

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und
ästhetische Operationen**

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

**Spatio-temporale Distribution der Tubuline und Tubulin spezifischen Chaperone
im sensorischen Epithel der murinen Cochlea**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lukas Julian Christoph Jürgens

aus Düsseldorf

Würzburg, Mai 2019



Referent/Referentin: Priv. Doz. Dr. med. Kristen Rak

Korreferent: Prof. Dr. Michael Sendtner

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2020

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern und Patricia

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Das Zytoskelett.....	2
1.2.1	Tubulin-Synthese und Heterodimer-Dissoziation.....	4
1.2.2	Posttranslationale Modifikationen von Tubulin.....	8
1.2.3	Tubulin-Isotypen.....	12
1.3	Das Innenohr.....	13
1.3.1	Anatomie.....	13
1.3.2	Eigenschaften und Entwicklung der Zellen des Corti-Organ.....	17
1.4	Mikrotubuli im cortischen Organ.....	22
1.4.1	Das Zytoskelett im adulten Corti-Organ.....	22
1.4.2	Expressionsmuster der Mikrotubuli im Verlauf der postnatalen Entwicklung in Gerbil (Hallworth, McCoy et al. 2000).....	23
1.4.3	Posttranslationale Modifikationen im Verlauf der postnatalen Entwicklung im Gerbil (Tannenbaum and Slepecky 1997).....	25
1.4.4	Beta-Tubulin-Isotypen im Verlauf der postnatalen Entwicklung im Gerbil (Hallworth and Luduena 2000, Jensen-Smith, Eley et al. 2003).....	27
1.5	Zielsetzung.....	29
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Material.....	30
2.1.1	Technische Geräte.....	30
2.1.2	Labormaterial.....	30
2.1.3	Selbsthergestellte Chemikalien.....	31
2.1.4	Chemikalien.....	32
2.1.5	Primäre Antikörper.....	33
2.1.6	Sekundäre Antikörper.....	34
2.1.7	Tierstamm.....	34
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Präparation der murinen Cochlea und Immersionsfixation.....	35
2.2.2	Kryoeinbettung und Anfertigen von Kryoschnitten.....	36
2.2.3	Azan-Färbung nach Heidenhein (modifiziert) von Kryoschnitten.....	36
2.2.4	Immunhistochemie von Kryoschnitten.....	37
2.2.5	Präparation und Immunhistochemie von Whole Mount Präparaten des Corti-Organ.....	37
2.2.6	Mikroskopie und Aufnahmetechnik.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Posttranslationale Modifikationen.....	39
3.1.1	Tyrosiniertes Tubulin.....	39
3.1.2	Detyrosiniertes Tubulin.....	41
3.1.3	Acetyliertes Tubulin.....	43
3.1.4	Polyglutamyliertes Tubulin.....	45
3.2	TBC Proteine.....	47
3.2.1	TBCA.....	47
3.2.2	TBCB.....	49
3.2.3	TBCC.....	51

3.2.4	TBCD	53
3.2.5	TBCE.....	55
4	Diskussion	57
4.1	Posttranslationale Modifikationen	57
4.2	TBC Proteine	62
4.3	Die „multi-tubulin hypothesis“ und der „tubulin code“	63
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	67
5	Literaturverzeichnis	69
6	Abbildungsverzeichnis	82
7	Abkürzungsverzeichnis	83
	Danksagung.....	85
	Curriculum Vitae	87

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die morphologischen Veränderungen des Corti-Organs während der Entwicklung des Innenohres der Maus sind seit langer Zeit gut beschrieben. Bereits zur Geburt liegen alle Zellen des Corti-Organs vor, die auch im maturen Zustand vorhanden sind. Während der ersten 14 Lebenstage reift das Corti-Organ aus einem kaum differenzierten Gewebe ohne große morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen zu einem hochdifferenzierten Gewebe mit ausgeprägten Zell-spezifischen Funktionen und Eigenschaften heran. Die Morphologie der Zellen ändert sich nach dem 14. Lebenstag nur noch marginal. Ab dem 10. Lebenstag beginnt das Corti-Organ Schallwellen in elektrische Impulse umzuwandeln – das Hören beginnt. Eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Entwicklung des Hörvorgangs stellt die fehlerfreie Ausbildung von Mikrotubuli-Netzwerken dar.

Mikrotubuli, bestehend aus Tubulin-Heterodimeren, tragen als ein essentielles Element des Zytoskeletts zur Aufrechterhaltung der Zellform und zum regelrechten Ablauf intrazellulärer Prozesse bei. Die Verteilung der Mikrotubuli weißt in den ersten 14 Tagen große Veränderungen auf (Hallworth, McCoy et al. 2000). Mikrotubuli stellen keine homogene Gruppe dar, sondern können durch unterschiedliche Bestandteile (Tubulin-Isotypen) und posttranslationale Modifikationen verschiedene Eigenschaften aufweisen.

Die Auswirkung posttranslationaler Modifikationen wurde bereits umfassend in unterschiedlichen Geweben untersucht. Da im Corti-Organ Zellen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften direkt aneinandergrenzen, stellt es ein optimales Gewebe dar, um Zelltyp-spezifische Funktionen zu analysieren.

Ein zentraler Bestandteil der Tubulin-Synthese sind die fünf *tubulin-specific chaperone proteins* (TBC). Beispielsweise führt die Punktmutation im Gen einer dieser Cofaktoren (TBCE Gen) neben einer Motoneuronopathie (Bommel, Xie et

al. 2002) zur Ertaubung in Mäusen (Volkenstein, Brors et al. 2009). TBCE wird ausschließlich in murinen äußeren Haarzellen exprimiert. Der selektive Untergang dieser Zellen, bedingt durch die beschriebene Punktmutation, zeigt die Bedeutung des TBCE für den physiologischen Hörvorgang auf (Rak, Frenz et al. 2013).

TBC Proteine sind bis dato weitestgehend unbekannte Moleküle. Bisherige Forschungen beschränken sich vor allem auf in-vitro Experimente. Beispiele für weitere Erkrankungen in Folge von Fehlfunktionen oder Mutationen von TBC Proteinen sind Neuropathien, Retinopathie und Tumoren (Wang, Ding et al. 2005, Li, Khan et al. 2013, Zhang, Ma et al. 2013).

1.2 Das Zytoskelett

Die Zelle wurde erstmals 1838/1839 von Matthias Jacob Schleiden und Theodor Schwann als kleinste lebende Funktionseinheit des Organismus definiert (Schwann 1839) und 1855 von Robert Virchow als „die vitalen Elemente, aus denen sich die Gewebe, die Organe, die Systeme, das ganze Individuum zusammensetzen“ sowie „die eigentlichen Herde des Lebens“ bezeichnet (Virchow 1855). Sie besteht aus einem Zellkörper (Zytoplasma) und einer Zellwand (Plasmamembran). Das Zytoplasma besteht aus der Zellflüssigkeit (Zytosol) und bei Eukaryoten aus Zellorganellen und Strukturproteinen. Um ein konstantes chemisches Milieu im Inneren der Zelle gewährleisten zu können, wird eine Abschirmung gegenüber dem extrazellulären Milieu benötigt. Diese wird von der semipermeablen Plasmamembran gebildet, die auf Grund ihres Lipidcharakters für wasserlösliche Stoffe eine Diffusionsbarriere darstellt, jedoch auf Grund von Membranproteinen einen Stoffaustausch und Kommunikation mit der Umwelt ermöglichen. Um die Zellform aufrechtzuerhalten, besitzt die Zelle ein dreidimensionales Stützgerüst aus Proteinen. Die drei Hauptbestandteile des Zytoskeletts sind Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli.

Das Protein Aktin bildet kettenartige Strukturen (Aktinfilamente) und ist das quantitativ bedeutendste Protein in den meisten Zellen. Es ist an zahlreichen

Zellfunktionen beteiligt, wie z.B. der aktiven Veränderung der Zellform, Bildung von interzellulären Kontakten und Zell-Matrix-Kontakten sowie der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität von Mikrovilli und Stereozilien. So wird z.B. jedes Stereozilium von einem Aktinfilamentbündel gestützt, das im Zellapex in der Kutikularplatte, einem dichten Aktinfilamentnetzwerk, verankert ist (Chhabra and Higgs 2007, Bornens 2008, Drummond, Belyantseva et al. 2012).

Im Zellkern und im Zytoplasma finden sich des Weiteren Intermediärfilamente. Diese tragen maßgeblich zur mechanischen Stabilität der Zelle, zum Zellüberleben, zur Apoptose sowie Zellmigration bei (Dey, Togra et al. 2014).

Mikrotubuli sind tubuläre Filamente mit einem Durchmesser von 15-25nm. Sie bilden ein polares Netzwerk in jeder Zelle, welches die Grundlange für den intrazellulären Transport von Zellorganellen, Trennung und Teilung der Chromosomen während der Mitose sowie Aufrechterhaltung der Zellform (Inoue and Sato 1967, Behnke 1970, Allen, Weiss et al. 1985, Barisic and Maiato 2015) bildet. In Zellen von Säugetieren gehört Tubulin zu den am meist vorhandenen Proteinen (Francis, Newman et al. 2017). Mikrotubuli bestehen den Proteinen α - und β -Tubulin. Durch die Bindung der beiden Proteine entsteht ein Heterodimer (Bryan and Wilson 1971), welches aneinandergereiht eine Kette, genannt Protofilament, bildet. Dies wird als Polymerisation bezeichnet. Aus 13 im Kreis angeordneten Protofilamenten entsteht ein Hohlzylinder, der Mikrotubulus (Erickson 1974). Der Entstehungsort der Mikrotubuli ist das Zentrosom. In diesem, auch als Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) bekannt, werden polarisierte Mikrotubuli generiert. Das Minus-Ende befindet sich am Zentrosom, während am Plus-Ende die Polymerisation unter GTP-Verbrauch fortschreitet, so dass der Mikrotubulus in die Länge wächst (Weisenberg 1972, Mitchison and Kirschner 1984, Kellogg, Moritz et al. 1994). Diese Anordnung wird auch als „Polarität“ bezeichnet und bildet die Grundlage des zellulären Transportes und des gerichteten Wachstums von Zellfortsätzen. Der intrazelluläre Transport erfolgt durch die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) Kinesin und Dynein, die an den Mikrotubuli entlanggleiten (Baas and Lin 2011).

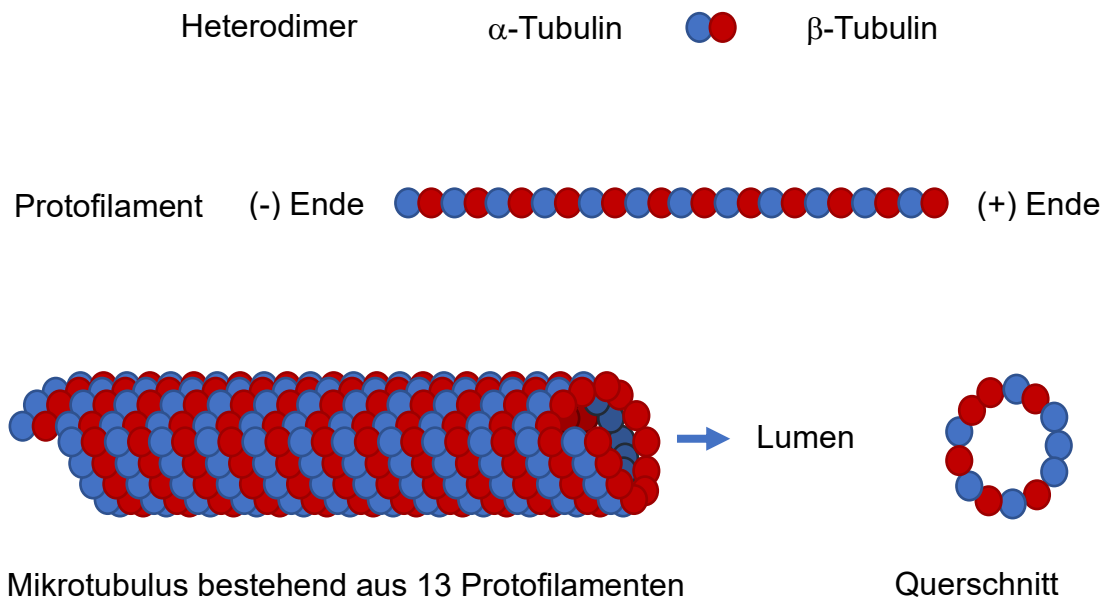


Abbildung 1 Schematische Darstellung über den Aufbau von Mikrotubuli

Am Plus-Pol findet nicht nur Polymerisation, sondern auch die Depolymerisation der Mikrotubuli statt. Der rege Wechsel der beiden Vorgänge wird als „dynamische Instabilität“ bezeichnet. Die Steuerung erfolgt durch die Bindung und Hydrolyse von GTP durch das α - und β - Heterodimer (Mitchison and Kirschner 1984). Einfluss auf den Auf- und Abbau der Mikrotubuli haben auch die Konzentration von freiem Tubulin (Walker, O'Brien et al. 1988), sowie MAPs, die durch Inhibierung der Depolymerisation zur Stabilisierung der Mikrotubuli beitragen (Bartolini, Tian et al. 2005), und die Mikrotubuli-destabilisierende Proteine, welche die Depolymerisation fördern (Cassimeris and Spittle 2001).

1.2.1 Tubulin-Synthese und Heterodimer-Dissoziation

Proteine werden als lineare Aminosäuresequenzen an Ribosomen synthetisiert. Diese nehmen während oder nach der Synthese in eine dreidimensionale Raumstruktur an. Dieser Prozess wird auch Proteinfaltung genannt, und erst, wenn die Proteine ihre endgültige Struktur angenommen haben, können sie ihre biologische Funktion ausüben. Im Inneren einer Zelle besteht auf Grund der

hohen Konzentration von zytosolischen Proteinen die Gefahr, dass neu produzierte Proteine bei diesem Prozess falsch gefaltet werden. Dies kann durch die Faltungshelferproteine unterbunden werden, zu denen auch die sogenannten Chaperone gehören. (Lübben 2009, Hartl, Bracher et al. 2011).

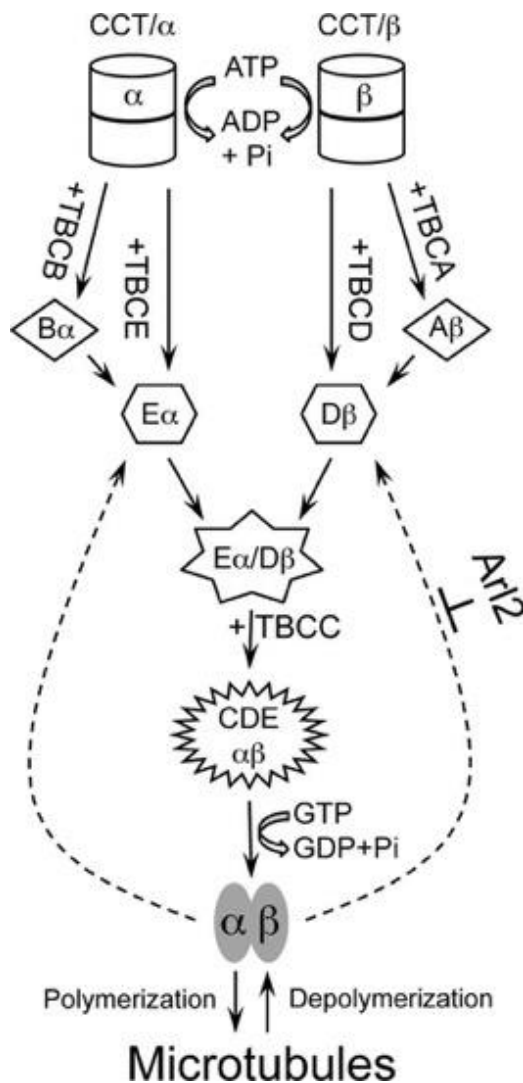


Abbildung 2 Der Ablauf der Faltungsreaktionen der Tubulin-Synthese.
 Modifizierte Abbildung aus Tian, Thomas et al. (2010)

Neu synthetisiertes alpha- und beta-Tubulin wird zunächst durch die ATP-abhängige Interaktion mit CCT (cytosolic chaperonin containing T-complex polypeptide 1) vor falscher Faltung geschützt. Um aus alpha- und beta-Tubulin

ein Heterodimer herzustellen, werden noch fünf weitere Chaperone benötigt. Diese sind die „tubulin-specific chaperone proteins“ oder „tubulin cofactors“ TBCA, TBCB, TBCC, TBCD und TBCE (Gao, Thomas et al. 1992, Archer, Vega et al. 1995, Cowan and Lewis 2001, Szymanski 2002). Bei diesen handelt es nicht um eine homogene Gruppe, sondern sie weisen jeweils unterschiedliche Strukturen auf, so dass davon ausgegangen wird, dass sie während der Tubulin-Evolution einen anderen Ursprung haben (Grynberg, Jaroszewski et al. 2003, Luduena 2013).

Die genauen Abläufe der Interaktion der Chaperone sind noch nicht vollständig geklärt (Francis, Newman et al. 2017). Ein von Tian, Huang et al. (1996) und Tian, Thomas et al. (2010) vorgeschlagenes Modell stellt sich wie folgt dar: Nach Inkorporierung von GTP und Trennung von CCT wird alpha-Tubulin von TBCB und beta-Tubulin von TBCA aufgenommen, so dass TBCB/alpha-Tubulin und TBCA/beta-Tubulin entsteht. Von diesen wird alpha-Tubulin an TBCE und beta-Tubulin an TBCD weitergereicht. Durch die Fusion der Komplexe TBCE/alpha-Tubulin und TBCD/beta-Tubulin entsteht TBCD/beta-Tubulin/TBCE/alpha-Tubulin. Sobald TBCC an diesen Superkomplex bindet, wird durch Hydrolyse von GTP die Freigabe des neugebildeten alpha-beta-Heterodimers ausgelöst. Diese Reaktion ist reversibel. Nach Interaktion mit TBCD bzw. TBCE können aus dem Dimer die alpha- und beta-Untereinheiten wieder abgespalten werden. Polymerisieren dann die Heterodimere, entsteht ein Mikrotubulus. Diese Reaktion ist ebenfalls reversibel: TBCD und TBCE können unabhängig voneinander den Heterodimer in alpha- und beta-Tubulin trennen. Arl2 (ADP-ribosylation factor-like protein 2) inhibiert die Bindung von TBCD an das alpha-beta-Tubulin-Heterodimer, sodass keine Spaltung durch TBCD möglich ist.

Francis, Newman et al. (2017) hingegen gehen davon aus, dass TBCD/ARL2/beta-Tubulin der Hauptkomplex während der Tubulin-Faltung ist. TBCB bzw. TBCE übergeben dann alpha-Tubulin an den TBCD/ARL2/beta-Tubulin-Komplex. Des Weiteren konnten sie erstmals die Existenz des TBCE/TBCB/alpha-Tubulin Komplex bestätigen (Serna, Carranza et al. 2015). In dem Falle, dass alpha-Tubulin nicht von TBCB zu TBCE transferiert und nicht

ordentlich gefaltet wird, erfolgt dessen Abbau im Proteosom (Voloshin, Gocheva et al. 2010).

Die spezifische Funktion von TBCA ist unklar. In Abwesenheit von TBCA kommt es nur zu einer sehr geringen Herstellung von Heterodimeren (Tian, Huang et al. 1996). Übereinstimmend damit wurde festgestellt, dass TBCA in vitro im Stande ist, die Effektivität der Tubulin-Synthese zu erhöhen (Fanarraga, Parraga et al. 1999). Es wird angenommen, dass der TBCA/beta-Tubulin-Komplex ein beta-Tubulin Reservoir darstellt (Archer, Vega et al. 1995, Tian, Huang et al. 1996). In vivo (HeLa Zellen und MCF-7 Zellen) führt das Silencing von TBCA zur Verminderung von löslichem alpha- und beta-Tubulin, dramatischen Veränderung der Zellform und schließlich zur Apoptose (Nolasco, Bellido et al. 2005).

Die genaue Rolle von TBCB ist auch noch nicht vollständig geklärt. In vitro wurde trotz Abwesenheit von TBCB eine kleine Menge alpha-Tubulin produziert (Tian, Lewis et al. 1997). In kultivierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Menge an alpha-Tubulin und die Stabilität nicht durch eine erniedrigte Konzentration von TBCB beeinflusst wird (Vadlamudi, Barnes et al. 2005). In zwei in-vivo Studien führte eine Überexpression von TBCB zur Depolymerisation von Mikrotubuli (Wang, Ding et al. 2005, Lopez-Fanarraga, Carranza et al. 2007). Um Mikrotubuli zu depolymerisieren, muss TBCB zunächst einen Komplex mit TBCE bilden (Carranza, Castano et al. 2013). Dieser wird durch elektrostatische Bindung geformt und nimmt nach der Dissoziation des Heterodimers das alpha-Tubulin auf (Kortazar, Fanarraga et al. 2007) In einer anderen Studie konnte kein ausgeprägter Effekt auf Mikrotubuli durch erhöhte oder erniedrigte intrazelluläre Konzentrationen von TBCB nachgewiesen werden (Kuh, Stockmann et al. 2012).

Die Überexpression von TBCD führt in HeLa Zellen hingegen zum Verlust von Mikrotubuli (Bhamidipati, Lewis et al. 2000, Martin, Fanarraga et al. 2000). Durch Zugabe von Arl2 konnte dies unterbunden werden. Arl2 inhibiert die Bindung von TBCD an den alpha-beta-Tubulin Heterodimer. Somit wird dieser nicht gespalten (Bhamidipati, Lewis et al. 2000). Neben dem Einfluss auf die Tubulin Faltung und Dissoziation wird angenommen, dass TBCD auch an der Bildung von Mikrotubuli

im Zentrosom beteiligt ist (Cunningham and Kahn 2008, Fanarraga, Bellido et al. 2010) und mit Bestandteilen der Plasmamembran interagiert (Okumura, Sakuma et al. 2015).

Die Überexpression von bovinem TBCE führt in HeLa Zellen zum Verlust von Mikrotubuli (Bhamidipati, Lewis et al. 2000). Die Interaktion von TBCE und TBCB wurde oben bereits beschrieben.

1.2.2 Posttranslationale Modifikationen von Tubulin

Posttranslationale Modifikationen (PTM) sind durch Enzyme vorgenommene chemische Veränderungen an Aminosäuren nach deren Einbau in die Proteinkette (Lübben 2009). Die Vielfalt der Vorgänge, bei denen Mikrotubuli beteiligt sind, setzen unterschiedliche Eigenschaften von Mikrotubuli voraus. PTM ermöglichen es, eine funktionelle Vielfalt von Mikrotubuli zu generieren (Hammond, Cai et al. 2008) und treten, wie in Abbildung 3 dargestellt, an unterschiedlichen Stellen an den Polypeptidketten von alpha- und beta-Tubulin auf. Durch die posttranslationalen Modifikationen entstehen Subpopulationen von Mikrotubuli, die durch die Beeinflussung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen verschiedene Eigenschaften erlangen (Verhey and Gaertig 2007). Posttranslationale Modifikationen treten überwiegend am C-Terminus von alpha- und beta-Tubulin auf, der sich an der Außenseite des Mikrotubuli-Hohlzylinders befindet und somit einen guten Zugang für MAPs bietet. Der N-Terminus hingegen liegt an der inneren Seite der Mikrotubuli. Trotz des schwierigen Zugangs sind Proteine in der Lage, auch mit posttranslationalen Modifikationen an dieser Stelle zu interagieren (Garnham and Roll-Mecak 2012, Janke 2014).

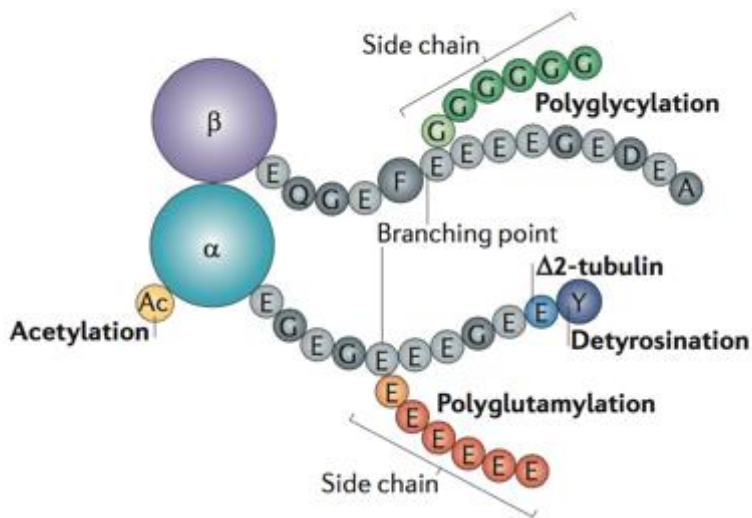


Abbildung 3 Posttranslationale Modifikationen von α - und β -Tubulin
Abbildung aus Janke and Bulinski (2011)

Nach Translation von alpha-Tubulin befindet sich am C-Terminus die Aminosäure Tyrosin (Valenzuela, Quiroga et al. 1981). Es konnte gezeigt werden, dass diese entfernt werden kann (Detyrosinierung) und wieder hinzugefügt werden kann (Tyrosinierung). Diese Reaktion ist reversibel. Detyrosinierung tritt vor allem bei Tubulin auf, das sich polymerisiert in Mikrotubuli befindet, während Tyrosinierung ausschließlich bei löslichen alpha-beta Heterodimeren stattfindet (Arce, Rodriguez et al. 1975, Hallak, Rodriguez et al. 1977, Raybin and Flavin 1977, Kumar and Flavin 1981, Janke 2014). Bei detyrosiniertem Tubulin befindet sich am Ende des C-Terminus Glutaminsäure. Durch Entfernung dieser Aminosäure entsteht $\Delta 2$ -Tubulin. Diese Reaktion ist irreversibel (Paturle-Lafanechere, Edde et al. 1991, Rudiger, Wehland et al. 1994). Wird die bei $\Delta 2$ -Tubulin sich am Ende des C-Terminus befindende Glutaminsäure enzymatisch abgespalten, entsteht $\Delta 3$ -tubulin. Es ist noch unklar, ob diese Reaktion reversibel ist und welche physiologischen Auswirkungen sie hat (Berezniuk, Vu et al. 2012, Aillaud, Bosc et al. 2016).

Die Acetylierung von alpha-Tubulin erfolgt am N-Terminus (an Lysin 40), der an der luminalen Seite der Mikrotubuli liegt, und tritt vor allem bei polymerisierten Mikrotubuli auf (L'Hernault and Rosenbaum 1985, Maruta, Greer et al. 1986,

Nogales, Wolf et al. 1998). Über die erst vor kurzem gefundene Acetylierung an Lysin 252 an beta-Tubulin ist bisher wenig bekannt (Chu, Hou et al. 2011). Der in dieser Arbeit verwendete Begriff Acetylierung bezieht sich auf die Acetylierung an Lysin 40 des alpha-Tubulins.

An der im Bereich des C-Terminus von polymerisiertem alpha- und beta-Tubulin anhängenden Glutaminsäure können aus mehreren Glutaminsäuren bestehende Seitenketten enzymatisch angehängen werden. Dieser Vorgang wird Polyglutamylation genannt und kann an tyrosiniertem wie auch detyrosiniertem Tubulin erfolgen (Edde, Rossier et al. 1990, Rudiger, Plessman et al. 1992).

Durch PTMs können Markierungen entlang der Mikrotubuli erstellt werden, die von MAPs erkannt werden und somit Feinregulierungen von zellulären Prozessen ermöglichen. Diese beinhalten u.a. Mitose, Entwicklung und Aufrechterhaltung von Neuronen und die Funktion von Zilien und Flagellen (Janke and Bulinski 2011).

Des Weiteren nehmen PTMs eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Stabilität von Mikrotubuli wahr. Sie beeinflussen die Geschwindigkeit, mit der Mikrotubuli depolymerisiert oder polymerisiert werden (Aillaud, Bosc et al. 2016).

In kultivierten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass ältere Mikrotubuli-Bündel mehr detyrosiniertes als tyrosiniertes Tubulin enthalten. Tyrosiniertes Tubulin stellt die native Form von alpha-Tubulin dar. An langlebigen Mikrotubuli haben mehr posttranslationale Modifikationen stattgefunden als an kurzlebigen (Gundersen, Kalnoski et al. 1984, Gundersen, Khawaja et al. 1987).

Das Enzym Tubulin-acetyltransferase (TAT) hat eine höhere Präferenz, den N-Terminus von in Mikrotubuli eingebautem alpha-Tubulin zu acetylieren als den von freiem, löslichem alpha-Tubulin. Die enzymatische Rate von TAT ist länger als die Lebensdauer von dynamischem Tubulin (Szyk, Deaconescu et al. 2014). Deacetylierung ist mit Depolymerisierung von Mikrotubuli verbunden (Black, Baas et al. 1989). Somit kann Acetylierung von Tubulin als Marker von stabilem Tubulin herangezogen werden, jedoch ist die genaue Auswirkung der Acetylierung weiter unklar (Janke 2014).

Khawaja, Gundersen et al. (1988) stellten fest, dass detyrosiniertes Tubulin vor allem in stabilen Mikrotubuli vorkommt. Tyrosiniertes Tubulin wird vor allem in dynamischem Tubulin gefunden (Webster, Gundersen et al. 1987). Mikrotubuli, die viel detyrosiniertes Tubulin besitzen, haben eine ATP-sensible Kappe auf dem Plus-Ende, die dieses stabilisiert (Infante, Stein et al. 2000). Detyrosinierung hemmt direkt Mikrotubuli-depolymerisierende Proteine, wie z.B. Kinesin-2, und hat somit eine stabilisierende Wirkung (Peris, Wagenbach et al. 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass tyrosinierte Mikrotubuli bis zu 2,5-fach schneller depolymerisiert werden als detyrosinierte Mikrotubuli. Dies kann durch den Einfluss von tyrosiniertem Tubulin auf Kinesin-13, einem depolymerisierenden Motorprotein, erklärt werden (Sirajuddin, Rice et al. 2014). Exemplarisch lässt sich dies in Neuronen zeigen: Tyrosinierung kann hier vor allem im Wachstumskegel von Axonen nachwiesen werden (Baas and Black 1990, Witte, Neukirchen et al. 2008). Diese Region besitzt viel dynamisches Tubulin, das für das Wachstum der Neurone notwendig ist (Tanaka, Ho et al. 1995).

Polyglutamylation (bis zu 8 Glutaminsäuren) stimuliert das Enzym Spastin (Lacroix, van Dijk et al. 2010, Valenstein and Roll-Mecak 2016), das eine Mikrotubuli spaltende Wirkung hat (Evans, Gomes et al. 2005, Roll-Mecak and Vale 2005). Valenstein and Roll-Mecak (2016) stellten die Vermutung auf, dass Polyglutamylation von Tubulin auf Katenin, ein dem Spastin eng verwandtes und ebenfalls Mikrotubuli trennendes Enzym (McNally and Vale 1993, Roll-Mecak and Vale 2005), eine ähnliche Wirkung wie auf Spastin aufweist. Dies deutet daraufhin, dass polyglutamyliertes Tubulin eher einen destabilisierenden Effekt auf Mikrotubuli hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass posttranslationale Modifikationen nicht die Eigenschaften der Mikrotubuli selbst ändern, sondern über die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen ihren stabilisierenden oder destabilisierenden Effekt entfalten.

1.2.3 Tubulin-Isotypen

Mikrotubuli sind hoch konservierte Proteine, die sich im Laufe der eukaryotischen Evolution kaum verändert haben. In Wirbeltieren existieren sieben Isotypen von alpha-Tubulin, über die nur wenig bekannt ist (Luduena 2013). Von beta-Tubulin existieren in Wirbeltieren auch sieben Isotypen, die jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden. Diese heißen: β I, β II, β III, β IVa, β IVb, β V und β VI. Die Aminosäuresequenz aller sieben beta-Tubulin-Isotypen in Säugetieren ist zu 75-96% identisch (Sullivan and Cleveland 1986, Luduena 1998). Die „multi-tubulin hypothesis“ nimmt an, dass die unterschiedlichen Tubulin-Isotypen für unterschiedliche Funktionen der Mikrotubuli benötigt werden (Fulton and Simpson 1976, Cleveland 1987). Es konnte nachgewiesen werden, dass mehrere Isotypen zur gleichen Zeit in einem Gewebe exprimiert werden, aber auch dass unterschiedliche Zelltypen eines Gewebes unterschiedliche Expressionsmuster der Isotypen aufweisen (Havercroft and Cleveland 1984, Roach, Boucher et al. 1998, Hallworth and Luduena 2000). Mikrotubuli-Polymere können aus unterschiedlichen beta-Tubulin-Isotypen zusammengesetzt sein (Lewis, Gu et al. 1987), diese haben unterschiedliche Dynamik bzw. Stabilität und binden unterschiedlich an andere Proteine (Banerjee and Luduena 1992, Banerjee, Roach et al. 1992, Panda, Miller et al. 1994). Daher wird angenommen, dass die Expression und der Einbau von unterschiedlichen Tubulin-Isotypen in Mikrotubuli hauptsächlich zwei Folgen hat: Einerseits die Beeinflussung der Mikrotubuli-Dynamik und der mechanischen Eigenschaften der Mikrotubuli selbst, andererseits durch geringe Unterschiede im C-Terminus die Beeinflussung der Interaktion mit MAPs oder/und posttranslationaler Modifikationen (Gadadhar, Bodakuntla et al. 2017)

1.3 Das Innenohr

1.3.1 Anatomie

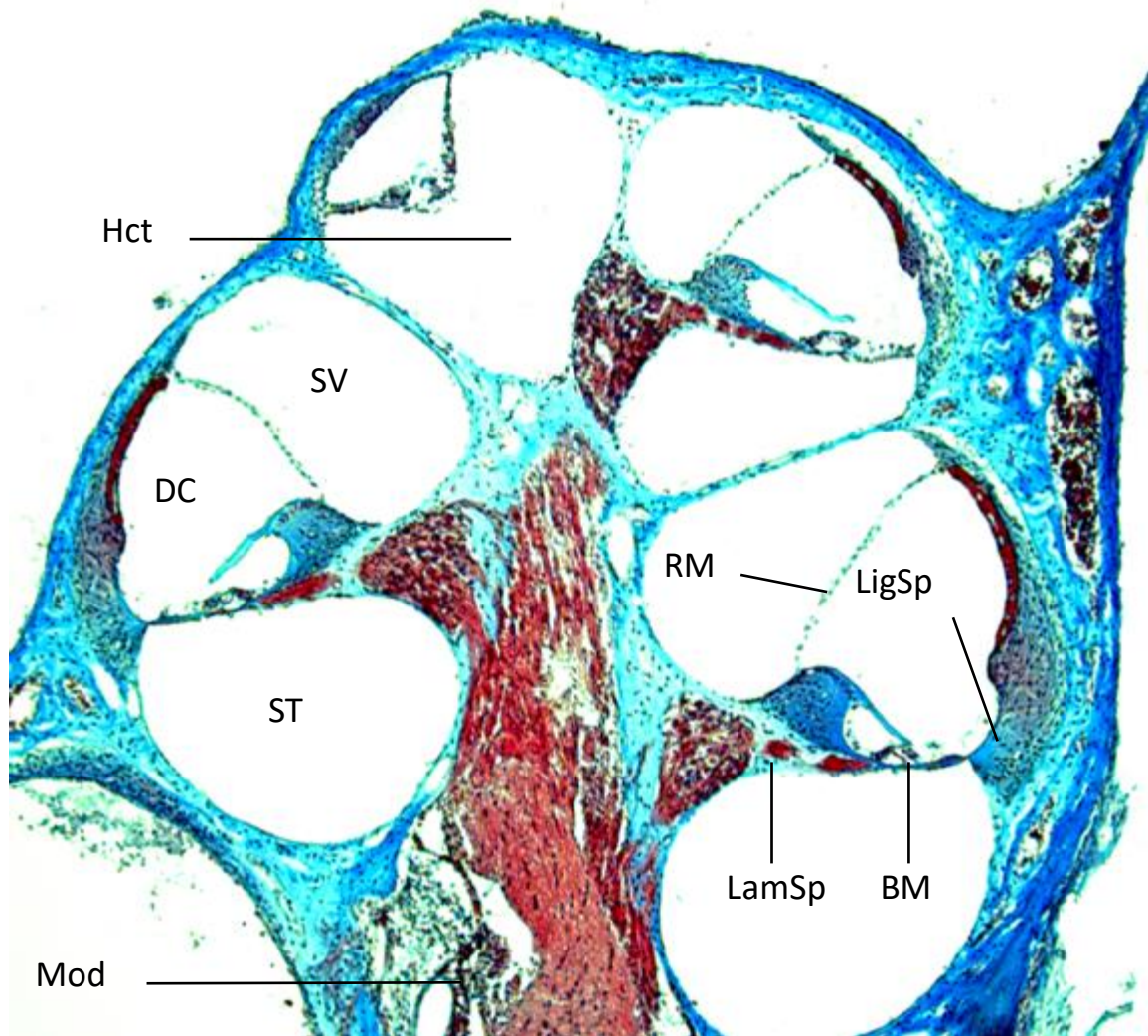


Abbildung 4 Azan-Färbung einer adulten murinen Cochlea

Scala vestibuli	SV
Scala tympani	ST
Ductus cochlearis	DC
Helicotrema	Hct
Reissner-Membran	RM
Basilarmembran	BM
Lamina spiralis	LaSp
Ganglion spirale	GSp
Ligamentum spirale	LigSp
Corti-Organ	CO
Modiolus	Mod

Das Innenohr (*Auris interna*) liegt im Felsenbein (*Pars petrosa ossis temporalis*) und besteht aus dem knöchernen und häutigen Labyrinth (*Labyrinthus osseus* und *Labyrinthus membranaceus*) sowie dem inneren Gehörgang (*Meatus acusticus internus*). Das knöcherne Labyrinth stellt ein komplexes von Knochen umgebenes Hohlraumsystem dar und besteht aus dem Vorhof (*Vestibulum*), drei knöchernen Bogengängen (*Canales semicirculares ossei*) und der knöchernen Schnecke (*Cochlea*). Hierin befindet sich das häutige Labyrinth, ein passend geformtes Schlauchsystem gefüllt mit Endolymphe. Der Raum zwischen knöchernem und häutigem Labyrinth ist mit Perilymphe gefüllt. Das Labyrinth unterteilt sich der Funktion nach in einen cochleären und vestibulären Anteil. (Drenckhahn and Waschke 2008, Schuenke 2010, Ekdale 2016)

Die Cochlea besteht aus dem knöchernen Schneckenkanal (*Canalis spiralis cochleae*), der sich um eine konische Achse (Schnecken spindle, *Modiolus*) windet, und dem häutigen Schneckenschlauch (*Ductus cochlearis*). Vom *Modiolus* entspringt die *Lamina spiralis ossea*, ein Knochenvorsprung, der sich wie eine Schraube durch die Cochlea bis zur Schnecken spitze (*Helicotrema*) dreht. Zwischen *Modiolus* und Außenwand der Cochlea ist der *Ductus cochlearis* aufgespannt. Das Dach des *Ductus cochlearis* ist die Reissner-Membran, und der Boden ist die Basilarmembran. Somit bilden sich drei Etagen: 1) die *Scala vestibuli*, die vom *Vestibulum* zum *Helicotrema* reicht, 2) die *Scala media*, die durch den *Ductus cochlearis* gebildet wird, 3) die *Scala tympani*, die vom *Helicotrema* bis zum runden Fenster (*Fenestra cochleae*) reicht. Das *Helicotrema* stellt die Verbindung zwischen *Scala vestibuli* und *Scala tympani* dar. Der *Ductus cochlearis* ist durch drei Wandabschnitte (*Paries vestibularis*, *tympanicus* und *externus*) begrenzt: Die Reissner-Membran bildet die Grenze zur *Scala vestibuli*, die Basilarmembran und der *Limbus spiralis* bilden die Grenze zur *Scala tympani*, den lateralen Wandabschnitt (*Paries externus*) bildet die *Stria vascularis* des an der Außenwand anliegenden *Ligamentum spirale* (Lüllmann-Rauch 2009, Paulsen and Waschke 2010, Schuenke 2010, Ekdale 2016).

Über das ovale Fenster (*Fenestra vestibuli*) besteht eine Verbindung zur Paukenhöhle (*Cavitas tympani*) des Mittelohres (*Auris media*). Im ovalen Fenster

befindet sich die Basis des Steigbügels (Stapes). Durch Schallwellen verursachte Schwingungen der Gehörknöchelchen (Ossicula auditus) werden so durch die Basis des Stapes auf die Perilymphe übertragen. Die so hervorgerufenen Druckwellen verlaufen entlang der Scala vestibuli und anschließend der Scala tympani und führen zu Wellenbewegungen an der Reissner- und insbesondere Basilarmembran (Drenckhahn 2004, Ekdale 2016, Sanchez and Grieco-Calub 2018).

Morphologisch weist die Cochlea unterschiedlicher Spezies deutliche Variationen auf, so besitzt beispielsweise die des Meerschweinchen eine deutliche höhere Anzahl an Windungen als die der Maus (Ekdale 2013).

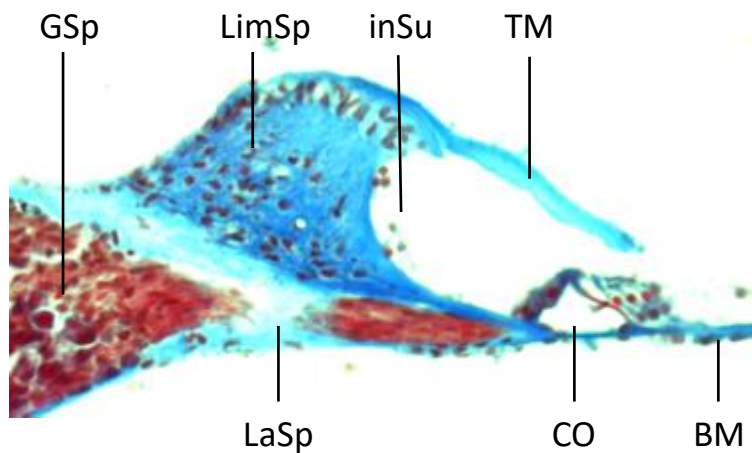


Abbildung 5 Azan-Färbung des medialen Anteils der Paries tympanicus des Ductus cochlearis einer murenen Cochlea

Ganglion spirale	GSp
Lamina spiralis	LaSp
Limbus spiralis	LimSp
innerer Sulkus	inSu
Tektorialmembran	TM
Corti-Organ	CO
Basilarmembran	BM

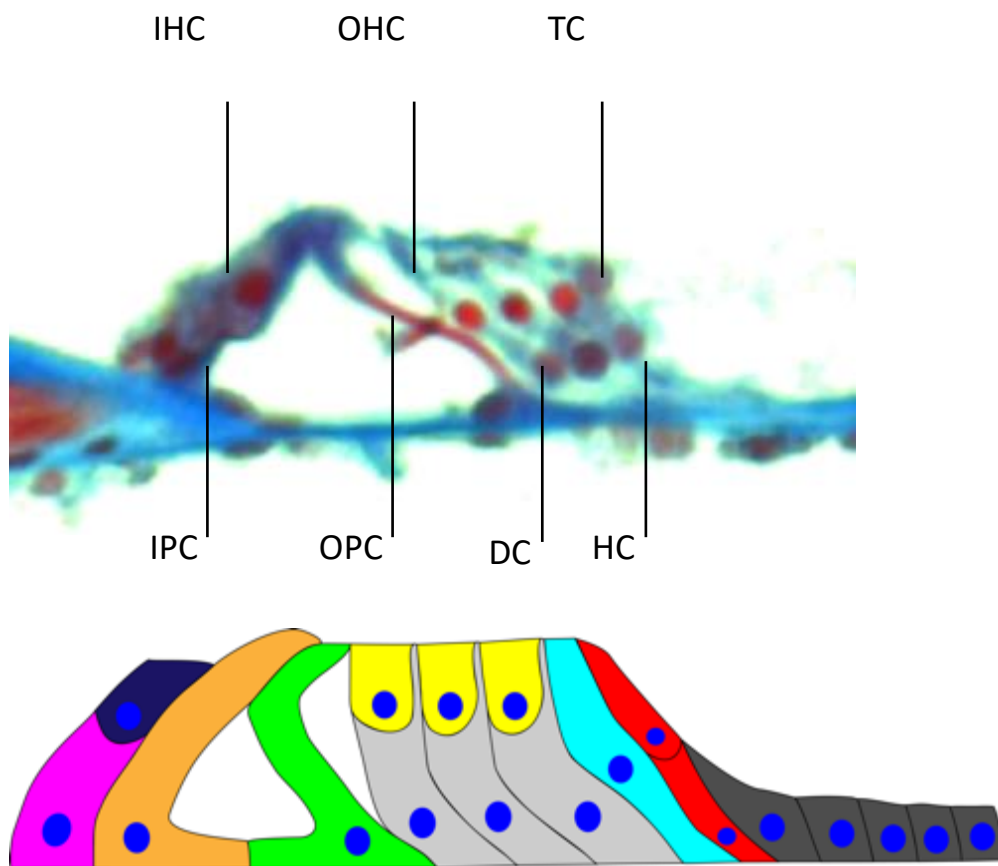


Abbildung 6 Das adulte murine Corti-Organ

Die obere Abbildung zeigt eine Azan Färbung und darunter findet sich eine schematische, farbcodierte Darstellung der Corti-Organ.

Innere Haarzelle	IHC	dunkelblau
Innere Phalangenzelle		magenta
Innere Pfeilerzelle	IPC	orange
Äußere Pfeilerzelle	OPC	grün
Äußere Haarzelle	OHC	gelb
Deiters-Zellen	DC	hellgrau
Hensen-Zellen	HC	cyan
Obere/untere Grenzzelle	TC	rot
Claudius-Zellen		dunkelgrau

Das Corti-Organ wurde 1851 erstmalig im Anatomischen Institut der Universität Würzburg von Alfonso Graf von Corti beschrieben (Corti 1851).

Das auf der Basilarmembran liegende Corti-Organ befindet sich zwischen dem durch den Limbus spirale gebildeten inneren Sulkus und dem durch das

Ligamentum spirale gebildeten äußeren Sulkus. Dem inneren Sulkus anliegend befinden sich die inneren Phalangenzellen, die die innere Haarzelle auf beiden Seiten mit fingerförmigen Fortsätzen (Phalangen) umfasst. Lateral anliegend befinden sich die innere und äußere Pfeilerzeller, zwischen denen sich der innere Tunnel befindet. Lateral davon liegen die äußeren Haarzellen den Deiters-Zellen auf und werden von diesen mit einem Fortsatz umfasst. Neben den drei Deiters-Zellen befinden sich die äußeren Grenzzellen und Hensen-Zellen. Den Übergang zum äußeren Sulkus bilden die Claudius- und Boettcher-Zellen. Die vom Limbus spiralis ausgehende Tektorialmembran in eine zellfreie, gallertige Struktur, die über das Corti-Organ ragt, jedoch im Ruhezustand nur Kontakt zu den längsten Stereozilien der äußeren Haarzelle hat. Durch die Habenula perforata, einem durchlöcherten Abschnitt der Basilarmembran, treten afferente und efferente Nervenfasern in das Corti-Organ über (Raphael and Altschuler 2003, Drenckhahn 2004, Sanchez and Grieco-Calub 2018).

1.3.2 Eigenschaften und Entwicklung der Zellen des Corti-Organs

Zu Beginn der Embryonalphase besteht das zukünftige Corti-Organ aus einem ektodermen Gewebe mit vier unterschiedlichen Vorläuferzellen für Neurone, Haarzellen, Stützzellen und otischem Epithel. Aus diesen Zellen entsteht, wie in Abbildung 7 bis Abbildung 9 dargestellt, ein Mosaik aus unterschiedlichen Zelltypen (Fritsch, Pan et al. 2015). Es bilden sich die inneren und die äußeren Haarzellen. Die Stützzellen unterteilen sich in innere und äußere Pfeilerzelle, innere und äußere Phalangenzellen (letztere werden auch Deiters-Zellen genannt). Des Weiteren entwickeln sich Grenzzellen und Hensen-Zellen sowie Claudius- und Böttcher-Zellen.

In neugeborenen Mäusen stellt sich das Corti-Organ als Epithel aus säulenförmigen Zellen dar und es sind keine extrazellulären Räume vorhanden. Am sechsten Tag nach Geburt öffnet sich am basalen Ende der cortische Tunnel zwischen der inneren und der äußeren Pfeilerzelle. Dieser erweitert sich nach apikal und erreicht seine vollständige Größe ab dem 10. postnatalen Tag.

Zeitgleich entwickeln sich extrazelluläre Räume zwischen den Haarzellen. Während der gesamten Entwicklung nehmen die Zellen nur gering in Höhe zu (Kikuchi and Hilding 1965).

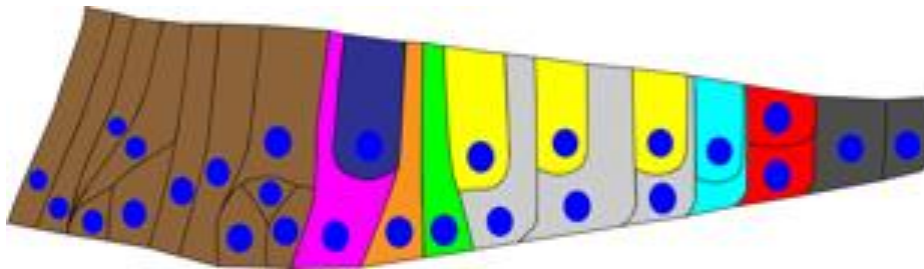


Abbildung 7 Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ am ersten postpartalen Tag (P1)

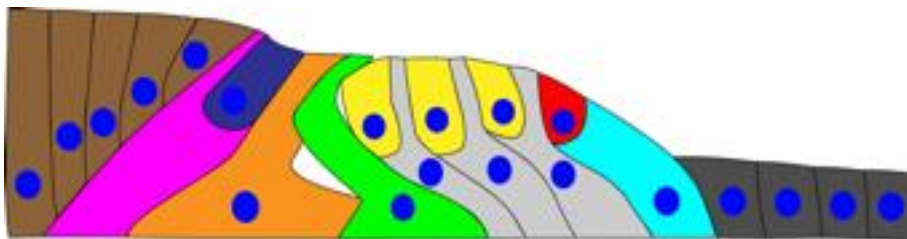


Abbildung 8 Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ am siebten postpartalen Tag (P7)

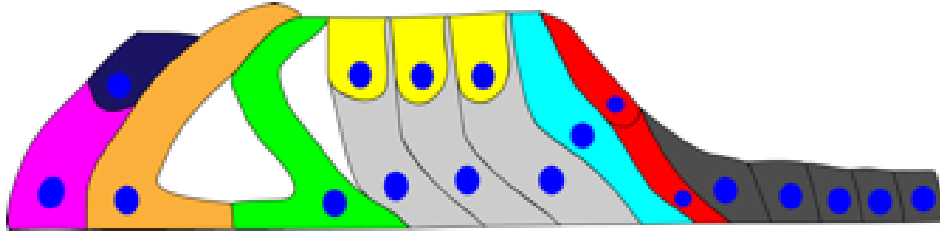


Abbildung 9 Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ ab dem vierzehnten postpartalen Tag (P14 und älter)

Kölliker-Organ	braun
Innere Haarzelle	dunkelblau
Innere Phalangenzelle	magenta
Innere Pfeilerzelle	orange
Äußere Pfeilerzelle	grün
Äußere Haarzelle	gelb
Deiters-Zellen	hellgrau
Hensen-Zellen	cyan
Obere/untere Grenzzelle	rot
Claudius-Zellen	dunkelgrau

In der Embryonalphase ist das **Kölliker-Organ** der Ursprung der Differenzierung der sensorischen Zellen (Kelley 2007). Es handelt sich dabei um dicht aneinander liegende, längliche Zellen. Nach dem Beginn des Hörens wandelt sie sich in kuboidale Zellen des inneren Sulkus um (Hinojosa 1977). Das Kölliker-Organ innerviert die inneren Haarzellen vor dem Beginn des Hörens. Durch die Depolarisation der inneren Haarzellen werden die afferenten Nervenfasern der Spiralganglienzellen stimuliert und das Wachstum des zentralen Axons propagiert (Tritsch, Yi et al. 2007)

Die **Haarzellen** sind die Sinneszellen im cortischen Organ und sind in vier Reihen angeordnet: eine Reihe innere Haarzellen und drei Reihen äußere Haarzellen, die durch die Pfeilerzellen und den inneren Tunnel voneinander getrennt sind. Die apikale Oberfläche der Haarzellen ist von Stereozilien gesäumt, wobei jedoch nur die der äußeren Haarzellen einen kontinuierlichen Kontakt zur Tectorialmembran besitzen (Lim 1986, Sziklai, He et al. 1996). Die basolaterale Oberfläche der Haarzellen ist von Perilymphe umgeben. An der Basis der inneren Haarzellen besteht Kontakt zu afferenten Nervenfasern und an der Basis der

äußeren Haarzelle zu vorwiegend efferenten als auch wenigen afferenten Fasern (Raphael and Altschuler 2003). Bei der Wahrnehmung des Hörens haben beide Zelltypen unterschiedliche Rollen: Die inneren Haarzellen wandeln die Schallwellen in elektrische Signale um, die an die Hörbahn weitergegeben werden. Die äußeren Haarzellen hingegen agieren als cochleärer Verstärker, die bei geringen Schalldruckpegeln eine Erregung der inneren Haarzellen ermöglichen.

Zu den **Stützzellen** gehören die innere und äußere Pfeilerzelle, die innere Phalangenzelle, die Deiters-Zellen (auch äußere Phalangealzellen genannt), Hensen-Zellen sowie die Grenzzellen (Malgrange, Thiry et al. 2002).

Die innere Haarzelle liegt auf der **inneren Phalangealzelle** und ist von dieser und der inneren Pfeilerzelle umgeben; die äußeren Haarzellen befinden sich auf den Deiters-Zellen und sind von diesen umgeben. Die am nächsten zum Modiolus gelegene äußere Haarzelle liegt an der äußeren Pfeilerzelle an.

Die **Deiters-Zellen**, zusammen mit den Pfeilerzellen, tragen ausschlaggebend zur Stabilität des sensorischen Epithels bei (Forge and Wright 2002). Basal liegen die Deiters-Zellen der Basilarmembran auf und umschließen apikal die äußeren Haarzellen. Wegen ihrer Steifigkeit stellen sie die Verbindung zwischen Basilarmembran und den Haarzellen dar (Zetes, Tolomeo et al. 2012), sodass eine Änderung des Abstandes zwischen Haarzellen und der Tektorialmembran möglich ist (Forge and Wright 2002). Des Weiteren spielen die Stützzellen durch das Vorhandensein von gap-junctions bei der Wasser- und Ionen-Homöostase der Perilymphe und interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle (Kikuchi, Adams et al. 2000, Spicer, Smythe et al. 2003).

Die **Pfeilerzellen** bilden den Bogen des inneren Tunnels (Zetes, Tolomeo et al. 2012). Die innere Pfeilerzelle kann vor allen anderen Zellen des Corti-Organs identifiziert werden (E17 in Ratten, gefolgt von den Haarzellen an E18) und daher wird angenommen, dass sie bei der Entwicklung des Corti-Organs eine wichtige Rolle einnimmt (Thelen, Breuskin et al. 2009)

Rueda, Prieto et al. (1993) konnten in Mäusen nach der Geburt medial der Hensen-Zellen einen weiteren Zelltyp nachgewiesen, der erstmals von Henson, Jenkins et al. (1983) in Fledermäusen vermutet worden war und **Grenzzelle (tectal cells)** genannt wird. Die Grenzzellen sind zum Zeitpunkt der Geburt zunächst an der Basilarmembran befestigt. Während der ersten postnatalen Woche lösen sie sich von dieser und ihre Zellorganellen lassen einen hohen Metabolismus vermuten. Ab dem 14. postnatalen Tag weisen sie, im Gegensatz zu den Hensen-Zellen, an der apikalen, endolymphatischen Zelloberfläche kurze Mikrovilli auf und begrenzen den äußeren Tunnel (Henson, Jenkins et al. 1983, Rueda, Prieto et al. 1993).

Die **Hensen-Zellen** sind hohe Zellen mit Kontakt zur Basilarmembran, die lateral der Deiters-Zellen und medial der Claudius Zellen liegen (Hensen 1863). In 10 Tage alten Mäusen besteht ein Kontakt zwischen der Tektorialmembran und den Hensen-Zellen, der bei ausgewachsenen Tieren nicht mehr vorhanden ist (Kimura 1966). Es konnte gezeigt werden, dass die Hensen-Zellen in den unteren Windungen der Cochlea von Meerschweinchen aus einer einzelligen Schicht aus kubischen Zellen bestehen, in apikalen Windungen hingegen aus mehreren, kugelförmigen Zellen (Merchan, Merchan et al. 1980). Es wird angenommen, dass Hensen-Zellen eine anti-inflammatorische Rolle in der Cochlea einnehmen (Kalinec, Webster et al. 2009). In einem in-vitro Experiment konnte gezeigt werden, dass Hensen- und Grenzzellen die Fähigkeit besitzen, sich in Deiters- und Haarzellen differenzieren zu können (Malgrange, Thiry et al. 2002).

Die **Claudius- und Böttcher-Zellen** gehören nicht zum cortischen Organ, sondern zum Sulkus-Epithel. Die Böttcher-Zellen liegen der Basilarmembran auf und befinden sich vor allem in den basalen Windungen (Ishiyama, Cutt et al. 1970, Malgrange, Thiry et al. 2002). Es wird angenommen, dass beide Zelltypen bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Elektrolyten in der Perilymphe beteiligt sind (Ishiyama, Cutt et al. 1970, Spicer and Schulte 1996, Nakazawa 2001, Yoo, Kim et al. 2012, Cloes, Renson et al. 2013).

1.4 Mikrotubuli im cortischen Organ

1.4.1 Das Zytoskelett im adulten Corti-Organ

Am Zellapex der adulten Haarzellen befindet sich die Kutikularplatte. Dies ist ein Netzwerk aus Aktinfilamenten, in dem die Aktinfilamente der Stereozilien verankert sind. Eine filamentfreie Aussparung in der Kutikularplatte wird Kutikularpore genannt, die durch den Basalkörper der Kinozilie entstanden ist (Raphael and Altschuler 2003). Die Kinozilie bestimmt während der Embryonalphase (bis E18,5) die Ausrichtung der Stereozilien und degeneriert zu Beginn des Hörens (P10) (Sobkowicz, Slapnick et al. 1995, Jones and Chen 2008). In der Kutikularplatte kann kein Tubulin nachgewiesen werden. In dem Aktin-freien Fontikulus, in dem sich ein Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) befindet, und im Aktin-freien Bereich um die Kutikularplatte ist reichlich Tubulin vorhanden. Basale Abschnitte der Haarzellen enthalten kaum Tubulin (Morup Jorgensen 1982, Raphael, Athey et al. 1993). Im Zellapex der inneren Haarzellen ist Tubulin peripher entlang der Zellmembran nachweisbar (Raphael, Athey et al. 1994) und stellt sich als ringförmige Struktur dar (Hallworth, McCoy et al. 2000).

Zur Aufrechterhaltung der Zellform benötigen Stützzellen ein komplexes Zytoskelett-Netzwerk. Dies spiegelt sich in der auffällig hohen Konzentration von Tubulin und Intermediärfilamenten wider (Raphael and Altschuler 2003). Die Entstehung des Mikrotubuli Netzwerks beginnt in Gerbils zunächst im Zellapex und breitet sich nach basal aus (Ito, Spicer et al. 1995). Im Zellapex befindet sich ein Zentrosom (Raphael and Altschuler 2003), das das Polymerisationszentrum für das zytoplasmatische Mikrotubulussystem darstellt (Bornens 2012). In der adulten inneren Pfeilerzelle des Gerbils verläuft ein Bündel vom Zellapex bis in basale Abschnitte der Zelle und separat davon ein Bündel ausschließlich im basalen Bereich. In den äußeren Pfeilerzellen ist ein Bündel aus Mikrotubuli in der Kopfplatte („beam bundle“, „Balken-Bündel“) und im mittleren Bereich der Zelle vorhanden. In den Deiters-Zellen ist im apikalen Abschnitt, der Teil der Retikularmembran ist, auch ein Mikrotubuli Bündel vorhanden. Des Weiteren verläuft ein Bündel vom apikalen Ende des phalangealen Fortsatzes bis in die

Basis der Zelle. Dort befinden sich noch weitere Mikrotubuli Bündel (Tannenbaum and Slepecky 1997).

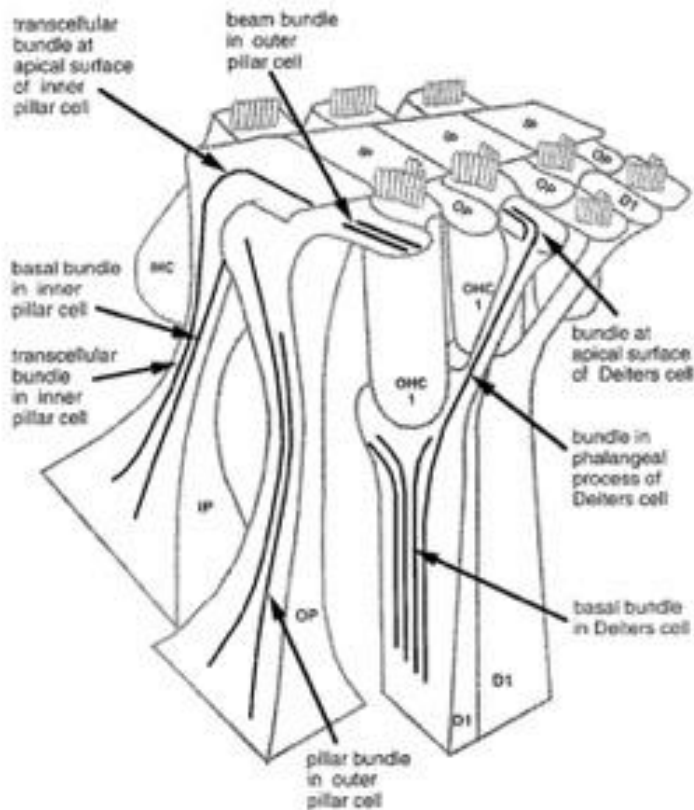


Abbildung 10 Lokalisation von Mikrotubuli in den Stützzellen des Corti-Organs.

Abbildung aus Tannenbaum and Slepecky (1997)

1.4.2 Expressionsmuster der Mikrotubuli im Verlauf der postnatalen Entwicklung in Gerbil (Hallworth, McCoy et al. 2000)

Die Entwicklung von Mikrotubuli-Netzwerken wurde bisher noch nicht in Mäusen untersucht, sodass in den folgenden Absätzen deren Entwicklung in Gerbils beschrieben wird.

Am Zeitpunkt P0 wird Tubulin nur in den inneren Haarzellen exprimiert. Die Tubulin-Filamente zeigen ein sternförmiges Muster, das sein Zentrum auf der Höhe der Retikularmembran hat. Zwei Tage später ist in den äußeren Haarzellen ebenfalls Tubulin nachweisbar.

An P3 hat die ist die Expression von Tubulin in den Inneren Pfeilerzellen am höchsten, in den äußeren Pfeilerzellen und Deiters-Zellen hingegen ist keine Tubulinexpression nachweisbar.

Bis P6 hat sich das sternförmige Muster der Tubulin Filamente in den inneren und äußeren Haarzellen zurückgebildet und zeigt dort nur noch eine geringe, diffuse Verteilung. In den inneren Pfeilerzellen hat sich das Tubulin Netzwerk vergrößert und sich im phalangealen Fortsatz der äußeren Deiters-Zellen gebildet.

An P9, reichen die Tubulin Bündel in den Pfeilerzellen weiter nach basal als an P6 und Tubulin ist zum ersten Mal in den Deiters-Zellen nachweisbar.

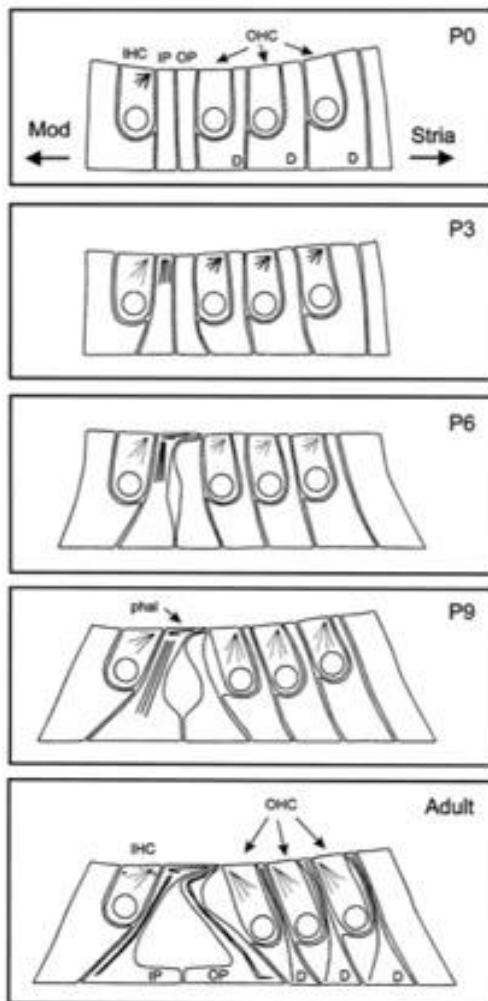


Abbildung 11 Expression von beta-Tubulin im Corti-Organ
Abbildung aus Hallworth, McCoy et al. (2000)

Im adulten Corti-Organ (P16 und älter) verläuft in den äußeren Pfeilerzellen ein breites Tubulin Bündel zunächst basal parallel zur Basalmembran und dann nach apikal zur Retikularmembran. In den inneren Pfeilerzellen verläuft ein breites Tubulin Bündel von der Retikularmembran nach basal in Richtung des Modiolus. Die innere Haarzelle weist am Zellapex im Bereich der Retikularmembran einen Ring aus Tubulin auf. In den phalangealen Fortsätzen der Deiters-Zellen befindet sich ein Tubulin-Bündel.

1.4.3 Posttranslationale Modifikationen im Verlauf der postnatalen Entwicklung im Gerbil (Tannenbaum and Slepecky 1997)

Auch bezüglich der Entwicklung von posttranslationalen Modifikationen erfolgte bislang noch keine Untersuchung in Mäusen, sodass in den folgenden Absätzen deren Entwicklung in Gerbils beschrieben wird.

Am Zeitpunkt P1 ist tyrosiniertes Tubulin in den meisten Zellen des Corti-Organs nachweisbar. Detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin sind beide am lateralen Rand der säulenförmigen Zellen des Kölliker-Organs und im apikalen Drittel der inneren Pfeilerzellen vorhanden. Des Weiteren ist detyrosiniertes Tubulin in den Haarzellen unterhalb der Kutikularplatte, acetyliertes Tubulin in den Deiters-Zellen von basal bis in die phalangealen Fortsätze und polyglutamyliertes Tubulin im apikalen Bereich der Pfeilerzellen, jedoch stärker in der inneren Pfeilerzelle exprimiert.

Ab P7 zeigt sich eine Abnahme der Konzentration von tyrosiniertem Tubulin in den Haarzellen. Basale Abschnitte der inneren Pfeilerzelle weisen in der Färbung eine höhere Intensität auf als der Zellapex. Apikal in den phalangealen Fortsätzen der Deiters-Zellen ist eine erhöhte Konzentration von tyrosiniertem Tubulin nachweisbar. Nur geringe Mengen von detyrosiniertem und acetyliertem Tubulin findet sich unterhalb der apikalen Oberfläche der verbliebenen Zellen des Kölliker-Organs und der Haarzellen, in der inneren Pfeilerzelle hingegen ist eine hohe Konzentration im Mikrotubuli-Bündel entlang der apikalen Oberfläche und

im Pfeilerbereich nachzuweisen. In der äußeren Pfeilerzelle und in den phalangealen Fortsätzen der Deiters-Zellen zeigte sich nur eine schwache Expression dieser beiden posttranslationalen Modifikationen. Acetyliertes Tubulin findet sich auch im Balken-Bündel im Zellapex der äußeren Pfeilerzelle. Polyglutamyliertes Tubulin ist nur gering im apikalen Bereich der Haarzellen, jedoch intensiv im apikalen Bereich der inneren Haarzelle nachweisbar.

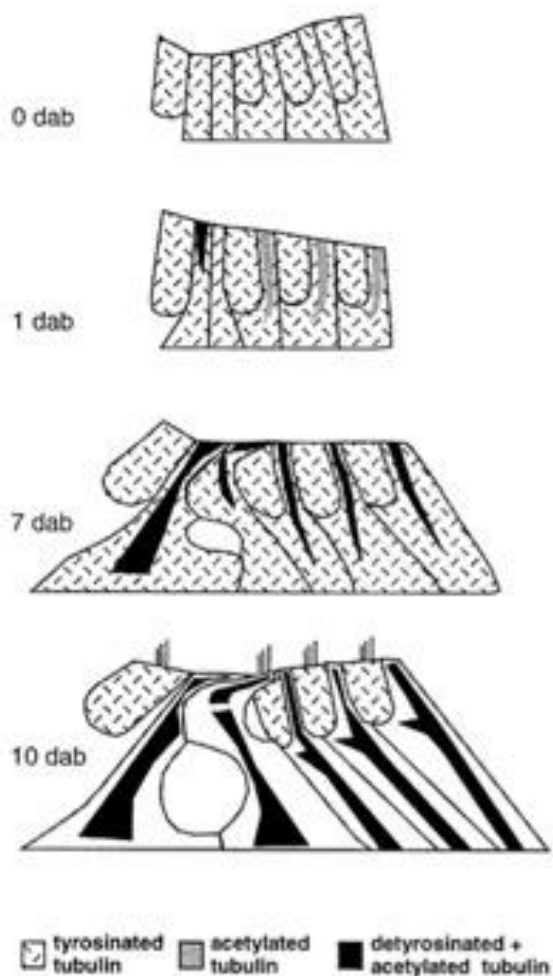


Abbildung 12 Zusammenfassung der zeitlichen und örtlichen Lokalisation der posttranslationalen Modifikationen im Corti-Organ
Abbildung aus Tannenbaum and Slepecky (1997)

Zum Zeitpunkt P14 ist tyrosiniertes Tubulin schwach in den wenigen verbliebenen Zellen des Kölliker-Organ und den Pfeilerzellen nachzuweisen. In den Haarzellen und den phalangealen Fortsätzen der Deiters-Zellen ist tyrosiniertes Tubulin vorhanden. Detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin findet sich in den Mikrotubuli entlang der gesamten Länge der Pfeilerzellen. Das Balken-Bündel in der äußeren Pfeilerzelle ist intensiver angefärbt als der apikale Bereich der inneren Pfeilerzelle. In den Deiters-Zellen ist detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin in den Mikrotubuli in basalen Abschnitten als auch in den phalangealen Fortsätzen nachzuweisen, wobei acetyliertes Tubulin eine intensivere Färbung aufweist. In den Haarzellen und den Stützzellen ist eine diffuse Verteilung von polyglutamylierten Tubulin vorhanden, besonders vermehrt in den Mikrotubuli-Bündeln der Pfeiler- und Deiters-Zellen.

1.4.4 Beta-Tubulin-Isotypen im Verlauf der postnatalen Entwicklung im Gerbil (Hallworth and Luduena 2000, Jensen-Smith, Eley et al. 2003)

Wie in den beiden vorangehenden Abschnitten wird die Entwicklung von beta-Tubulin-Isotypen in Gerbils beschrieben, da bislang keine Daten hierzu in murinen Cochleae vorliegen.

Zu P0 sind in den Mikrotubuli der inneren Haarzellen die beta-Tubulin-Isotypen beta I, beta II und beta IV vorhanden. In der adulten inneren Haarzelle sind beta I und beta II in dem Mikrotubuli-Bündel am Zellapex vorhanden, die wie Hallworth, McCoy et al. (2000) beschrieben, eine ringförmige Struktur bilden. Ab P27 ist in den inneren Haarzellen kein beta IV mehr nachweisbar.

In den äußeren Haarzellen ist zur Zeit der Geburt (P0) die gleiche Zusammensetzung von beta-Tubulin-Isotypen (beta I, beta II, beta IV) vorhanden. Ab P20 ist beta II vermindert und fehlt ab P27 vollständig.

An P0 ist bereits eine Expression von beta I, beta II und beta IV in den Pfeilerzellen nachweisbar. Ab P20 nimmt die Expression von beta I zuerst in der

inneren und dann auch in der äußeren Pfeilerzelle ab, ab P27 ist kein beta I mehr nachweisbar.

In den Deiters-Zellen ist ab P6 beta I, beta II und beta IV nachweisbar.

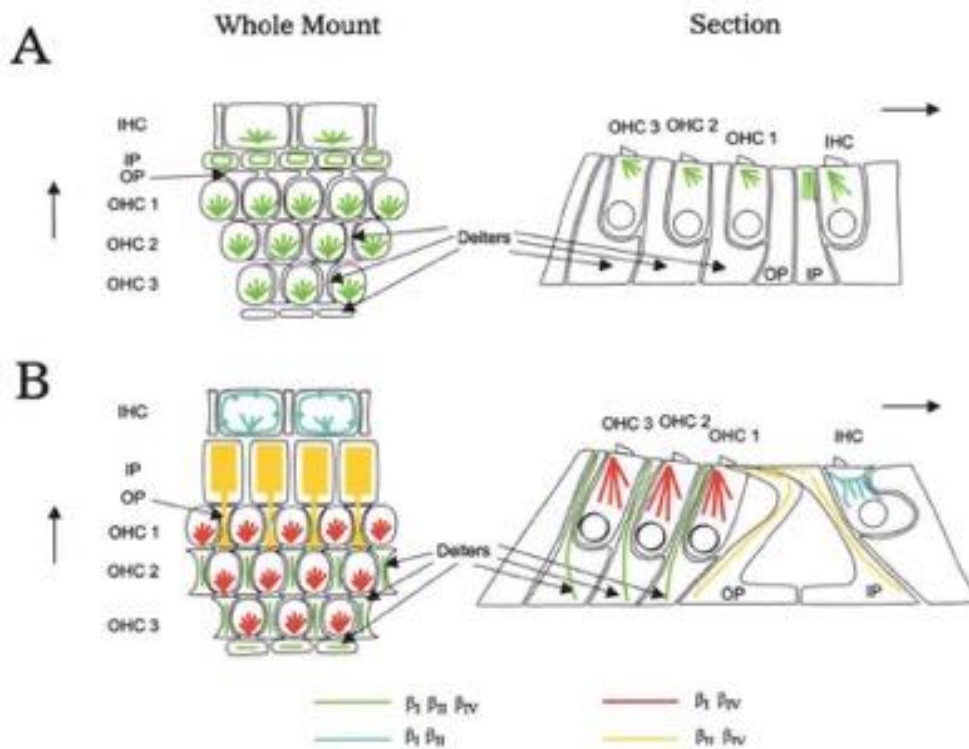


Abbildung 13 Beta-Tubulin-Isotypen im Corti-Organ

In der oberen Reihe ist die Verteilung der beta-Tubulin-Isotypen an P3 und in der unteren Reihe im adulten Entwicklungsstadium

Abbildung aus Jensen-Smith, Eley et al. (2003)

1.5 Zielsetzung

Eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Entwicklung des Hörvorgangs stellt die fehlerfreie Ausbildung von Mikrotubuli-Netzwerken dar. Sie sind ein wichtiger Teil des Zytoskeletts und tragen als Infrastruktur für viele intrazelluläre Prozesse zur korrekten Funktion der Zelle bei.

Die Entstehung, die Aufrechterhaltung und der Abbau von Mikrotubuli ist ein höchst komplexer Vorgang. Wie die Punktmutation im TBCE Gen der Maus zeigt, können kleinste Veränderungen zu funktionellen Störungen und bis zur Ertaubung führen.

Bisher wurden viele Untersuchungen der Mikrotubuli im Corti-Organ anderer Spezies (vor allem in Gerbil) durchgeführt. Daher war ein Ziel der vorliegenden Studie, die spatio-temporale Verteilung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von Mikrotubuli während der ersten 14 postnatalen Tage im murinen Corti-Organ immunhistologisch darzustellen.

Obwohl die TBC Proteine ein zentraler Bestandteil der Tubulin-Synthese sind, handelt es sich hierbei um bis dato weitestgehend unbekannte Moleküle. Die hohe Bedeutung für das Hören zeigt der Hörverlust in Mäusen auf, die eine Punktmutation im TBCE Gen haben. Daher stellte die immunhistologische Darstellung der spatio-temporalen Verteilung von „tubulin-specific chaperone“ Proteinen (TBCs) während der ersten 14 postnatalen Tage im murinen Corti-Organ das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikel
Absaugpumpe	KNF	AP86
Einkanal-Pipetten	Eppendorf	Pipette research
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Leica	DMI 4000B
Konfokal-Mikroskop	Olympus	IX81 Fluoview
Kryostat	Leica	CM1510S Cryostat
Operationsmikroskop	Zeiss	OPMI 1

2.1.2 Labormaterial

Bezeichnung	Artikel	Bezugsquelle
Einmal-Skalpell	Feather disposable scalpel NO.15,	Feather safety razor Co., Ltd.
Pinzetten	Typ 5/45	Dumont
1 ml Spritze	BD Plastipak, Ref# 303172	Becton Dickinson GmbH
Kanüle	BD Microlance Nr. 1, Ref# 301300	Becton Dickinson GmbH

Petrischalen 35 mm	CELLSTAR cell culture dishes, 627160	Greiner bio-one
Einbettchälchen (10mm x 10mm x 5mm)	Cryomold® Biopsy	Sakura Finetek
Objektträger	SuperFrost® plus	R. Langenbrinck
Deckgläser		R. Langenbrinck
Fettstift	Liquid Blocker Super PAP-Pen	Science Services
Pipettenspitzen	Pipette tip neutral	Sarstedt

2.1.3 Selbsthergestellte Chemikalien

Puffer oder Lösung	Zusätze
Mowiol Eindecklösung	10 g Mowiol 40-88, 40 ml PBS 20 ml wasserfreies Glycerin
PBS, 0,05 M	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 4,5 g NaCl pH 7,2 - 7,4
PBS, 0,05 M mit 1 % Triton X100	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 5 ml Triton X 100 = 1 % 4,5 g NaCl = 0,9 % pH 7,2 - 7,4
Paraformaldehyd (PFA) 4%	0,1 M NaPP 4% Paraformaldehyd reinst pH 7,4

Saccharose-Lösung 30 %	50 mL 0,1 M NaPP 15g D(+)-Saccharose
TBST	1,21 g Tris-Base (MG 121,14) 4,0 g NaCl, 350 ml Aq. dem. (steril) pH→7,6 mit ca. 0,5 ml HCl (rauchend) ad 500 ml Aq. dem. (steril) + 0,5 ml Tween 20
0,1% Azokarmin	0,1 g Azokarmin in 100 ml Aq. dem. Aufschwemmen, kurz aufkochen, nach dem Abkühlen filtrieren. Vor Gebrauch 1 ml Eisessig zugeben (= 1%)
Anilinalkohol	0,05 ml Anilinöl + 50 ml 90% Ethanol
Essigsäurealkohol	0,5 ml Eisessig in 50 ml 96% Ethanol
Anilinblau-Orange G	0,5 g Anilinblau wasserlöslich 2,0 g Orange G in 100 ml A. dem. lösen 8,0 ml Eisessig zugeben aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren

2.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Artikel	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	A9418	Sigma-Aldrich
Tissue - Tek O.C.T Compound	4557	Sakura Finetek
D(+)-Saccharose	4661.1	Carl Roth GmbH
Mowiol 40-88	324590	Sigma Aldrich
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	DPBS with Ca & Mg, H15-001	PAA Laboratories
Entellan	1.07960.0500	Merck KGaA

2.1.5 Primäre Antikörper

Antigen	Konz.	Klonalität	Host	Artikel	Bezugsquelle
TBCA	1:50	polyclonal	rabbit	12304-1-AP	Proteintech
TBCB	1:100	polyclonal	rabbit	15782-1-AP	Proteintech
TBCC	1:200	polyclonal	rabbit	15917-1-AP	Proteintech
TBCD	1:100	polyclonal	rabbit	16450-1-AP	Proteintech
TBCE	1:100	polyclonal	rabbit	12021-1-AP	Proteintech
Tyrosiniertes Tubulin	1:500	monoclonal	rat	MAB1864	Millipore Merck
Detyrosiniertes Tubulin	1:500	polyclonal	rabbit	AB3201	Millipore Merck
Acetyliertes Tubulin	1:500	monoclonal	mouse	T7451	Sigma-Aldrich
Polyglutamyliertes Tubulin	1:500	monoclonal	mouse	AG20B-0020	AdipoGen
Beta-Tubulin	1:500	monoclonal	mouse	T 5168	Sigma-Aldrich
DAPI	1:1000	-	-	D9542	Sigma-Aldrich
Alexa Fluor 488 Phalloidin	1:250	-	-	A-12379	Invitrogen

2.1.6 Sekundäre Antikörper

Antigen	Konz.	Ziel-Antigen	Host	Artikel	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 IgG	1:500	anti-mouse	goat	A-11001	Invitrogen
Alexa Fluor 488 IgG	1:500	anti-mouse	goat	A-11008	Invitrogen
Alexa Fluor 555 IgG	1:500	anti-mouse	goat	A-21422	Invitrogen
Alexa Fluor 555 IgG	1:500	anti-mouse	goat	A-21428	Invitrogen

2.1.7 Tierstamm

NMRI Mäuse (Naval Medical Research Institute) wurden von dem Tierstall des Instituts für Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der murinen Cochlea und Immersionsfixation

Es wurden NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäuse im Alter P1, P7 und P14 (Tag der Geburt P0) zervikal disloziert und dekapitiert. Der Schädel wurde in sagittaler Schnitfführung durchtrennt und das Gehirn entnommen. Damit konnte intracranial die Oberfläche des Felsenbeins dargestellt werden. Die beiden Schädelhälften wurden in eine mit 0,1M NaPP gefüllte Petrischale überführt. Nach Entfernen der Dura mater erfolgte die Dissektion der Cochlea. Die Cochlea wurde entlang den Fissuren vom Knochen getrennt und durch das Entfernen der Bulla das Mittelohr eröffnet.

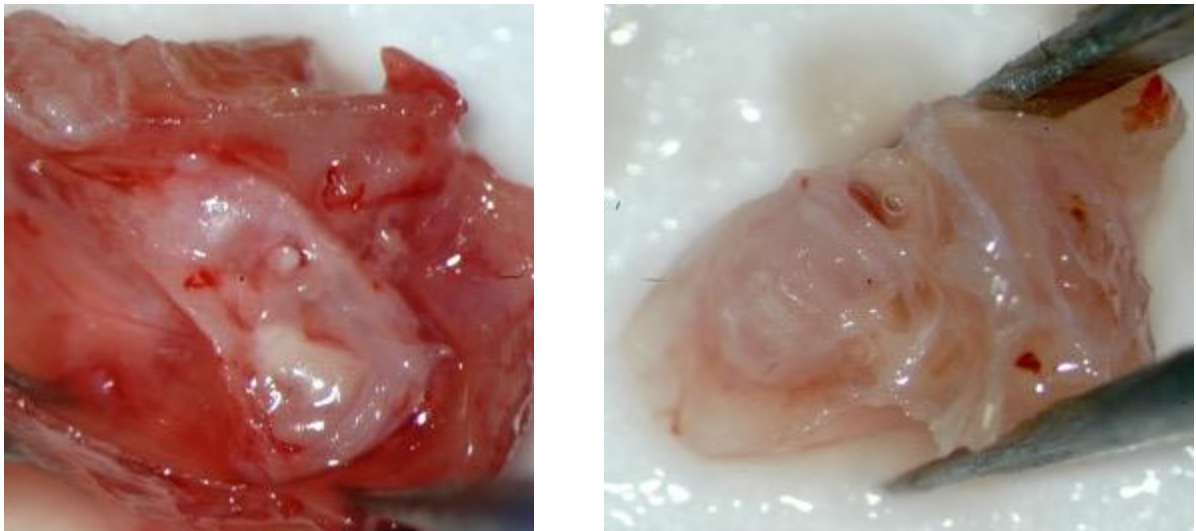


Abbildung 14 Felsenbein und Innenohr

Links, Ansicht von intracranial auf das Felsenbein während der Präparation. Rechts, Ansicht auf das Innenohr nach Entfernung des Mittelohres

Nach dem Dislozieren des Stapes wurden das ovale und runde Fenster mit der Spitze einer Pinzette penetriert und in diese ein Fixans (4% PFA) mittels einer 0,2ml Spritze und 20G Kanüle instilliert. Die Cochlea wurde anschließend in einem mit 5ml Fixierlösung gefüllten 15 ml Gläschen für 2 h auf einem Rotator

bei 4 °C gelagert. Daraufhin wurde die Cochlea zweimal für 30min mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer gespült.

2.2.2 Kryoeinbettung und Anfertigen von Kryoschnitten

Die Cochlea wurde in einem 15 ml Behälter in 10ml 30% Saccharose-Lösung auf einen Rotator bei Raumtemperatur eingelegt. Sobald die Cochlea auf den Boden des Behälters gesunken war, wurden 5 ml der Lösung mit 5 ml entgastem TissueTek ersetzt. Nach 8 h wurde das Gemisch durch reines Tissue-Tek ersetzt. Die Cochlea wurde anschließend in ein Kryomold überführt, für Längsschnitte ausgerichtet und auf einem -80 °C kaltem Metallblock tiefgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde die mit Tissue-Tek umgebene Cochlea aus dem Kryomold herausgelöst und an die im Kryostaten herrschenden -25 °C anpasst. Es wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, von denen jeweils vier auf einen Adhäsions-Objektträger gezogen wurden. Diese wurden dann bei -80°C gelagert.

2.2.3 Azan-Färbung nach Heidenhein (modifiziert) von Kryoschnitten

Nach Entnahme aus dem -80°C kalten Tiefkühlschrank wurden die Objektträger zunächst zweimal für 5 min mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,1% Azokarmin Lösung bei 56°C für 10min. Nachdem diese Lösung mit demineralisiertem Wasser entfernt wurde, erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Anilinalkohol. Sobald die Zellkerne gut erkennbar waren, wurde die Färbung mittels Essigsäurealkohol unterbrochen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 5 % Phosphorwolframsäure bei 40°für 15 min. Nach Spülung mit demineralisiertem Wasser wurden die Gewebeschnitte bei 40°C mit Anilinblau - Orange G für 1-2 min (unter Mikroskopkontrolle) inkubiert. Nach Spülung mit demineralisiertem Wasser erfolgte unter Mikroskopkontrolle (2x 1-3min) die Differenzierung der Gewebeschnitte mit 96% Ethanol. Daraufhin wurden Gewebeschnitte mit 100% Ethanol für 2x 2 min entwässert und 100% Xylol als

Intermedium für 2x 2 min inkubiert. Die Einbettung erfolgte mit Entellan und einem Glasdeckchen, wobei Lufteinschlüsse strengstens zu vermeiden waren.

2.2.4 Immunhistochemie von Kryoschnitten

Nach Entnahme aus dem -80°C kalten Tiefkühlschrank wurden die Objektträger zunächst für 15min in einer feuchten Kammer an die Raumtemperatur akklimatisiert. Daraufhin erfolgte eine Gewebenachfixation mit PFA (4%) für 10 min. Nach Absaugen des PFA und dreimaliger Spülung mit 0,05M PBS (jeweils 5 min Inkubationszeit) wurden die einzelnen Gewebeschnitte mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit 10% BSA in 0,1 % Triton X 100 für 30 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in 1% BSA mit 0,1% Triton X 100 über Nacht bei 4°C. Nach Absaugung und dreimaliger Spülung mit 1x TBST (jeweils 5 min Inkubationszeit) erfolgte die Inkubation des in 1% BSA mit 0,1% Triton X 100 angesetzten sekundären Antikörpers bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen, feuchten Kammer für 1h. Zusätzlich zu DAPI (1:1000) wurden goat anti-rabbit bzw. goat anti-mouse (gekoppelt an Alexa Fluor 488 und 555, Invitrogen. 1:500) als sekundäre Antikörper verwendet. Nach dreimaliger Spülung mit 1x TBST (jeweils 5 min Inkubationszeit) erfolgte die Eindeckung mit 60°C heißem Mowiol und einem Glasdeckchen, wobei Lufteinschlüsse strengstens zu vermeiden waren. Die Objektträger wurden bei 4°C in lichtundurchlässigen Objektträgerkästen aufbewahrt.

2.2.5 Präparation und Immunhistochemie von Whole Mount Präparaten des Corti-Organs

Bis zur Eröffnung der Bulla erfolgten dieselben Arbeitsschritte wie bei 2.2.1 beschrieben. Jedoch wurde hierbei der Stapes nicht entfernt. Nach Fixierung in PFA für 2h bei 4°C erfolgte eine Dekalzifizierung in 0,135M EDTA bei Raumtemperatur und anschließend Lagerung in 0,1M NaPP bei 4°C.

Anschließend wurde das ovale Fenster mit der Spitze einer feinen Schere penetriert und von dort mehrere kleine Schnitte entlang der basalen Windung

ausgeführt. Daraufhin wurde die basale Windung von der mittleren und oberen durch einen Schnitt getrennt. Die Fasern der Spiralganglien wurden zur Entlastung der Spannung in der basalen Windung durchtrennt und Anteile des Ligamentums spirale und der Stria vascularis entfernt. Nach dem Trennen der mittleren von der apikalen Windung wurden die vorher genannten Arbeitsschritte durchgeführt.

Die Etablierung dieser Technik erfolgte durch persönliche Korrespondenz mit Brandon Cox, Southern Illinois University, School of Medicine, sowie deren Publikation Montgomery and Cox (2016).

2.2.6 Mikroskopie und Aufnahmetechnik

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (Olympus IX81 Fluoview), die der Azan-Färbung lichtmikroskopisch an einem Leica DMI 4000B. Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte in ImageJ (Version 2.0.0) sowie Adobe Photoshop CS6 (Version 13.0, OSX). Die Präsentation der Aufnahmen wurde mit Adobe Illustrator CS6 (Version 42.42, OSX) erstellt.

Digitale Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung der whole mount-Präparate wurden an einem konfokalen Mikroskop (Olympus IX81 Fluoview) erstellt. Das Corti-Organ wurde dabei in 0,5 µm Abständen in baso-apikaler Richtung als Stack digital aufgenommen. Um diese Stacks mit den Aufnahmen der Kryoschnitte vergleichen zu können, wurden sie anschließend in ImageJ (Version 2.0.0) orthogonal in XZ Ebene rekonstruiert. Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte in ImageJ (Version 2.0.0) sowie Adobe Photoshop CS6 (Version 13.0, OSX). Die Präsentation der Aufnahmen wurde mit Adobe Illustrator CS6 (Version 42.42, OSX) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Posttranslationale Modifikationen

3.1.1 Tyrosiniertes Tubulin

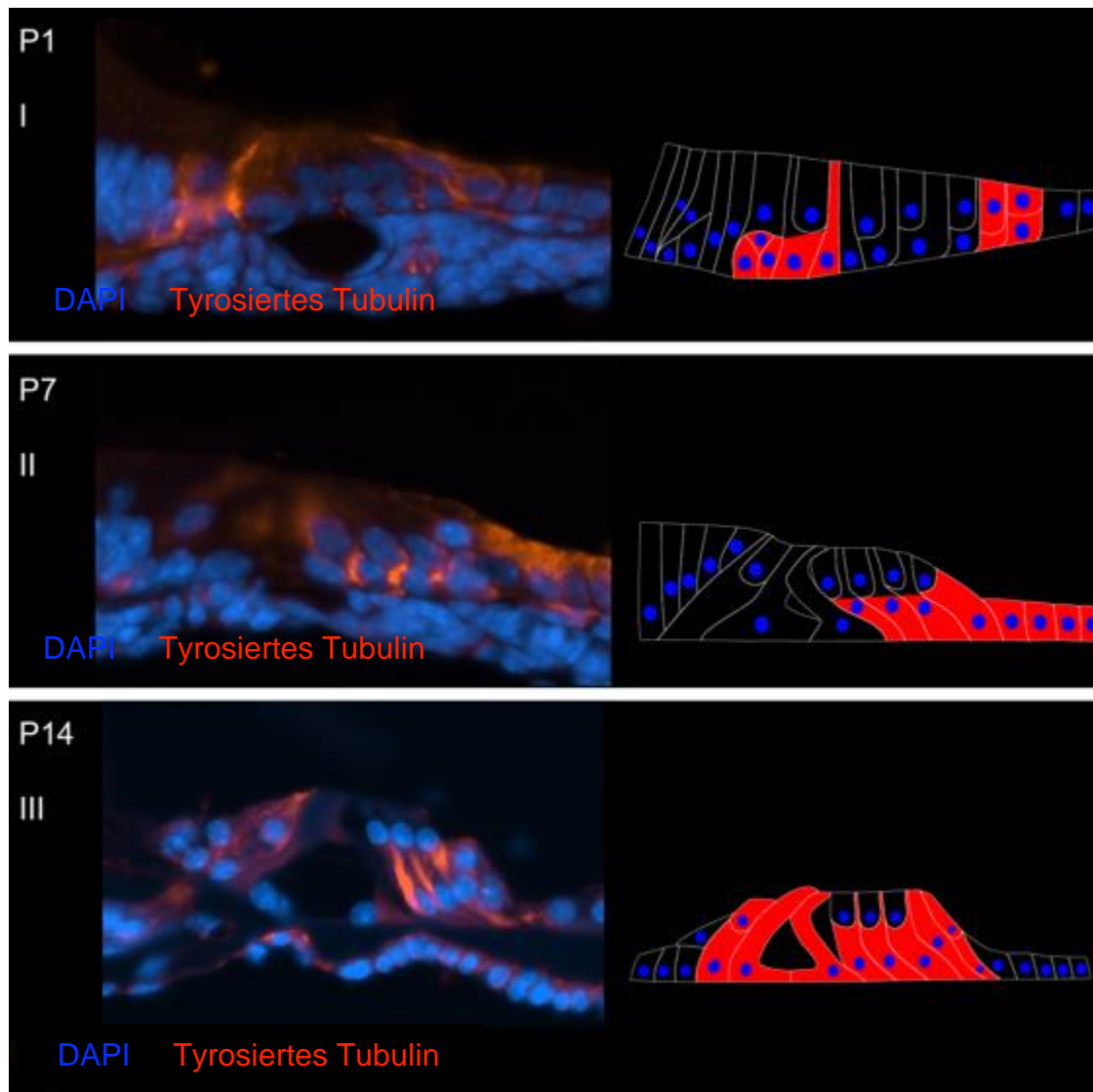


Abbildung 15 Immunhistochemische Darstellung von tyrosiniertem Tubulin im Corti-Organ
Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). Tyrosiniertes Tubulin (rot) und DAPI (blau).

An P1 (Abbildung 15, I) zeigt sich durch den Antikörper eine Anfärbung in basalen Zellen des Kölliker-Organ und in der inneren Pfeilerzelle. Die Hensen- und Grenzzellen werden ebenfalls markiert.

P7 (Abbildung 15, II) zeigt eine Antikörperfärbung in der basalen Hälfte der Deiters-Zellen, Hensen- und Grenzzellen.

Zum Zeitpunkt P14 (Abbildung 15, III) wird durch den Antikörper die innere Haarzelle, die innere Phalangealzelle sowie innere und äußere Pfeilerzelle diffus markiert. In jeder der drei Deiters-Zellen wird durch den Antikörper eine dichte Struktur dargestellt, die von der basalen Zellwand bis zum Beginn der phalangealen Fortsätze reicht. Die Hensen-Zellen und Grenzzellen zeigen ebenfalls eine diffuse Anfärbung durch den Antikörper.

3.1.2 Detyrosiniertes Tubulin

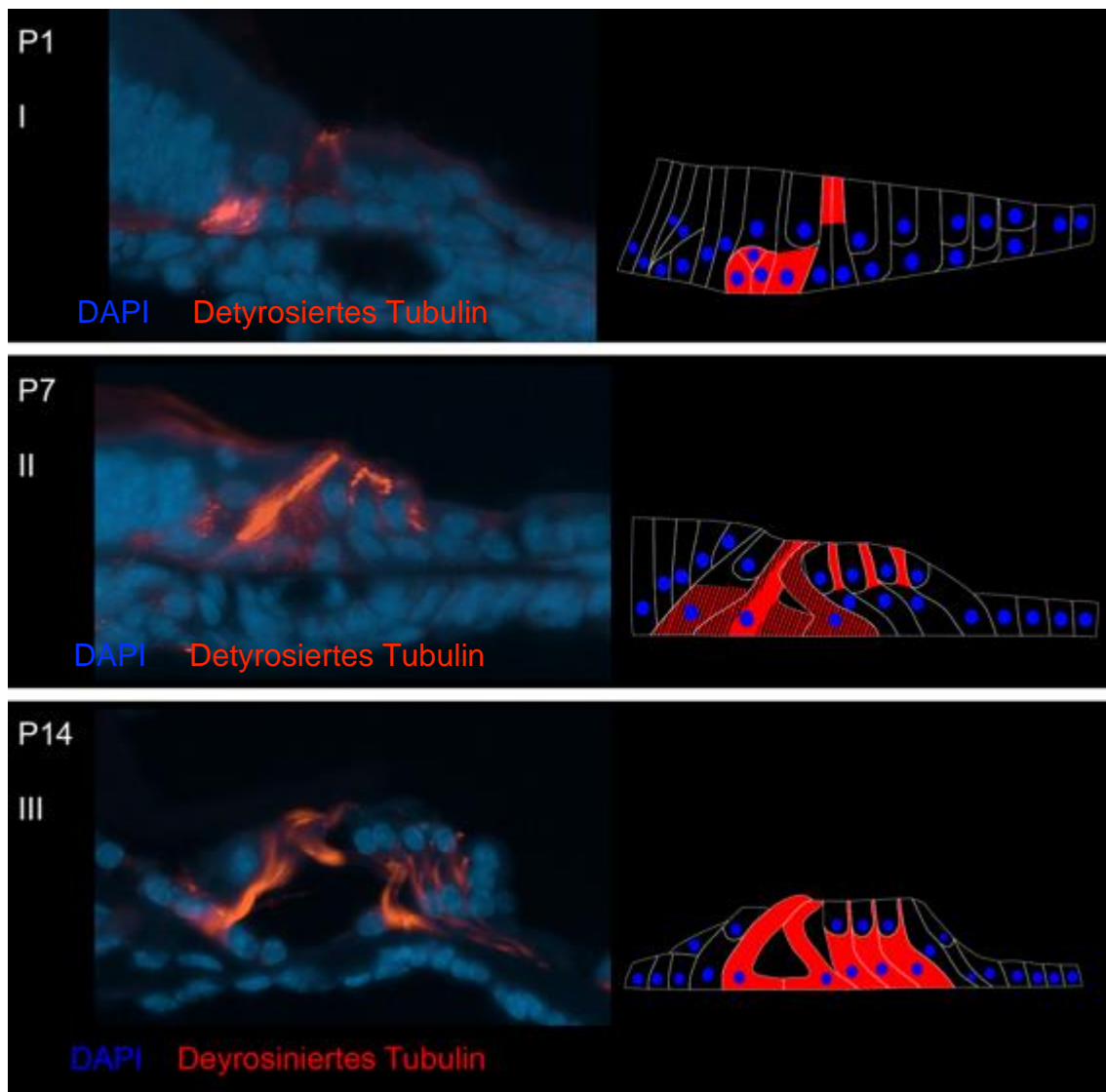


Abbildung 16 Immunhistochemische Darstellung von detyrosiniertem Tubulin im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). Detyrosiniertes Tubulin (rot) und DAPI (blau).

An P1 zeigt sich eine Antikörpermarkierung in basalen Abschnitten des Kölliker-Organs sowie in der apikalen Hälfte der inneren und äußeren Pfeilerzelle.

An P7 färbt der Antikörper die basale Hälfte der inneren Phalangealzelle sowie der inneren Pfeilerzelle an. Die äußere Pfeilerzelle färbt sich ebenfalls diffus an. Die phalangealen Fortsätze der Deiters-Zellen und eine dichte, durch die ganze innere Pfeilerzelle reichende Struktur werden intensiv angefärbt.

Zum Zeitpunkt P14 zeigen sich intensiv angefärbte, längliche Strukturen in der inneren und äußeren Pfeilerzelle sowie den drei Deiters-Zellen. Die bündelartigen Strukturen reichen in den Pfeilerzellen vom basalen Zellpol bis in die Kopfplatte und in den Deiters-Zellen von basalen Zellpol bis in die Phalangen.

3.1.3 Acetyliertes Tubulin

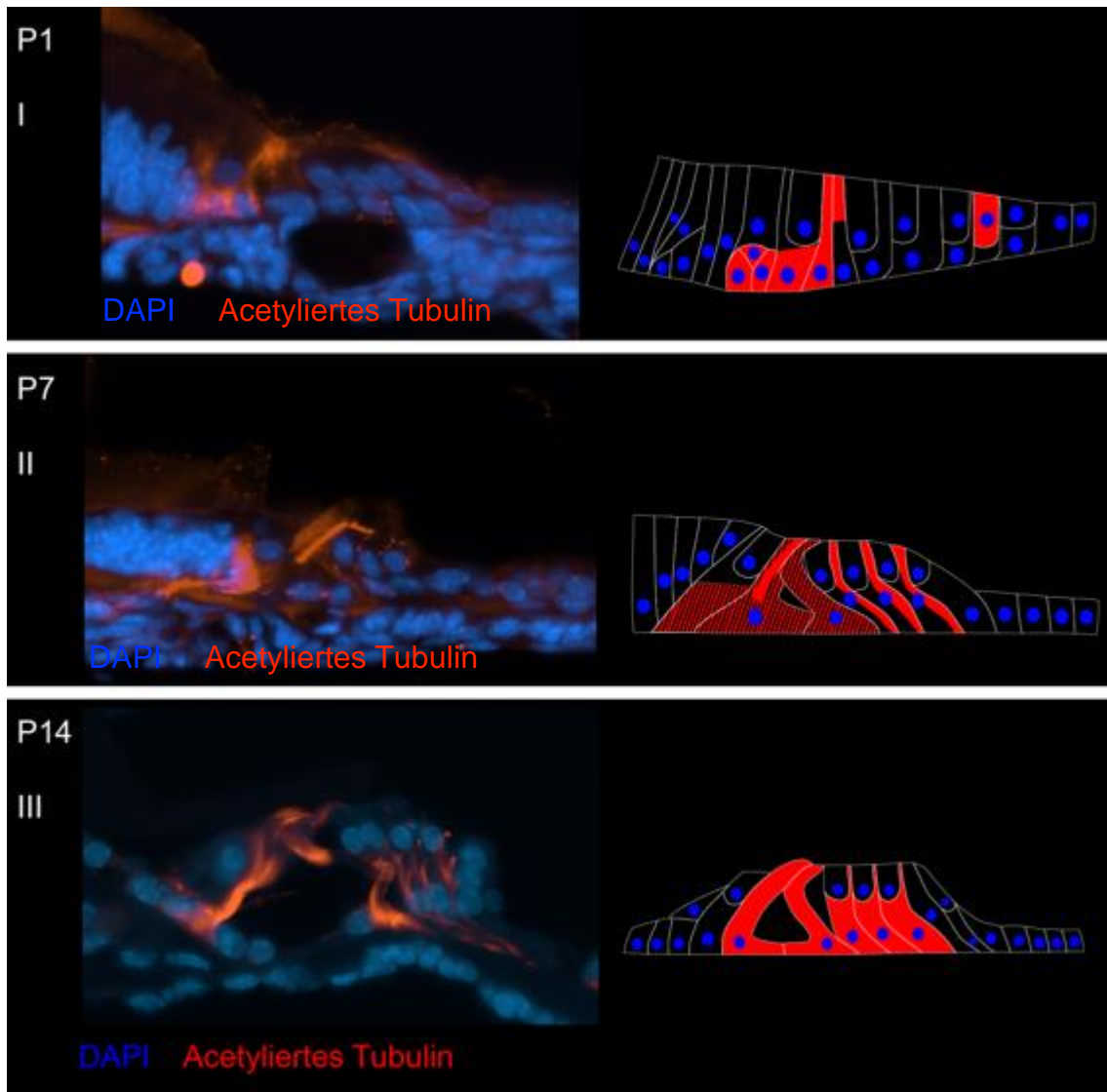


Abbildung 17 Immunhistochemische Darstellung von acetyliertem Tubulin im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). Acetyliertes Tubulin (rot) und DAPI (blau).

An P1 zeigt sich eine Antikörpermarkierung in basalen Abschnitten des Kölliker-Organs. Während die innere Pfeilerzelle vom basalen bis zum apikalen Zellpol angefärbt wird, zeigt sich in der äußeren Pfeilerzelle lediglich die apikale Hälfte angefärbt. Eine Grenzzelle wird ebenfalls diffus angefärbt.

An P7 färbt der Antikörper die basale Hälfte der inneren Phalangealzelle sowie der inneren Pfeilerzelle. Die äußere Pfeilerzelle färbt sich ebenfalls diffus an. Eine dichte, durch die apikale Hälfte bis in die Kopfplatte der inneren Pfeilerzelle reichende Struktur zeigt sich intensiv angefärbt. In jeder der drei Deiters-Zellen wird durch den Antikörper eine dichte Struktur dargestellt, die von der basalen Zellwand bis zum Beginn der phalangealen Fortsätze reicht.

Zum Zeitpunkt P14 zeigen sich intensiv angefärbte, längliche Strukturen in der inneren und äußeren Pfeilerzelle sowie den drei Deiters-Zellen. Die bündelartigen Strukturen reichen in den Pfeilerzellen vom basalen bis in die Kopfplatte und in den Deiters-Zellen von basalen Zellpol bis in die Phalangen. Abbildung 17, III zeigt, dass diese Bündel bis an das apikale Ende der Phalangen reichen.

3.1.4 Polyglutamyliertes Tubulin

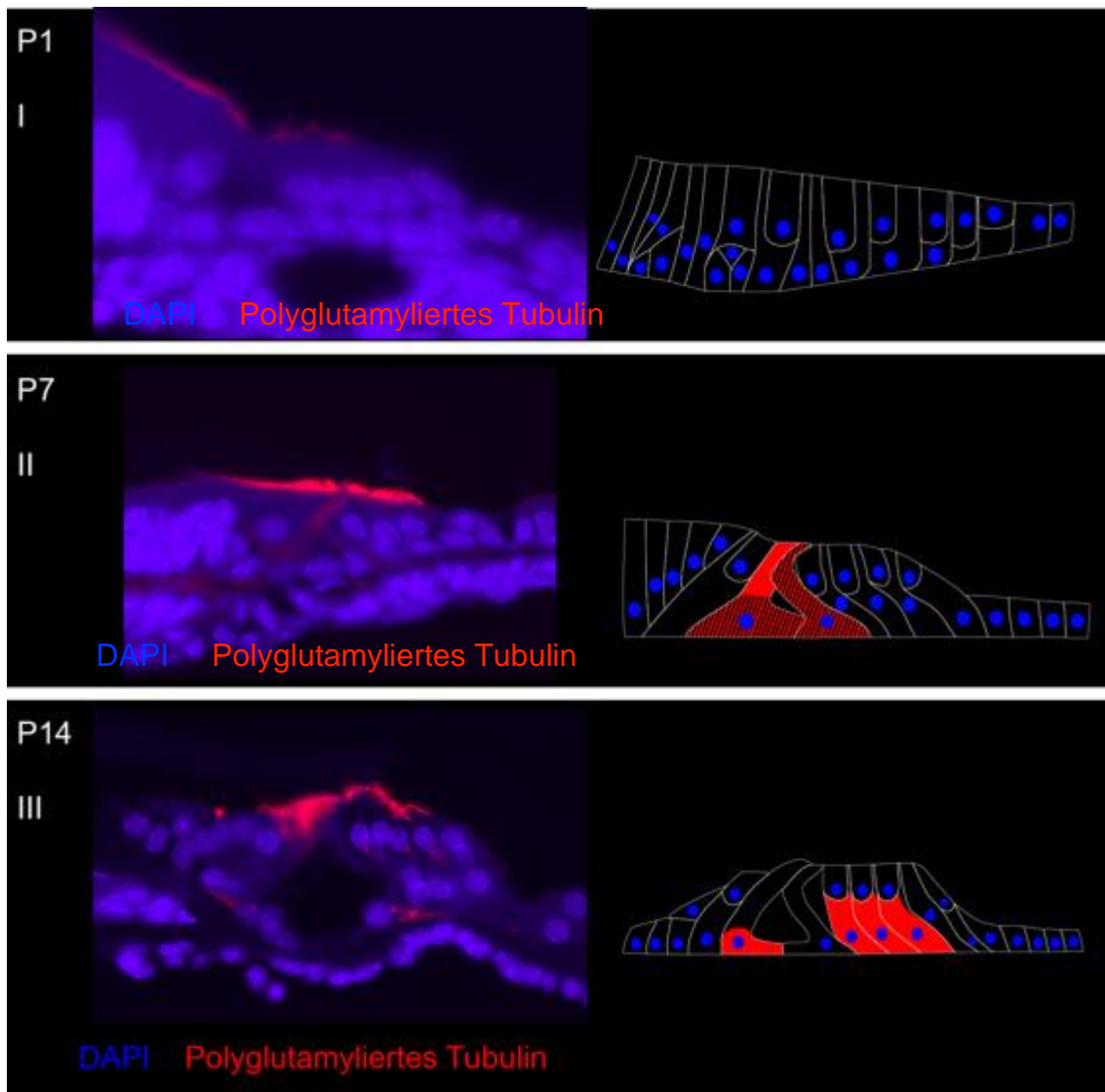


Abbildung 18 Immunhistochemische Darstellung von polyglutamyliertem Tubulin im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). Polyglutamyliertes Tubulin (rot) und DAPI (blau).

Zum Zeitpunkt P1 findet sich im cortischen Organ oder angrenzenden Zellen keine Antikörpermarkierung.

An P7 zeigt sich eine schwache Anfärbung der basalen Hälfte beider Pfeilerzellen sowie eine intensivere Anfärbung der apikalen Hälfte der inneren Pfeilerzelle.

Zum Zeitpunkt P14 zeigen sich intensiv angefärbte, längliche Strukturen in den drei Deiters-Zellen sowie etwas schwächer in der inneren Pfeilerzelle. Die bündelartigen Strukturen reichen in den Pfeilerzellen vom basalen Zellpol bis zu der Kopfplatte und in den Deiters-Zellen von basalen Zellpol bis zum Beginn der phalangealen Fortsätze. Dem Corti-Organ aufliegend ist die Tektorialmembran zu erkennen, die durch den sekundären Antikörper stark akzentuiert wird.

3.2 TBC Proteine

3.2.1 TBCA

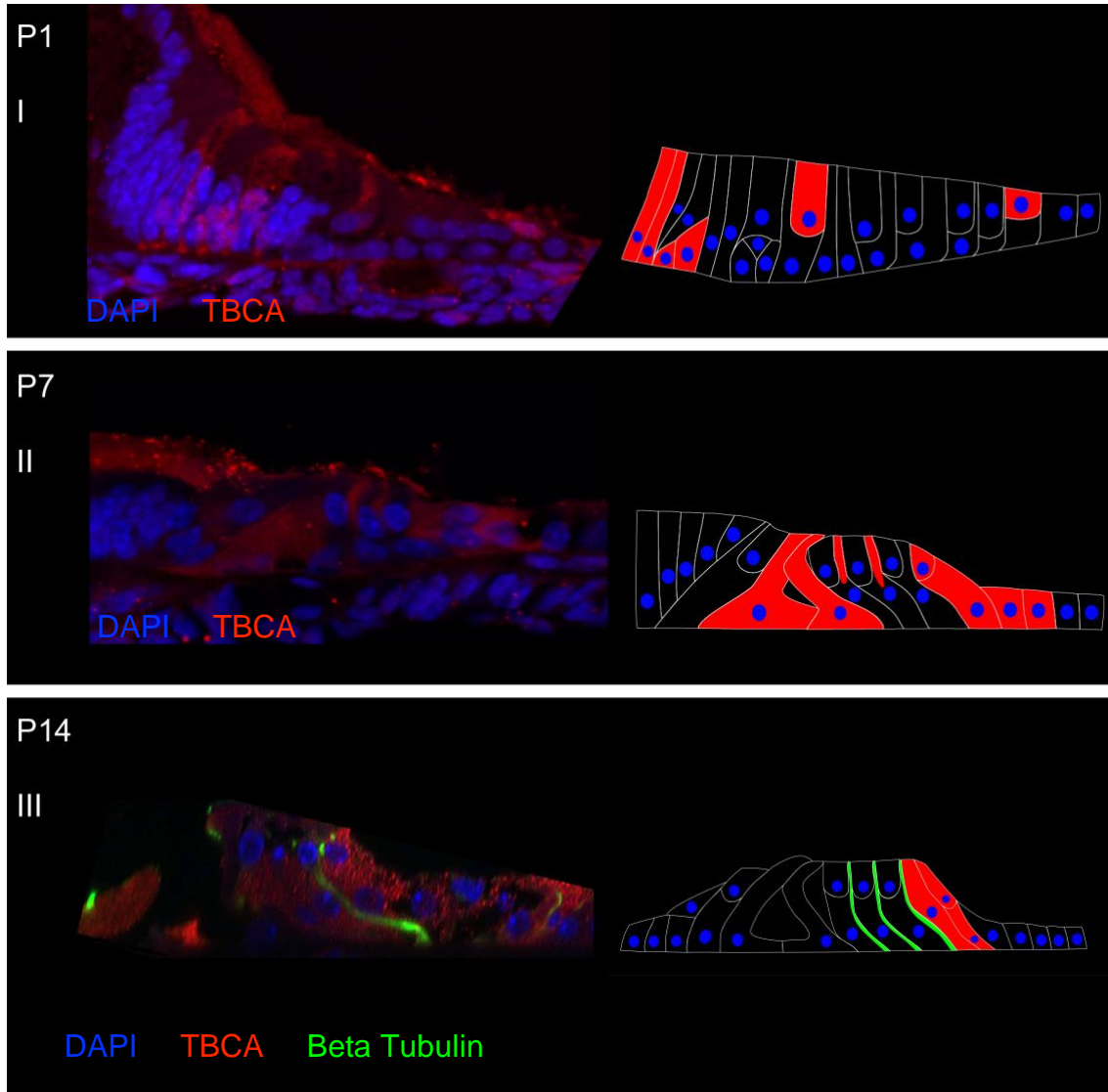


Abbildung 19 Immunhistochemische Darstellung von TBCA im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). TBCA (rot), beta Tubulin (grün) und DAPI (blau).

An P1 zeigt sich durch den Antikörper eine Markierung von Zellen im inneren Bereich des Kölliker-Organs sowie der inneren Haarzelle und einer Tektalzelle.

An P7 färbt der Antikörper die komplette innere und äußere Pfeilerzelle an. Die phalangealen Fortsätze der drei Deiters-Zellen, Tektalzellen sowie Hensen-Zellen werden ebenfalls durch den Antikörper markiert.

Die Abbildung 19, III zeigt eine Doppelfärbung von TBCA und acetyliertem Tubulin. Die TBCA Markierung findet sich in den Tektal- und Hensen-Zellen. Bündelartige Strukturen aus beta Tubulin reichen in den Deiters-Zellen vom basalen Zellpol bis in die phalangealen Fortsätze.

3.2.2 TBCB

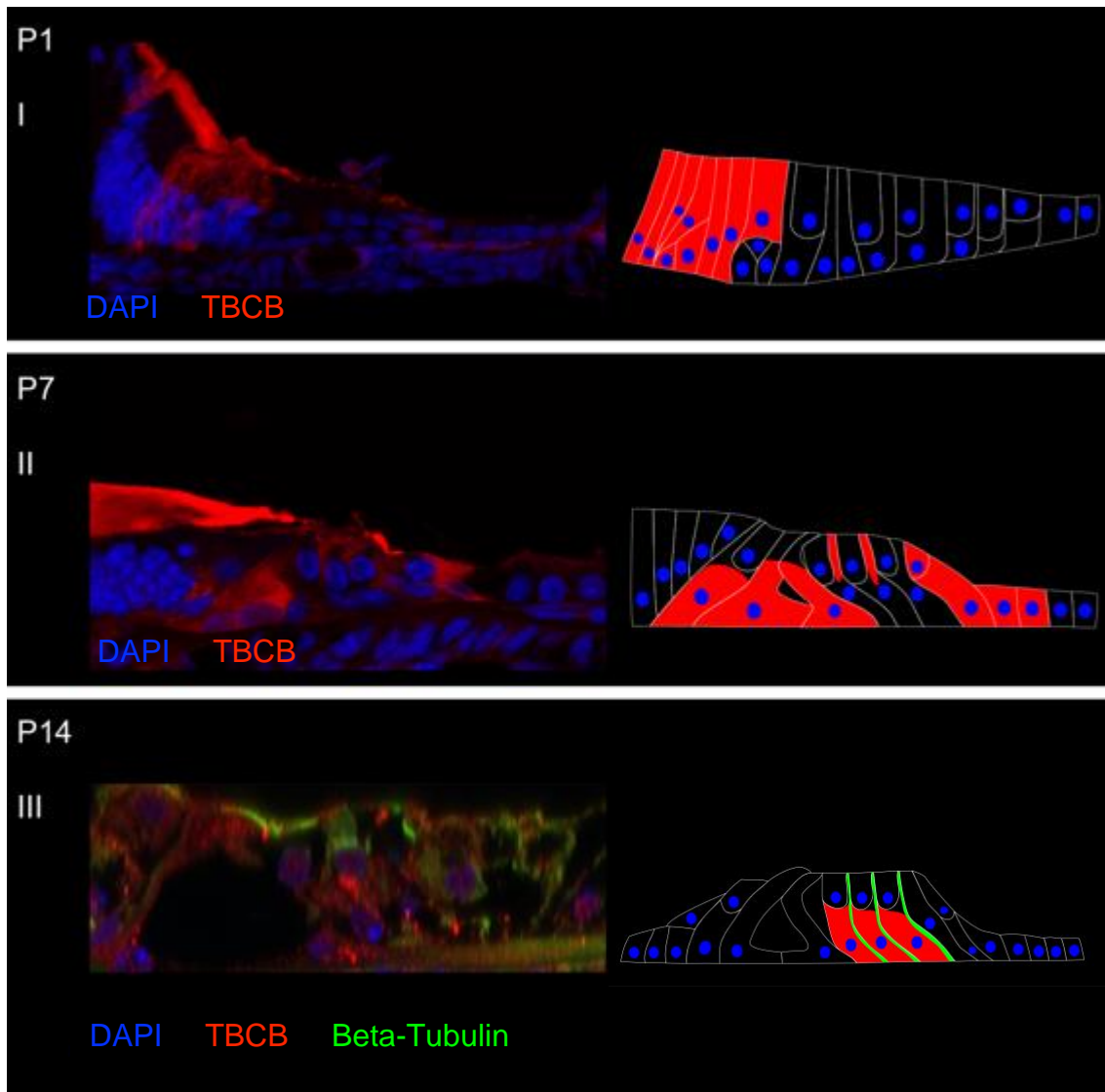


Abbildung 20 Immunhistochemische Darstellung von TBCB im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). TBCB (rot), beta-Tubulin (grün) und DAPI (blau).

An P1 markiert der Antikörper einen Großteil der Zellen des Kölliker-Organs. Zellen des Corti-Organs werden nicht angefärbt.

An P7 färbt der Antikörper die basale Hälfte der inneren Phalangealzelle sowie der inneren und äußeren Pfeilerzellen an. Die phalangealen Fortsätze der drei Deiters-Zellen, Tektalzellen sowie Hensen-Zellen werden ebenfalls durch den Antikörper markiert.

Die Abbildung 20, III zeigt eine Doppelfärbung von TBCB und beta-Tubulin zum Zeitpunkt P14. In der basalen Zellhälfte der Deiters-Zellen sind TBCB Bereiche zu erkennen, die von der basalen Zellwand bis unterhalb die äußere Haarzelle reichen.

3.2.3 TBCC

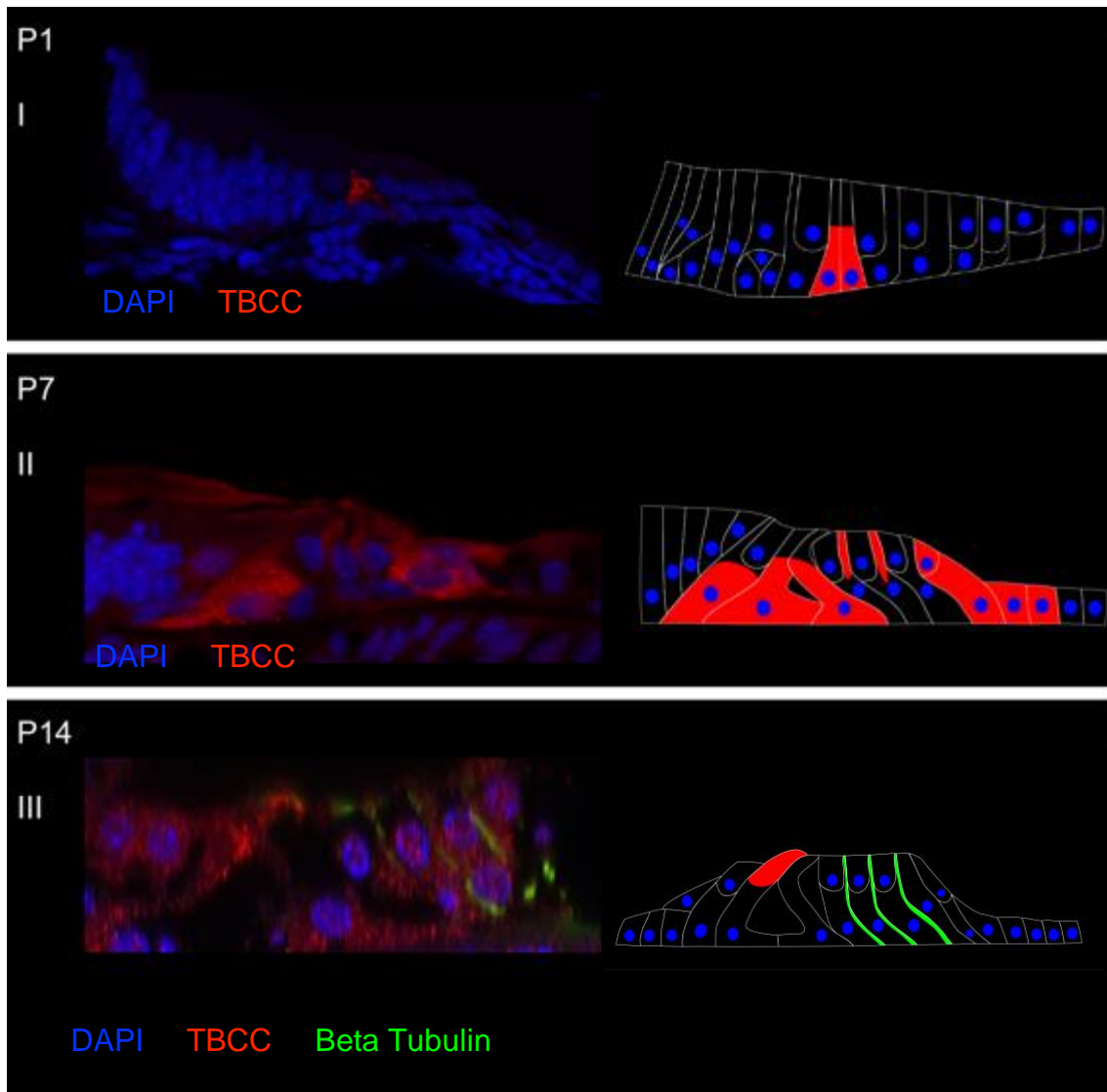


Abbildung 21 Immunhistochemische Darstellung von TBCC im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). TBCC (rot), beta Tubulin (grün) und DAPI (blau).

Zum Zeitpunkt P1 findet sich eine intensive Antikörpermarkierung in der basalen Hälfte der beiden Pfeilerzellen.

An P7 färbt der Antikörper die basale Hälfte der inneren Phalangealzelle sowie der inneren und äußeren Pfeilerzellen an. Die phalangealen Fortsätze der drei Deiters-Zellen, Tektalzellen sowie Hensen-Zellen werden ebenfalls durch den Antikörper markiert.

Die Abbildung 21, III zeigt eine Doppelfärbung von TBCC und acetyliertem Tubulin. Bis auf die äußeren Haarzellen zeigen alle Zellen des Corti-Organ eine TBCC Markierung. In den Deiters-Zellen reichen bündelartige, beta Tubulin markierte Strukturen vom basalen Zellpol entlang der phalangealen Fortsätze bis an die apikale Oberfläche.

3.2.4 TBCD

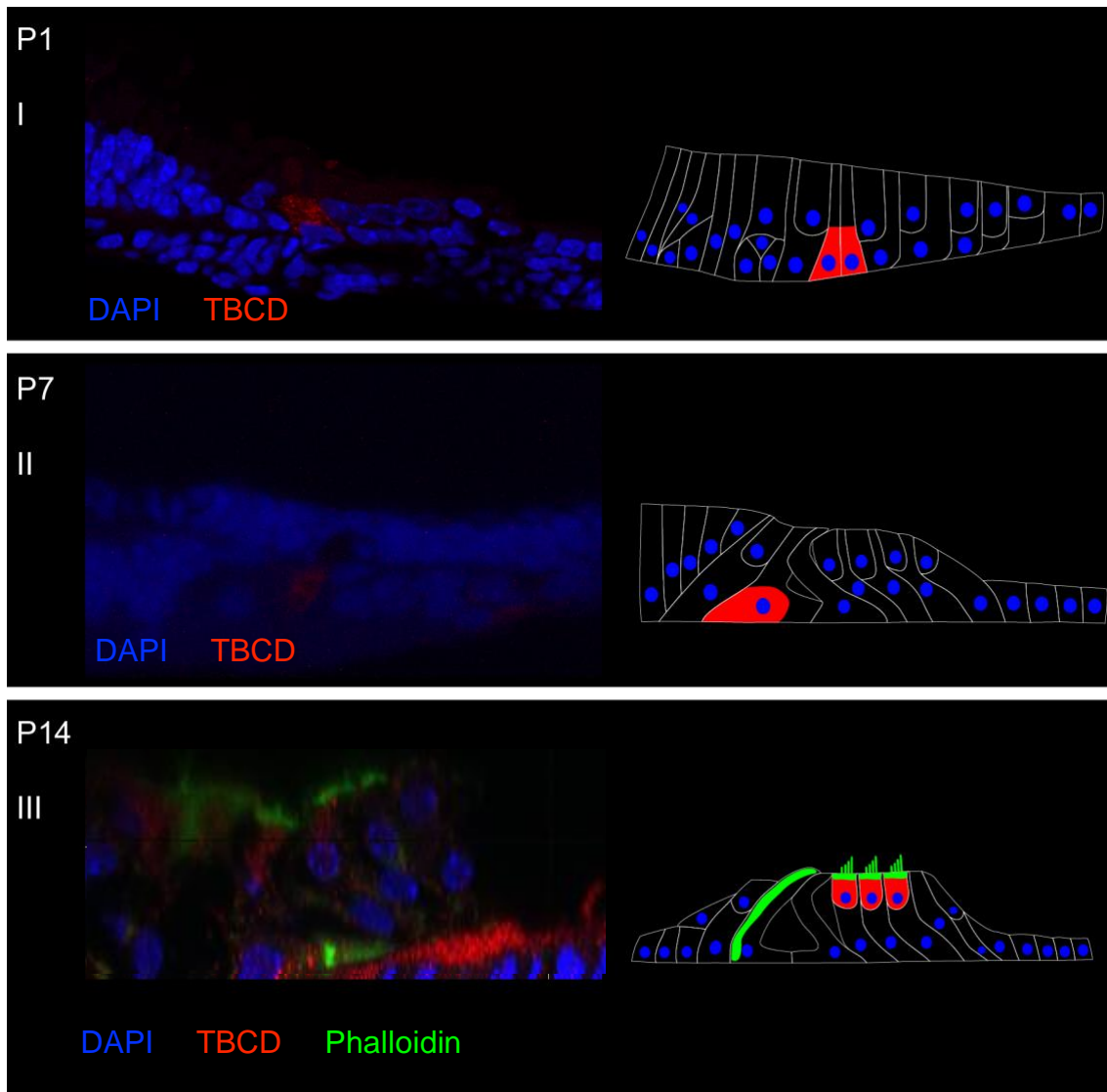


Abbildung 22 Immunhistochemische Darstellung von TBCD im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). TBCD (rot), Phalloidin (grün) und DAPI (blau).

Zum Zeitpunkt P1 findet sich eine intensive Antikörpermarkierung in der basalen Hälfte der beiden Pfeilerzellen.

An P7 färbt der Antikörper die inneren Pfeilerzellen im Bereich des Zellkerns an.

Die Abbildung 22, III zeigt eine Doppelfärbung von TBCD und Phalloidin. Diffuse TBCD Markierung findet sich in den äußeren Haarzellen, deren Stereozilien eine Phalloidin Färbung aufweisen.

3.2.5 TBCE

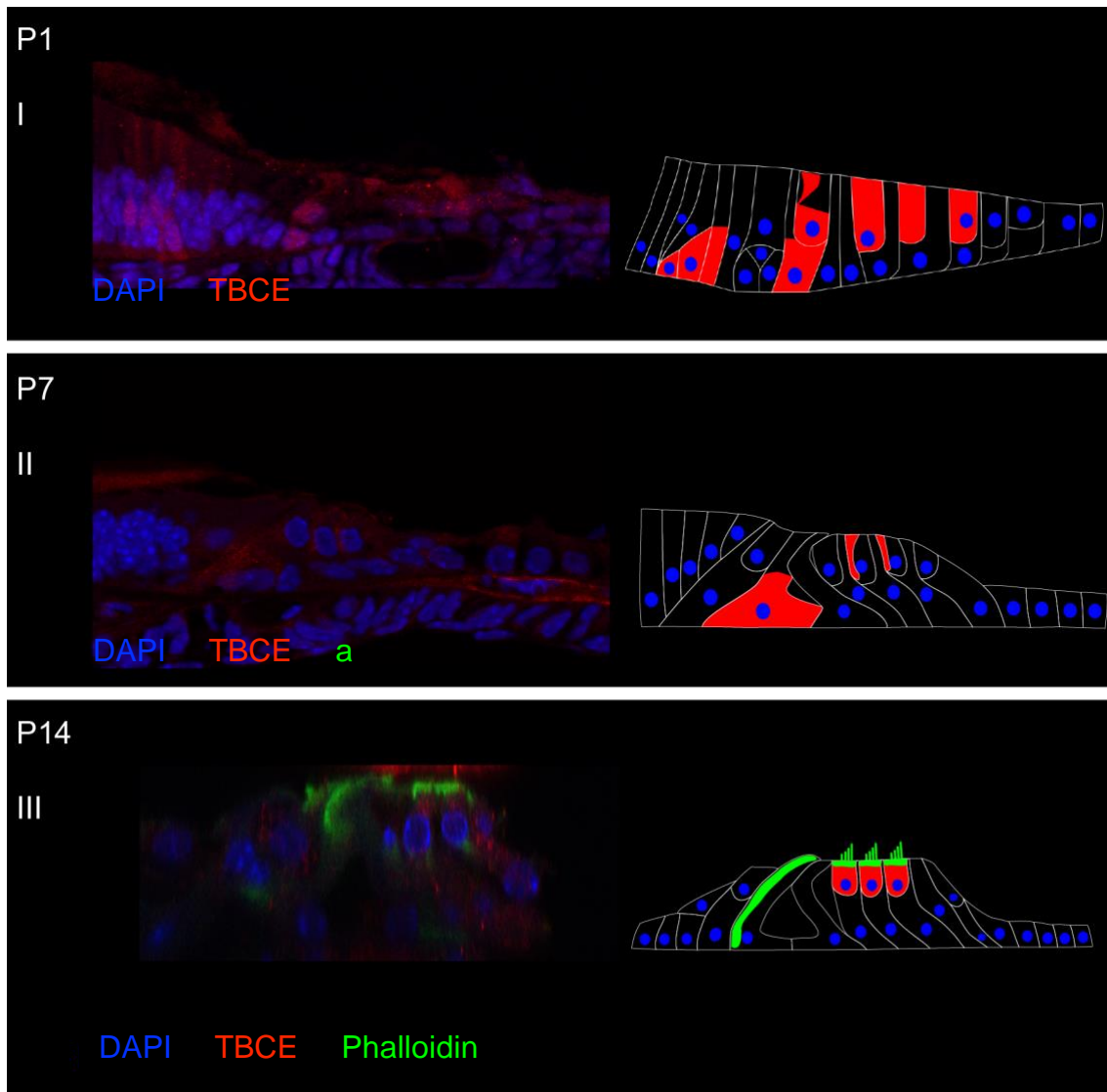


Abbildung 23 Immunhistochemische Darstellung von TBCE im Corti-Organ

Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der Immunhistochemie. Die entsprechende schematische Darstellung ist der rechten Spalte zu entnehmen (erste Reihe P1, zweite Reihe P7, dritte Reihe P14). TBCE (rot), Phalloidin (grün) und DAPI (blau).

An P1 zeigt sich durch den Antikörper eine Anfärbung in basalen Zellen des Kölliker-Organs und in der basalen Hälfte der inneren Phalangealzelle. Um den Zellkern und unterhalb der apikalen Oberfläche der inneren Haarzellen ist eine

diffuse Anfärbung zu erkennen. Die drei äußeren Haarzellen werden ebenfalls markiert.

An P7 färbt der Antikörper die basale Hälfte der inneren Phalangealzelle sowie die phalangealen Fortsätze der Deiters-Zellen an.

Die Abbildung 23, III zeigt eine Doppelfärbung von TBCE und Phalloidin. Diffuse TBCE Markierung findet sich in den äußeren Haarzellen, deren Stereozilien eine Phalloidin Färbung aufweisen.

4 Diskussion

In der folgenden Diskussion wird die spatio-temporale Verteilung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von Mikrotubuli und der „tubulin-specific chaperone“ Proteinen (TBCs) während der ersten 14 postnatalen Tage im murinen Corti-Organ kritisch betrachtet. Hierfür werden diese zusammengefasst, interpretiert und im Vergleich mit aktueller Literatur diskutiert. Abschließend erfolgen eine Zusammenfassung sowie ein Ausblick auf weiteren Forschungsbedarf zu dieser Thematik.

4.1 Posttranslationale Modifikationen

Am ersten postnatalen Tag zeigen tyrosiniertes, detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin ähnliche Expressionsmuster auf, während polyglutamyliertes Tubulin in keiner Zelle des Corti-Organs nachgewiesen werden kann. Tyrosiniertes, detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin werden im Bereich der basalen Zellen des Kölliker-Organs exprimiert. In diesem Entwicklungsstadium sind Mäuse noch taub. Es wird angenommen, dass im Kölliker-Organ intrinsische, spontane Aktivität generiert wird, die die Entwicklung der primären afferenten Nervenfasern fördert (Tritsch, Yi et al. 2007). In diesem Bereich befindet sich die Habenula perforata, ein durchlöcherter Abschnitt der Basilarmembran, durch deren Löcher die Nervenfasern vom Corti-Organ in Richtung Modiolus und vice versa verlaufen (Raphael and Altschuler 2003). In der Arbeit von Ito, Spicer et al. (1995) konnte die Expression von beta-Tubulin in diesem Bereich des Corti-Organs von Gerbil nachgewiesen werden. Auf den hochauflösenden Aufnahmen von Tannenbaum and Slepecky (1997) ist hier die Expression von posttranslationen Tubulinmodifikationen in den Nervenfasern zu erkennen, während in den Zellen des Kölliker-Organs keine Expression nachgewiesen wird. Im Vergleich dazu kann in den Aufnahmen der vorliegenden Arbeit nicht klar zwischen Zellen des Kölliker-Organs und den Nervenfasern differenziert werden.

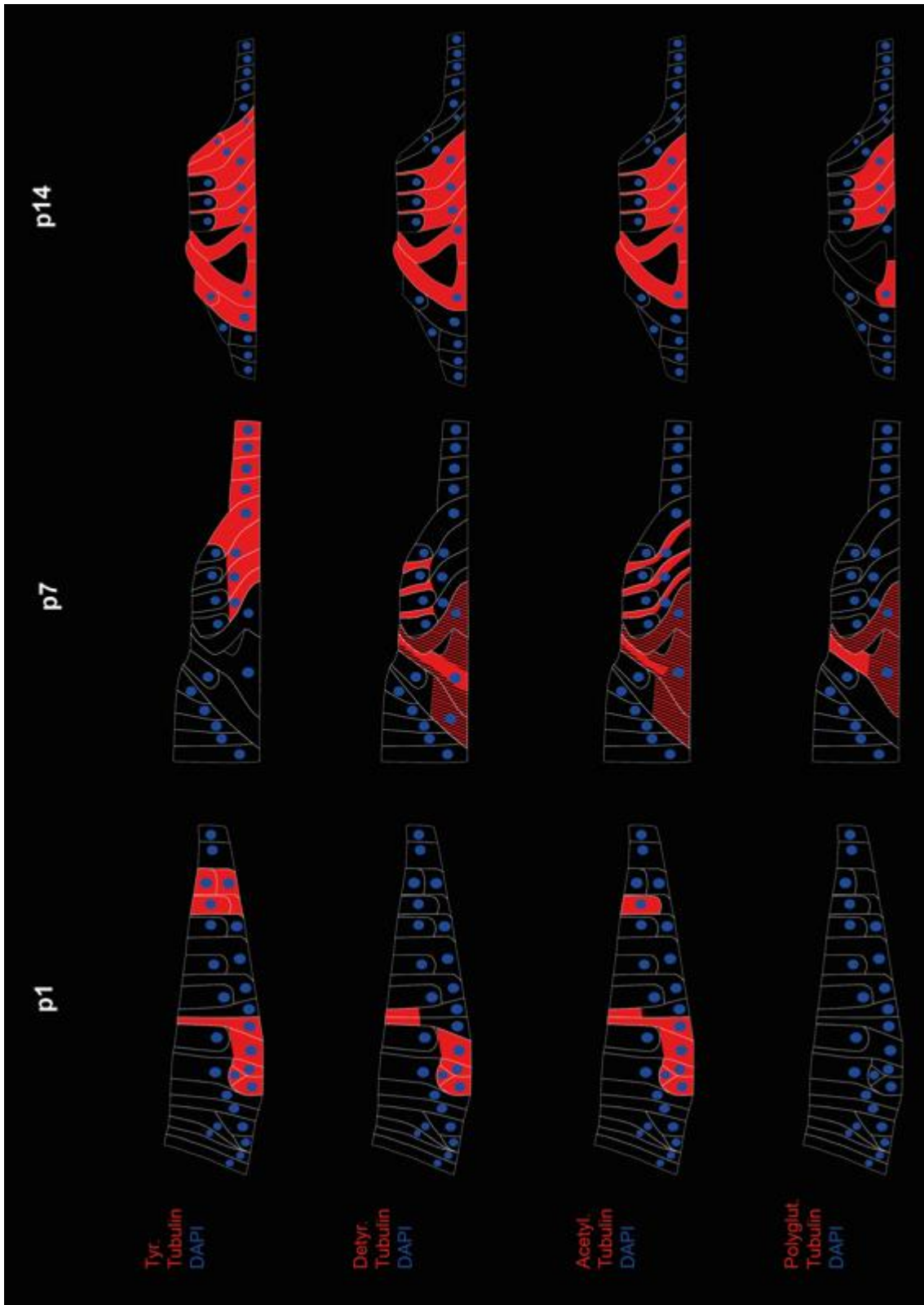


Abbildung 24 Expressionsmuster der posttranslationalen Modifikation von Tubulin P0, P7, P14

In der vorliegenden Arbeit konnte folgendes Expressionsmuster der drei posttranslationalen Modifikationen in den Pfeilerzellen gefunden werden: Tyrosiniertes, detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin in der inneren Pfeilerzelle und die letzteren zusätzlich im apikalen Drittel der äußeren Pfeilerzelle. Dieses Expressionsmuster entspricht weitestgehend dem in Gerbils, das von Tannenbaum and Slepecky (1997) beschrieben wurde. Im Apex der Pfeilerzellen befindet sich das Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC), in dem die Mikrotubuli gebildet werden (Tucker, Paton et al. 1992, Jensen-Smith, Eley et al. 2003).

Im Gegensatz zu Tannenbaum and Slepecky (1997) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine geringe Expression von tyrosiniertem und acetyliertem Tubulin am lateralen Rand des Corti-Organs. Dies ist der Bereich, in dem sich später die Tektal und Hensen-Zellen befinden. Ob diese Zellen an P1 spezifische Eigenschaften und Funktionen haben, ist bisher noch unbekannt.

Am siebten postnatalen Tag zeigen detyrosiniertes, acetyliertes und polyglutamyliertes Tubulin ähnliche Expressionsmuster. Zum einen werden die drei Tubulinmodifikationen in beiden Pfeilerzellen exprimiert. Während detyrosiniertes Tubulin als kräftige strangförmige Struktur vom Zellapex bis Zellbasis zieht, ist acetyliertes Tubulin vermehrt in der apikalen Zellhälfte und polyglutamyliertes Tubulin ubiquitär nachweisbar. Zum anderen liegen detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin auch in den Deiters-Zellen als strangförmige Bündel (Mikrotubuli-Bündel) vor. Dieses Expressionsmuster korreliert mit dem von Tannenbaum and Slepecky (1997) in Gerbils beschriebenen Muster.

Tyrosiniertes Tubulin zeigt im Gegensatz zu den anderen drei posttranslationalen Modifikationen keine Expression in den Pfeilerzellen, sondern eine kräftige Expression in der unteren Hälfte der Deiters-Zellen sowie eine diffuse Expression in den lateralen Zellen des Corti-Organs (Tektal und Hensen-Zellen). Spezifische Aufgaben oder Eigenschaften dieser Zellen und der Aufbau und die Organisation von Mikrotubuli-Netzwerken in diesem Entwicklungsstadium sind bislang nicht bekannt. Hier liegt einer der Hauptunterschiede im Vergleich der vorliegenden

Arbeit mit der Publikation von Tannenbaum and Slepecky (1997): In Gerbils konnte tyrosiniertes Tubulin vor allem in der Basis der inneren Pfeilerzelle, in der gesamten äußeren Pfeilerzelle und in den Phalangen der Deiters-Zellen nachgewiesen werden.

Wie auch die Expression von beta-Tubulin (Ito, Spicer et al. 1995) nimmt die Expression von PTMs innerhalb der Nervenfasern oberhalb der Habenula perforata im Laufe der ersten postnatalen Woche merklich ab.

An P14 wird tyrosiniertes, detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin in allen Stützzellen exprimiert. Die kräftigen Mikrotubuli-Bündel in den Pfeilerzellen und Deiters-Zellen zeigen eine starke Expression von tyrosiniertem, detyrosiniertem und acetyliertem Tubulin. Hier besteht ein wesentlicher Unterschied zur Arbeit von Tannenbaum and Slepecky (1997): Im Corti-Organ von Gerbils lag tyrosiniertes Tubulin ausschließlich diffus und nicht im Mikrotubuli-Bündel vor. Polyglutamyliertes Tubulin findet sich in den basalen Abschnitten der inneren Pfeilerzelle und der Deiters-Zellen. In Gerbils konnte polyglutamyliertes Tubulin entlang des gesamten Verlaufs der Mikrotubuli-Bündel sowie der Deiters und Pfeilerzellen nachgewiesen werden (Tannenbaum and Slepecky 1997). In der inneren Haarzelle konnte diffus verteiltes tyrosiniertes Tubulin nachgewiesen werden und damit die einzige Haarzelle, in der nur eine posttranslationale Modifikation vorliegt.

Posttranslationale Modifikationen wurden in der vorliegenden Arbeit nur in den Stützzellen sowie in einigen das Corti-Organ nach lateral abgrenzenden Zellen nachgewiesen. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit der elektronenmikroskopischen Beschreibung der Mikrotubuli im Corti-Organ. Während in den Pfeiler- und Deiters-Zellen sehr ausgeprägte Mikrotubuli Bündel beschrieben werden (Tucker, Mogensen et al. 1998), waren in den Haarzellen nur wenige Mikrotubuli nachweisbar (Renauld, Johnen et al. 2015).

Die Expression von posttranslationalen Modifikationen findet sich zunächst im Zellapex und schreitet im Laufe der Zeit Richtung Zellbasis fort. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Zentrosome ebenfalls am Zellapex befinden und die

Mikrotubuli vom Apex aus in Richtung Basis wachsen (Tucker, Paton et al. 1992, Henderson, Tucker et al. 1994, Henderson, Tucker et al. 1995, Tucker, Mogensen et al. 1998).

4.2 TBC Proteine

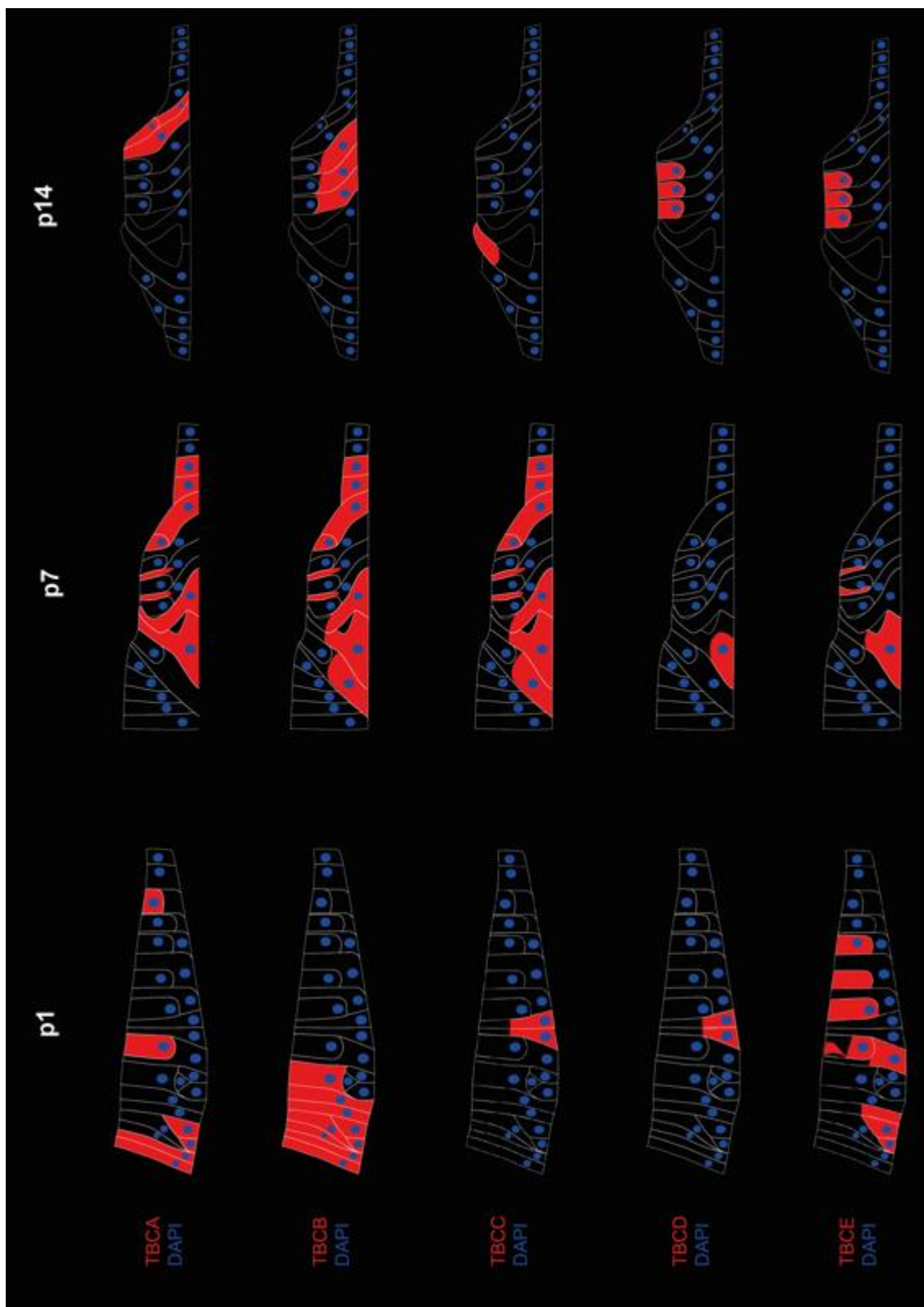


Abbildung 25 Expressionsmuster der TBC Proteine P0, P7, P14

In der vorliegenden Arbeit stellten sich die Expressionsmuster der TBC Proteine an P1 deutlich vielfältiger und komplexer dar als die der posttranslationalen Tubulinmodifikationen. Im Kölliker-Organ können TBCA (nur medial), TBCB (alle Zellen) und TBCE (nur medial und basal) nachgewiesen werden. In der inneren Haarzelle wird TBCA und TBCE exprimiert. TBCE liegt außerdem in den äußeren Haarzellen sowie der inneren Phalangealzelle vor. TBCC und TBCD kommen ausschließlich im basalen Bereich der Pfeilerzellen vor.

Am siebten postnatalen Tag zeigt sich ein wesentlich homogeneres Bild: TBCA, TBCB und TBCC werden in beiden Pfeilerzellen, den Phalangen der Deiters-Zellen und Zellen im lateralen Bereich des Corti-Organs (Tektal, Hensen und Claudius/Böttcher Zellen) exprimiert. Zusätzlich kann TBCC im basalen Abschnitt der inneren Phalangealzelle nachgewiesen werden. TBCD und TBCE werden im basalen Bereich der inneren Pfeilerzelle exprimiert, TBCE zusätzlich in den phalangealen Fortsätzen der Deiters-Zellen. Damit zeigen TBCA, TBCB und TBCE ein gänzlich geändertes Expressionsmuster im Vergleich zu P1: In keiner Zelle, die an P1 die genannten Proteine exprimiert, ist dies an P7 nachweisbar.

Auch am 14. postnatalen Tag zeigt sich eine deutliche Reduktion der Expressionsmuster: TBCA wird nur in lateralen Zellen des Corti-Organs (Hensen und Tektal Zellen), TBCB nur noch in den Deiters-Zellen (ausgenommen der phalangealen Fortsätze) und TBCC im apikalen Abschnitt der inneren Pfeilerzelle exprimiert. In den äußeren Haarzellen findet sich eine TBCD- und TBCE-Expression.

4.3 Die „multi-tubulin hypothesis“ und der „tubulin code“

Während über Isotypen und posttranslationalen Modifikationen von Tubulin bereits einiges bekannt ist, ist das Wissen über TBC Proteine noch sehr begrenzt. Westermann and Weber (2003) schufen den Begriff des „tubulin code“. Posttranslationale Modifikationen von Tubulin stellen Markierungen für Mikrotubuli-assoziierten Proteine dar: Da sich diese Modifikationen an der Außenseite des Mikrotubuli-Hohlzylinders (C-Terminus) befinden, können sie

von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen „abgelesen“ werden und diese somit beeinflussen. Hieraus resultieren stabilisierende oder destabilisierende Effekte. Detyrosinierung und Acetylierung von Tubulin wird vor allem auf langlebigen Mikrotubuli gefunden und somit eher als stabilisierende Faktoren interpretiert (Janke 2014). Wie bereits von Tannenbaum and Slepecky (1997) beschrieben, finden sich diese beiden Modifikationen an P1 in der inneren Pfeilerzelle und ab P7 zusätzlich in der äußeren und den Deiters-Zellen von Gerbils. Dieses Expressionsmuster konnte in der vorliegenden Arbeit in der Maus bestätigt werden.

Über die genaue Funktion der inneren Pfeilerzelle während den ersten postpartalen Tagen liegen in der Literatur bisher nur wenig Daten vor. Die innere Pfeilerzelle wird in der Entwicklung des Corti-Organs als erstes gebildet. (Thelen, Breuskin et al. 2009). In der Embryonalphase finden innerhalb dieser Zelle zudem wichtige Signalwege (u.a. FGFR3 und Notch) statt, deren Unterbrechung zu einem fehlerhaften Aufbau des Corti-Organs führt (Puligilla, Feng et al. 2007). Es wird daher angenommen, dass die innere Pfeilerzelle eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Corti-Organs einnimmt (Thelen, Breuskin et al. 2009). Wie in der vorliegenden Arbeit und auch in der Arbeit von Tannenbaum and Slepecky (1997) gezeigt wurde, weist zu diesem Zeitpunkt nahezu keine andere Zelle posttranslationale Modifikationen auf. Ebenso konnten auch Tubulin-Isotypen nicht nachgewiesen werden (Renauld, Johnen et al. 2015). Daher ist anzunehmen, dass die innere Pfeilerzelle eine wichtige Rolle für die Stabilität und Integrität des Corti-Organs spielt. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, sind Experimente zur Steifigkeit der inneren Pfeilerzelle durchgeführt worden (Zetes, Tolomeo et al. 2012). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Steifigkeit des muren Corti-Organs vor allem durch das Vorhandensein von großen Mikrotubuli-Bündeln erreicht wird, welche den Hauptteil des Zytoskeletts der Stützzellen ausmachen.

Für den Hörvorgang ist die Steifigkeit der Pfeilerzellen und Deiters-Zellen von essentieller Bedeutung. Ohne diese wäre keine Verbindung zwischen Basilarmembran und Haarzellen gegeben, durch welche die Deflexion der

Stereozilien durch die Tektorialmembran ermöglicht wird (Forge and Wright 2002). Diese Steifigkeit wird vor allem durch das Vorhandensein von großen Mikrotubuli-Bündeln erreicht, welche den Hauptteil des Zytoskeletts der Stützzellen ausmachen (Zetes, Tolomeo et al. 2012). Diese Bündel weisen viel deetyrosiniertes und acetyliertes Tubulin auf. Beide Modifikationen werden vor allem auf langlebigen Mikrotubuli gefunden (Khawaja, Gundersen et al. 1988, Peris, Wagenbach et al. 2009, Janke 2014). Diese sind bereits vor dem Beginn des Hörens (P10, Mikaelian and Ruben (1965)) vorhanden. In der vorliegenden Arbeit konnten diese bereits an P7 nachgewiesen werden. Dies kann als Zeichen einer beginnenden Stabilisierung der Mikrotubuli-Bündel innerhalb der Deiters-Zellen gewertet werden. Grund hierfür könnte sein, dass die Mikrotubuli im Bereich der Stützzellen im Vergleich zu anderen Zellen mit weniger komplexen Mikrotubuli ein deutlich langsames Wachstum aufweisen (Tucker, Mogensen et al. 1995).

Im Gegensatz zur Arbeit von Tannenbaum and Slepecky (1997) können in der vorliegenden Arbeit keine posttranslationalen Modifikationen in den Haarzellen nachgewiesen werden.

An P1, P7 und P14 liegt eine TBCE Expression in den äußeren Haarzellen vor. Eine andere Studie wies diese Expression zum Zeitpunkt P35 nach (Rak, Frenz et al. 2013). Obwohl TBCD an P1 und P7 nur in den Stützzellen exprimiert wird, ist das Protein an P14 nur in den Haarzellen durch Antikörperfärbung nachweisbar.

Eine Erklärung für die aufgezeigten Unterschiede lässt sich nach umfassender Recherche in der bislang vorhandenen internationalen Literatur auf verschiedene Weise formulieren.

Zunächst sind Spezies-spezifische Unterschiede denkbar. Die bisherigen Studien über posttranslationale Modifikationen und Isotypen von Mikrotubuli im sensorischen Epithel der Cochlea wurden an Gerbil durchgeführt. Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig die posttranslationalen Modifikationen des murinen Corti-Organs. Es konnten Spezies-spezifische Unterschiede in dem

Aufbau der äußeren Haarzellen nachgewiesen werden. So findet sich in Mäusen beispielsweise nur eine Schicht von subsurface cisternae (SSC), einem Bestandteil der lateralen Wand der äußeren Haarzellen, während sich in Gerbils 2-7 Schichten finden (Raphael and Altschuler 2003). Die SSC sind an das Mikrotubuli Netzwerk angeschossen (Flock, Flock et al. 1986, Raphael and Wroblewski 1986, Raphael, Lenoir et al. 1991), Die Funktion der SSC ist bisher noch weitestgehend unklar. Sie besitzen eine ähnliche Struktur wie der Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum (Pollice and Brownell 1993), die eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese sowie Endo- und Exozytose einnehmen. Außerdem konnten Spezies-spezifische Unterschiede im Aufbau des Zytoskeletts nachgewiesen werden: Im Gegensatz zu Affen, Ratten und Mäusen besitzen die äußeren Haarzellen in Meerscheinchchen ein Netzwerk aus Aktin und Spectrin unterhalb der Kutikularplatte (Raphael, Athey et al. 1994).

Eine weitere denkbare Hypothese wäre auch, dass der verwendete Antikörper gegen andere Epitope gerichtet ist. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Antikörper wurden nach dem Paper Magiera and Janke (2013) und nach persönlicher Kommunikation mit C. Janke (Institut Curie, Orsay, Frankreich) gewählt. Somit wurden die nach aktueller Datenlage am besten beschriebenen Antikörper verwendet. In den Arbeiten von Slepecky, Henderson et al. (1995), Tannenbaum and Slepecky (1997), Saha and Slepecky (2000) wurde der monoklonale Antikörper gegen tyrosiniertes Tubulin „T9028“ von Sigma-Aldrich genutzt, während in dieser Arbeit „MAB1864-I“ von Millipore verwendet wurde. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des Organismus, in dem sie hergestellt wurden. So wurden zur Generierung des einen Antikörpers Mäuse und des anderen Ratten immunisiert. Weiterhin binden die Antikörper höchstwahrscheinlich leicht unterschiedliche Epitope. Genauere Informationen zu den verwendeten Epitopen lassen sich leider aus den Angaben der Hersteller nicht entnehmen, so dass diese Hypothese nicht geprüft werden kann.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In diversen Studien wurde in der Vergangenheit die Bedeutung von PTMs für die physiologische Entwicklung des Hörvorgangs aufgezeigt. Den verschiedenen TBC-Proteinen wird diesbezüglich ebenfalls eine hohe Relevanz zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher in einem deskriptiven Ansatz das Expressionsmuster von PTMs und TBCs im Corti-Organ während verschiedener Entwicklungsstadien im murinen Organismus beschrieben werden. Die wichtigsten Ergebnisse hieraus werden im Folgenden nochmals kurz zusammengefasst.

An P1 findet sich tyrosiniertes, detyrosiniertes und acetyliertes Tubulin in den Pfeilerzellen. In den darauffolgenden Entwicklungsstadien (P7 und P14) werden diese drei Modifikationen in allen Stützzellen nachgewiesen. Polyglutamyliertes Tubulin zeigt an P1 keine Expression, während es an P7 in den Pfeilerzellen und an P14 zusätzlich in den Deiters-Zellen vorkommt.

Im Gegensatz hierzu zeigt sich für die TBCs ein sehr diskontinuierliches Expressionsmuster. Beispielsweise wird TBCB an P1 im Kölliker-Organ exprimiert, während es an P7 in der inneren Stützzelle, den Pfeilerzellen, den Phalangen der Deiters-Zellen sowie Grenz- und Hensen-Zellen zur Darstellung kommt. An P14 hingegen zeigt sich ausschließlich eine Expression in den Deiters-Zellen, jedoch mit Aussparung der Phalangenprozesse.

Dieses sprunghafte Muster lässt letztlich keinen Rückschluss auf eine spezifische Funktion der TBCs im cortischen Organ zu. Ein Vergleich mit anderen Publikationen zu dieser Thematik, welche vorwiegend in vitro Versuche beinhalteten, ist aufgrund der geringen Datenlage nur bedingt möglich.

Bezüglich der PTMs ist das spatio-temporale Expressionsmuster von Gerbils zu diskutieren, welches für tyrosiniertes Tubulin ein gegensätzliches Expressionsmuster im Vergleich zu anderen publizierten Ergebnissen aufweist. Denkbare Hypothesen für diese gegensätzlichen Ergebnisse sind Spezies-spezifische Unterschiede, aber auch eine unterschiedliche Epitopbindung der verwendeten Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster von PTMs erstmalig in der murinen Cochlea über mehrere Entwicklungsstadien hinweg dargestellt werden konnte. Des Weiteren ist dies die erste Arbeit, in der eine spatio-temporale Verteilung von TBCs in einem Gewebe beschrieben wurde. Trotz der dargestellten Unterschiede wurde die deskriptive Zielsetzung der Arbeit erfüllt. Mögliche Lösungsansätze zur Eruiierung von Ursachen der diskrepanten Ergebnisse wären die Durchführung vergleichender Versuchsreihen mit verschiedenen Antikörpern, die Untersuchung der Verteilung von PTMs und TBC Proteinen in Gerbils oder zelltypspezifische Knockoutexperimente.

5 Literaturverzeichnis

- Aillaud, C., C. Bosc, Y. Saoudi, E. Denarier, L. Peris, L. Sago, N. Taulet, A. Cieren, O. Tort, M. M. Magiera, C. Janke, V. Redeker, A. Andrieux and M. J. Moutin (2016). "Evidence for new C-terminally truncated variants of alpha- and beta-tubulins." *Mol Biol Cell* **27**(4): 640-653.
- Allen, R. D., D. G. Weiss, J. H. Hayden, D. T. Brown, H. Fujiwake and M. Simpson (1985). "Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport." *J Cell Biol* **100**(5): 1736-1752.
- Arce, C. A., J. A. Rodriguez, H. S. Barra and R. Caputo (1975). "Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin." *Eur J Biochem* **59**(1): 145-149.
- Archer, J. E., L. R. Vega and F. Solomon (1995). "Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo." *Cell* **82**(3): 425-434.
- Baas, P. W. and M. M. Black (1990). "Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability." *J Cell Biol* **111**(2): 495-509.
- Baas, P. W. and S. Lin (2011). "Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron." *Dev Neurobiol* **71**(6): 403-418.
- Banerjee, A. and R. F. Luduena (1992). "Kinetics of colchicine binding to purified beta-tubulin isotypes from bovine brain." *J Biol Chem* **267**(19): 13335-13339.
- Banerjee, A., M. C. Roach, P. Trcka and R. F. Luduena (1992). "Preparation of a monoclonal antibody specific for the class IV isotype of beta-tubulin. Purification and assembly of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers from bovine brain." *J Biol Chem* **267**(8): 5625-5630.
- Barisic, M. and H. Maiato (2015). "Cracking the (tubulin) code of mitosis." *Oncotarget* **6**(23): 19356-19357.
- Bartolini, F., G. Tian, M. Piehl, L. Cassimeris, S. A. Lewis and N. J. Cowan (2005). "Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1197-1207.
- Behnke, O. (1970). "A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells." *J Ultrastruct Res* **31**(1): 61-75.
- Berezniuk, I., H. T. Vu, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, B. Burd, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami and L. D. Fricker (2012). "Cytosolic carboxypeptidase 1

is involved in processing alpha- and beta-tubulin." *J Biol Chem* **287**(9): 6503-6517.

Bhamidipati, A., S. A. Lewis and N. J. Cowan (2000). "ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin." *J Cell Biol* **149**(5): 1087-1096.

Black, M. M., P. W. Baas and S. Humphries (1989). "Dynamics of alpha-tubulin deacetylation in intact neurons." *J Neurosci* **9**(1): 358-368.

Bommel, H., G. Xie, W. Rossoll, S. Wiese, S. Jablonka, T. Boehm and M. Sendtner (2002). "Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease." *Journal of Cell Biology* **159**(4): 563-569.

Bornens, M. (2008). "Organelle positioning and cell polarity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 874-886.

Bornens, M. (2012). "The centrosome in cells and organisms." *Science* **335**(6067): 422-426.

Bryan, J. and L. Wilson (1971). "Are cytoplasmic microtubules heteropolymers?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(8): 1762-1766.

Carranza, G., R. Castano, M. L. Fanarraga, J. C. Villegas, J. Goncalves, H. Soares, J. Avila, M. Marenchino, R. Campos-Olivas, G. Montoya and J. C. Zabala (2013). "Autoinhibition of TBCB regulates EB1-mediated microtubule dynamics." *Cell Mol Life Sci* **70**(2): 357-371.

Cassimeris, L. and C. Spittle (2001). "Regulation of microtubule-associated proteins." *Int Rev Cytol* **210**: 163-226.

Chhabra, E. S. and H. N. Higgs (2007). "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures." *Nat Cell Biol* **9**(10): 1110-1121.

Chu, C. W., F. Hou, J. Zhang, L. Phu, A. V. Loktev, D. S. Kirkpatrick, P. K. Jackson, Y. Zhao and H. Zou (2011). "A novel acetylation of beta-tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation." *Mol Biol Cell* **22**(4): 448-456.

Cleveland, D. W. (1987). "The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned?" *J Cell Biol* **104**(3): 381-383.

Cloes, M., T. Renson, N. Johnen, N. Thelen and M. Thiry (2013). "Differentiation of Boettcher's cells during postnatal development of rat cochlea." *Cell Tissue Res* **354**(3): 707-716.

Corti, A. (1851). "Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères." *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* **3**: 109-169.

Cowan, N. J. and S. A. Lewis (2001). "Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones." *Adv Protein Chem* **59**: 73-104.

Cunningham, L. A. and R. A. Kahn (2008). "Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle." *J Biol Chem* **283**(11): 7155-7165.

Dey, P., J. Togra and S. Mitra (2014). "Intermediate filament: structure, function, and applications in cytology." *Diagn Cytopathol* **42**(7): 628-635.

Drenckhahn, D. (2004). „Hör- und Gleichgewichtssystem“ in *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* **Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie**. A. Benninghoff and D. Drenckhahn, Urban & Fischer in Elsevier. **2**: 725-735.

Drenckhahn, D. and J. Waschke (2008). „Sinnesorgane, Rezeptoren“ in *Taschenbuch Anatomie*. **Taschenbuch Anatomie**. A. Benninghoff and D. Drenckhahn, Urban & Fischer in Elsevier: 519-551.

Drummond, M. C., I. A. Belyantseva, K. H. Friderici and T. B. Friedman (2012). "Actin in hair cells and hearing loss." *Hear Res* **288**(1-2): 89-99.

Edde, B., J. Rossier, J. P. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros and P. Denoulet (1990). "Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin." *Science* **247**(4938): 83-85.

Ekdale, E. G. (2013). "Comparative Anatomy of the Bony Labyrinth (Inner Ear) of Placental Mammals." *PLoS One* **8**(6): e66624.

Ekdale, E. G. (2016). "Form and function of the mammalian inner ear." *J Anat* **228**(2): 324-337.

Erickson, H. P. (1974). "Assembly of microtubules from preformed, ring-shaped protofilaments and 6-S tubulin." *J Supramol Struct* **2**(2-4): 393-411.

Evans, K. J., E. R. Gomes, S. M. Reisenweber, G. G. Gundersen and B. P. Lanning (2005). "Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing." *J Cell Biol* **168**(4): 599-606.

Fanarraga, M. L., J. Bellido, C. Jaen, J. C. Villegas and J. C. Zabala (2010). "TBCD links centriologensis, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells." *PLoS One* **5**(1): e8846.

Fanarraga, M. L., M. Parraga, K. Aloria, J. del Mazo, J. Avila and J. C. Zabala (1999). "Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis." *Cell Motil Cytoskeleton* **43**(3): 243-254.

Flock, A., B. Flock and M. Ulfendahl (1986). "Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis." *Arch Otorhinolaryngol* **243**(2): 83-90.

Forge, A. and T. Wright (2002). "The molecular architecture of the inner ear." *Br Med Bull* **63**: 5-24.

Francis, J. W., L. E. Newman, L. A. Cunningham and R. A. Kahn (2017). "A Trimer Consisting of the Tubulin-specific Chaperone TBCD, Regulatory GTPase ARL2, and beta-tubulin is Required for Maintaining the Microtubule Network." *J Biol Chem*.

Fritzscht, B., N. Pan, I. Jahan and K. L. Elliott (2015). "Inner ear development: building a spiral ganglion and an organ of Corti out of unspecified ectoderm." *Cell Tissue Res* **361**(1): 7-24.

Fulton, C. and P. A. Simpson (1976). *Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Gadadhar, S., S. Bodakuntla, K. Natarajan and C. Janke (2017). "The tubulin code at a glance." *J Cell Sci*.

Gao, Y., J. O. Thomas, R. L. Chow, G. H. Lee and N. J. Cowan (1992). "A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding." *Cell* **69**(6): 1043-1050.

Garnham, C. P. and A. Roll-Mecak (2012). "The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions." *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**(7): 442-463.

Grynberg, M., L. Jaroszewski and A. Godzik (2003). "Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization." *BMC Bioinformatics* **4**: 46.

Gundersen, G. G., M. H. Kalnoski and J. C. Bulinski (1984). "Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo." *Cell* **38**(3): 779-789.

Gundersen, G. G., S. Khawaja and J. C. Bulinski (1987). "Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules." *J Cell Biol* **105**(1): 251-264.

Hallak, M. E., J. A. Rodriguez, H. S. Barra and R. Caputto (1977). "Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin." *FEBS Lett* **73**(2): 147-150.

Hallworth, R. and R. F. Luduena (2000). "Differential expression of beta tubulin isoforms in the adult gerbil cochlea." *Hear Res* **148**(1-2): 161-172.

Hallworth, R., M. McCoy and J. Polan-Curtain (2000). "Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti." *Hearing Research* **139**(1-2): 31-41.

Hallworth, R., M. McCoy and J. Polan-Curtain (2000). "Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti." *Hear Res* **139**(1-2): 31-41.

Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey (2008). "Tubulin modifications and their cellular functions." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 71-76.

Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* **475**(7356): 324-332.

Havercroft, J. C. and D. W. Cleveland (1984). "Programmed expression of beta-tubulin genes during development and differentiation of the chicken." *J Cell Biol* **99**(6): 1927-1935.

Henderson, C. G., J. B. Tucker, M. A. Chaplin, J. B. Mackie, S. N. Maidment, M. M. Mogensen and C. C. Paton (1994). "Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell." *J Cell Sci* **107 (Pt 2)**: 589-600.

Henderson, C. G., J. B. Tucker, M. M. Mogensen, J. B. Mackie, M. A. Chaplin, N. B. Slepecky and L. M. Leckie (1995). "Three microtubule-organizing centres collaborate in a mouse cochlear epithelial cell during supracellularly coordinated control of microtubule positioning." *J Cell Sci* **108 (Pt 1)**: 37-50.

Hensen, V. (1863). "Zur Morphologie der Schnecke des Menschen und der Säugetiere." *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*: 13: 481-512.

Henson, M. M., D. B. Jenkins and O. W. Henson, Jr. (1983). "Sustentacular cells of the organ of Corti--the tectal cells of the outer tunnel." *Hear Res* **10**(2): 153-166.

Hinojosa, R. (1977). "A note on development of Corti's organ." *Acta Otolaryngol* **84**(3-4): 238-251.

Infante, A. S., M. S. Stein, Y. Zhai, G. G. Borisy and G. G. Gundersen (2000). "Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap." *J Cell Sci* **113 (Pt 22)**: 3907-3919.

Inoue, S. and H. Sato (1967). "Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement." *J Gen Physiol* **50**(6): Suppl:259-292.

Ishiyama, E., R. A. Cutt and E. W. Keels (1970). "Distribution and ultrastructure of the Boettcher's cells in mammals." *Ann Otol Rhinol Laryngol* **79**(1): 54-69.

Ito, M., S. S. Spicer and B. A. Schulte (1995). "Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel." *Hear Res* **88**(1-2): 107-123.

Janke, C. (2014). "The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions." *J Cell Biol* **206**(4): 461-472.

Janke, C. and J. C. Bulinski (2011). "Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(12): 773-786.

Jensen-Smith, H. C., J. Eley, P. S. Steyger, R. F. Luduena and R. Hallworth (2003). "Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti." *J Neurocytol* **32**(2): 185-197.

Jones, C. and P. Chen (2008). "Primary cilia in planar cell polarity regulation of the inner ear." *Curr Top Dev Biol* **85**: 197-224.

Kalinec, F., P. Webster, A. Maricle, D. Guerrero, D. N. Chakravarti, B. Chakravarti, R. Gellibolian and G. Kalinec (2009). "Glucocorticoid-stimulated, transcription-independent release of annexin A1 by cochlear Hensen cells." *Br J Pharmacol* **158**(7): 1820-1834.

Kelley, M. W. (2007). "Cellular commitment and differentiation in the organ of Corti." *Int J Dev Biol* **51**(6-7): 571-583.

Kellogg, D. R., M. Moritz and B. M. Alberts (1994). "The centrosome and cellular organization." *Annu Rev Biochem* **63**: 639-674.

Khawaja, S., G. G. Gundersen and J. C. Bulinski (1988). "Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level." *J Cell Biol* **106**(1): 141-149.

Kikuchi, K. and D. Hilding (1965). "The development of the organ of Corti in the mouse." *Acta Otolaryngol* **60**(3): 207-222.

Kikuchi, T., J. C. Adams, Y. Miyabe, E. So and T. Kobayashi (2000). "Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness." *Med Electron Microsc* **33**(2): 51-56.

Kimura, R. S. (1966). "Hairs of the Cochlear Sensory Cells and Their Attachment to the Tectorial Membrane." *Acta Oto-laryngologica* **61**(1-6): 55-72.

Kortazar, D., M. L. Fanarraga, G. Carranza, J. Bellido, J. C. Villegas, J. Avila and J. C. Zabala (2007). "Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation." *Exp Cell Res* **313**(3): 425-436.

Kuh, G. F., M. Stockmann, M. Meyer-Ohlendorf, L. Linta, C. Proepper, A. C. Ludolph, J. Bockmann, T. M. Boeckers and S. Liebau (2012). "Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150(Glued)." *Cell Tissue Res* **350**(1): 13-26.

Kumar, N. and M. Flavin (1981). "Preferential action of a brain detyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin." *J Biol Chem* **256**(14): 7678-7686.

L'Hernault, S. W. and J. L. Rosenbaum (1985). "Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine." *Biochemistry* **24**(2): 473-478.

Lacroix, B., J. van Dijk, N. D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D. W. Gerlich and C. Janke (2010). "Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing." *J Cell Biol* **189**(6): 945-954.

Lewis, S. A., W. Gu and N. J. Cowan (1987). "Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules." *Cell* **49**(4): 539-548.

Li, L., N. Khan, T. Hurd, A. K. Ghosh, C. Cheng, R. Molday, J. R. Heckenlively, A. Swaroop and H. Khanna (2013). "Ablation of the X-linked retinitis pigmentosa 2 (Rp2) gene in mice results in opsin mislocalization and photoreceptor degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**(7): 4503-4511.

Lim, D. J. (1986). "Functional structure of the organ of Corti: a review." *Hear Res* **22**: 117-146.

Lopez-Fanarraga, M., G. Carranza, J. Bellido, D. Kortazar, J. C. Villegas and J. C. Zabala (2007). "Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone." *J Neurochem* **100**(6): 1680-1687.

Lübben, M. (2009). Proteine. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. M. Scharl, M. Gessler and A. Von Eckardstein, Urban & Fischer in Elsevier: 32-80.

Luduenas, R. F. (1998). "Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications." *Int Rev Cytol* **178**: 207-275.

Luduenas, R. F. (2013). "A hypothesis on the origin and evolution of tubulin." *Int Rev Cell Mol Biol* **302**: 41-185.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). „Ohr“ in Taschenlehrbuch Histologie. *Taschenlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag KG: 559-571.

Magiera, M. M. and C. Janke (2013). "Investigating tubulin posttranslational modifications with specific antibodies." *Methods Cell Biol* **115**: 247-267.

Malgrange, B., M. Thiry, T. R. Van De Water, L. Nguyen, G. Moonen and P. P. Lefebvre (2002). "Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti." *Cell Mol Life Sci* **59**(10): 1744-1757.

Martin, L., M. L. Fanarraga, K. Aloria and J. C. Zabala (2000). "Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein." *FEBS Lett* **470**(1): 93-95.

Maruta, H., K. Greer and J. L. Rosenbaum (1986). "The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules." *J Cell Biol* **103**(2): 571-579.

McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). "Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules." *Cell* **75**(3): 419-429.

Merchan, M. A., J. A. Merchan and M. D. Ludena (1980). "Morphology of Hensen's cells." *J Anat* **131**(Pt 3): 519-523.

Mikaelian, D. and R. J. Ruben (1965). "Development of Hearing in the Normal Cba-J Mouse: Correlation of Physiological Observations with Behavioral Responses and with Cochlear Anatomy." *Acta Oto-Laryngologica* **59**(2-6): 451-461.

Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-242.

Montgomery, S. C. and B. C. Cox (2016). "Whole Mount Dissection and Immunofluorescence of the Adult Mouse Cochlea." *J Vis Exp*(107).

Morup Jorgensen, J. (1982). "Microtubules and laminated structures in inner ear hair cells." *Acta Otolaryngol* **94**(3-4): 241-248.

Nakazawa, K. (2001). "Ultrastructural localization of calmodulin in gerbil cochlea by immunogold electron microscopy." *Hear Res* **151**(1-2): 133-140.

Nogales, E., S. G. Wolf and K. H. Downing (1998). "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." *Nature* **391**(6663): 199-203.

Nolasco, S., J. Bellido, J. Goncalves, J. C. Zabala and H. Soares (2005). "Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death." *FEBS Lett* **579**(17): 3515-3524.

Okumura, M., C. Sakuma, M. Miura and T. Chihara (2015). "Linking cell surface receptors to microtubules: tubulin folding cofactor D mediates Dscam functions during neuronal morphogenesis." *J Neurosci* **35**(5): 1979-1990.

Panda, D., H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Luduena and L. Wilson (1994). "Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(24): 11358-11362.

Paturle-Lafanechere, L., B. Edde, P. Denoulet, A. Van Dorsselaer, H. Mazarguil, J. P. Le Caer, J. Wehland and D. Job (1991). "Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated." *Biochemistry* **30**(43): 10523-10528.

- Paulsen, F. and J. Waschke (2010). „Ohr“ in Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen. Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen. F. Paulsen and J. Waschke, Urban & Fischer in Elsevier. **3**: 134-160.
- Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechere, J. Brocard, A. T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman and A. Andrieux (2009). "Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination." J Cell Biol **185**(7): 1159-1166.
- Pollice, P. A. and W. E. Brownell (1993). "Characterization of the outer hair cell's lateral wall membranes." Hear Res **70**(2): 187-196.
- Puligilla, C., F. Feng, K. Ishikawa, S. Bertuzzi, A. Dabdoub, A. J. Griffith, B. Fritsch and M. W. Kelley (2007). "Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment." Dev Dyn **236**(7): 1905-1917.
- Rak, K., S. Frenz, A. Radloff, J. Groh, S. Jablonka, R. Martini, R. Hagen and R. Mlynski (2013). "Mutation of the TBCE gene causes disturbance of microtubules in the auditory nerve and cochlear outer hair cell degeneration accompanied by progressive hearing loss in the pmn/pmn mouse." Exp Neurol **250C**: 333-340.
- Raphael, Y. and R. A. Altschuler (2003). "Structure and innervation of the cochlea." Brain Res Bull **60**(5-6): 397-422.
- Raphael, Y., B. D. Athey, Y. Wang and J. E. Hawkins, Jr. (1993). "Structure of the reticular lamina and repair after noise injury." Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) **114**(3): 171-175.
- Raphael, Y., B. D. Athey, Y. Wang, M. K. Lee and R. A. Altschuler (1994). "F-actin, tubulin and spectrin in the organ of Corti: comparative distribution in different cell types and mammalian species." Hearing Research **76**(1-2): 173-187.
- Raphael, Y., M. Lenoir, R. Wroblewski and R. Pujol (1991). "The sensory epithelium and its innervation in the mole rat cochlea." J Comp Neurol **314**(2): 367-382.
- Raphael, Y. and R. Wroblewski (1986). "Linkage of sub-membrane-cisterns with the cytoskeleton and the plasma membrane in cochlear outer hair cells." J Submicrosc Cytol **18**(4): 731-737.
- Raybin, D. and M. Flavin (1977). "Modification of tubulin by tyrosylation in cells and extracts and its effect on assembly in vitro." J Cell Biol **73**(2): 492-504.
- Renauld, J., N. Johnen, N. Thelen, M. Cloes and M. Thiry (2015). "Spatio-temporal dynamics of beta-tubulin isoforms during the development of the sensory auditory organ in rat." Histochem Cell Biol **144**(5): 403-416.

Roach, M. C., V. L. Boucher, C. Walss, P. M. Ravdin and R. F. Luduena (1998). "Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of beta-tubulin: the beta isotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues." *Cell Motil Cytoskeleton* **39**(4): 273-285.

Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2005). "The *Drosophila* homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules." *Curr Biol* **15**(7): 650-655.

Rudiger, M., U. Plessman, K. D. Kloppel, J. Wehland and K. Weber (1992). "Class II tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435." *FEBS Lett* **308**(1): 101-105.

Rudiger, M., J. Wehland and K. Weber (1994). "The carboxy-terminal peptide of deetyrosinated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase." *Eur J Biochem* **220**(2): 309-320.

Rueda, J., J. J. Prieto, M. E. Rubio, A. Gutierrez and J. A. Merchan (1993). "Development of the tectal cells in the mouse cochlea." *Anat Embryol (Berl)* **187**(5): 425-432.

Saha, S. and N. B. Slepecky (2000). "Age-related changes in microtubules in the guinea pig organ of Corti. Tubulin isoform shifts with increasing age suggest changes in micromechanical properties of the sensory epithelium." *Cell Tissue Res* **300**(1): 29-46.

Sanchez, J. T. and T. M. Grieco-Calub (2018). „Hearing“ in *Anatomy and Physiology of Speech and Hearing*, Georg Thieme Verlag.

Schuenke, E. (2010). „Ear and Vestibular Apparatus“ in *THIEME Atlas of Anatomy Head and Neuroanatomy*, Georg Thieme Verlag.

Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*, Sander.

Serna, M., G. Carranza, J. Martin-Benito, R. Janowski, A. Canals, M. Coll, J. C. Zabala and J. M. Valpuesta (2015). "The structure of the complex between alpha-tubulin, TBCE and TBCB reveals a tubulin dimer dissociation mechanism." *J Cell Sci* **128**(9): 1824-1834.

Sirajuddin, M., L. M. Rice and R. D. Vale (2014). "Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications." *Nat Cell Biol* **16**(4): 335-344.

Slepecky, N. B., C. G. Henderson and S. Saha (1995). "Post-translational modifications of tubulin suggest that dynamic microtubules are present in sensory cells and stable microtubules are present in supporting cells of the mammalian cochlea." *Hearing Research* **91**(1-2): 136-147.

Sobkowicz, H. M., S. M. Slapnick and B. K. August (1995). "The kinocilium of auditory hair cells and evidence for its morphogenetic role during the regeneration of stereocilia and cuticular plates." *J Neurocytol* **24**(9): 633-653.

Spicer, S. S. and B. A. Schulte (1996). "The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency." *Hear Res* **100**(1-2): 80-100.

Spicer, S. S., N. Smythe and B. A. Schulte (2003). "Ultrastructure indicative of ion transport in tectal, Deiters, and tunnel cells: differences between gerbil and chinchilla basal and apical cochlea." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **271**(2): 342-359.

Sullivan, K. F. and D. W. Cleveland (1986). "Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(12): 4327-4331.

Sziklai, I., D. Z. He and P. Dallos (1996). "Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells." *Hear Res* **95**(1-2): 87-99.

Szyk, A., A. M. Deaconescu, J. Spector, B. Goodman, M. L. Valenstein, N. E. Ziolkowska, V. Kormendi, N. Grigorieff and A. Roll-Mecak (2014). "Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase." *Cell* **157**(6): 1405-1415.

Szymanski, D. (2002). "Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer." *Curr Biol* **12**(22): R767-769.

Tanaka, E., T. Ho and M. W. Kirschner (1995). "The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth." *J Cell Biol* **128**(1-2): 139-155.

Tannenbaum, J. and N. B. Slepecky (1997). "Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development." *Cell motility and the cytoskeleton* **38**(2): 146-162.

Thelen, N., I. Breuskin, B. Malgrange and M. Thiry (2009). "Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development." *Cell Tissue Res* **337**(1): 1-14.

Tian, G., Y. Huang, H. Rommelaere, J. Vandekerckhove, C. Ampe and N. J. Cowan (1996). "Pathway leading to correctly folded beta-tubulin." *Cell* **86**(2): 287-296.

Tian, G., S. A. Lewis, B. Feierbach, T. Stearns, H. Rommelaere, C. Ampe and N. J. Cowan (1997). "Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors." *J Cell Biol* **138**(4): 821-832.

Tian, G., S. Thomas and N. J. Cowan (2010). "Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity." *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**(11): 706-714.

Tritsch, N. X., E. Yi, J. E. Gale, E. Glowatzki and D. E. Bergles (2007). "The origin of spontaneous activity in the developing auditory system." *Nature* **450**(7166): 50-55.

Tucker, J. B., M. M. Mogensen, C. G. Henderson, S. J. Doxsey, M. Wright and T. Stearns (1998). "Nucleation and capture of large cell surface-associated microtubule arrays that are not located near centrosomes in certain cochlear epithelial cells." *J Anat* **192 (Pt 1)**: 119-130.

Tucker, J. B., M. M. Mogensen, C. C. Paton, J. B. Mackie, C. G. Henderson and L. M. Leckie (1995). "Formation of two microtubule-nucleating sites which perform differently during centrosomal reorganization in a mouse cochlear epithelial cell." *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**: 1333-1345.

Tucker, J. B., C. C. Paton, G. P. Richardson, M. M. Mogensen and I. J. Russell (1992). "A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea." *J Cell Sci* **102 (Pt 2)**: 215-226.

Vadlamudi, R. K., C. J. Barnes, S. Rayala, F. Li, S. Balasenthil, S. Marcus, H. V. Goodson, A. A. Sahin and R. Kumar (2005). "p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3726-3736.

Valenstein, M. L. and A. Roll-Mecak (2016). "Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation." *Cell* **164**(5): 911-921.

Valenzuela, P., M. Quiroga, J. Zaldivar, W. J. Rutter, M. W. Kirschner and D. W. Cleveland (1981). "Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by alpha and beta tubulin mRNAs." *Nature* **289**(5799): 650-655.

Verhey, K. J. and J. Gaertig (2007). "The tubulin code." *Cell Cycle* **6**(17): 2152-2160.

Virchow, R. (1855). "Cellular-Pathologie." *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **8**.

Volkenstein, S., D. Brors, S. Hansen, A. Berend, R. Mlynski, C. Aletsee and S. Dazert (2009). "Auditory development in progressive motor neuronopathy mouse mutants." *Neuroscience Letters*.

Voloshin, O., Y. Gocheva, M. Gutnick, N. Movshovich, A. Bakhrat, K. Baranes-Bachar, D. Bar-Zvi, R. Parvari, L. Gheber and D. Raveh (2010). "Tubulin chaperone E binds microtubules and proteasomes and protects against misfolded protein stress." *Cell Mol Life Sci* **67**(12): 2025-2038.

Walker, R. A., E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson and E. D. Salmon (1988). "Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies." *J Cell Biol* **107**(4): 1437-1448.

Wang, W., J. Ding, E. Allen, P. Zhu, L. Zhang, H. Vogel and Y. Yang (2005). "Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway." *Curr Biol* **15**(22): 2050-2055.

Webster, D. R., G. G. Gundersen, J. C. Bulinski and G. G. Borisy (1987). "Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9040-9044.

Weisenberg, R. C. (1972). "Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations." *Science* **177**(4054): 1104-1105.

Westermann, S. and K. Weber (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12): 938-947.

Witte, H., D. Neukirchen and F. Bradke (2008). "Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization." *J Cell Biol* **180**(3): 619-632.

Yoo, J. C., H. Y. Kim, K. H. Han, S. H. Oh, S. O. Chang, D. C. Marcus and J. H. Lee (2012). "Na⁺ absorption by Claudius' cells is regulated by purinergic signaling in the cochlea." *Acta Otolaryngol* **132 Suppl 1**: S103-108.

Zetes, D. E., J. A. Tolomeo and M. C. Holley (2012). "Structure and mechanics of supporting cells in the guinea pig organ of Corti." *PLoS One* **7**(11): e49338.

Zhang, P., X. Ma, E. Song, W. Chen, H. Pang, D. Ni, Y. Gao, Y. Fan, Q. Ding, Y. Zhang and X. Zhang (2013). "Tubulin cofactor A functions as a novel positive regulator of ccRCC progression, invasion and metastasis." *Int J Cancer* **133**(12): 2801-2811.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung über den Aufbau von Mikrotubuli	4
Abbildung 2	Der Ablauf der Faltungsreaktionen der Tubulin-Synthese.	5
Abbildung 3	Posttranslationale Modifikationen von α - und β -Tubulin	9
Abbildung 4	Azan-Färbung einer adulten murinen Cochlea	13
Abbildung 5	Azan-Färbung des medialen Anteils der Paries tympanicus des Ductus cochlearis einer murenen, murinen Cochlea	15
Abbildung 6	Das adulte murine Corti-Organ	16
Abbildung 7	Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ am ersten postpartalen Tag (P1)	18
Abbildung 8	Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ am siebten postpartalen Tag (P7)	18
Abbildung 9	Schematische, farbcodierte Darstellung Corti-Organ ab dem vierzehnten postpartalen Tag (P14 und älter).....	19
Abbildung 10	Lokalisation von Mikrotubuli in den Stützzellen des Corti- Organs. 23	
Abbildung 11	Expression von beta-Tubulin im Corti-Organ.....	24
Abbildung 12	Zusammenfassung der zeitlichen und örtlichen Lokalisation der posttranslationalen Modifikationen im Corti-Organ	26
Abbildung 13	Beta-Tubulin-Isotypen im Corti-Organ	28
Abbildung 14	Felsenbein und Innenohr.....	35
Abbildung 15	Immunhistochemische Darstellung von tyrosiniertem Tubulin im Corti-Organ.....	39
Abbildung 16	Immunhistochemische Darstellung von detyrosiniertem Tubulin im Corti-Organ.....	41
Abbildung 17	Immunhistochemische Darstellung von acetyliertem Tubulin im Corti-Organ.....	43
Abbildung 18	Immunhistochemische Darstellung von polyglutamyliertem Tubulin im Corti-Organ.....	45
Abbildung 19	Immunhistochemische Darstellung von TBCA im Corti-Organ	47
Abbildung 20	Immunhistochemische Darstellung von TBCB im Corti-Organ	49
Abbildung 21	Immunhistochemische Darstellung von TBCC im Corti-Organ	51
Abbildung 22	Immunhistochemische Darstellung von TBCD im Corti-Organ	53
Abbildung 23	Immunhistochemische Darstellung von TBCE im Corti-Organ	55
Abbildung 24	Expressionsmuster der posttranslationalen Modifikation von Tubulin P0, P7, P14	58
Abbildung 25	Expressionsmuster der TBC Proteine P0, P7, P14.....	62

7 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha Tubulin
ADP	Adenosindiphosphat
Arl2	ADP-ribosylation factor-like 2
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta-Tubulin
BM	Basilarmembran
BSA	Bovines Serumalbumin
CCT	cytosolic chaperonin containing T-complex
CO	Corti-Organ
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Ductus cochlearis
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
GDP	Guanosindiphosphat
GSp	Ganglion spirale
GTP	Guanosintriphosphat
Hct	Helicotrema
inSu	Sulcus spiralis internus
LaSp	Lamina spiralis
LigSp	Ligamentum spirale
LimSp	Limbus spiralis
MAP	Microtubule-associated protein
MCF	Michigan Cancer Foundation
Mod	Modiolus
MTOC	microtubule organizing center
NaPP	Ntriumphosphatpuffer
NMRI	Naval Medical Research Institute
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Pi	anorgansiches Phosphat
PTM	Posttranslationale Modifikation
RM	Reissner-Membran
SSC	subsurfacecisternae
ST	Scala tympani
SV	Scala vestibuli

TAT	α -tubulin acetyltransferase
TBC	tubulin-specific chaperone
TBCA	tubulin-specific chaperone A
TBCB	tubulin-specific chaperone B
TBCC	tubulin-specific chaperone C
TBCD	tubulin-specific chaperone D
TBCE	tubulin-specific chaperone E
TBST	Tris-buffered saline with Tween20

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Kristen Rak für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und für die langjährige Betreuung. Durch seine Förderung war es mir möglich, vorläufige Ergebnisse auf dem Inner Ear Biology Workshop in Kyoto präsentieren zu können. Mit seinem außergewöhnlichen Engagement ist er mir stets ein Vorbild gewesen und hat mein Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten angeregt.

Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank gilt unserer Arbeitsgruppe: Herrn Dr. Johannes Völker, der mir während meiner Arbeitszeit im Labor unermüdlich zu jeder erdenklichen Uhrzeit zur Seite stand und Christine Völker, die zu jeder erdenklichen Uhrzeit die Stimmung mit einem aufmunternden Spruch heben konnte. Unsere gemeinsame Zeit in Japan wird mir immer in besonderer Erinnerung bleiben.

Den Mitarbeiterinnen des HNO-Forschungslabors, Frau Laura Halbhuber und Petra Joa, danke ich für die Geduld und Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für all die Unterstützung in der Vergangenheit und bis heute, ohne die ich heute nicht an diesem Punkt stehen würde. Meiner Patricia danke ich für die Geduld und Hingabe, ohne die die Arbeit in dieser Form nicht vollendet worden wäre, aus tiefstem Herzen.