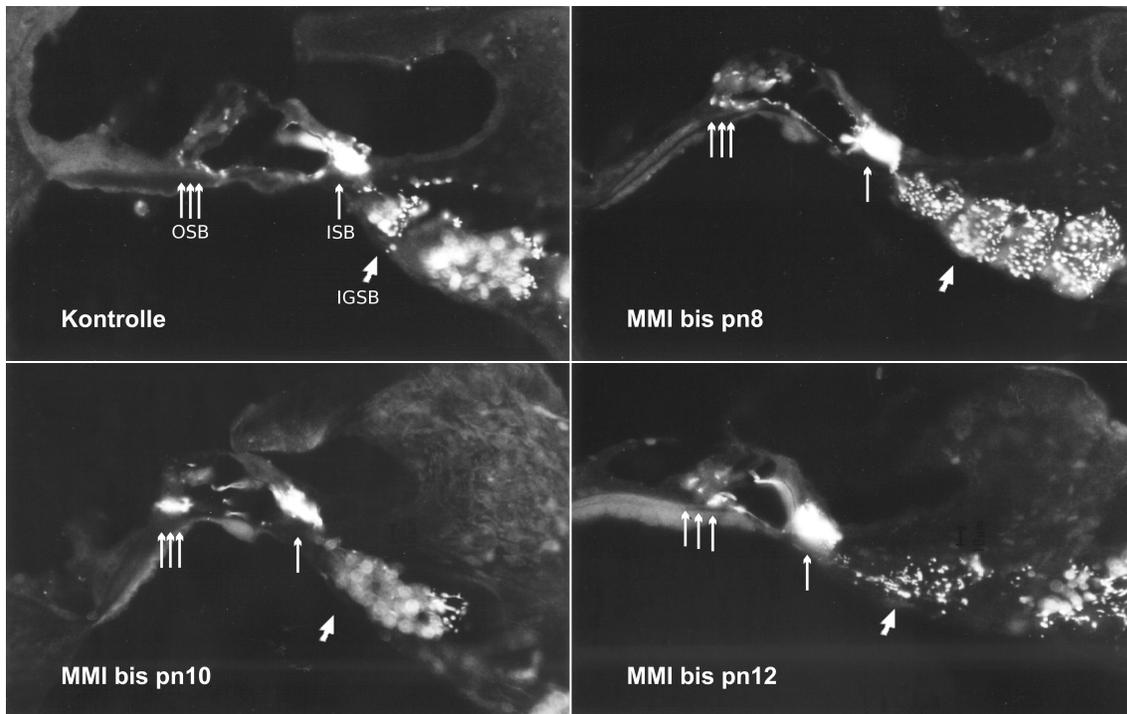


Abbildung 3.10: Färbung mit NF200 — Kontrolle, MMI bis p8, MMI bis p10 und MMI bis p12. Bei der Kontrolle ist das IGSB, ISB und OSB positiv. Bei den mit MMI behandelten sind das IGSB und ISB positiv, das OSB sogar mehr; außerdem findet sich eine positive Faser im Cortischen Tunnel.

glund und Ryugo, 1986; Knipper et al., 1997). Bei der Kontrolle erhält man wie erwartet ein sehr starkes positives Signal am ISB und IGSB. Das Signalmuster am OSB ist deutlich geringer ausgeprägt. Wohingegen die bis pn8, pn10 und pn12 mit MMI behandelten Tiere ein intensiveres Expressionsmuster am OSB zeigen. Zusätzlich erkennt man eine positiv gefärbte Faser, die vom ISB durch den Cortischen Tunnel zur medialen OHC zieht (Abb. 3.10).

Synaptophysin als Marker für die Efferenzen

Die Markierung der Efferenzen im adulten Alter wurde mittels Synaptophysin erreicht (Knipper et al., 1995, 1997; Wiechers et al., 1999). In der adulten Cochlea

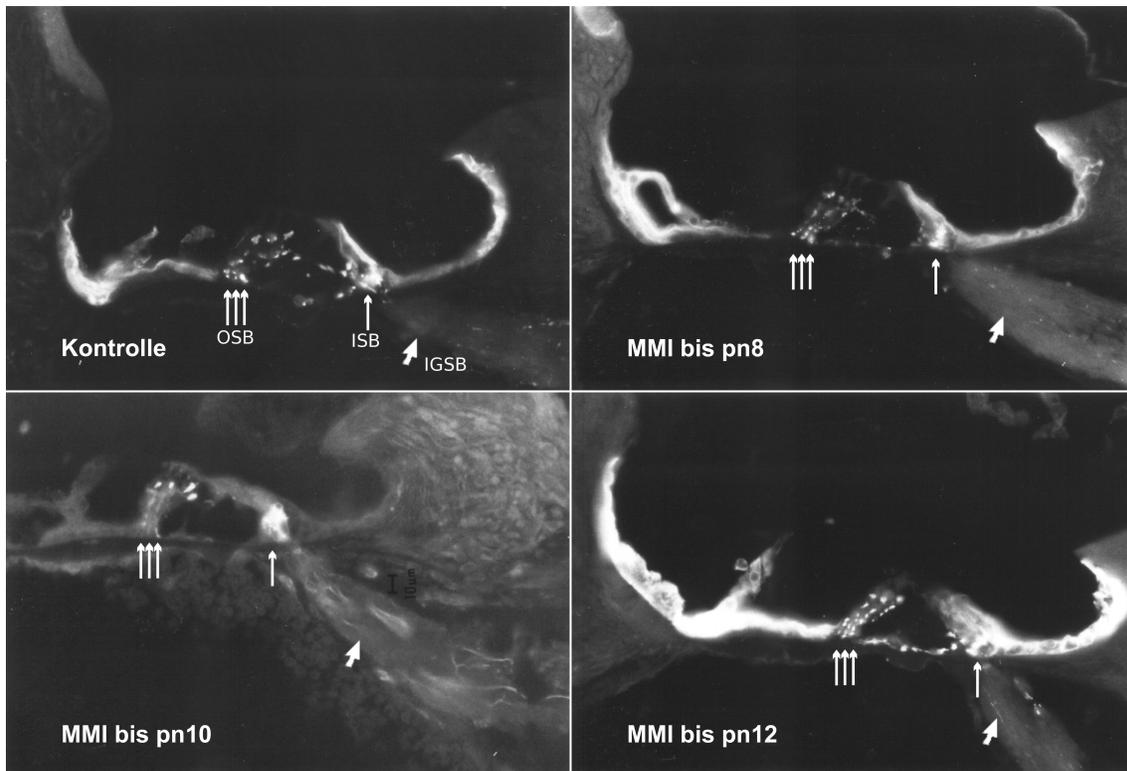


Abbildung 3.11: Färbung mit Syn — Kontrolle, MMI bis p8, MMI bis p10 und MMI bis p12. Bei allen Teilbildern sind das IGSB und OSB positiv. Das ISB ist auch bei allen positiv, aber bei MMI bis p8 und p10 ist die Form verändert.

der Kontrolle zeichnen sich stark positive Signale am ISB und OSB ab. Das Signal am ISB stellt sich am medialen Rand der IHC streifenförmig bis an ihren Apex dar. Vereinzelt tritt Synaptophysin in Fasern des IGSB auf. An nichtneuralen Strukturen sind der Innere und Äußere Sulcus mit einem positiven Signal versehen. Im Vergleich zur Kontrolle unterscheidet sich das Signalmuster der bis pn8 mit MMI behandelte Cochlea nicht. Das Muster der Synaptophysinexpression beim bis pn10 mit MMI behandelten Cochleae zeigt an dem ISB ein positives Signal ohne den medialseitigen bis an den Apex reichenden Streifen. Die an dem OSB positiven Signale zeigen wie auch in der Kontrolle unmittelbar an den OHC wulstige Auftreibungen (Abb. 3.11). Am Expressionsmuster des IGSB ist im Ver-

3.3. ZEITLICH BEGRENZTER HYPOTHYREODISMUS

gleich zur Kontrolle kein Unterschied vorhanden. Bei bis pn12 behandelten Tieren ergeben sich bis auf das fehlende medialsseitige Signal an den IHC keine Abweichungen vom Expressionsmuster der Kontrolle.

3.3.3 Funktion

Hörschwellenmessungen an adulten Tieren mittels Klick-BERA

Um die Hörfunktion der postnatal hypothyroid gesetzten Tiere zu untersuchen, wurde die Methode der Hirnstammaudiometrie mittels Klicklauten durchgeführt (Klick-BERA). Dabei werden durch akustische Reize Zentren der Hörbahn stimuliert. Bei der Stimulation entstehen elektrische Potentiale, die mit Elektroden am Schädel abgeleitet werden können. Bei der Ratte entstehen vier charakteristische Wellen. Die erste entsteht durch die Stimulation des achten Hirnnerven, die zweite an den Nuclei cochleares, die dritte an der oberen Olive und die vierte am Colliculus inferior (Jewett und Romano, 1972). Die Laufzeiten der Wellen nennt man (Absolut-)Latenzen und die Zeit zwischen den Wellen Interpeaklatenzen.

Beruhend auf die Messung der Interpeaklatenzen bei der Hirnstammaudiometrie, wird die Reifung der zentralen auditorischen Prozesse bei Nagetieren am Ende des dritten Lebensmonats beendet (Moore, 1985). Um Unsicherheiten bei der BERA bezüglich der verzögerten zentralnervöse Reifung durch die postnatale Hypothyreose zu vermeiden, wurden die Messungen ausschließlich bei erwachsenen Ratten über 3 Lebensmonaten durchgeführt, die in den postnatalen Tagen hypothyreot gehalten wurden.

Die BERA-Untersuchung zeigt eine äußerst prägnante Verlaufsform der Hörschwellen (Abb. 3.12). Zunächst findet man keine besondere Hörschwellenverschiebung bei den bis pn2 behandelten Tieren. Mit zunehmender Verlängerung der postnatalen MMI-Einnahme der Tiere erkennt man eine um so schwerwiegendere Störung der Hörfunktion resp. Erhöhung der Hörschwelle. Dabei ist zu beach-

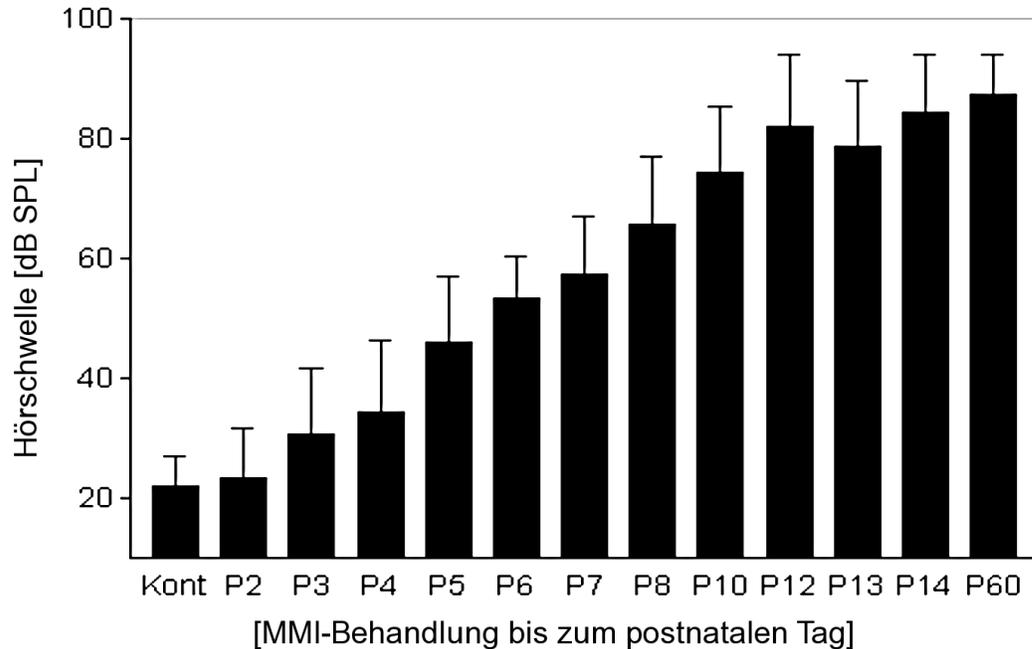


Abbildung 3.12: Durch Klick-BERA erhaltene Hörschwellenkurven von adulten Kontrollen und Tieren, die postnatal bis pn2, pn3, pn4, pn5, pn6, pn7, pn8, pn10, pn12, pn13, pn14 und pn60 mit MMI behandelt worden sind. Es zeigt sich eine zunehmende Verschlechterung der Hörschwelle, je länger die Behandlung mit MMI durchgeführt wurde. Ab pn12 verändert sich die Schwelle nicht mehr wesentlich.

ten, dass keine sprunghaften Veränderungen der Hörschwelle mit zunehmender Thyreoidhormonsynthesestarthemmung mittels MMI vorhanden ist. Vielmehr nimmt die Schwere der Hörschwellenerhöhung mit zunehmend längerer MMI-Gabe bis pn5/6 in exponentieller Art zu. Dies geschieht bis etwa der MMI-Gabe. Anschließend flacht die Kurve der Schwellenerhöhung in der Art ab, dass sich die Hörschwelle von Tag zu Tag der längeren Synthesestarthemmung der Schilddrüsenhormone langsamer erhöht. Bei den Tieren, die MMI bis pn12 erhalten haben, ist die Hörschwelle maximal an Taubheit grenzend erhöht. Jede weitere postnatale MMI-Gabe bis pn60 erbringt keine signifikante Schwellenerhöhung.

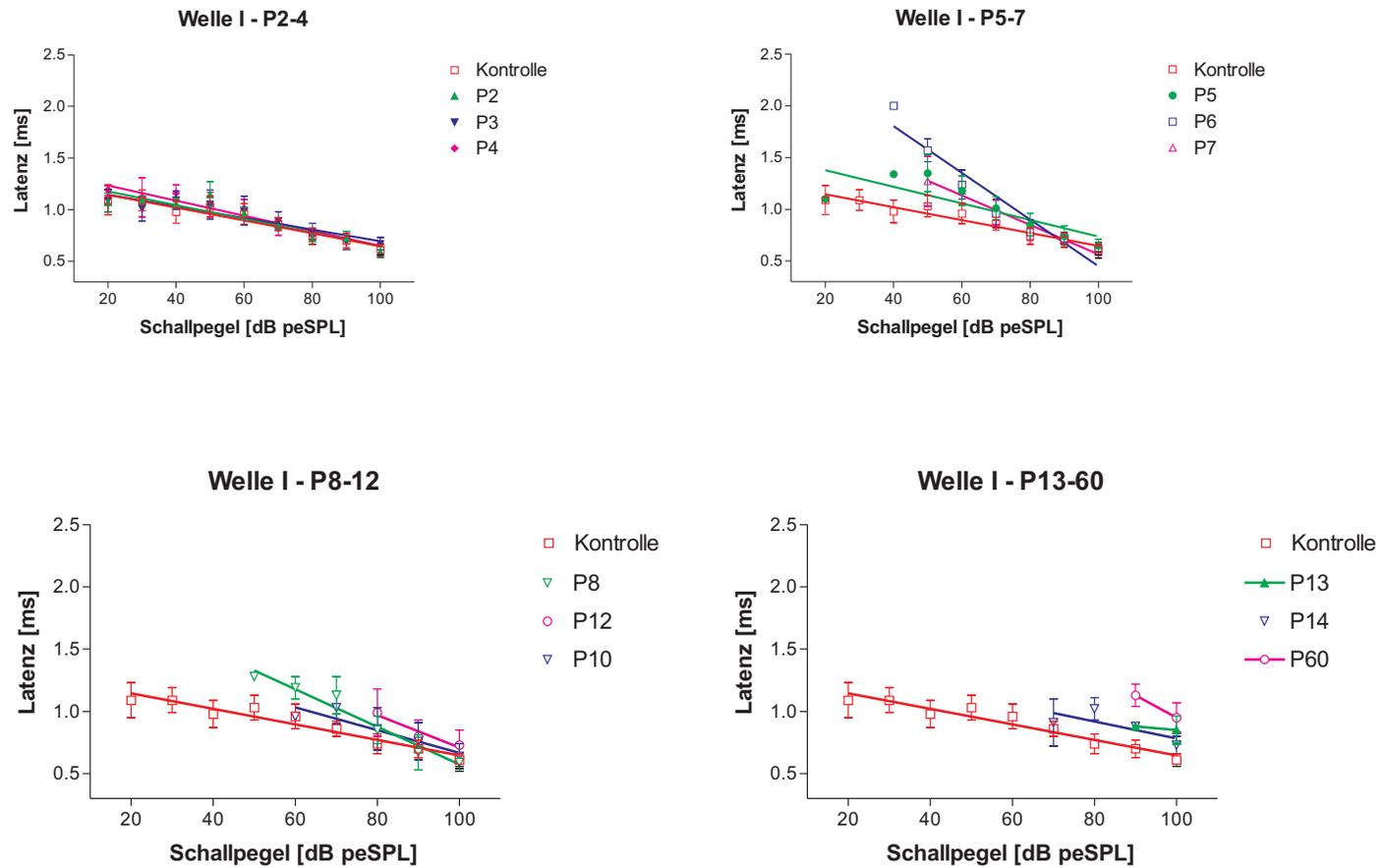


Abbildung 3.13: BERA, Welle I : Latenzen; Kontrolle und MMI bis pn2-60. Bis zu einer Behandlung bis pn4 findet sich kein Unterschied zur Kontrolle. Ab MMI bis pn5 zeigt sich eine zunehmende Verlängerung der Latenzen bei niedrigeren Schalldruckpegeln. Bei MMI bis pn60 ist die Latenz bei allen Schalldruckpegeln verlängert.

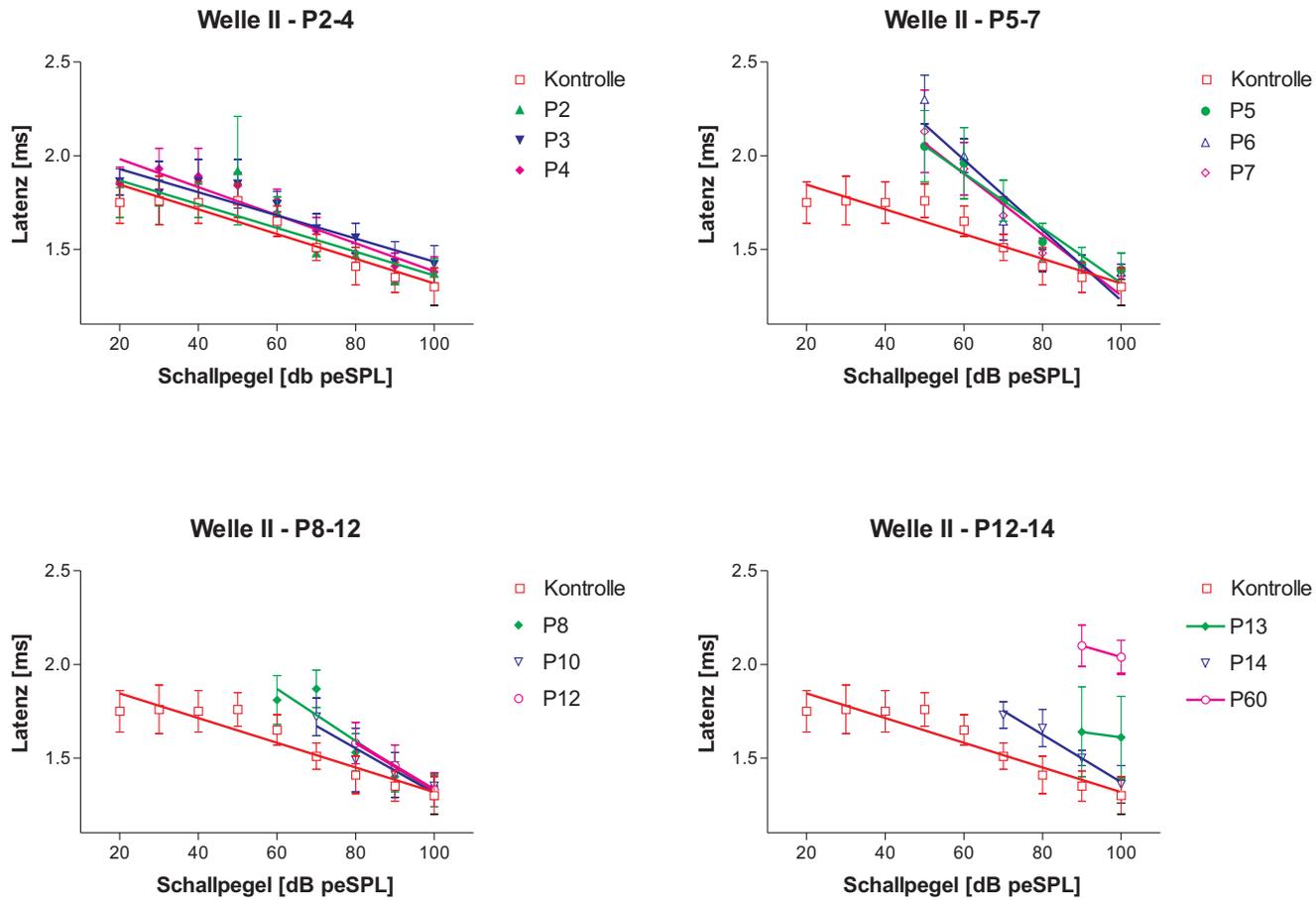


Abbildung 3.14: BERA, Welle II : Latenzen; Kontrolle und MMI bis pn2-60. Bis zu einer Behandlung bis pn4 findet sich kein Unterschied zur Kontrolle. Ab MMI bis pn5 zeigt sich eine zunehmende Verlängerung der Latenzen bei niedrigeren Schalldruckpegeln. Bei MMI bis pn60 ist die Latenz bei allen Schalldruckpegeln verlängert.

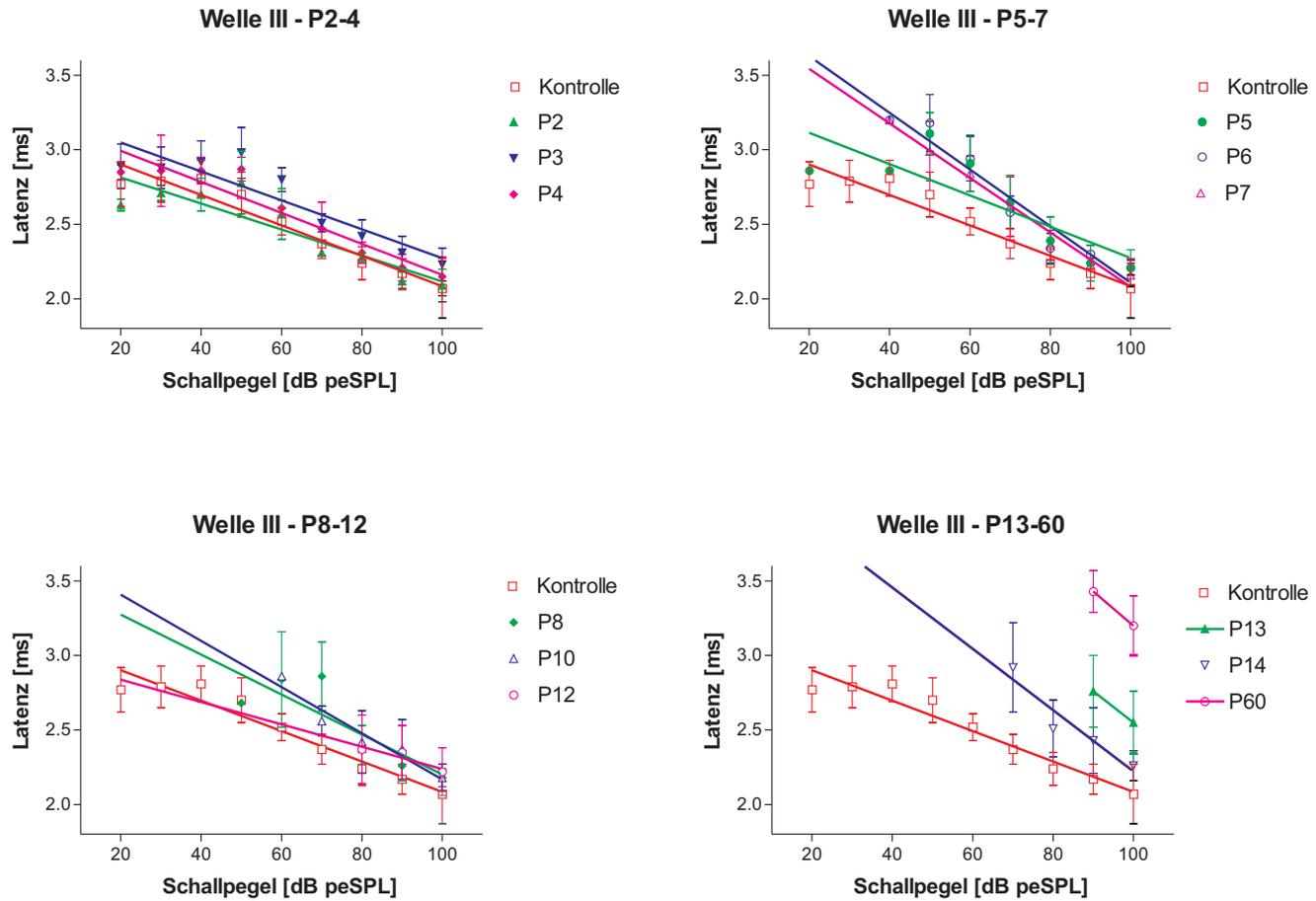


Abbildung 3.15: BERA, Welle III : Latenzen; Kontrolle und MMI bis pn2-60. Bis zu einer Behandlung bis pn4 findet sich kein Unterschied zur Kontrolle. Ab MMI bis pn5 zeigt sich eine zunehmende Verlängerung der Latenzen bei niedrigeren Schalldruckpegeln. Ab MMI bis pn13 ist die Latenz bei allen Schalldruckpegeln verlängert.

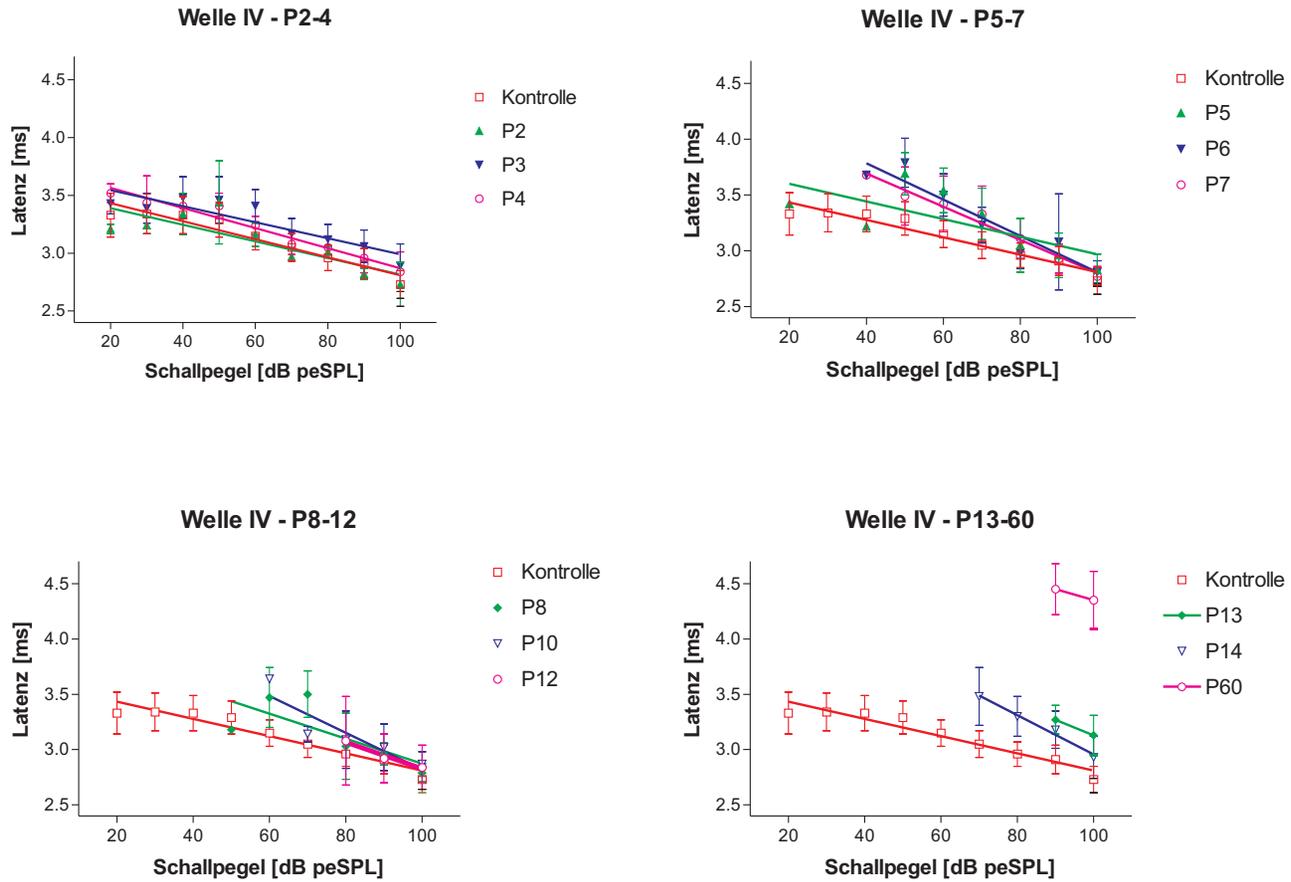


Abbildung 3.16: BERA, Welle IV : Latenzen; Kontrolle und MMI bis pn2-60. Bis zu einer Behandlung bis pn4 findet sich kein Unterschied zur Kontrolle. Ab MMI bis pn5 zeigt sich eine zunehmende Verlängerung der Latenzen bei niedrigeren Schalldruckpegeln. Ab MMI bis pn13 ist die Latenz bei allen Schalldruckpegeln verlängert, insbesondere bei MMI bis pn60.

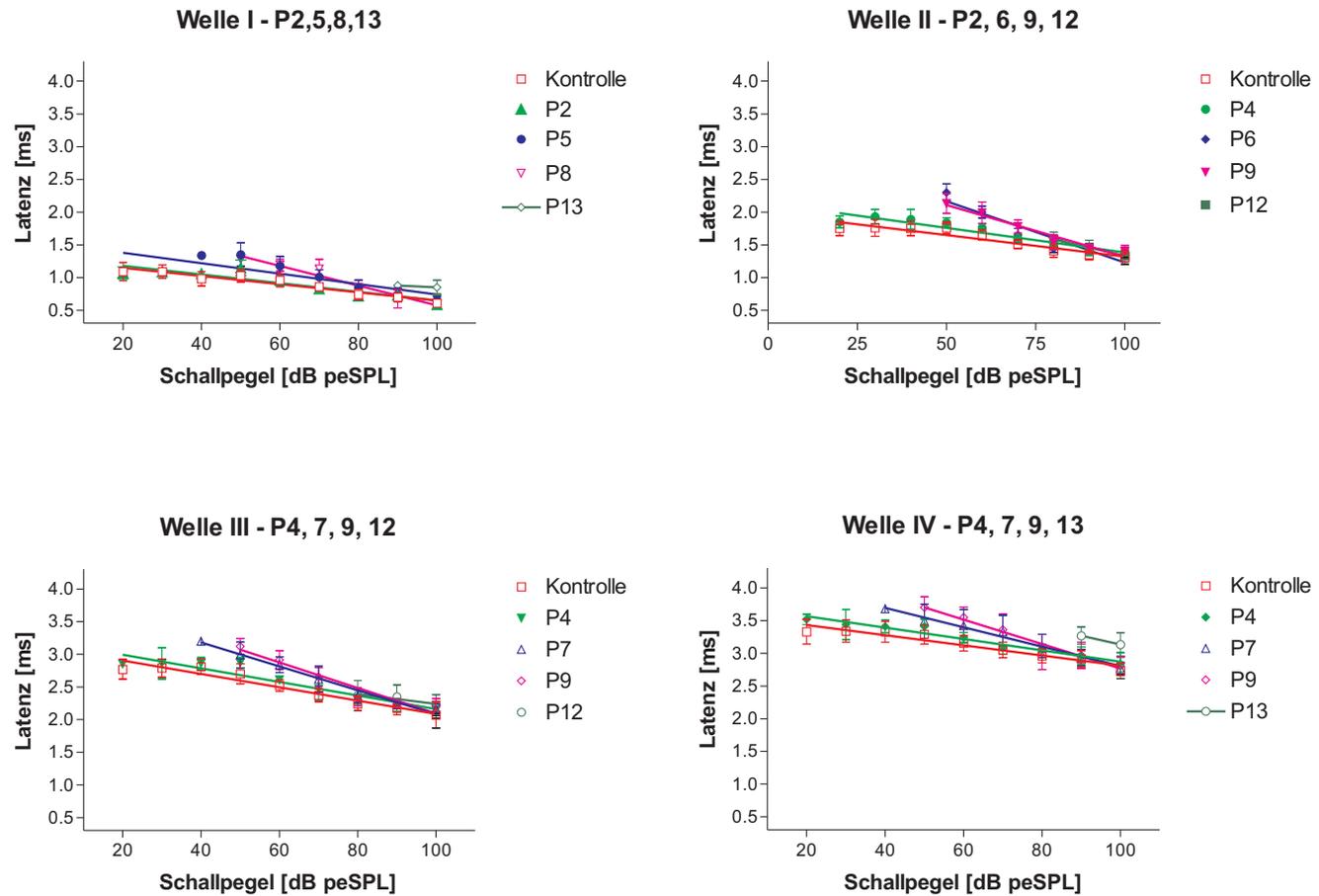


Abbildung 3.17: BERA, Welle I-IV: Latenzen; Kontrolle und MMI bis pn2-13, gleiche Ordinatoreinteilung aller 4 Diagramme. Aufgrund der engeren Ordinatoreinteilung zeigte sich eine Abweichung der Latenzen von der Norm (Kontrolle) bei vorwiegend niedrigeren Schalldruckpegeln.

Auswertung von Latenzen in der Klick-BERA

Während der Hörschwellenmessung mit der Klick-BERA (Abschnitt 3.3.3) wurden gleichzeitig die Latenzen der Wellen I–IV zur Auswertung mitprotokolliert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Latenzen an den zugehörigen Schalldruckpegeln wurden ermittelt und einer Regressionskurve statistisch unterworfen.

Zunächst betrachtet man die Welle I und die unterschiedlichen Laufzeiten bei den Tieren, bei denen transient postnatal die Schilddrüsenhormonsynthese gehemmt wurde (Abb. 3.13). Man erkennt, dass die Hemmung bis pn4 nur minimal die Latenzen in den einzelnen Schalldruckpegeln tangiert. Hingegen, wenn die Hemmung durch MMI länger als pn4 andauert, bleiben die Latenzen bei den sehr hohen Schalldruckpegeln wie 100dB SPL zwar bei allen Hörmessungen im selben Zeitfenster; jedoch je niedriger der Schalldruckpegel und je länger die Hemmung mittels MMI durchgeführt wird, desto länger werden die Latenzen. Nur die Laufzeiten, bei denen die Schilddrüsenhormonsynthese bis pn40 gehemmt wurde, treten bei 100dB SPL deutlich später auf (Abb. 3.13, Welle I — p12–14,P40). Bei Betrachtung der Welle II (Abb. 3.14), Welle III (Abb. 3.15) und Welle IV (Abb. 3.16) erhält man die gleichen Ergebnisse wie bei der Welle I. Zur Veranschaulichung sind alle vier Wellen in einem Schaubild (Abb. 3.17) mit der selben Ordinateneinteilung abgebildet.

Hörschwellenmessung an adulten Tieren mittels frequenzabhängiger BERA

Nach Durchführung der Hörschwellenmessung mittels Klick-BERA (Abschnitt 3.3.3) wurden zusätzlich die Hörschwellen durch Ableitung der durch bestimmte Frequenzen evozierte Potentiale ermittelt.

In Abbildung 3.18 findet man zunächst bei 4.000Hz die Hörschwellen der einzelnen Populationen sehr nah beieinander um die 90dB SPL. Wie erwartet sinkt die

3.3. ZEITLICH BEGRENZTER HYPOTHYREODISMUS

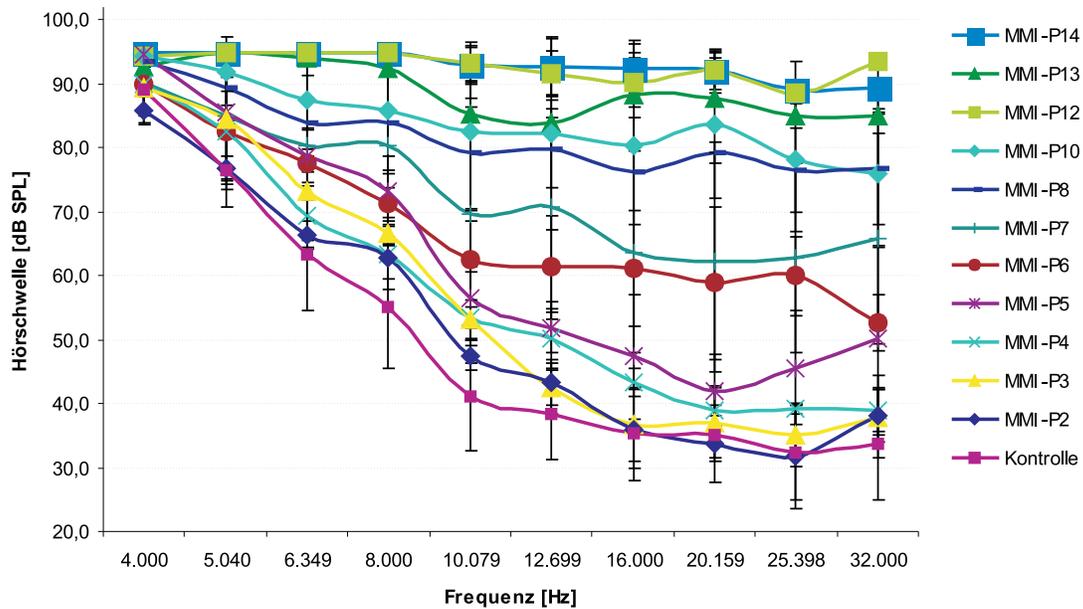


Abbildung 3.18: Frequenzabhängige BERA: Hörschwellenkurven von adulten Kontrollen und Tieren, die bis pn2–14 mit MMI behandelt wurden. Das Hörspektrum reicht bei der Ratte weiter als 32.000 Hz. Die Messung konnte technikbedingt nur bis 32.000 Hz erfolgen. Die unterste Kurve zeigt die Hörschwelle bei einer gesunden Ratte. Je länger die MMI-Gabe postnatal erfolgt ist, desto höher liegt die Hörschwelle. Auch wenn die Kurve der bis pn13 mit MMI Behandelten unterhalb von "MMI bis pn12" liegt, ist die Kurve dennoch zu "MMI bis pn12" und "MMI bis pn14" gehörig.

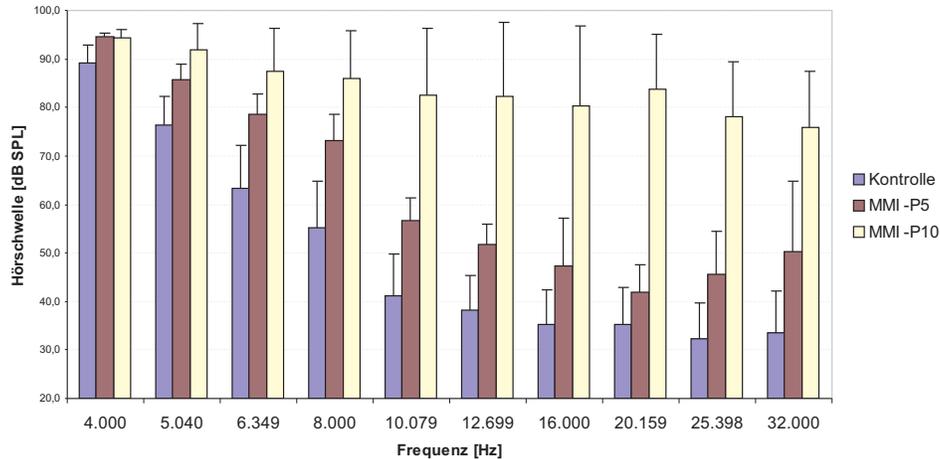


Abbildung 3.19: Frequenzabhängige BERA: Hörschwellenkurven von Kontrollen und Tieren, die mit MMI bis pn5 und pn10 behandelt wurden. In der Abszisse sind die Frequenzen aufgetragen, bei denen die Messungen vorgenommen wurden, und in der Ordinate der Schalldruckpegel. Hier wird zur besseren Anschauung eine andere Form als bei Abb. 3.18 gewählt. Die Unterschiede zwischen den behandelten und gesunden Tieren sind deutlich durch die unterschiedlichen Höhen der Hörschwellen an den jeweiligen Frequenzen.

Hörschwelle der Kontrolle etwa umgekehrt exponentiell auf circa 32 dB SPL bei 16 bis 26 kHz, um danach wieder anzusteigen. Bei Betrachtung der Kurven der mit MMI behandelten Tiere ist erkennbar, dass mit zunehmender Verlängerung der Schilddrüsen-Synthese-Starthemmung die Hörschwellenkurve sowohl flacher absinkt als auch bei wesentlich höheren dB-Zahlen im Intervall 16 bis 26 kHz stehenbleibt und anschließend wieder ansteigt. Zwischen den Tagen 4 und 8 ist die größte Verschlechterung der Hörschwellen erkennbar. Hier scheint das Intervall mit der größten Vulnerabilität der Hörfunktionsentwicklung zu liegen. Wenn die Behandlung p12 überschreitet, bleibt die Kurve nahezu konstant auf einer Hörschwelle zwischen 90 und 95 dB stehen. Bei 90 bis 95 dB ist deshalb eine Taubheit anzunehmen. Wenn man zu Anschauungszwecken nur 3 Hörschwellenkurven heranzieht, werden die Unterschiede zwischen Kontrolle und den un-

3.3. ZEITLICH BEGRENZTER HYPOTHYREODISMUS

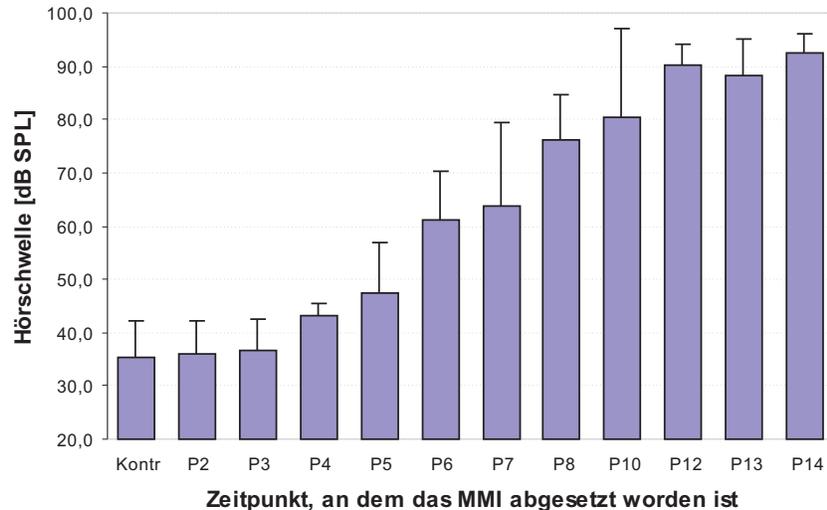


Abbildung 3.20: Frequenzabhängige BERA: Hörschwellenkurven bei 16 kHz von adulten Kontrollen und Tieren, die postnatal bis zum jeweiligen Tag mit MMI behandelt wurden. Diese Form der Kurve in der Region des besten Hörens der Tiere ähnelt sehr der Abb. 3.12. Auch hier zeigt sich eine zunehmende Verschlechterung der Hörschwelle mit der längeren Gabe von MMI während der kritischen Phase der Entwicklung der Cochlea.

terschiedlichen MMI-Regimen noch klarer (Abb. 3.19).

Wo die Hemmung mit MMI bis pn5 durchgeführt wurde, ist eine Minderung der Hörleistung erkennbar. Es ist aber hervorzuheben, dass die Hemmung der Thyroidhormonsynthese bis pn5 etwa dem halben Intervall der kritischen Phase der Innenohrentwicklung entspricht. Die Hörschwellenkurve dagegen liegt nicht im mathematischen Mittel zwischen der Hörschwelle der Kontrolle und des tauben Kollektivs, sondern näher an der Schwelle der Kontrolle. Betrachtet man die Hörschwellenkurve der mit MMI bis pn10 behandelten, beträgt der Unterschied nicht die doppelten Werte des Unterschiedes zwischen Kontrolle und bis pn5 MMI-behandelten, sondern ist wesentlich höher angesiedelt und verläuft sehr flach auf optimale Hörschwellen bei ca. 75–80 dB SPL. Nimmt man sich eine bestimmte

Frequenz (zum Beispiel 16 kHz) im Bereich des besten Hörens heraus und betrachtet man dabei die gemessenen Hörschwellen der unterschiedlich mit MMI behandelten Gruppen (Abb. 3.20), erkennt man die Ähnlichkeit des Verlaufs gegenüber dem mit der Klick-BERA erhaltenen Ergebnis (Abb. 3.12). Nur sind die bei der mit frequenzabhängiger BERA gemessenen Hörschwellen bei höheren Schalldruckpegeln etwa ab 35 dB SPL angesiedelt.

Kapitel 4

Diskussion

Neurotrophine regulieren das Überleben sowie die Differenzierung spezifischer Populationen von Neuronen und halten deren Funktionen aufrecht (Toenen 1995). Sie beeinflussen ferner das Innervationsmuster (Cabelli 1995, Cohen-Cori und Fraser 1995) und die Innervationsdichte (Causing et al. 1997) in verschiedenen sensorischen und motorischen Systemen. Desweiteren spielen sie bei der Myelinisierung (Pruginin-Bluger et al. 1997) und wahrscheinlich auch bei der Differenzierung nicht-neuronaler Zellen eine Rolle (Sariola et al. 1991).

Dabei werden während verschiedener Entwicklungsphasen von den einzelnen Neurotrophinen unterschiedliche und im zeitlichen Verlauf wechselnde Funktionen erfüllt (Snider 1994).

4.1 Entwicklungsverlauf der p75^{NGFR}-Expression während der Morphogenese

Es sind bereits sowohl lichtmikroskopische Untersuchungen an neugeborenen hypothyroiden Mäusen (Deol, 1973, 1976), als auch zusätzlich elektronenmikroskopische Untersuchungen an neugeborenen hypothyroiden Ratten (Uziel et al.,

1981) durchgeführt worden. Dabei sind gravierende Fehlentwicklungen und Nicht-Entwicklung in unterschiedlichen Bereichen der Cochlea beobachtet worden. Bezüglich der p75-Expression bei hypothyroiden Tieren konnte im Cerebellum (Figueiredo et al., 1993) nachgewiesen werden, dass eine verzögerte Expression und Expressionsintensität auftritt. Auch hier in diesem Fall in der Cochlea findet man eine verzögerte p75-Expression bei den hypothyroiden Tieren in Verhältnis zur Kontrolle. Wie in Abb. 3.1 erkennbar, lässt sich p75 in der Pfeilerzelle bis pn7 nachweisen. Wie in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Abe et al., 1991; von Bartheld et al., 1991) und hier erneut bestätigt wurde (Abb. 3.1), bleibt die Immunreaktivität der Pfeilerzelle im euthyreoten Stoffwechsel nur bis ca. pn3 bestehen. Zeitgleich mit dem Verschwinden des Signals an der Pfeilerzelle taucht bei der Kontrolle das Signal am Köllikerschen Organ auf. Das Muster der immunhistologischen Reaktion beginnt an der axialen Stelle des Köllikerschen Organs, wobei das Intensitätsmaximum an der apikalen Seite lokalisiert ist. Sowohl die zeitliche als auch räumliche Dynamik der Verteilung der p75^{NGFR}-Rezeptoren steht in enger Korrelation mit der Umwandlung des Köllikerschen Organs in den inneren Sulcus. Dabei scheint die allmähliche Umwandlung des Köllikerschen Organs in den inneren Sulcus mit dem Verschwinden der hochprismatischen Epithelzellen begründet (Hinojosa, 1977). Auch teilt p75 Sequenzmuster mit Proteinen aus der TNF-Familie (Chao, 1994), die in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod stehen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass p75 selbst die Apoptose von Zellen fördern kann (Rabizadeh et al., 1993; Barrett und Bartlett, 1994). In diesem Sinne kann von einer Beteiligung von p75 im programmierten Tod von Epithelzellen im Köllikerschen Organ ausgegangen werden. Dieser Tod stellt eine Mitursache für die Umwandlung des Organs in den inneren Sulcus dar. Die Mitwirkung in der Apoptose als eines von anderen Funktionen von p75 wird umso mehr in der gegenwärtigen Untersuchung bekräftigt. Während im hypothyroiden Zustand das Köllikersche Organ pathologischerweise persistiert und keine

4.1. ENTWICKLUNGSVERLAUF DER p75^{NGFR}-EXPRESSION WÄHREND DER MORPHOGENESE

Umwandlung erfährt, kommt es darin während der gesamten Periode zu keiner Expression von p75.

Der Untergang des Köllikerschen Organs und die Bildung des inneren Sulcus daraus findet durch den Wechsel vom hochprismatischen in ein kuboides Epithel statt (Hensen, 1863; Hinojosa, 1977). Es wurde auch mehrmals vorgeschlagen, dass die kuboiden aus den hochprismatischen Zellen hervorgehen (Hensen, 1863; Pujol und Hilding, 1973; Uziel, 1986). Zeitgleich degenerieren die kuboiden Zellen des äußeren Sulcus in die neu geformten Epithelzellen des äußeren Sulcus (McPhee und Van De Water, 1988). Aus der obigen Beobachtung, dass beim Untergang des Köllikerschen Organs p75 exprimiert wird, ließe sich ebenfalls ein Auftreten von p75 im äußeren Sulcus schließen. Dies kann jedoch weder bei den Kontrollen noch hypothyroiden Tieren gezeigt werden. Daraus lässt sich folgern, dass entweder p75 bei sehr gravierenden strukturellen Veränderungen exprimiert wird oder dass bei der Ausdifferenzierung des äußeren Sulcus andere Faktoren eine Rolle spielen. Da aber offensichtlich p75 die Apoptose fördert und man neben der Umwandlung der hochprismatischen Zellen des Köllikerschen Organs auch programmierten Zelltod annehmen kann, wäre auch statt Zelluntergang nur eine zelluläre Umdifferenzierung im äußeren Sulcus naheliegend. In diesem Fall wäre ein Nicht-Auftreten des p75 eine logische Konsequenz. Dies erklärt ebenfalls unter der Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung der p75-Signale im hypothyroiden Status das Fehlen einer Expression.

Neben dem äußeren Sulcus erfährt im gleichen zeitlichen Verlauf auch die Stria vascularis eine Umwandlung (McPhee und Van De Water, 1988, S. 237). Wenn in dieser Region wie am Köllikerschen Organ Apoptosen bzw. schwerwiegende Änderungen stattfinden sollten, müsste nach den bisherigen Beobachtungen p75 exprimiert werden. Wenn jedoch statt dessen nur eine Umwandlung auf zellulärer und nicht auf struktureller Ebene erfolgen sollte, würde man p75 in diesem zeitlichen Rahmen vermissen. Interessanterweise lässt sich p75 in der Kontrolle

als diffuses Muster in der Stria vascularis für ein kurzes Zeitfenster lokalisieren (s. Abb. 3.1).

In der Untersuchung von Figueiredo et al. (1993) wird bei den hypothyroiden Tieren beobachtet, dass das p75-Expressionsmaximum in Purkinje-Zellen im Cerebellum verspätet auftritt. Auf der anderen Seite findet man ein höheres Intensitätsmaximum als bei den Tieren ohne Hormondefizit. Bei den Cochlea-Schnitten von hypothyroiden Tieren kann jedoch in sämtlichen nicht-neuronalen Bereichen im zeitlichen Verlauf kein derartiges Expressionsverhalten beobachtet werden. Es wird diskutiert, dass möglicherweise durch eine Ver- oder Behinderung des axonalen Transportes von p75 und folglich intrazellulärer Erhöhung der p75-Konzentration das erhöhte Intensitätsmaximum zustande kommt. In den nicht-neuronalen Strukturen der Cochlea sind keine ähnlichen Zellbestandteile vorhanden, die solche Proteine wie p75 vom Soma wegtransportieren. Aus diesem Grund kann ein derartiges spatio-temporales Signalmuster in der Cochlea weder erwartet noch vorgefunden werden.

4.2 Rolle des Hypothyreoidismus auf die postnatale Entwicklung der Innervation

4.2.1 Entwicklungsverlauf der p75-Expression

Während der kritischen Phase der Entwicklung des Innenohrs (Rubel, 1978) finden auch neben Änderungen in der Morphologie auch Änderungen des Innervationsmusters an den inneren und den äußeren Haarzellen statt (Knipper et al., 1996). Dabei wird p75 sowohl in afferenten als auch efferenten Fasern in der Cochlea exprimiert (Knipper et al., 1996). Diese sind jedoch vorwiegend am OSB lokalisiert und sind bereits an pn3 vorhanden. Diese Fasern lassen sich bis pn12

4.2. ROLLE DES HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE POSTNATALE ENTWICKLUNG DER INNERVATION

nachweisen und sind sogar noch an pn16 vorhanden (Knipper et al., 1996). Bei Beobachtung der hypothyroiden Tiere fällt auf, dass die Fasern des OSB nicht verspätet auftreten. Neben den gewöhnlichen Fasern des OSB, lassen sich auch im hypothyroiden Falle p75-Expressionsmuster an der lateralen Seite der OHC finden. Zwar sind die Muster in ihrer Intensität eingeschränkt, doch lassen sie sich in der gleichen Form darstellen wie in sonst physiologischen Schnitten. Im weiteren Verlauf divergieren die Muster zwischen den Kontrolltieren und den hypothyroid gesetzten. Bei den Hypothyroiden kann man interessanterweise am pn12 die in der Kontrolle vorhandenen Fasern des OSB nicht mehr nachweisen. Genau den selben Verlauf nimmt auch das IGSB beim hypothyroiden Status. Verfolgt man jedoch die Entwicklung des Expressionsmusters am ISB, so findet sich dort zu keiner Zeit ein positives Signal bei den hypothyroiden Tieren. Dafür lassen sich bereits an pn11 in der Kontrolle (Knipper et al., 1996) deutliche Signale um die IHC ableiten. Diese sind sowohl caudal der IHC, als auch supranukleär lokalisiert. Dabei entwickelt sich das Signalmuster bis pn16 in der Weise, dass dann nur noch die supranukleäre Faser eine Immunantwort gibt.

Wenn man den unterschiedlichen Verlauf der p75-Expression in den Spiralbündeln beim hypothyroiden Tier und bei der Kontrolle betrachtet, so fällt einem auf, dass die Änderungsmodalitäten der hypothyroiden Spiralfasern gegenüber den nicht-neuronalen Strukturen differieren. Zum einen findet keine zeitliche Verzögerung bei den Strukturen statt, die ebenfalls wie in der Kontrolle exprimiert werden (z.B. OSB). Zum anderen ist die Intensität wesentlich geringer und lässt sich in nur einem kürzeren Zeitintervall nachweisen. Dies mag daran liegen, dass bereits thyroidhormonunabhängige Prozesse die Expression von p75 starten, aber durch einen Hormonmangel — in diesem Falle künstlich herbeigeführt — die Anzahl der Rezeptoren in einem geringeren Rahmen gehalten wird. Auf der Seite des kürzeren Intervalls liegen mehr Erklärungsmöglichkeiten. Die eine Möglichkeit ist, dass eine durch die Hypothyreose bedingte Abregulation der p75^{NGFR}-Rezepto-

ren stattfindet. Dies könnte durch eine Minderung der Gesamtfaserzahl des OSB sowie durch eine alleinige oder zusätzliche Erniedrigung der Rezeptorenzahl in den Fasern bedingt sein. Eine zweite Möglichkeit ist, dass afferente Fasern vom Typ II im Gegensatz zur Kontrolle in diesem Zeitraum nicht ausgebildet werden (Lenoir et al., 1980; Liberman, 1980b; Simmons und Liberman, 1988; Hafidi und Romand, 1989; Liberman et al., 1990; Echterler, 1992; Sobkowicz, 1992). Durch eine Nicht-Ausbildung könnte eine möglich p75-Expression nicht stattfinden. Somit wäre ein verfrühtes Ausbleiben des Signals erklärbar.

Bei der Kontrolle an pn11 werden p75-positive Signale unterhalb und supranukleär-axial der IHC exprimiert (Knipper et al., 1996). Ein Ausbleiben dieser Signale beim hypothyroiden Tier (Abb. 3.1) wäre eine mögliche Erklärung, dass bei diesen Tieren keine efferenten Fasern am IHC ausgebildet werden.

Dadurch aber, dass man die immunhistologische Färbung mit p75 nicht zwischen den afferenten und efferenten Strukturen unterscheiden kann, lässt sich durch die ausschließliche Betrachtung von p75 nicht auf die Änderung des Innervationmusters schließen.

4.2.2 Entwicklungsverlauf der TrkB-Expression

TrkB wird in zahlreichen neuronalen Geweben wie zB. dem Gehirn exprimiert (Alvarez-Dolado et al., 1994). Neben der Expression von p75 findet man auch TrkB in der Cochlea (Knipper et al., 1995, 1996, 1997, 1999). In vergangenen Arbeiten konnten hochaffine Tyrosinkinaserzeptoren, wie TrkB in nicht-neuronalen Zellen des in Entwicklung begriffenen Innenohrs, nachgewiesen werden (Pirvola et al., 1994). Der Nachweis ist jedoch auf die Expression der abgeschnittenen Form des Carboxyendes des TrkB-Rezeptors beschränkt (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991; Tsoulfas et al., 1993). Der abgeschnittenen Form wurde dabei eine Funktion zugewiesen, die in den zusätzlich bereitgestellten Bindungsstellen

4.2. ROLLE DES HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE POSTNATALE ENTWICKLUNG DER INNERVATION

für überschüssige Liganden zu sehen ist (Klein et al., 1990).

Beim zeitlichen Verlauf der TrkB-Expression in den OHC fällt auf, dass die Expression ca. einen Tag vor Beginn der Synaptogenese der efferenten Fasern (Sobkowicz, 1992) aufreguliert wird. Die Aufregulation in den OHC wird fortgesetzt, wobei jedoch die Immunreaktivität an den afferenten Fasern herunterreguliert wird, um scheinbar später an anderen afferenten Fasern wieder aufzutauchen (Knipper et al., 1996). Dieses Verschwinden und Wiederauftauchen von TrkB in den genannten Strukturen könnte mit dem Rückzug von überschüssigen afferenten Fasern Typ I und dem Einsproßen und Bildung von afferenten Fasern Typ II in Korrelation stehen. Dieser Prozess wurde in der Entwicklung bereits mehrfach postuliert (Pujol et al., 1978, 1979; Lenoir et al., 1980; Shnerson und Pujol, 1983; Pujol, 1986; Pujol und Lenoir, 1986; Echteler, 1992). Die Immunreaktivität von TrkB nimmt ca. einen Tag nach Abschluss der Synaptogenese in den jeweiligen Windungen ab (Sobkowicz, 1992; Knipper et al., 1995).

Bei Betrachtung der TrkB-Immunreaktivität an der IHC erfolgt die Expression in den Zellen zeitgleich mit der Änderung des efferenten Innervationsmusters. Die Änderung erfolgt unmittelbar von der Basis der IHC in zentripetaler Richtung unter die IHC (Knipper et al., 1996). Dies könnte in engem Zusammenhang mit der Änderung von axosomatischer zur axodendritischer Verschaltung der Efferenzen stehen (Pujol, 1986). Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die IHC in diesem Entwicklungszeitraum auch axosomatisch in supranukleärer Position efferent innerviert (Angelborg und Engström, 1973; Hashimoto et al., 1990; Saito, 1990; Sobkowicz, 1992; Yamashita et al., 1993; Elgoyhen et al., 1994; Sobkowicz und Slapnick, 1994; Knipper et al., 1995). Es scheint so, als ob TrkB vorwiegend in der Zeit der Umgestaltung des afferenten und efferenten Innervationsmusters an den Haarzellen exprimiert wird.

In den Untersuchungen von Alvarez-Dolado et al. (1994) konnte in verschiedenen Bereichen des Gehirns bei hypothyroiden Tieren und ihren Kontrollpartnern

kein Unterschied in der Genexpression von TrkB entdeckt werden. Bei Beobachtung der TrkB-Entwicklung in der Cochlea bei den hypothyroiden Tieren fallen jedoch wichtige Unterschiede auf. Zunächst unterscheidet sich das Expressionsmuster von TrkB in Kontrolle und hypothyroides Tier bis pn6 nicht. Bis zu diesem Zeitpunkt hat aber auch die große Reorganisation des Innervationsmusters, wie oben gezeigt, nicht voll eingesetzt. Wie schon an pn7 (Knipper et al., 1999) und in dieser Arbeit an pn9 gezeigt wird, wird in den hypothyroiden OHC kein TrkB exprimiert. Es konnte bereits gezeigt werden (Uziel et al., 1983b; Knipper et al., 1999), dass es beim Hypothyroidismus zu einem kompletten Stopp der postnatalen Differenzierung des Innervationsmusters an den OHC kommt. Das Fehlen der Expression von TrkB in den äußeren Haarzellen könnte somit in engem Zusammenhang mit der fehlenden Synaptogenese, der efferenten Innervierung und postsynaptischen Spezialisierung stehen. Daneben könnte das fehlende TrkB-Antigen für die fehlende Anzahlminderung der afferenten Fasern des Typs I verantwortlich sein oder zumindest in enger Korrelation damit stehen. Der gleiche Mechanismus bzw. Zusammenhang sollte somit auch in der fehlenden Bildung von afferenten Fasern des Typs II bzw. deren Anschluss an die OHC bestehen. Auch drei Tage später, an pn12, lassen sich weder die OHC noch das OSB mit einer positiven Immunantwort belegen. Somit verhärtet sich der Verdacht, dass die Expression von TrkB nicht nur lediglich verzögert wird, sondern komplett unterbleibt. Somit kann man umso mehr die durch den Hypothyroidismus ausgelöste Inexistenz von TrkB in engem Verhältnis zur fehlenden efferenten und fehlenden Wechsel der afferenten Innervation der OHC stellen.

Eine Immunreaktion an pn12 fehlt ebenso an IHC und ISB. In das Stoppen der Innervationsdifferenzierung der äußeren Haarzellen würde sich ebenfalls das der inneren Haarzelle reihen. Auch wenn in Abb. 3.2 kein positives Signal zu sehen ist, wird an den noch relativ gut erkennbaren Strukturen keine klar abgrenzbare ISB deutlich, d.h. es führen keine schlanken faserigen Strukturen caudal der

4.2. ROLLE DES HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE POSTNATALE ENTWICKLUNG DER INNERVATION

Basis der IHC zur IHC hin. Die breit an der Basis der IHC sitzenden efferenten Fasern scheinen nicht die Umwandlung von axosomatischer Verschaltung in eine axodendritische erfahren zu haben. Außerdem lässt sich die im euthyreoten Zustand vorhandene supranukleäre Faser (Knipper et al., 1996) ebenfalls nicht vorfinden. Die Beobachtung der Vorgänge an der IHC kann man als weiteres Indiz dafür nehmen, dass TrkB eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung der Innervation in der Cochlea spielt. Durch das Fehlen des Schilddrüsenhormons ändert sich das zeitliche und örtliche Expressionsmuster von TrkB. Und wie bisher hier beobachtet werden konnte, geschieht die Umstrukturierung des Innervationsmusters in der Cochlea der Ratte postnatal in engem Zeitrahmen. Ein Fehlen des Thyroidhormons bewirkt nicht nur eine nicht synchron ablaufende Änderung des Innervationsmusters zwischen Kontrolle und hypothyroidem Tier. Viel mehr ändert sich die Innervation der Cochlea ab dem Zeitpunkt nicht in physiologischer Weise (siehe auch Uziel et al., 1983b) bzw. bleibt stehen, ab dem die hypothyreotische Behandlung angefangen wurde.

4.2.3 Entwicklungsverlauf der Afferenzen anhand von Glu 2/3

In Abschnitt 4.2.2 wurde bereits sehr viel über die zeitlichen Verlauf des Expressionsmusters von Glu 2/3 von der euthyreoten und hypothyroiden Cochlea gegenüber gestellt.

Bevor die durch Glu 2/3 immunhistochemisch nachweisbare Änderung des Innervationsmusters bezüglich der Afferenzen einsetzt, besteht zwischen Kontrollen und hypothyroiden Tieren an pn3 kein Unterschied (siehe Abb. 3.3). Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen bei den Untersuchungen mit TrkB in Abschnitt 4.2.2. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Glu 2/3 bereits nach pn5 im OSB nicht mehr nachweisbar ist (Knipper et al., 1999). Dies konnte auch in dieser Untersuchung bestätigt werden (siehe Abb. 3.3). Desweiteren bleibt die

Nachweisbarkeit von Glu 2/3 am äußeren Spiralbündel beim hypothyroiden Tier bis mindestens pn12 (Abb. 3.7) erhalten. Dies ist als weiterer Beweis zu sehen, dass die übermäßige Anzahl von afferenten Fasern des Typs I, die anfangs neben den IHC auch die OHC innervieren, beim hypothyroiden Tier über die Zeit der regulären Umorganisation der afferenten Fasern hinaus persistieren.

In Bezug auf die afferente Innervierung der inneren Haarzelle wird man aufgrund der persistierenden Fasern an der IHC bzw. des ISB (Echteler, 1992, diese Arbeit) keinen Unterschied zwischen Kontrolle und hypothyroiden Tieren feststellen können.

4.2.4 Entwicklungsverlauf der Synaptogenese und Efferenzen

Um die Entwicklung der Synaptogenese und Efferenzen in der Cochlea und im Vergleich dazu die Entwicklung dieser Strukturen in der hypothyroiden Cochlea darstellen zu können, wurde die Methode des immunhistologischen Nachweises von Synaptophysin gewählt. Synaptophysin konnte bereits erfolgreich sowohl im Allgemeinen in der Cochlea nachgewiesen, als auch im Speziellen zum Nachweis in der Bildung von efferenten Fasern und Synapsen angewandt werden (Gillozaga und Pujol, 1988; Nadol Jr. et al., 1993; Knipper et al., 1995).

In der Arbeit von Knipper et al. (1995) konnte bereits gezeigt werden, dass das zeitlich begrenzte Auftauchen bis pn3 von Syn im OSB und in den Spiralganglien in engem Zusammenhang mit den zu diesem Zeitpunkt die OHC innervierenden afferenten Fasern steht (Echteler, 1992). Wie in Abschnitt 4.2.3 gezeigt handelt es sich dabei um afferente Fasern des Typs I. Es wurde bereits dokumentiert, dass sich synaptische Vesikel in afferenten Synapsen befinden (De Camilli et al., 1988; Scarfone et al., 1988, 1991). Weitere Studien befassen sich mit der Funktion solcher Vesikel und diskutieren ihre Rolle im Wachstum der Fasern (Hume et al., 1983; Sun und Poo, 1987; Taylor und Gordon-Weeks, 1989, 1991). Wie

4.2. ROLLE DES HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE POSTNATALE ENTWICKLUNG DER INNERVATION

in Abb. 3.4 erkennbar ist, ist eine deutliche Persistenz von Vesikeln in den OHC an pn3 bei der hypothyroiden Cochlea vorhanden. Dies unterstützt die These der Persistenz der afferenten Fasern des Typs I an den OHC im hypothyroiden Tier, wie es bereits in den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 diskutiert wurde.

Bei genauerer Betrachtung der Immunreaktivität an der IHC wird augenfällig, dass die Immunreaktion sich von einer löffelförmigen in eine eher kelchartige Form umwandelt, wobei sich das Signal an der modiulären Seite über die Zellkernebene fortsetzt. Das gleichzeitige Auftauchen von GAP-43 (Growth Associated Protein 43) und Syn an der IHC legt die Annahme nahe, dass zwei verschiedene efferente Fasern aus dem LOC (Laterale Olivocochleäre Komplex) entspringen (Knipper et al., 1995). Ein synaptophysin-positives Signal an einer Faser wurde erstmalig löffelförmig an der Basis der IHC beschrieben und fiel in den Zeitrahmen der Synaptogese von GABAergen Fasern an die IHC (Gil-Loyzaga und Pujol, 1988; Merchan-Perez et al., 1990, 1993). Die Löffelform ähnelt zwar der Form den GABAergen Fasern (Gil-Loyzaga und Pujol, 1988), jedoch unterscheidet sie sich von anderen LOC Efferenzen (Despres et al., 1991; Sobkowicz, 1992; Sobkowicz und Emmerling, 1989). Es wurden bisher sowohl axosomatisch (Sobkowicz, 1992; Sobkowicz und Slapnick, 1994), als auch axodendritisch (Emmerling et al., 1990; Pujol, 1986) endende efferente Fasern aus dem LOC beschrieben. Und es wurde diskutiert, ob die axosomatisch endenden Fasern allmählich in der frühen postnatalen Entwicklung in axodendritische umgewandelt werden (Emmerling et al., 1990; Pujol, 1986; Sobkowicz, 1992). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten axosomatisch endende efferente Fasern an der IHC im späten postnatalen Entwicklungsverlauf nachgewiesen werden (Sobkowicz und Slapnick, 1994). So könnte es sich beim in dieser Arbeit an der modiulären Seite der IHC nachgewiesenen Syn-Signal um axosomatisch endende efferente Fasern handeln. Beim an der Basis der IHC sitzenden Signal könnte es sich um axodendritischen Endigungen der Efferenzen handeln, so wie es bei

Knipper et al. (1995) vorgeschlagen wird. Das allmähliche Übergehen der efferenten axosomatischen Fasern in axodendritische würde einen hervorragenden Rückkopplungsmechanismus für die aufgenommenen Signale der IHC von den afferenten Fasern bilden. So könnten die dynamischen akustischen in elektrisch umgewandelte Signale je nach —hohem oder niedrigem— Stimulus inhibiert oder verstärkt werden. Zumal gibt es ein morphologisches Korrelat in Form des LOC, das ipsilateral auf die IHCs projiziert (Guinan et al., 1983; Liberman und Brown, 1986). Es ist ebenfalls eine Art ipsilaterale Lateralinhibition aus den Signalen, die von den benachbarten IHCs kommen, möglich. So wäre eine Hemmung von benachbarten IHCs durch eine bestimmte Frequenz maximal stimulierte IHC mittels der Rückkopplungsschleife möglich. Dies würde zu einer zusätzlichen Frequenzdiskrimination beim Hören verhelfen.

Bei der parallelen Betrachtung des Entwicklungsverlaufs der Syn-Expression bei den hypothyroiden Tieren zeigt sich, dass die Löffelform am IHC nicht in die Form eines Kelches übergeht. Um die Gedanken von oben weiter zu entwickeln, liegt die Annahme der Nicht-Umwandlung von axosomatischen efferenten in axodendritische Fasern am IHC nahe. Somit wäre die angenommene Rückkopplung mit der Amplifikation oder Inhibition der durch die afferenten Fasern geleiteten Signale nicht vorhanden. Weitergehend ist die Bildung von axosomatischen efferenten Fasern an der modiolären Seite der IHC unwahrscheinlich, wie man in Abb. 3.4 am Nicht-vorhandensein von supranukleären an der modiolären Seite befindlichen Fasern erkennen kann.

Bezüglich der in pn7 beim hypothyroiden Tier aufgetauchten Syn-Signals an der Basis des KöO findet man in der Literatur keinen Hinweis, zumal beim euthyreoten Verlauf diese Fasern nicht vorhanden sind. Dadurch dass das Signal nicht nur bei pn7 über mehrere Windungen darstellbar (Daten nicht gezeigt), sondern auch wenige Tage später fortgeschritten war, spricht gegen eine zufällige Entwicklung und für eine fehlgeleitete Aussprossung der Fasern. Durch die fehlen-

4.3. ROLLE DES POSTNATAL BEGRENZTEN HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE P75^{NGFR}-EXPRESSION

de Umwandlung des hochprismatischen Epithels des KöO zum inneren Sulcus könnte eine größere Affinität für die Aussprossung der Fasern unter das KöO vorhanden sein. Die größere Affinität könnte auf der anderen Seite mit einer weniger ausgeprägten Bahnung Richtung IHC oder OHC bedingt sein. Eine weitere Erklärung könnte für eine reine Hemmung und/oder Obstruktion durch die pathologische zahlenmäßige Überrepräsentation von afferenten Fasern des Typs I sprechen. Die Ursache der Fehlsprossung der Fasern bleibt in Zukunft zu untersuchen.

Bei Betrachtung der Synaptophysin-Expression der Fasern, die auf die OHC projizieren, erkennt man ebenfalls Unterschiede zwischen einer euthyreoten und hypothyreoten Cochlea. Die Ergebnisse der euthyreoten Cochlea stimmen mit der Arbeit von Knipper et al. (1995) überein. Der Nachweis der Synapsenbildung bei den hypothyroiden Tieren wird ebenfalls relativ früh bereits an pn3 an der Basis der medialen OHC-Reihe und medialen OSB erbracht. Diesbezüglich wurde bereits weiter oben diskutiert. An pn7 erkennt man die volle Ausprägung der Synapsenbildung an der Basis aller drei OHC. Und an pn9 ist ebenfalls wie an pn7 an den Projektionen der Efferenzen in Richtung der OHC im Vergleich zur euthyreoten Cochlea kein Unterschied erkennbar.

4.3 Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die p75^{NGFR}-Expression

In den Ergebnissen fanden sich unerwartete p75-Expressionsmuster der Cochleae fortgeschrittenen Alters bei den Kontrollen und den zeitlich begrenzt hypothyreot Gestellten. Im Gegensatz zu den postnatalen Schnitten fanden sich keine Unterschiede an den nicht-neuronalen und neuronalen Strukturen. Es ist jedoch erstaunlich, dass die sämtlich auf den Präparaten erkennbaren Strukturen

—neuronal und nicht-neuronal— bei den zeitlich begrenzt gehaltenen hypothyreoiden Tieren den Kontrollen glichen. Dieses Ergebniss stand im Gegensatz zu der fehlenden Weiterentwicklung der Cochlea bei den postnatal wenige Tage alten hypothyreoiden Tieren.

4.4 Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die Innervation

Da in den Präparaten kein TrkB nachgewiesen werden konnte, müssen die Schnitte, bei denen NF200- und Synaptophysin-Signale vorhanden waren, näher betrachtet werden. Das Nicht-vorhandensein von TrkB-Signalen würde erneut dafür sprechen, dass TrkB in der Cochlea nur in der Zeit der neuronalen Umgestaltung exprimiert wird (siehe dazu Abschnitt 4.2.2).

Bei den Kontroll-Schnitten, bei denen das NF200-Expressionsmuster untersucht wurde, fanden sich kräftige positive Signale am ISB und IGSB. Im Unterschied dazu war die Expression am OSB geringer. Dies bekräftigt die Annahme, dass deutlich mehr afferente Fasern an der IHC present sind als an der OHC. Zum Vergleich haben zeitlich begrenzt hypothyreot gehaltene Tiere neben einer scheinbar später abgelaufenen regelrechten Morphogenese noch durch eine starke Expression von NF200 am OSB eine offensichtliche Persistenz von afferenten Fasern bis ins adulte Alter. Die Persistenz der afferenten Fasern beim hypothyreoiden postnatalen Tier wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 mittels Glu2/3 gezeigt. Durch den Nachweis von überschüssigen afferenten Fasern im adulten Alter ist zudem eine geringe Anzahl von efferenten Fasern, falls überhaupt vorhanden, zu fordern. Diese geringe Zahl würde der Minderung der elektromechanischen Verstärkung von akustischen Reizen durch die äußeren Haarzellen beitragen. Die Minderung der elektromechanischen Verstärkung wurde durch Knipper et al. (2000) gezeigt.

4.4. ROLLE DES POSTNATAL BEGRENZTEN HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE INNERVATION

Durch den Nachweis der efferenten Fasern an die OHC mittels Syn kann zumindest qualitativ über die Präsenz der efferenten Fasern eine Aussage getroffen werden, jedoch nicht über die Anzahl und regelrechte Funktion. Alle drei Anteile des OSB sind bei den begrenzt mit MMI gehaltenen Tieren bis hin zur Nervenendigung unter die OHC nachweisbar. Leider lässt sich daraus nicht ableiten, inwieweit die Funktion der efferenten Fasern intakt ist. Anhand der untersuchten Region lässt sich nicht feststellen, ob die persistierenden afferenten Fasern Typ I eine, wenn auch unwahrscheinliche, zentrale Rückkopplung zu den efferenten Neuronen herstellen. Ferner ist aus den nachweisbaren Signalen nicht ersichtlich, ob bei den zeitlich begrenzt hypothyreot gehaltenen Cochleae ein Fasermuster für laterale Inhibition zur besseren Frequenzdiskriminierung vorhanden ist.

Bei den Präparaten der mindestens bis pn10 mit MMI behandelten Tieren fand sich die fehlende Fortsetzung des ISB am medialen Rand der IHC, der bis an den Apex heranreichte. Wie bereits mit TrkB unter 4.2.2 diskutiert, entwickeln sich bei den Kontrollen supranukleäre und axosomatische efferente Fasern an die IHC bei pn9/10 (Angelborg und Engström, 1973; Hashimoto et al., 1990; Saito, 1990; Sobkowicz, 1992; Yamashita et al., 1993; Elgoyhen et al., 1994; Sobkowicz und Slapnick, 1994; Knipper et al., 1995). Offensichtlich entwickelt sich die supranukleäre Faser an der IHC im Gegensatz zum ISulc und OSulc nach Absetzen von MMI nach dem zehnten postnatalen Tag nicht. Inwiefern oder ob die axosomatische efferente Fasern sich in axodentrische Fasern umwandeln, lässt sich anhand von Synaptophysin nicht darlegen.

4.5 Rolle des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die Hörfunktion

Nach Erörterung der Innervation kommen nun die Auswirkungen des postnatal begrenzten Hypothyreoidismus auf die Hörfunktion in den Betrachtungswinkel. Wie bereits bei den hypothyreoten postnatalen Cochleae gezeigt werden konnte, entwickeln sich sukzessive die einzelnen Strukturen nicht weiter wie sie es sonst in der Euthyreose tun. Je länger die hypothyreotische Phase postnatal angehalten wird, umso weitreichender sind die Störungen des Reifungsprozesses des Innenohrs. Die Verschlechterung der Hörschwellen in Abhängigkeit der postnatalen hypothyreotischen Phase (s. Abb. 3.12) korreliert mit dem Ausmaß der postnatalen Entwicklungshemmung in der Cochlea. Wie in der o.g. Abbildung ersichtlich sind die entscheidenden Entwicklungstage die ersten zwölf postnatalen. Die Euthyreose danach erwirkt zwar eine morphologische Nachreifung und Innervation (s. Abschnitt 4.3 und 4.4), jedoch reicht offensichtlich diese Nachreifung nicht aus, um den erlittenen Schaden der Entwicklung in mehr als in Ansätzen auszugleichen. Es ist zu fordern beziehungsweise zu bedenken, dass die interzellulären (z.B. axosomatische in axodendritische) und intrazellulären (z.B. Zytoskelett (Poddar et al., 1996)) Umbauvorgänge in den neuronalen und nicht-neuronalen Strukturen der Cochlea der ersten postnatalen 12 Tagen nicht nachträglich oder verzögert ablaufen können. Die geforderten Strukturunterschiede müssen mit anderen Methoden als den bisher durchgeführten untersucht werden.

Ob nur bestimmte Frequenzbereiche oder ob die gesamte Schallempfindung durch die Hypothyreose beeinträchtigt sind, lässt sich mit der Klick-BERA nicht eruieren. Die Schwellenmessung mit der Klick-BERA liefert uns nur einen Blick auf die Funktion der Gesamtochlea ohne die Frequenzbereiche einzeln zu betrachten. Deshalb wurde die Analyse mit der frequenzabhängigen BERA durchgeführt

4.5. ROLLE DES POSTNATAL BEGRENZTEN HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE HÖRFUNKTION

(s. Abb. 3.18).

In der frequenzabhängigen BERA (fa-BERA) findet sich eine näherungsweise gleichmäßige Verschlechterung der Schwelle über alle Frequenzen, insbesondere im Bereich des besten Hörens bei der Ratte (ab 12–16 kHz). Falls bei den nur postnatal hypothyreoiden Tieren lediglich umschriebene Bereiche der Cochlea durch die Hypothyreose affiziert worden wären, so würde sich entweder die Hörkurve abschnittsweise mit der Hörkurve der Kontrolle decken oder abschnittsweise von dieser divergieren. Das geschieht jedoch nicht. Technikbedingt konnten die Potentiale nur bis 32 kHz abgeleitet werden und nicht über das gesamte Hörspektrum. Ferner ist im Vergleich zur Klick-BERA bei der fa-BERA erkennbar, dass die gemessenen Hörschwellen bestenfalls bei etwa 32 dB liegen. Bei der Klick-BERA liegen sie bei etwa 20 dB. Das liegt nicht daran, dass die Tiere bei der fa-BERA generell schlechter hören, sondern weil bei der Klick-BERA ein breites Frequenzspektrum als Stimulus gegeben wird. Durch das breite Frequenzspektrum wird eine große Zahl von Neuronen stimuliert. Bei der BERA wird wie bei anderen neuronalen Potentialableitung (z.B. das EEG) allgemein die Summe von neuronalen Potentialen gemessen. Durch die Stimulation einer größeren neuronalen Population mit demselben Schalldruckpegel, in diesem Falle Click verglichen mit einer diskreten Frequenz, heben sich die charakteristischen Wellen früher von der uncharakteristischen Wellensumme ab als die Stimulation einer kleineren Gruppe. Durch diese Ausführungen erklärt sich die Differenz des besten Hörens zwischen der Click- und fa-BERA.

Bei Betrachtung der weiteren Ergebnisse der BERA, und zwar der Latenzen, ergeben sich weitere interessante Aspekte. Sowohl bei den Absolut-, als auch bei den Interpeak-Latenzen zeigte sich, dass durch die Thyroidhormondeprivation in den wenigen Tagen postnatal keine signifikanten Latenzveränderungen vorhanden sind. Die Latenzunterschiede zeigen sich insbesondere bei Betrachtung der III. und IV. Latenz und der Interpeaklatenzen I–III und I–IV. Die Un-

terschiede betreffen die bis mindestens pn8 hypothyroid gehaltenen Tiere und sind besonders gut an den Werten bei 70 und 80 dB erkennbar (z.B. Abb. 3.15 und 3.16). Insbesondere die Latenzen bei der MMI-Gabe bis pn60 heben sich von der Gruppe anderer dadurch ab, dass alle Absolut- und Interpeaklatenzen deutlich verzögert sind. Die Verzögerung wird möglicherweise durch eine verminderte Myelinisierung des VIII. Hirnnerven oder weiter zentraler auditorischer Bereiche verursacht. Es gibt Berichte, die die Möglichkeit unterstützen, dass ein Teil des Myelinisierungsprozesses schilddrüsenhormonabhängig ist (Oppenheimer et al., 1994). Ferner konnte bereits beobachtet werden, dass die Myelingenexpression im intraduralen Anteil des N. vestibulocochlearis zeitgleich mit und/oder vor Beginn der cochleären Funktion stattfindet. Um pn12, an dem die cochleäre Funktion beginnt, wird das Maximum der Myelingenexpression erreicht (Knipper et al., 1998). Diese schilddrüsenhormonabhängige Myelingenexpression könnte als Auftakt für die weitere zentrale Reifung des auditorischen Systems angesehen werden. Unter anderem könnte dies die Zunahme der Myelinscheiden und Reifung der zentralen Synapsen und Dendriten beinhalten (Shah et al., 1978; Eggermont et al., 1991; Moore et al., 1995). Tatsächlich wird von mehreren Stellen die Annahme unterstützt, dass für die physiologische Reifung zentraler auditorischer Regionen eine in engem Zeitrahmen stattfindende cochleäre Funktionsaufnahme, folglich (d.h. erste Höreindrücke) immens wichtig ist (Walger et al., 1993; Ptok und Ptok, 1988).

Nach Rubel (1978) und Shah et al. (1978) beginnt an pn12 bei den Ratten die Hörfunktion. Am selben Tag endet die schilddrüsenhormonabhängige Zeit der Cochlea (Knipper et al., 1999). Mit folgenden Voraussetzungen lässt sich pn12 bei der Ratte auf den Entwicklungszeitpunkt beim Menschen übertragen. Als ersten Punkt kennt man den Grad der cochleären Reife bei der Ratte¹ und beim Men-

¹Lavigne-Rebillard und Pujol (1987)

4.5. ROLLE DES POSTNATAL BEGRENZTEN HYPOTHYREOIDISMUS AUF DIE HÖRFUNKTION

schen². Als weiterer Punkt ist der Zeitpunkt bekannt, an dem man zum ersten Mal als Zeichen des cochleären Funktionbeginns Hirnstammpotentiale bei der Ratte³ und beim Menschen⁴ ableiten kann. Daraus lässt sich folgern, dass im Sinne der Reife des auditorischen Systems pn12 bei der Ratte ungefähr der 29. Schwangerschaftswoche beim menschlichen Embryo entspricht. So müsste bei einer hypothyreoten Mutter eine optimale Substitutionstherapie (Jodid plus L-Thyroxin) bereits vor der 29. Embryonalwoche zur möglichsten Verhinderung einer Fehlentwicklung der Schallempfindung des Kindes erfolgreich sein. Aus dem Grund des absehbaren Erfolges zum Vorteil der kindlichen Schallempfindung sollte die Substitutionstherapie der Mutter überdacht werden. Die momentanen empfohlenen Serumspiegel für Jodid und die Schilddrüsenhormone in der Schwangerschaft auch ohne Vorliegen einer Schilddrüsenerkrankung könnten neu überdacht werden, da bereits durch einen kurzfristigen Schilddrüsenhormondefizit im empfindlichen Zeitfenster die Hörentwicklung in verschiedenster Ausprägung gestören sein kann. Das Zeitfenster ist zwischen dem Beginn der kindeseigenen Schilddrüsenhormonproduktion in der etwa 11. Schwangerschaftswoche und dem Zeitpunkt der ersten ableitbaren akustisch evozierbaren Hirnstammpotentialen zu sehen (etwas 29. Woche (Moore et al., 1995)).

Manche Erbkrankheiten mit einer Schilddrüsenunterfunktion gehen mit einer Hörstörung oder Nicht-Entwicklung des Gehörs einher. Bei den betroffenen Patienten fanden sich jedoch oftmals morphogenetisch regelrecht ausgebildete Cochleae mit regelrechter Innervation (Green et al., 1988; Utiger, 1995; O'Malley Jr. et al., 1995; Biebermann et al., 1997). Nach zeitlich begrenzter Hypothyreose im postnatalen Alter konnte auch in dieser Arbeit in weitesten Teilen unauffällige Morphologie der Cochlea mit Innervation vorgefunden werden. Deshalb verdie-

²Johansson et al. (1964); Moore et al. (1995)

³Jewett und Romano (1972); Geal-Dor et al. (1993); He et al. (1994)

⁴Starr et al. (1977); Birnholz und Benacerral (1983); Bonfils et al. (1988); Ponton et al. (1996)

nen genetische oder erworbene Krankheiten, die in Zusammenhang mit einer Hypothyreose⁵ stehen und bei der die Schallempfindung in verschiedenster Ausprägung gestört sein kann, eine besondere Aufmerksamkeit.

⁵Trotter (1960); Refetoff et al. (1967); Meyerhoff (1980); Oppenheimer et al. (1994); Bernal und Nunez (1995); Biebermann et al. (1997)

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone sind essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung verschiedenster Körperfunktionen und Organe. Durch Schilddrüsenhormon-Mangel, Hypothyreose, kann Taubheit, mentale Retardation und Minderwuchs hervorgerufen werden. In der kritischen Entwicklungsperiode des Hörorgans, die mit dem Beginn der Hörfunktion endet, im Menschen ungefähr zwischen der zehnten und zwanzigsten embryonalen Woche, in Nagetieren wie Ratte und Maus zwischen der Geburt und dem postnatalen Tag 12, erfährt das Hörorgan einen terminalen Reifungsprozess, der insbesondere die synchrone morphogenetische, neuronale und zelluläre Differenzierung des Cortischen Organs umfasst. Durch Hypothyreose lässt sich im kritischen Zeitfenster der Innenohrentwicklung unwiderruflich die Reifung zum auditorisch funktionsfähigen sensorischen Organ hemmen. Die Hemmung erfolgt nicht nach dem Schalter-Prinzip, sondern kann von einer geringen Minderung des Hörvermögens bis hin zum Grad der Taubheit reichen. Bei den untersuchten Tieren (hypothyroide postnatale und adulte Ratten) wurden im Vergleich zu Kontrolltieren mit normalem Schilddrüsenhormonspiegel sowohl morphologische, neuronale als auch funktionelle Störungen nachgewiesen. Der Grad der Störung ist abhängig von der Zeitdauer der Hypothyreose während der kritischen Entwicklungsperiode vor Hörfunktionsbeginn.

Die morphogenetische Umgestaltung des immaturren Kölliker'schen Organs zum adulten Cortischen Organ findet bei den untersuchten hypothyreoiden Ratten nicht statt. Die Abwesenheit von Schilddrüsenhormon führt zur Persistenz des

großen epithelialen Wulstes. Die Bildung des inneren Sulcus aus dem großen epithelialen Wulst ist entwicklungsphysiologisch eine Lumenbildung, wie sie während der Organogenese auch in anderen Systemen stattfindet. Sowohl im Innenohr als auch in anderen Organen wird Apoptose (programmierter Zelltod) als Ursache für das Verschwinden von Zellen angesehen. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass genau an der Stelle, an der im großen epithelialen Wulst zum ersten Mal eine Einstülpung zu beobachten ist, der niedrig affine Neurotrophinrezeptor p75NGFR nachweisbar ist, der in neuronalen Zellen Zelltod verursachen kann.

In der kritischen Entwicklungsperiode vor Hörfunktionsbeginn - parallel zum Anstieg des Thyroidhormon-Blutspasmaspiegels - kommt es zur Ausprägung des finalen Phänotyps der inneren und äußeren Haarzellen. Dieser Prozess schließt u.a. die Reorganisation von neuronalen Projektionen und die Ausprägung des adulten Innervationsmusters ein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der neuronale Reorganisationsprozess durch Thyroidhormon massiv beeinflusst wird. In Abwesenheit von Thyroidhormon persistiert das immatue Innervationsmuster und eine immature Verteilung von Glutamatrezeptoren.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus demonstriert, dass das Schilddrüsenhormon für die Entwicklung einer normalen Hörfunktion nur während einer kritischen Phase zwischen dem Beginn der Schilddrüsenfunktion und dem Beginn der Hörfunktion essentiell ist. Je länger die Schilddrüsenhormon-freie Periode in dieser kritischen Entwicklungsphase des Innenohres andauert, desto schwerwiegender ist die Hörstörung. Zuerst ist nur die Hörschwelle betroffen, dann fällt die aktive Cochleamechanik aus und schließlich verlangsamt sich die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung in höher zentralwärts gelegene auditorische Kerngebiete (Knipper et al., 2000).

Das Ende der kritischen auditorischen Entwicklungsphase bei der Ratte am postnatalen Tag 12 ist im Sinne der auditorischen Reife beim Menschen auf etwa

die 29. Schwangerschaftswoche festzusetzen. Bei Vorliegen einer Hypothyreose während der Schwangerschaft ist es für die physiologische Entwicklung der Cochlea immens wichtig, dass eine entsprechende Substitutionstherapie (Jodid, L-Thyroxin) der Mutter bereits deutlich vor der 29. Schwangerschaftswoche begonnen wird. Ähnlich schwerwiegende Gefahren für die Entwicklung des Gehörs des werdenden Kindes bergen Erbkrankheiten, die mit einer Hypothyreose einhergehen. Aus diesem Grund verdienen in Zukunft diese Krankheiten eine besondere Aufmerksamkeit, damit die Gefahr der Entwicklungsstörung des auditiven Systems minimiert wird und die geborenen Kinder im gleichen Maße wie gesunde Kinder verbal kommunizieren können.

Literaturverzeichnis

- Abe H., Wataya H., Amano O. und Kondo H. 1991. Localization of nerve growth factor receptor in developing inner ear of rats. *Acta Otolaryngologica* 111(4):691–698.
- Alvarez-Dolado M., Iglesias T., Rodríguez-Peña A., Bernal J. und Muñoz A. 1994. Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Molecular Brain Research* 27:249–257.
- Angelborg C. und Engström H. 1973. The normal organ of Corti. In: Möller A.R. (Hg.), *Basic mechanisms in hearing*, S. 125–183. Academic Press, New York.
- Anniko M., Arnold W. und Thornell L.E. 1989. Localization of the integral membrane glycoprotein synaptophysin and the surface glycoprotein Egp-34 in the embryonic and adult human inner ear. *J ORL Relat Spec* 51:221–228.
- Barinaga M. 1991. On the right track to the NGF receptor. *Science* 252:505–506.
- Barrett G.L. und Bartlett P.F. 1994. The p75 receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neurone development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6501–6505.
- Bentivoglio M. und Chen S. 1993. Retrograde neuronal tracing combined with immunocytochemistry. In: Cuello A.C. (Hg.), *Immunohistochemistry II*, S. 301–328. John Wiley & Sons.

- Berglund A.M. und Ryugo D.K. 1986. A monoclonal antibody labels tii neurons of the spiral ganglion. *Brain Res* 383:327–332.
- Berglund A.M. und Ryugo D.K. 1987. Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 255(4):560–570.
- Bernal J. und Nunez J. 1995. Thyroid hormones and brain development. *European Journal of Endocrinology* 133:390–398.
- Biebermann H., Gruters M., Schoneberg T. und Gudermann T. 1997. Congenital hypothyroidism caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *New England Journal of Medicine* 336:1390–1391.
- Bigler J. und Eisenman R.N. 1994. Isolation of a thyroid hormone-responsive gene by immunoprecipitation of thyroid hormone receptor-DNA complexes. *Molecular and Cellular Biology* 14(11):7621–7632.
- Birnholtz J.C. und Benacerral B.R. 1983. The development of fetal hearing. *Science* 222:516–518.
- Bonfils P., Uziel A. und Pujol R. 1988. Evoked otoacoustic emissions from adults and infants: clinical applications. *Acta Otolaryngol* 105:445–449.
- Brown J.N., Miller J.M., Altschuler R.A. und Nuttall A.L. 1993. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hearing Research* 70:167–177.
- Chao M.V. 1994. The p75 neurotrophin receptor. *Journal of Neurobiology* 25(11):1373–1385.
- Corey D.P. und Breakefield X.O. 1994. Transcription factors in inner ear development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:433–436.

- Corwin J.T. und Warchol M.E. 1991. Auditory hair cells— structure, function, development, and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 14:301–333.
- Crowley D.E. und Hepp-Raymond M.C. 1966. Development of cochlear function in the ear of the infant rat. *J Comp Physiol Psychol* 62:427–432.
- Cyander M. 1979. Competitive interaction in postnatal development of the kitten's visual system. In: Freeman R.D. (Hg.), *Developmental neurobiology of vision*. Plenum Press, New York.
- De Camilli P., Vitadello M., Canevini M., Zanoni R., Jahn R. und Gorio A. 1988. The synaptic vesicle proteins synapsin I and synaptophysin (protein 38) are concentrated both in efferent and afferent nerve endings of the skeletal muscle. *J Neurosci* 8:1625–1631.
- Deol M.S. 1973. An experimental approach to the understanding and treatment of hereditary syndromes with congenital deafness and hypothyroidism. *J Med Genet* 10:235.
- Deol M.S. 1976. The role of thyroxin in the differentiation of the organ of corti. *Acta Otolaryngol* 81(5–6):429.
- Despres G., Hafidi A. und Romand R. 1991. Immunohistochemical localization of nerve growth factor receptor in the cochlea and in the brainstem of the perinatal rat. *Hearing Res* 52(1):157–166.
- Devoto S.H. und Barnstable C.J. 1986. SVP38: a synaptic vesicle protein whose appearance correlates closely with synaptogenesis in the rat nervous system. *Ann NY Acad Sci* 493:493–496.
- Echteler S.M. 1992. Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(14):6324–6327.

- Echteler S.M., Arjamand E. und Dallos P. 1989. Developmental alterations in the frequency map of the mammalian cochlea. *Nature* 341:147–149.
- Edelman G.M. 1979. Group selection and phase re-entrant signaling: a theory of higher brain function. In: *The neurosciences, fourth study program*, S. 1115–1139. MIT Press, Cambridge MA, USA.
- Eggermont J.J., Ponton C.W., Coupland S.G. und Winkelaar R. 1991. Maturation of the traveling-wave delay in the human cochlea. *J Acoust Soc Am* 90:288–298.
- Elgoyhen A.B., Johnson D.S., Boutler J., Vetter S.W. und Heinemann S. 1994. $\alpha 9$: An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705–715.
- Emmerling M.R., Sobkowicz H.M., Levenick C.V., Scott G.L., Slapnick S.M. und Rose J.E. 1990. Biochemical and morphological differentiation of acetylcholinesterase-positive efferent fibers in the mouse cochlea. *J Electron Microscop Tech* 15:123–143.
- Figueiredo B.C., Otten U., Strauss S., Volk B. und Maysinger D. 1993. Effects of perinatal hypo- and hyperthyroidism on the levels of nerve growth factor and its low-affinity receptor in cerebellum. *Developmental Brain Research* 72:237–244.
- Freeman S., Geal-Dor M., Shimoni Y. und Sohmer H. 1993. Thyroid hormone induces earlier onset of auditory function in neonatal rats. *Hearing Research* 69:229–235.
- Furusaka A., Nishiyama M., Nishimaki H., Ogasawara Y., Tamemoto H., Yamauchi T., Tobe K., Kadowaki T. und Tanaka T. 1995. Ornithine decarboxylase induction

- during liver regeneration in IRS-1-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216(1):284–290.
- Geal-Dor M., Freeman S., Li G. und Sohmer H. 1993. Development of hearing in neonatal rats: Air and bone conducted ABR thresholds. *Hearing Research* 69:236–242.
- Gil-Loyzaga P. und Pujol R. 1988. Synaptophysin in the developing cochlea. *Int J Dev Neurosci* 6:55–60.
- Green R.P., Birkenmeier E.H., Beamer W.G., Maltais L.J. und Gordon J.I. 1988. The hypothyroid (hyt/hyt) mouse: A model system for studying the effects of thyroid hormone on developmental changes on gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 85:5592–5596.
- Guinan J., Warr W.B. und Norris B.E. 1983. Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 221:358–370.
- Hafidi A. und Romand R. 1989. First appearance of type II neurons during ontogenesis in the spiral ganglion of the rat. An immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 48:143–149.
- 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.
- Hayashi M. und Araki T. 2002. Caspase in renal development. *Nephrol Dial Transplant* 17(9):8–10.
- He D.Z., Evans B.N. und Dallos P. 1994. First appearance and development of electromotility in neonatal gerbil outer hair cells. *Hearing Research* 78:77–90.

- Hensen V. 1863. Zur morphologie der schnecke des menschen und der säugetiere. *Z Wiss Zool* 13:481.
- Hinojosa R. 1977. A note on development of Corti's organ. *Acta Otolaryngologica* 84:238–251.
- Hume R.I., Role L.W. und Fischbach G.D. 1983. Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* 305:632–634.
- Ichikawa M., Kimura-Kuroda J., Yasui K. und Kuroda Y. 1991. Expression of synaptophysin during synapse formation between dissociated cortical neurons. *Neurosci Res* 12:452–458.
- Jewett D.L. und Romano M.N. 1972. Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Research* 36:101–115.
- Johansson B., Wedenberg E. und Westin B. 1964. Measurement of tone response by the human fetus. *Acta Otolaryngol Stockh* 57:188–192.
- Kiang N.Y.S., Liberman M.C., Gage J.S., Northrop C.C., Dodds L.W. und Oliver M.E. 1984. Afferent innervation of the mammalian cochlea. In: Boris L., Keynes R.D. und Maddrell S.H.P. (Hg.), *Comparative Physiology of Sensory Systems*, S. 143–161. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kiang N.Y.S., Rho J.M., Northrop C.C., Liberman M.C. und Ryugo D.K. 1982. Hair cell innervation by spiral ganglion cells in adult cat. *Science* 217:175–177.
- Kikuchi K. und Hilding D.A. 1965. The development of the organ of Corti in the mouse. *Acta Otolaryngol Stockh* 60:207–222.

- Klein R., Martin-Zanca D., Barbacid M. und Parada L. 1990. Expression of the tyrosine kinase gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109:845–850.
- 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.
- Knipper M., Gestwa L., Ten Cate W.J., Lauterbach J., Brugger H., Maier H., Zimmermann U., Rohbock K., Köpschall I., Wiechers B. und Zenner H.P. 1999. Distinct thyroid hormone-dependent expression of *trkB* and $p75^{NGFR}$ in nonneuronal cells during the critical TH-dependent period of the cochlea. *J Neurobiol* 38(3):338–356.
- Knipper M., Köpschall I., Rohbock K., Köppke A.K., 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., Zimmermann U., Köpschall I., Rohbock K., Jüngling S. und Zenner H.P. 1986. Immunological identification of candidate proteins involved in regulating active shape changes of outer hair cells. *Hearing Research* 86(1,2):100–110.
- Knipper M., Zimmermann U., Rohbock K., Köpschall I. und Zenner H.P. 1995. Synaptophysin and Gap-43 proteins in efferent fibers of the inner ear during postnatal development. *Developmental Brain Research* 89:73–86.
- Knipper M., Zimmermann U., Rohbock K., Köpschall I. und Zenner H.P. 1996. Expression of neurotrophin receptor *trkB* in rat cochlear hair cells at time of rearrangement of innervation. *Cell Tissue Res* 283:339–353.

- Knipper M., Zinn C., Maier H., Praetorius M., Rohbock K., Köpschall I. und Zimmermann U. 2000. Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems. *J Neurophysiol* 83(5):3101–3112.
- Kölliker A. 1863. Köllikers Handbuch der Gewebelehre des Menschen, Band 4, Kapitel Bau der Schnecke, S. 708. Leipzig.
- Lavigne-Rebillard M. und Pujol R. 1987. Surface aspects of the developing human organ of Corti. *Acta Otolaryngol Stockh Suppl* 436:43–50.
- Lenoir M., Shnerson A. und Pujol R. 1980. Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat Embryol* 160:253–262.
- Liberman M.C. 1980a. Efferent synapses in the inner hair cell area of the rat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:189–204.
- Liberman M.C. 1980b. Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45–63.
- Liberman M.C. und Brown M.C. 1986. Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hearing Res* 24:17–36.
- Liberman M.C., Dodds L.W. und Pierce S. 1990. Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443–460.
- Lim D.J. und Anniko M. 1985. Developmental morphology of the mouse inner ear: A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Stockh* 422:1–69.

- McPhee J.R. und Van De Water T.R. 1988. Structural and functional development of the ear. In: Jahn A.F. und Santos-Sacchi J. (Hg.), *Physiology of the Ear*, S. 221–242. Raven Press, New York.
- Meakin S.O. und Shooter E.M. 1992. The nerve growth factor family of receptors. *TINS* 15(9):323–331.
- Merchan-Perez A., Gil-Loyzaga P. und Eybalin M. 1990. Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *Int J Dev Neurosci* 8:613–620.
- Merchan-Perez A., Gil-Loyzaga P., Lopez-Sanchez J., Eybalin M. und Valderrama F.J. 1993. Ontogeny of γ -amino butyric acid in efferent fibers to the rat cochlea. *Dev Brain Res* 76(1):33–41.
- Meyerhoff W.L. 1980. Hypothyroidism and the ear: electrophysiological, morphological and chemical considerations. *Laryngoscope* 89(10 Pt 2 Suppl 19):1–25.
- Middlemas D.S., Lindberg R.A. und Hunter T. 1991. TrkB, a neuronal receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 11:143–153.
- Moore D.R. 1985. Postnatal development of the mammalian central auditory system and the neural consequences of auditory deprivation. *Acta Otolaryngol* 421:19–30.
- Moore J.K., Perazzo L.M. und Braun A. 1995. Time course of axonal myelination in the human brainstem auditory pathway. *Hear Res* 87:21–31.
- Nadol Jr. J.B., Cho J.B., Burges B.J. und Adams J.C. 1993. The localization of synaptophysin in the organ of Corti of the human as shown by immunoelectron microscopy. *Acta Otolaryngol Stockh* 113:312–317.

- O'Malley Jr. B.W., Li D. und Turner D.S. 1995. Hearing loss and cochlear abnormalities in the congenital hypothyroid (hyt/hyt) mouse. *Hearing Research* 88:181–189.
- Oppenheimer J.H., Schwartz H.L. und Strait K.A. 1994. Thyroid hormone action 1994: the plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130:15–24.
- Pasic T.R. und Rubel E.W. 1989. Rapid changes in cochlear nucleus cell size following blockade of auditory nerve electrical activity in gerbils. *The Journal of Comparative Neurology* 283:474–480.
- Pator R., Bernal J. und Rodríguez-Peña A. 1994. Unliganded c-erbA/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* 9:1081–1089.
- Perkins R.E. und Morest D.K. 1975. A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski optics. *J Comp Neurol* 163(2):129–158.
- Pirvola U., Arumäe U., Moshnyakov M., Palgi J., Saarma M. und Ylikoski J. 1994. Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. *Hearing Research* 75:131–144.
- Poddar R., Paul S., Chaudhury S. und Sarkar P.K. 1996. Regulation of actin and tubulin gene expression by thyroid hormone during rat brain development. *Mol Brain Res* 35:111–118.
- Ponton C.W., Eggermont J.J., Coupland S.G. und Winkelaar R. 1992. Frequency-specific maturation of the eighth nerve and brain-stem auditory pathway: Evidence from derived auditory brain-stem responses (ABRs). *J Acoust Soc Am* 91(3):1576–1586.

- Ponton C.W., Moore J.K. und Eggermont J.J. 1996. Auditory brain stem response generation by parallel pathways: differential maturation of axonal conduction time and synaptic transmission. *Ear Hear* 17:402–410.
- Poulain B., Rossetto O., Deloye F., Schiavo G., Tauc L. und Montecucco C. 1993. Antibodies against rat brain vesicle-associated membrane protein (synaptobrevin) prevent inhibition of acetylcholine release by tetanus toxin or botulinum neurotoxin type B. *Journal of Neurochemistry* 61(3):1175–1178.
- Ptok J. und Ptok A. 1988. Structural and functional development of the ear. In: Jahn A.F. und Santos-Sacchi J. (Hg.), *Physiology of the Ear*, S. 221–242. Raven Press, New York.
- Ptok J. und Ptok A. 1996. Die Entwicklung des Hörens. *Sprache Stimme Gehör*. *Sprache Stimme Gehör* 1:6–10.
- Pujol R. 1986. Synaptic plasticity in the developing cochlea. In: Ruben R.W., Van de Water T.R. und Rubel E.W. (Hg.), *The biology of change in otolaryngology*, S. 47–54. Elsevier, Amsterdam.
- Pujol R., Carlier E. und Devigne C. 1978. Different patterns of cochlear innervation during development of the kitten. *J Comp Neurol* 177:529–535.
- Pujol R., Carlier E. und Devigne C. 1979. Significance of presynaptic formations in early stages of cochlear synaptogenesis. *Neurosci Lett* 15:97–102.
- Pujol R. und Hilding D. 1973. Anatomy and physiology of the onset of auditory function. *Acta Otolaryngol* 76:1–10. (Stockh).
- Pujol R. und Lenoir M. 1986. The four types of synapses in the organ of Corti. In: Altschuler R.A., Hoffmann D.W. und Robbin R.P. (Hg.), *Neurobiology of hearing: the cochlea*, S. 161–172. Raven, New York.

- Pujol R. und Marty R. 1968. Structural and physiological relationship of the maturing auditory system. In: Jilek und Trojan (Hg.), *Ontogenesis of the brain*, S. 337–385. Charles University Press, Prag.
- Rabizadeh S., Oh J., Zhong L.T., Yang J., Bitler C.M., Butcher L.L. und Bredesen D.E. 1993. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261:345–348.
- Radeke M.J., Misko T.P., Hsu C., Herzenberg L.A. und Shooter E.M. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325:593–597.
- Rauber A. und Kopsch F. 1994. In: Leonhardt H., Töndury G. und Zilles K. (Hg.), *Anatomie des Menschen, Band III Nervensystem, Sinnesorgane*, S. 604–646. Thieme, Stuttgart.
- Refetoff S., De Wind L.T. und De Grott L.J. 1967. Familiar syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormal high PBT: possible target organ refractoriness to thyroid hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 27:279–294.
- Robertson D., Harvey A.R. und Cole K.S. 1989. Postnatal development of the efferent innervation of the rat cochlea. *Dev Brain Res* 47:197–207.
- Romand M.R. und Romand R. 1987. The ultrastructure of spiral ganglion cells in the mouse. *Acta Otolaryngol* 104:29–39.
- Roth B. und Bruns V. 1992a. Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells. *Anat Embryol* 185:559–569.
- Roth B. und Bruns V. 1992b. Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements. *Anat Embryol* 185:571–581.

- Rubel E.W. 1978. Ontogeny of structure and function in the vertebrate auditory system. In: Jacobson M. (Hg.), Handbook of sensory physiology, Band IX, Kapitel Development of sensory systems, S. 135–220. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Rueda J., De la Sen C., Juiz J.M. und Merchán J.A. 1987. Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Otolaryngol* 104:417–421.
- Saito K. 1990. Freeze-fracture organization of hair cell synapses in the sensory epithelium of guinea pig organ of Corti. *J Electron Microscop Tech* 15:173–186.
- Scarfone E., Dememes D., Jahn R., De Camilli P. und Sans A. 1988. Secretory function of the vestibular nerve calyx suggested by presence of vesicles, synapsin I and synaptophysin. *J Neurosci* 8:4640–4645.
- Scarfone E., Dememes D. und Sans A. 1991. Synapsin I and synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci* 11:1173–1181.
- Schwaber J.S., Chronwall B.M. und Lewis M.E. 1989. In Situ hybridization histochemistry combined with markers of neuronal connectivity. *Methods in Enzymology* 168:778–791.
- Shah S.N., Bhargava V.K. und McKean C.M. 1978. Maturation changes in early auditory evoked potentials and myelination of the inferior colliculus in rats. *Neurosci* 3:561–653.
- Shnerson A. und Pujol R. 1983. Development: anatomy, electrophysiology and behaviour. In: Willot J.F. (Hg.), *The physiology of the mouse*, S. 395–425. Thomas, Springfield Illinois USA.

- Simmons D. und Liberman M.C. 1988. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats. I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 270:132–144.
- Snider W.D. 1994. Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell* 77:627–638.
- Sobkowicz H.M. 1992. The development of innervation in the organ of Corti. In: Romand R. (Hg.), *Development of auditory and vestibular systems*, Band II, S. 59–100. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- Sobkowicz H.M. und Emmerling M.R. 1989. Development of acetylcholinesterase-positive neuronal pathways in the cochlea of the mouse. *J Neurocytol* 18:209–224.
- Sobkowicz H.M. und Slapnick S.M. 1994. The efferents interconnecting auditory inner hair cells. *Hear Res* 75(1–2):81–92.
- Spoendlin H. 1969. Innervation of the organ of Corti of cat. *Acta Otolaryngol Stockh* 67:238–254.
- Spoendlin H. 1978. The afferent innervation of the cochlea. In: Naunton R.F. und Fernandez C. (Hg.), *Evoked Electrical Activity Of The Auditory Nervous System*, S. 21–41. Academic Press, New York.
- Starr A., Amili R.N., Martin W.H. und Sanders S. 1977. Development of auditory function in newborn infants revealed by auditory brainstem potentials. *Pediatrics* 60:831–839.
- Sun F., Akazawa S., Sugahara K., Kamihira S., Kawasaki E., Eguchi K. und Koji T. 2002. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. *Arch Histol Cytol* 65:145–157.

- Sun Y.A. und Poo M.M. 1987. Evoked release of acetylcholine from the growing embryonic neuron. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2540–2544.
- Taylor J. und Gordon-Weeks P.R. 1989. Developmental changes in the calcium dependency of γ -amino butyric acid release from isolated growth cones: correlation with growth cone morphology. *J Neurochem* 53:834–843.
- Taylor J. und Gordon-Weeks P.R. 1991. Calcium-independent GABA release from GABAergic growth cones: role of GABA transport. *J Neurochem* 56:273–280.
- Trotter N.R. 1960. The association of deafness with thyroid dysfunction. *Brit Med Bull* 16:92–98.
- Tsoufas P., Soppet D., Escandon E., Tessarollo C., Mendoza-Ramirez J.L., Rosenthal A., Nikolics K. und Parada L.F. 1993. The rat *trkC* locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC-12 cells. *Neuron* 10:975–990.
- Utiger R.D. 1995. Thyreotropin-receptor mutations and thyroid dysfunction. *New England Journal of Medicine* 332(3):183–185.
- Uziel A. 1986. Periods of sensitivity to thyroid hormone during the development of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 429:23–27.
- Uziel A., Gabrion J., Ohresser M. und Legrand C. 1981. Effects of hypothyroidism on the structural development of the organ of Corti in the rat. *Acta Otolaryngol* 92:469–480.
- Uziel A., Legrand C., Ohresser M. und Marot M. 1983a. Maturational and degenerative processes in the organ of Corti after neonatal hypothyroidism. *Hearing Research* 11:203–218.

- Uziel A., Legrand C. und Rabie A. 1985. Corrective effects of thyroxine on cochlear abnormalities induced by congenital hypothyroidism in the rat. I. morphological study. *Developmental Brain Research* 19:111–122.
- Uziel A., Pujol R., Legrand C. und Legrand J. 1983b. Cochlear synaptogenesis in the hypothyroid rat. *Developmental Brain Research* 7:295–301.
- von Bartheld C.S., Patterson S.L., Heuer J.G., Wheeler E.F., Bothwell M. und Rubel E.W. 1991. Expression of nerve growth factor (NGF) receptors in the developing inner ear of chick and rat. *Development* 113:455–470.
- Walger M., Laska M., Schneider I., Diekmann H. und von Wedel H. 1993. Maturation of auditory evoked potentials in young guinea pigs with binaural conductive hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250:362–365.
- Warr W.B. 1975. Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport of acetylcholinesterase histochemistry. *J Comp Neurol* 161:159–182.
- Whitehead M.C. 1986. Development of the cochlea. In: Altschuler R.A., Bobbin R.P. und Hoffman D.W. (Hg.), *Neurobiology of hearing: the cochlea*, S. 191–211. Raven, New York.
- Wiechers B., Gestwa G., Mack A., Carroll P., Zenner H.P. und Knipper M. 1999. A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *The Journal of Neuroscience* 19(8):3033–3042.
- Wiedemann B. und Franke W.W. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M_r 38000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017–1028.

Yamashita T., Amano H. und Kumazawa T. 1993. Efferent neurotransmitters and intracellular Ca^{2+} concentrations in inner hair cells of guinea pig. ORL 55:201–204.

Zenner H.P. 1988. Motility of outer hair cells as an active, actin-mediated process. Acta Otolaryngol 105:39–44.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Marlies Knipper. Sie stand immer freundlich, kritisch und aufgeschlossen zur Seite. Ihre positive Motivationskraft war unerschöpflich. In Situationen, aus denen man selbst kein Ausweg gesehen hat, erschloss sie oft gleich mehrere Möglichkeiten zur Lösung des Problems.

Mein nächster Dank gilt Frau Dr. Ulrike Zimmermann. Ihre Beratungskraft und tatkräftige Hilfe im Labor kann ich nicht zu Genüge würdigen.

Ich danke Iris Köppschall. Ihre verschieden gefärbten histologischen Schnitte waren ausgezeichnet. Ich danke Karin Rohbock. Die Cryo-Schnitte, die sie angefertigt hat, waren immer perfekt.

Ferner danke Frau Prof. Dr. Knipper, Frau Dr. Zimmermann, Frau Köpschall, Frau Rohbock, Frau Dr. Barbara Wiechers und Frau Dr. Glikeria Gestwa für die geduldige Anleitung der notwendigen Techniken und Protokolle, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Privatdozent Dr. Markus Müller für die Anleitung und Arbeit an der frequenzspezifischen BERA. Ferner bedanke ich mich bei Frau Christina Uysal für die hervorragenden Abzüge der Fotografien.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Frau bedanken. Sie standen stets liebevoll, unterstützend und motivierend mir zur Seite.

Lebenslauf

Name: Mete Cirali
Geburtsdatum: 11. Juli 1971
Geburtsort: Reutlingen in Baden-Württemberg
Familienstand: verheiratet
Staatsbürgerschaft: deutsch

Schule / Studium / Promotionsarbeit

1982 – 1991 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Pfullingen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

1991 – 05.1998 Studium für Humanmedizin an der Universität Tübingen

04.1997 – 07.1997 PJ-Auslandsabschnitt Chirurgie an der Medizinischen Fakultät Cerrahpaşa der Universität von Istanbul in Istanbul, Türkei

20.05.1998 Erfolgreicher Abschluss des Studiums

05.1998 – 10.1999 Promotionsarbeit an der HNO-Hörforschung, Tübingen
Thema der Arbeit: Identifizierung und Charakterisierung thyroïd hormonabhängiger Prozesse während der kritischen Entwicklungsperiode des Innenohrs

Berufstätigkeit und Weiterbildung

11.1999 – 04.2001 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der HNO-Klinik des Helios Klinikums Berlin-Buch

seit 08.2001 Tätigkeit als Assistenzarzt in der HNO-Klinik des Katharinenhospitals Stuttgart