

# Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms der Maus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Mark-Oliver Trowe,**  
geboren am 22.12.1978 in Gifhorn

2009

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 1.11.2004 bis zum 14.05.2009 im Labor von Prof. Dr. Andreas Kispert am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Andreas Kispert

Korreferent: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Tag der Promotion: 29. Juni 2009

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen ganz herzlich bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit auf vielfältigste Art und Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt...

Prof. Dr. Andreas Kispert für die Möglichkeit, in seinem Labor dieses spannende Projekt bearbeiten zu können, und vor allem für die exzellente Betreuung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat,

Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn für die bereitwillige Übernahme des Korreferats,

Dr. Hannes Maier, Dr. Michaela Schweizer und Dr. Oliver Dittrich-Breiholz für ihren Beitrag zu dieser Arbeit,

Marianne Petry für die tatkräftige Unterstützung hinter den Kulissen,

all denen, die durch die Bereitstellung von transgenen Mauslinien und Materialien etwas zu dieser Arbeit beigesteuert haben,

und nicht zuletzt meinen Kollegen aus der AG Kispert und dem Institut für Molekularbiologie, insbesondere Rannar Airik und Henner Farin, für die gute Zusammenarbeit während der vergangenen Jahre.

Danke!!!

Meinen Eltern

## Zusammenfassung

In der Cochlea, dem Hörsinnesorgan von Säugetieren, wandeln Haarsinneszellen eine durch Schall vermittelte mechanische Stimulation in elektrische Signale um und leiten diese an auditorische Zentren des Gehirns weiter. Die Erregbarkeit der Sinneszellen hängt dabei essentiell von der adäquaten ionischen Zusammensetzung der Endolymphe ab, einer Extrazellulärflüssigkeit, die die Sinneszellen apikal umgibt. Die ionische Zusammensetzung der Endolymphe wird aktiv aufrechterhalten durch einen Prozess, der vor allem aus dem schnellen intrazellulären Rücktransport von Kalium-Ionen durch ein Netzwerk von otischen Fibrozyten und die *Stria vascularis*, einer spezialisierten epithelialen Struktur in der Seitenwand des cochleären Ganges, besteht. Der Stellenwert dieses Prozesses für die Funktion des Innenohrs wird dadurch hervorgehoben, dass viele der heute bekannten, erblich bedingten Hörfunktionsstörungen auf eine gestörte Endolymphhomöostase zurückzuführen sind.

Trotz der enormen Bedeutung der otischen Fibrozyten und der *Stria vascularis* für die Physiologie des Hörens, ist bis heute unklar, wie diese Gewebe aus einem homogenen Vorläufergewebe, dem periotischen Mesenchym, während der Entwicklung des Innenohrs hervorgehen und wie die zugrunde liegenden Musterungs- und Differenzierungsprozesse auf molekularer Ebene reguliert werden.

In dieser Arbeit wurde die Funktion des T-Box-Transkriptionsfaktors *Tbx18*, des HMG-Box-Transkriptionsfaktors *Sox9* und des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin für die Entwicklung des periotischen Mesenchyms durch molekulare und genetische Experimente in der Maus untersucht.

*Tbx18* ist ab Embryonaltag 12,5 (E12,5) spezifisch im inneren Kompartiment des periotischen Mesenchyms und den daraus abgeleiteten otischen Fibrozyten exprimiert. Adulte *Tbx18*-Verlustmutanten sind taub und weisen eine gestörte Differenzierung der Fibrozyten und eine Hypoplasie der *Stria vascularis* auf. *Tbx18*<sup>-/-</sup>-Embryonen zeigen eine Störung in der Abgrenzung zwischen otischen Fibrozyten und der endochondralen otischen Kapsel, die aus dem äußeren Kompartiment des periotischen Mesenchyms hervorgeht. Dies legt nahe, dass die späten Defekte aus einer gestörten primären Funktion von *Tbx18* in der Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms resultieren.

Die Expression von *Tbx18* wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg aufrechterhalten, was durch die Analyse einer konditionellen *Tbx18*<sup>Cre</sup>  $\beta$ -Catenin Mutante gezeigt wurde. Zusätzlich weist diese Mutante eine drastische Ausweitung der otischen Kapsel zu Lasten der otischen

Fibrozyten auf. Dies deutet auf eine zusätzliche, von *Tbx18* unabhängige Funktion des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Musterung des periotischen Mesenchyms.

*Sox9* ist ab E10,5 transient im gesamten periotischen Mesenchym und ab E12,5 in der (prospektiven) otischen Kapsel exprimiert. Die konditionelle Inaktivierung von *Sox9* im gesamten periotischen Mesenchym verursachte primär einen Verlust der otischen Kapsel, sekundär eine Störung in der Differenzierung und Expansion otischer Fibrozyten und der Windungsmorphogenese des cochleären Ganges. Dies zeigt, dass die *Sox9* vermittelte Bildung der endochondralen Kapsel eine essentielle Rolle für die Entwicklung der mesenchymalen und epithelialen Innenohrkompartimente spielt.

*E-Cadherin* wird ab E16,5 in otischen Fibrozyten und (prospektiven) Basalzellen der *Stria vascularis* exprimiert. Die konditionelle Deletion von *E-Cadherin* in diesen Zellen führt zu einer Hypoplasie der *Stria vascularis* mit veränderte Zellarchitektur der strialen Basalzellen und einem Verlust der Intermedialzellen, was eine Funktion von *E-Cadherin* in der terminalen Differenzierung von Basalzellen und der Homöostase der *Stria vascularis* nahe legt.

Insgesamt zeigt diese Studie, dass die frühe Musterung des periotischen Mesenchyms, die anschließende Aufrechterhaltung der Kompartimentsgrenzen und die Entwicklung der otischen Knochenkapsel essentielle Voraussetzungen für die Differenzierung der otischen Fibrozyten und der *Stria vascularis* darstellen und dass  $\beta$ -Catenin, *Tbx18* und *Sox9* maßgeblich an der Regulation dieser Entwicklungsprozesse beteiligt sind.

Diese Arbeit leistet damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der genetischen Kontrolle von Musterungs- und Differenzierungsprozessen im periotischen Mesenchym und seinen Derivaten und unterstreicht die Bedeutung von nicht-epithelial abgeleiteten Zelltypen für den Hörprozess und die Ätiologie von Taubheit.

Schlagworte: Mausentwicklung, Otische Fibrozyten, *Stria vascularis*

## Abstract

In the cochlea, the mammalian auditory organ, sensory hair cells transduce sound waves into electrical impulses. The excitability of sensory cells critically depends on the adequate ionic composition of the endolymph, an extracellular fluid that surrounds the hair cells apically. The maintenance of its composition is an active process that relies on intracellular transport of  $K^+$ -ions to the endolymph through a network of otic fibrocytes and the *Stria vascularis*, a specialized epithelial structure at the lateral wall of the cochlear duct. The importance of this process has become apparent by the finding that many inherited hearing disorders are caused by disturbances in the ionic homeostasis of the endolymph. Despite the significance of otic fibrocytes and the *Stria vascularis* for the physiology and pathology of hearing, only little is known about the genetic circuits and developmental programs regulating their development from the periotic mesenchyme, a simple homogenous precursor population.

In this work, the role of the T-Box transcription factor *Tbx18*, the HMG-transcription factor *Sox9* and the cell-adhesion protein E-Cadherin in periotic mesenchyme development was examined by molecular and genetic experiments in mice.

It could be shown that *Tbx18* expression in the developing inner ear is restricted to a subregion of otic mesenchyme that gives rise to otic fibrocytes. Adult *Tbx18*-deficient mice are deaf and exhibit disturbed differentiation of fibrocytes and hypoplasia of the *Stria vascularis*. These defects may be subordinate to a primary role of *Tbx18* in early compartmentalization of the periotic mesenchyme, as lineage restriction and boundary formation between otic fibrocytes and the surrounding otic capsule are severely affected in the mutant. Genetic analysis in conditional *Tbx18<sup>Cre</sup>, $\beta$ -Catenin* knockout mice revealed that *Tbx18* expression in the inner ear is maintained by the canonical Wnt signaling pathway. Furthermore, in  *$\beta$ -Catenin* mutant mice the otic capsule is dramatically expanded at the expense of otic fibrocytes, indicating an additional function of this factor in patterning the periotic mesenchyme independent of *Tbx18*.

*Sox9* is transiently expressed throughout the entire periotic mesenchyme at E10.5 and becomes restricted to the (prospective) otic capsule at E12.5. The conditional ablation of *Sox9* from the periotic mesenchyme results in a complete absence of the endochondral otic capsule. Ultimately, this leads to defects in otic fibrocyte differentiation and expansion, and altered cochlear duct morphogenesis. These data argue for a central role of the endochondral capsule in regulating the development of the mesenchymal and epithelial compartments in the inner ear.

*E-cadherin* is expressed in otic fibrocytes and (prospective) basal cells of the *Stria vascularis* from E16.5 onwards. The conditional inactivation of *E-cadherin* in these cells leads to hypoplasia of the *Stria vascularis* with an altered cell architecture of the basal cells and a reduction of intermediate cells, suggesting a function of *E-cadherin* in terminal differentiation of basal cells and the homeostasis of the *Stria vascularis*.

Overall, this study demonstrates that the early patterning of the periotic mesenchyme, the subsequent maintenance of compartment boundaries and the development of the endochondral capsule are essential prerequisites for the differentiation of otic fibrocytes and *Stria vascularis*, and shows that  $\beta$ -catenin, *Tbx18* and *Sox9* are important regulators of these developmental processes.

Hence, this work sheds light on the genetic control of patterning and differentiation of the otic mesenchyme and its derivatives and illuminates the importance of non-epithelially-derived otic cell types for normal hearing and the etiology of deafness.

Key words: Mouse development, Otic fibrocytes, *Stria vascularis*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Struktur des Innenohrs .....	1
1.2 Struktur der Cochlea .....	2
1.3 Bedeutung von otischen Fibrozyten und <i>Stria vascularis</i> für die Physiologie des Hörens .....	5
1.4 Entwicklung der otischen Fibrozyten und der <i>Stria vascularis</i> .....	7
1.5 Genetische Kontrolle der periotisch-mesenchymalen Zelldifferenzierung .....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	11
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	12
2.2 Chemikalien .....	13
2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie .....	13
2.4 Antikörper.....	14
2.5 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme .....	14
2.5.1 Klonierungsvektoren.....	14
2.5.2 Wirtssysteme .....	14
2.5.2.1 Bakterienstämme .....	14
2.6 Versuchstiere.....	15
2.7 Synthetische Oligonukleotide .....	16
2.8 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungs sonden .....	17
2.9 Molekularbiologische Methoden .....	18
2.9.1 Lösungen.....	18
2.9.2 Standardmethoden.....	19
2.9.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	20
2.9.4 Herstellung der Hybridisierungs sonden .....	20
2.9.5 DNA- Microarray.....	21
2.10 Mausmethoden.....	21
2.10.1 Lösungen.....	21
2.10.2 Embryologische Methoden .....	21
2.10.2.1 Verpaarungen .....	21

2.10.2.2	Gewinnung der Embryonen .....	22
2.10.2.3	PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben.....	22
2.10.2.4	Bouins-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben.....	22
2.10.2.5	Genotypisierung von Embryonen.....	23
2.10.3	Isolierung der Innenohren aus Embryonen und adulten Tieren .....	23
2.10.4	Hirnstammaudiometrie.....	23
2.11	Histologische Methoden .....	24
2.11.1	Lösungen.....	24
2.11.2	Paraffinschnitte .....	24
2.11.3	Kryoschnitte .....	24
2.11.4	Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen .....	25
2.11.5	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	25
2.11.6	Alzian-Blau-Färbung .....	25
2.11.7	Sirius-Rot Färbung.....	26
2.11.8	$\beta$ -Galaktosidase-Färbung auf Gefrierschnitten .....	26
2.11.9	Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay .....	26
2.11.10	BrdU–Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten .....	26
2.11.11	Elektronenmikroskopische Analyse der Innenohren adulter Tiere.....	26
2.11.12	Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffin- und Gefrierschnitten .....	27
2.11.13	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten.....	27
2.11.14	Dokumentation.....	28
2.11.15	Dreidimensionale Geweberekonstruktion.....	29
<b>3.</b>	<b>Experimente und Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Funktion von <i>Tbx18</i> während der Entwicklung des Innenohrs .....	30
3.1.1	<i>Tbx18</i> wird in den Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten exprimiert.....	30
3.1.2	Der Verlust von <i>Tbx18</i> führt zu Taubheit durch den Verlust des EP .....	32
3.1.3	<i>Tbx18</i> Mutanten zeigen eine Hypoplasie der seitlichen Wand der Cochlea .....	34
3.1.4	<i>Tbx18</i> Mutanten weisen eine Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten auf .....	35
3.1.5	Der Verlust von <i>Tbx18</i> stört die Entwicklung der <i>Stria vascularis</i> .....	37
3.1.6	Verlust der Kondensation mesenchymaler Zellen während der frühen Entwicklung der <i>Stria vascularis</i> in <i>Tbx18</i> -Mutanten.....	39

---

3.1.7	<i>Tbx18</i> Mutanten zeigen eine gestörte Abgrenzung zwischen otischer Kapsel und otischen Fibrozyten .....	41
3.2	Funktionelle Analyse von <i>Sox9</i> in der Entwicklung des Innenohrs .....	44
3.2.1	<i>Sox9</i> ist im Mesenchym des sich entwickelnden Innenohrs in Bereichen starker Zellkondensation und Knorpelzellendifferenzierung exprimiert .....	44
3.2.2	Konditionelle Inaktivierung von <i>Sox9</i> im periotischen Mesenchym .....	46
3.2.3	Der konditionelle Verlust von <i>Sox9</i> beeinträchtigt die Differenzierung der otischen Kapsel und die Windungsmorphologie des cochleären Ganges .....	48
3.2.4	Der Verlust von <i>Sox9</i> beeinträchtigt die Differenzierung des periotischen Mesenchyms .....	50
3.2.5	<i>Sox9KO</i> -Mäuse weisen Veränderungen in der Musterung des otischen Epithels auf .....	53
3.2.6	Der konditionelle Verlust von <i>Sox9</i> verursacht Störungen in der Entwicklung des frühen periotischen Mesenchyms .....	55
3.2.7	<i>Sox9KO</i> -Mäuse zeigen eine deregulierte Zellproliferation in periotischem Mesenchym und otischem Epithel .....	56
3.3	Funktionelle Charakterisierung von <i>E-Cadherin</i> in der Entwicklung des Innenohrs .....	58
3.3.1	<i>E-Cadherin</i> wird ab E16, 5 in otischen Fibrozyten exprimiert .....	59
3.3.2	Konditionelle Inaktivierung von <i>E-Cadherin</i> im Spiralligament und strialen Basalzellen der Cochlea .....	60
3.3.3	Partielle Hypoplasie der <i>Stria vascularis</i> in <i>EcadKO</i> -Mäusen .....	62
3.3.4	<i>EcadKO</i> -Mäuse weisen eine normale Fibrozytendifferenzierung auf .....	63
3.3.5	<i>EcadKO</i> -Mäuse zeigen Veränderungen in der <i>Stria vascularis</i> .....	64
3.3.6	E-Cadherin besitzt eine späte Funktion in der Entwicklung der <i>Stria vascularis</i> .....	66
3.4	Identifikation von Genen mit potentieller Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms .....	67
3.5	$\beta$ -Catenin ist notwendig für die Aufrechterhaltung der <i>Tbx18</i> Expression im periotischen Mesenchym .....	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
4.1	Die Funktion von <i>Tbx18</i> in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms ...	74
4.2	Die Entwicklung der <i>Stria vascularis</i> .....	76

---

4.3	Die Bedeutung von <i>Tbx18</i> für das Hören .....	78
4.4	<i>Sox9</i> und die Differenzierung der otischen Knochenkapsel .....	78
4.5	Der Einfluss des periotischen Mesenchyms auf Windungsmorphogenese und Musterung des cochleären Ganges .....	81
4.6	Die Funktion von <i>E-Cadherin</i> in der Entwicklung der Basalzellen .....	83
4.7	Die Musterung des periotischen Mesenchyms .....	86
<b>5.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....</b>	<b>97</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AP	anteriorposterior
ATP	Adenosintriphosphat
B	Base(n)
bidest.	bidestiliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	centi-
Ca	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cre	'cyclization recombinase'
d	Tage
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dB	Dezibel
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DIC	Differential-Interferenzkontrast
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
DV	dorsoventral
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis-(β-aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetsäure
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	(Erdbeschleunigung)
GFP/Gfp	green-fluorescent-protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin

---

k	kilo-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KBp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
<i>LacZ</i>	$\beta$ -Galaktosidase
LB	Luria-Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
m	milli-
M	Mol pro Liter
$\mu$	mikro-
Mg	Magnesium
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
MQ- $\text{H}_2\text{O}$	Millipore-Wasser
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA
n	nano-
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
p	pico-
P	postnataler Tag
<i>p.A.</i>	zur Analyse
<i>p.c.</i>	post coitum
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
$\text{P}_i$	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfatnatriumsalz
Sec	Sekunden
peSPL	'peak equivalent sound pressure level'
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling
U	Units (Einheiten)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumenanteile
WT	Wildtyp

---

x	-fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

# 1. Einleitung

Das Innenohr von Säugetieren vermittelt den Hör- und Gleichgewichtssinn. Als eines der primären Sinnesorgane ist es seit langem Gegenstand zahlreicher anatomischer und physiologischer Untersuchungen, so dass die Anatomie des Ohrs und die Physiologie von Hör- und Gleichgewichtssinn inzwischen gut erforscht sind. Die Frage, wie sich die hochkomplexe Struktur des Innenohrs aus einer einfachen embryonalen Anlage entwickelt, ist aber bis heute nur in Ansätzen verstanden.

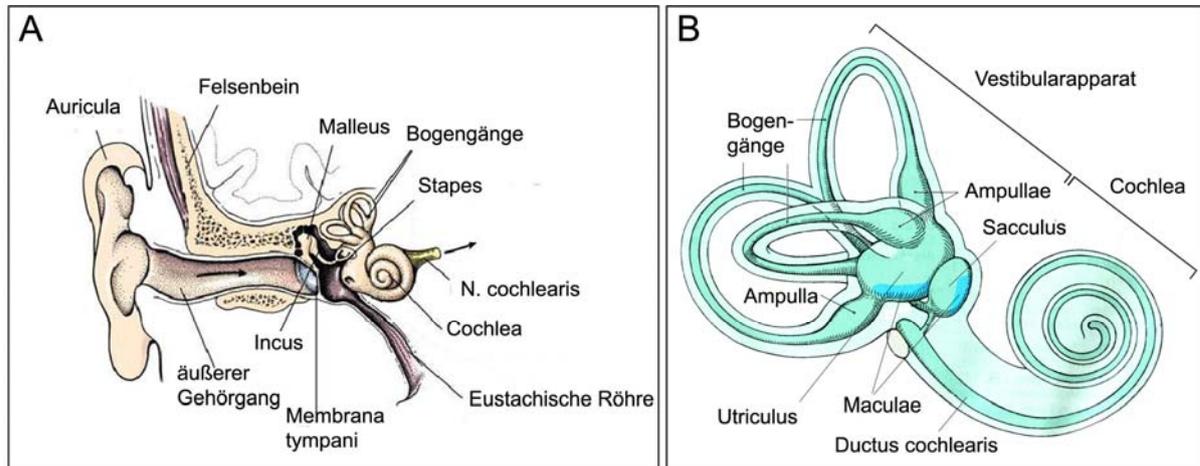
## 1.1 Struktur des Innenohrs

Das Ohr lässt sich anatomisch und funktionell in drei Abschnitte gliedern, das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Äußeres Ohr und Mittelohr dienen der Schallweiterleitung, während das Innenohr das eigentliche Organ der Sinneswahrnehmung darstellt (siehe Abb. 1A). Das Innenohr wird von einem knöchernen Anteil, dem knöchernen Labyrinth, und einem epithelial-mesenchymalen Anteil, dem häutigen Labyrinth, gebildet. Das knöcherne Labyrinth ist mit Perilymphe gefüllt. In dieser schwimmt, seitlich an den Knochenwänden aufgehängt, das mit Endolymphe gefüllte häutige Labyrinth, das die spezialisierten Sinnesepithelien beherbergt (Schiebler *et al.*, 1999).

Gleichgewichtsorgan und Hörorgan sind in verschiedenen Teilen des Innenohrs lokalisiert (siehe Abb. 1B). In der zentralen Knochenhöhle des Innenohrs, dem Vestibulum, liegen die häutigen Strukturen Sacculus und Utriculus. Ihre Sinnesepithelien, *Macula utriculi* und *Macula sacculi*, vermitteln über die Detektion von Gravitation und Linearbeschleunigung den Lagesinn. Die Sinnesepithelien der drei in den Utriculus mündenden Bogengänge, die *Cristae ampullaris*, nehmen Winkelbeschleunigung wahr und vermitteln den Drehsinn. Bogengänge und Vestibulum bilden als Vestibularapparat das Gleichgewichtsorgan. Das Hörorgan ist in der knöchernen Schnecke (Cochlea) lokalisiert. Es wird vom Cortischen Organ gebildet, einem Sinnesepithel, das sich über die gesamte Länge des cochleären Gangs erstreckt.

Die Perzeption der Reize erfolgt in beiden Organen durch mechanosensitive Rezeptorzellen, die aufgrund ihrer apikal liegenden Stereozilien dem Haarzelltyp zugerechnet werden. Über gallertige, azelluläre Hilfsstrukturen detektieren sie eine Veränderung der Lage im Raum bzw. Endolymphschwingungen, die durch Drehbeschleunigung oder die Umsetzung von Schallwellen ausgelöst werden. Die Rezeptorzellen werden von Neuronen des

vestibulocochleären Ganglions afferent und efferent innerviert (Forge und Wright, 2002; Raphael und Altschuler, 2003).



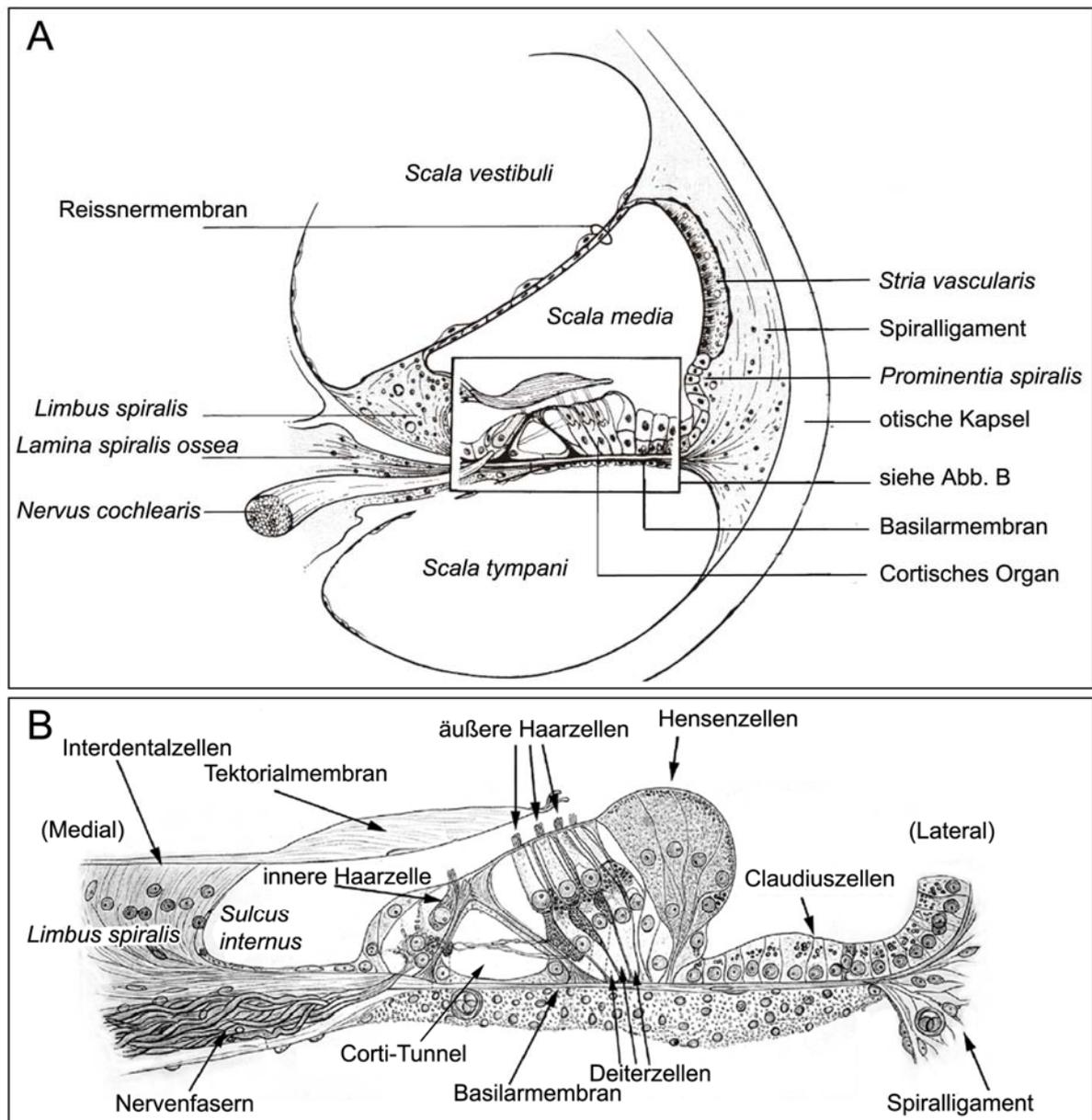
**Abb. 1: Aufbau des menschlichen Ohrs.** (A) Schematische Darstellung der auditorischen Peripherie des Menschen (modifiziert nach Bedoui, 2006). Das Außenohr wird durch das Trommelfell (*Membrana tympani*) von der luftgefüllten Paukenhöhle des Mittelohrs abgegrenzt. Diese ist über die Eustachische Röhre mit dem Rachenraum verbunden und wird von den drei Gehörknöchelchen Malleus, Incus und Stapes durchspannt. Die Grundplatte des Stapes verschließt das Vorhoffenster des Innenohrs. (B) Schematische Darstellung des menschlichen Innenohrs (modifiziert nach (Kahle und Frotscher, 2002)). Das Innenohr wird aus zwei Teilen gebildet, dem häutigen Labyrinth, das mit Endolymphe gefüllt ist (grün), und dem knöchernen Labyrinth, das das häutige umgibt und mit Perilymphe gefüllt ist (hellgrün). Funktional lässt sich das Innenohr in zwei Bereiche einteilen: Vestibulum und Bogengänge bilden als Vestibularapparat das Gleichgewichtsorgan, die Cochlea beherbergt das Hörorgan.

## 1.2 Struktur der Cochlea

Der cochleäre Gang (*Ductus cochlearis*) ist ein spiralförmig gewundener Gang, der mit Flüssigkeit, der Endolymphe, gefüllt ist. Das Epithel des *Ductus* ist Teil des häutigen Labyrinths (siehe Abb. 1B). In diesem Epithel lassen sich sensorische und nicht-sensorische Bereiche unterscheiden. Der mit Endolymphe gefüllte Raum des cochleären Ganges, die *Scala media*, wird von weiteren flüssigkeitsgefüllten Räumen umgeben, der *Scala vestibuli* und der *Scala tympani* (Abb. 2A), von denen er durch die Reissnersche Membran und die Basilarmembran getrennt wird (Forge und Wright, 2002; Raphael und Altschuler, 2003).

Die Basilarmembran trägt auf ihrem medialen Abschnitt das Cortische Organ, das sensorische Endorgan des Hörprozesses. Es besteht aus den nicht-sensorischen Stützzellen und den sensorischen Haarzellen (siehe Abb. 2B) und wird von einer azellulären Struktur, der Tektorialmembran bedeckt. Mit ihrer Basis liegt sie dem Epithel des *Limbus spiralis* auf und

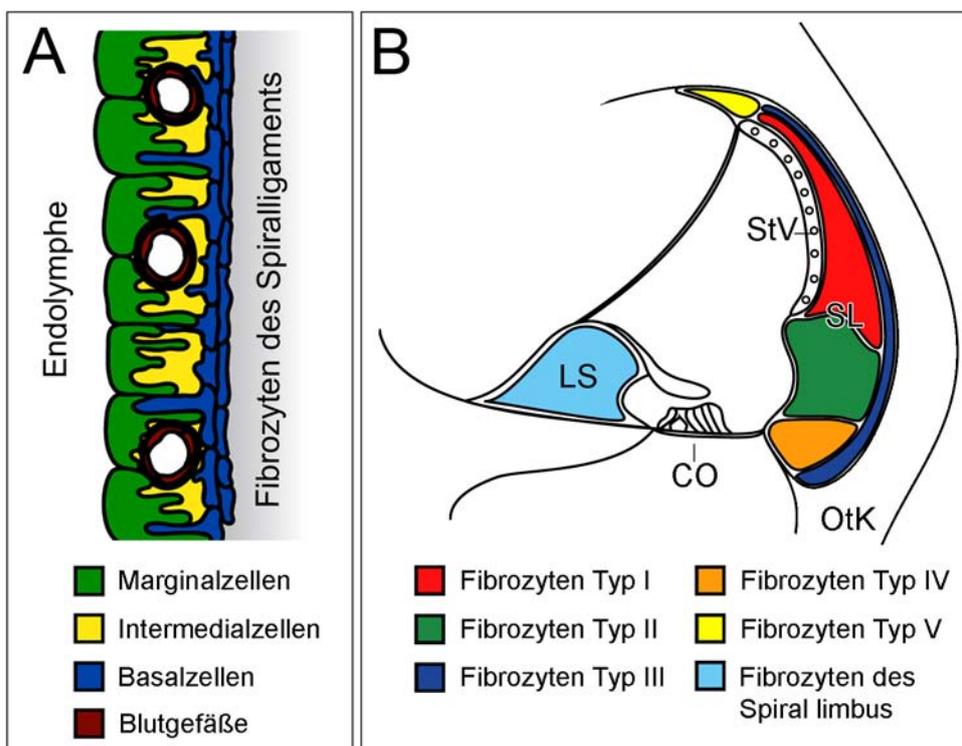
löst sich von diesem im Bereich der oberen Lippe des *Sulcus internus*. Der *Limbus spiralis* ist eine aus Fibrozyten bestehende Verdickung im zentralen Bereich des *Ductus cochlearis*.



**Abb. 2: Querschnitt des cochleären Ganges.** (A) Schematische Darstellung einer Cochleawindung (modifiziert nach Ross und Reith, 1985). (B) Schematische Darstellung des Cortischen Organs und seiner Peripherie (modifiziert nach Raphael und Altschuler, 2003).

Über das Bindegewebe der seitlichen Wand ist der cochleäre Gang mit der otischen Knochenkapsel bzw. dem knöchernen Labyrinth verbunden. Die seitliche Wand besteht aus der medial gelegene *Stria vascularis* und dem lateral gelegenen Spiralligament (Raphael und Altschuler, 2003, siehe Abb. 2A).

Die *Stria vascularis* ist ein hoch spezialisiertes Organ, das aus drei eng miteinander assoziierten Zellschichten besteht. Die flachen Basalzellen bilden eine mehrreihige Epithelschicht, die über 'tight junctions' den intrastrialen Extrazellularräum vom Extrazellularräum des Spiralligaments isoliert. Die dem Lumen des cochleären Ganges zugewandten Marginalzellen, die sich durch zahlreiche basolaterale bis in die Basalzellschicht reichende zytoplasmatische Fortsätze auszeichnen, trennen den intrastrialen vom endolymphatischen Raum. Eingebettet zwischen diese beiden Epithelschichten und eng assoziiert mit den Marginalzellfortsätzen liegen die ebenfalls durch zahlreiche zytoplasmatische Projektionen gekennzeichneten Intermedialzellen und die für die *Stria vascularis* typischen Blutkapillaren (siehe Abb. 3A, Raphael und Altschuler, 2003).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der *Stria vascularis* (A) und der verschiedenen Fibrozytensubpopulationen in der Cochlea (B).** (A) Die dreischichtige *Stria vascularis* wird von Marginal-, Intermedial- und Basalzellen gebildet und ist von einem feinen Kapillarnetz durchzogen. Alle drei Zelltypen sind durch die Bildung zahlreicher zytoplasmatischer Zellfortsätze eng miteinander assoziiert. (B) Anhand von Lokalisierung, Zellmorphologie und Markergenexpression können im Spiralligament fünf Subtypen otischer Fibrozyten unterschieden werden. Die verschiedenen Zelltypen (A) bzw. Fibrozyten-Subtypen (B) sind farbig gekennzeichnet (Legende siehe Abb.). CO, Cortisches Organ, OtK, otische Kapsel, LS, Spirallimbus, StV, *Stria vascularis*

Zwischen *Stria vascularis* und otischer Kapsel liegt das Spiralligament. Es wird von Bindegewebszellen, den otischen Fibrozyten, gebildet und ist von einem dichten Kapillarnetz

durchzogen. Anhand ultrastruktureller und molekularer Kriterien konnte eine Spezialisierung der Fibrozyten in verschiedene Subtypen festgestellt werden (Spicer und Schulte, 1991, 1996, siehe Abb. 3B). Lateral der *Stria vascularis* liegen die Fibrozyten des Typs I, im Bereich der *Prominentia spiralis* die des Typs II. Über ein mesenchymales 'gap junction'-Netzwerk sind die Fibrozyten beider Typen mit den Basal- und Intermedialzellen der *Stria vascularis* gekoppelt (Kikuchi *et al.*, 2000; Raphael und Altschuler, 2003). Die Fibrozyten des Typ III sind senkrecht zur Achse der Cochlea ausgerichtet und verankern das locker gepackte Bindegewebe des Spiralligaments an der otischen Knochenkapsel. Im basalen und suprastrialen Bereich des Spiralligaments liegen die Fibrozyten Typ IV bzw. V (Spicer und Schulte, 1991; Spicer und Schulte, 1996).

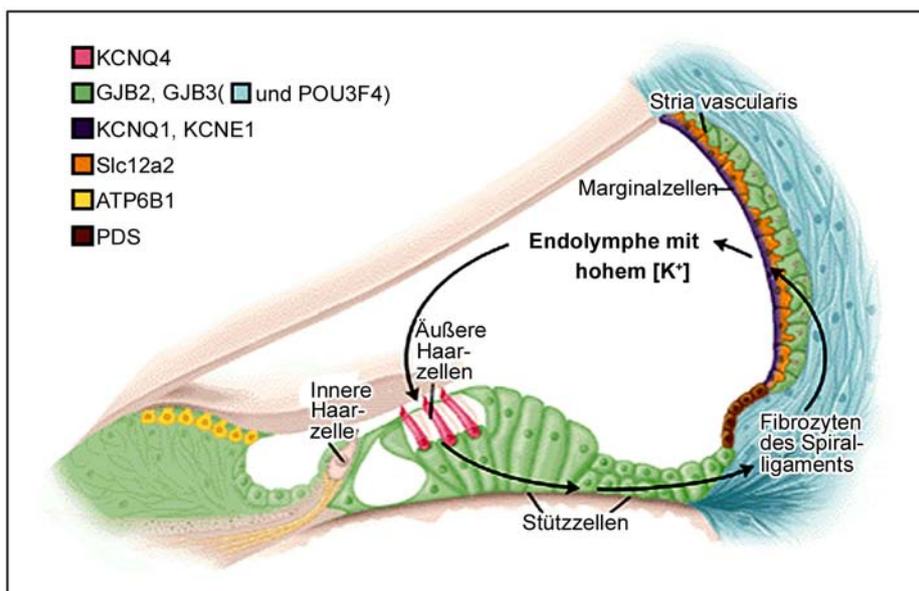
### **1.3 Bedeutung von otischen Fibrozyten und *Stria vascularis* für die Physiologie des Hörens**

Otische Fibrozyten und *Stria vascularis* besitzen eine bedeutende Funktion für die Physiologie des Hörens. Erblich- oder umweltbedingte pathologische Veränderungen in Fibrozyten oder *Stria vascularis* sind eine häufige Ursache für Hörfunktionsstörungen und Taubheit beim Menschen. Untersuchungen am Tiermodell belegen, dass der Verlust verschiedener in Fibrozyten oder *Stria vascularis* exprimierter Gene schwerwiegende Störungen der Hörphysiologie hervorruft (Boettger *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2005; Minowa *et al.*, 1999; Teubner *et al.*, 2003) und sowohl lärminduzierte als auch altersbedingte Schwerhörigkeit von Veränderung der Fibrozyten-Physiologie begleitet werden (Hequembourg und Liberman, 2001; Hirose und Liberman, 2003). Zurückzuführen ist dies auf eine Funktion dieser Gewebe in der Ionenhomöostase der Cochlea.

Der cochleäre Gang ist mit endolymphatischer Flüssigkeit gefüllt. Diese weicht mit einer für Extrazellulärflüssigkeiten untypisch hohen Kalium- und geringen Natriumkonzentration bezüglich ihrer ionalen Zusammensetzung stark von der Perilymphe, mit der *Scala vestibuli* und *Scala tympani* gefüllt sind, ab. Als Folge dieser Konzentrationsunterschiede weist die Endolympe gegenüber der Perilymphe ein elektrisches Potential, das endocochleäre Potential (EP), von ungefähr +80mV auf. Gegenüber den Haarsinneszellen, die ein Potential zwischen -40 und -70 mV aufweisen, liegt somit ein Potentialgradient von 120-180mV vor. Dieses Sensorpotential liefert die elektromotorische Kraft für einen depolarisierenden, hauptsächlich von Kalium- und Kalziumionen getragenen Kationeneinstrom in die Haar-

sinneszellen und ist somit essentiell für den Signaltransduktionsmechanismus dieser Zellen (Wangemann, 2002; Wangemann, 2006).

Die Zusammensetzung der Endolymphe muss aktiv aufrechterhalten werden. An diesem Prozess, der vor allem aus dem schnellen Rücktransport von Kaliumionen in die Endolymphe besteht und daher als  $K^+$ -Kreislauf bezeichnet wird, sind die *Stria vascularis*, die nicht-sensorischen Zellen des basalen und lateralen Epithels des cochleären Ganges und die otischen Fibrozyten des Spiralligaments beteiligt (siehe Abb. 4; Übersichtsartikel, siehe Wangemann, 2006; Salt und Ohyama, 1993)).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des  $K^+$ -Kreislaufs.** Kalium-Ionen, die während der Signaltransduktion die Endolymphe über die Sinneszellen verlassen, gelangen in das Spiralligament und werden von der Stria vascularis wieder in die Endolymphe abgegeben. Einige wichtige transmembrane Kanalproteine und Ionentransporter, die aktiv am  $K^+$ -Kreislauf teilnehmen, sind farbig gekennzeichnet (Legende siehe Abb.). Der Transkriptionsfaktor Pou3f4, der an der Differenzierung der Fibrozyten beteiligt ist, steht stellvertretend für die Kanal- und Transportproteine der Fibrozyten des Spiralligaments. Modifiziert nach Steel, 1999.

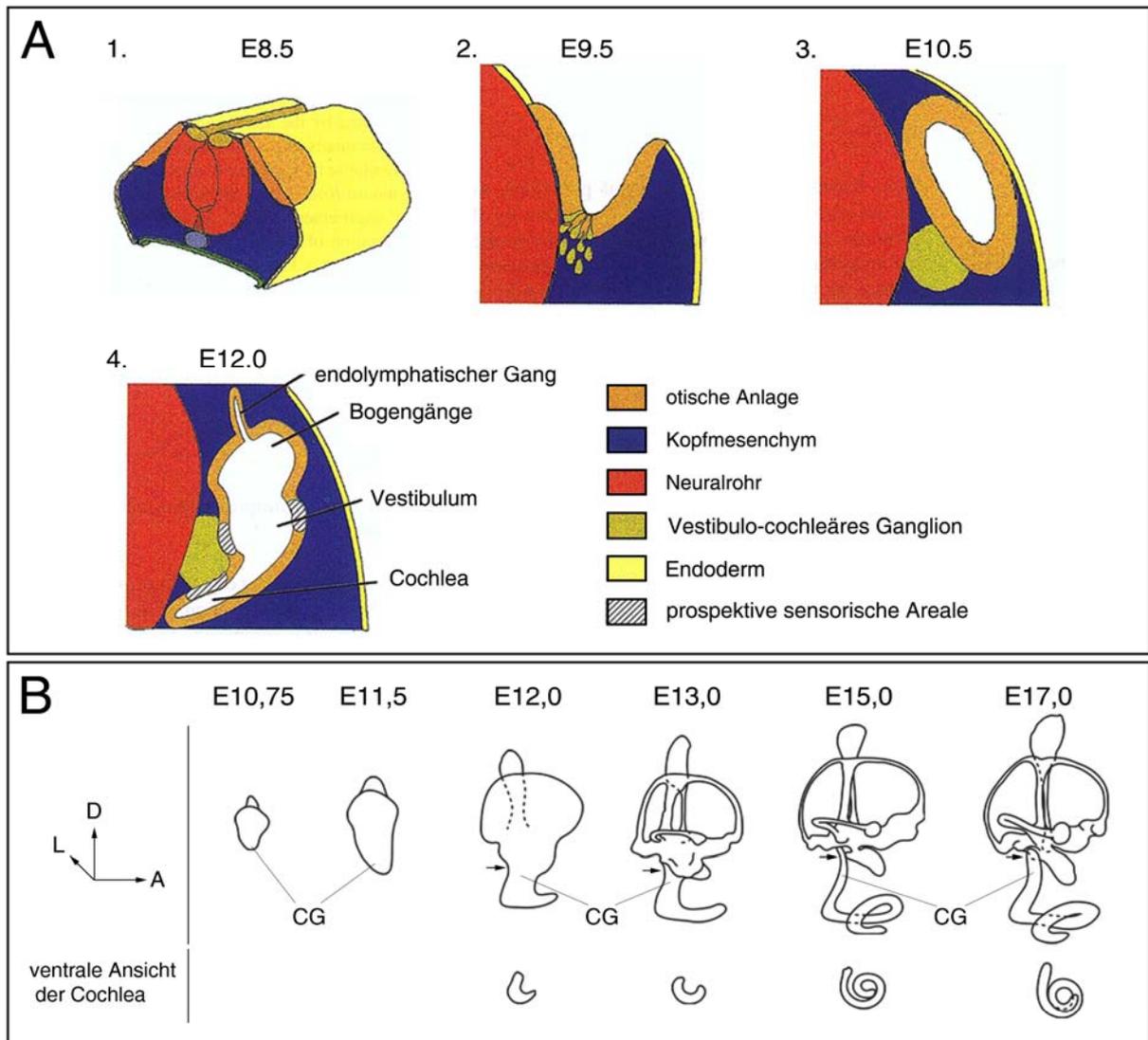
$K^+$ -Ionen, die die Endolymphe über Sinneszellen verlassen, werden in den Extrazellularraum des Spiralligaments transportiert. Zurzeit werden in diesem Kontext ein extrazellulärer Weg über die Perilymphe der *Scala tympani* und ein intrazellulärer Weg durch ein epitheliales 'gap junction'-Netzwerk' diskutiert (Zidanic und Brownell, 1990; Asher und Sando, 1981), Übersichtsartikel, siehe (Kikuchi *et al.*, 2000). Im Spiralligament werden die Kaliumionen dann von den Fibrozyten des Typs II mittels verschiedener Kaliumtransporter aufgenommen (Mizuta *et al.*, 1997; Crouch *et al.*, 1997; ten Cate *et al.*, 1994; McGuirt und Schulte, 1994) und durch das mesenchymale 'gap junction'-Netzwerk, das nach bisherigen Erkenntnissen

von den 'gap junction'-Proteinen GJB2, 3, 6 (Connexin26, 30, 31) gebildet wird, über die Typ I Fibrozyten zu den Basal- und Intermedialzellen der *Stria vascularis* transportiert (Kikuchi *et al.*, 1995; Forge *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2001). Von den Intermedialzellen werden die K<sup>+</sup>-Ionen in den intrastrialen Raum entlassen, unter hohem Energieaufwand von den Marginalzellen wieder aufgenommen und in die Endolymphe abgegeben (Marcus *et al.*, 1998; Mizuta *et al.*, 1997; Wangemann, 1995).

Die Bedeutung des K<sup>+</sup>-Kreislaufs und der daran beteiligten Geweben für die Funktion des Innenohrs wird dadurch belegt, dass viele der heute bekannten, erblich bedingten Hörfunktionsstörungen beim Menschen auf Mutationen in Genen zurückzuführen sind, deren Genprodukte direkt oder indirekt an der Homöostase der Endolymphe beteiligt sind. Neben Genen, die Komponenten von Kanalproteinen und Ionentransportern kodieren, wie *BSND*, *GJB2*, *KCNE1*, und *PDS* (Birkenhager *et al.*, 2001; Everett *et al.*, 1997; Kelsell *et al.*, 1997; Schulze-Bahr *et al.*, 1997), führen auch Mutationen in den Genen *Pou3f4* und im Mausmodell *Otos* zu massiven Störungen der Hörfunktion. Beide Faktoren sind an der Differenzierung der otischen Fibrozyten beteiligt (Minowa *et al.*, 1999).

#### **1.4 Entwicklung der otischen Fibrozyten und der *Stria vascularis***

Die otische Fibrozyten der Cochlea leiten sich embryonal vom (peri-)otischen Mesenchym ab, das während der Innenohrentwicklung den epithelialen Anteil des Innenohrs umgibt und sich in enger Assoziation mit diesem entwickelt. Das epitheliale Innenohr entsteht embryonal aus einer plakodalen Einfaltung des Oberflächenektoderms, die durch Invagination das otische Vesikel formt und nach einer Phase intensiver Musterungsprozesse eine komplizierte dreidimensionale Morphogenese durchläuft (Für eine Zusammenfassung der epithelialen Innenohrentwicklung, siehe Abb. 5). Das anfänglich homogene periotische Mesenchym durchläuft ab Tag 11,5 der Embryonalentwicklung einen Kondensationsprozess, der durch eine starke Sekretion extrazellulärer Matrixkomponenten gekennzeichnet ist, und eine frühe Phase der Chondrogenese darstellt (Cohen-Salmon *et al.*, 2000; McPhee und Van de Water, 1986). Bis E14 teilt sich das periotische Mesenchym in zwei Bereiche, die verschiedene Differenzierungswege einschlagen (McPhee und Van de Water, 1986; Sher, 1971). Im äußeren Bereich des periotischen Mesenchyms schreitet der Chondrogeneseprozess weiter fort und führt letztlich zur Bildung der otischen Kapsel, die als knöchernes Labyrinth das



**Abb. 5: Die Entwicklung des epithelialen Innenohrs.** Schematische Darstellung der (A) frühen Innenohrentwicklung (modifiziert nach Torres und Giraldez, 1998) und (B) der Innenohrmorphogenese zwischen E10,75 und E17 aus lateraler Sicht (nach Morsli et al., 1998). Die Pfeile in B markieren die Basis der Cochlea. (A1) Die otische Plakode bildet sich zwischen Tag 8,0 und 8,5 der Embryonalentwicklung im dem Rhombencephalon benachbarten Ektoderm. (A2,3) Zwischen E8,5 und E10,5 invaginiert die Plakode und bildet schrittweise Ohrgrube und otisches Vesikel. Gleichzeitig delaminieren im medialen Ohrepithel die prospektiven Neurone des vestibulo-cochleären Ganglions. (A4) Ab E11,5 beginnt die Morphogenese des Innenohrs und führt bis E12 durch Evaginationsprozesse zur Ausbildung der Anlagen von Vestibularapparat und Cochlea. (B) Ab E12 durchläuft die Cochlea, die sich vorerst als cochleärer Gang in ventraler Richtung ausdehnt, neben der kontinuierlichen Verlängerung einen Windungsprozess. Ab E17,5 hat sie die endgültige Windungszahl von 1,75 erreicht. Zellproliferation, programmierter Zelltod (Apoptose) und Migration von Zellen stellen die morphogenetische Grundlage der Bildung der hochkomplexen dreidimensionalen Struktur des Innenohrs dar (Lang *et al.*, 2000). Abkürzungen: A, anterior; CG, cochleärer Gang; D, Dorsal; L, lateral.

häutige umgibt (McPhee und Van de Water, 1986). Die mesenchymalen Zellen, die das otische Epithel direkt umgeben, differenzieren ab E14 zu Fibrozytenvorläuferzellen und später zu Fibrozyten verschiedener Subtypen (Sher, 1971; Takahashi und Kimura, 1970). Ab

E16 entstehen *Scala tympani* und *Scala vestibuli* durch einen mesenchymalen Kavitationsprozess.

Die Entwicklung der *Stria vascularis* wird mit der Kondensation mesenchymaler Zellen des Spiralligaments an das Epithel des cochleären Gangs ab E17 eingeleitet. Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie die Vorläufer der späteren Basalzellen darstellen. Bereits zu diesem Zeitpunkt haben von der Neuralleiste abgeleitete Melanozyten, die Vorläufer der späteren Intermedialzellen, eine Zellschicht unterhalb der zukünftigen Marginalzellen gebildet und sind eng mit diesen assoziiert. Ab E18 wird die epitheliale Basalmembran abgebaut und es kommt zur Bildung und Interkalation der zytoplasmatischen Fortsätze von Basal-, Intermedial- und Marginalzellen (Sher, 1971; Kiernan *et al.*, 2002).

## 1.5 Genetische Kontrolle der periotisch-mesenchymalen Zelldifferenzierung

Wie Kondensation und Musterung des periotischen Mesenchyms sowie Differenzierung von otischer Kapsel, otischen Fibrozyten und *Stria vascularis* auf genetischer Ebene reguliert werden, ist allenfalls in Ansätzen verstanden. Geweberekombinationsexperimente haben gezeigt, dass eine intensive reziproke epithelial-mesenchymale Wechselwirkung für die normale Entwicklung der epithelialen und mesenchymalen Anteile des Innenohrs essentiell ist (McPhee und Van de Water, 1986; Swanson *et al.*, 1990). So stammen einerseits Signale für die Bildung und Invagination der otischen Plakode sowie Morphogenese und Differenzierung des epithelialen Innenohrs aus dem periotischen Mesenchym (Doetzlhofer *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2004; Wright und Mansour, 2003; Xu *et al.*, 2007a), auf der anderen Seite zeigten Rekombinationsexperimente in Gewebekulturen, dass Kondensation und Chondrogenese des periotischen Mesenchyms durch Signalfaktoren aus dem otischen Epithel ausgelöst werden (McPhee und Van de Water, 1986; Van de Water und MCPhee, 1987). Ein regulierender Einfluss des Neuralrohrs auf die frühe Entwicklung des periotischen Mesenchyms ist ebenfalls sehr wahrscheinlich (Riccomagno *et al.*, 2002). Einige der epithelial gebildeten Signalfaktoren konnten bereits identifiziert werden, z.B. Fgf2, Fgf3, Tgf $\beta$ 1, Bmp4 und Shh (Frenz und Van De Water, 1991; Frenz *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Mansour *et al.*, 1993) und gaben damit einen Ansatzpunkte für das Verständnis der molekularen Regulation der frühen Entwicklung des periotischen Mesenchyms. Weitestgehend unklar ist jedoch nach wie vor, welche Zielgene im periotischen Mesenchym die Wirkung dieser Signalwege vermitteln.

*Pou3f4* (auch Brn4) kodiert einen Transkriptionsfaktor der evolutionär konservierten *POU*-Klasse, und weist eine sehr frühe einsetzende, spezifische Expression im periotischen Mesenchym und in den Vorläufern der otischen Fibrozyten auf (Riccomagno *et al.*, 2002). Der homozygote Verlust von *Pou3f4* im Tiermodell führt neben einer leichten Störung der cochleären Windungsmorphogenese zu einer Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten und Taubheit (Minowa *et al.*, 1999; Phippard *et al.*, 1999). Der Verlust des Gens *Otos*, das für ein kleines Protein der extrazellulären Matrix kodiert, verursacht ebenfalls pathologische Veränderungen der otischen Fibrozyten und eine eingeschränkte Hörfunktion (Delprat *et al.*, 2005).

Neben diesen beiden Genen scheinen auch T-Box-Gene (*Tbx-Gene*), die eine phylogenetisch konservierte Gruppe von Transkriptionsfaktoren kodieren, eine wichtige Rolle in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms zu spielen. Das im Innenohr sowohl epithelial als auch mesenchymal exprimierte *Tbx1* wird mit der Pathogenese des DiGeorge Syndroms in Verbindung gebracht und ist essentiell für die normale Morphogenese des Innenohrs (Vitelli *et al.*, 2003). Im Epithel des otischen Vesikels ist es an Musterungsprozessen beteiligt, im periotischen Mesenchym reguliert es die Proliferation während der Chondrogenese (Raft *et al.*, 2004; Vitelli *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007a; Xu *et al.*, 2007b). Ein Expressionscreen für alle bekannten *Tbx*-Gene der Maus, der im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt wurde, identifizierte darüberhinaus *Tbx2*, *Tbx3* und *Tbx18* als Gene mit einer spezifischen Expression im sich entwickelnden Innenohr. Während die Expression von *Tbx2* und *Tbx3* auf den epithelialen cochleären Gang beschränkt ist, weist *Tbx18* eine spezifische Expression im inneren Kompartiment des periotischen Mesenchyms, den Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten und der *Stria vascularis* auf. Die initiale histologische Charakterisierung von im Labor generierten *Tbx18*-Nullmutanten deutete auf eine Differenzierungsstörung der otischen Fibrozyten und eine vermutlich sekundäre Fehlbildung der *Stria vascularis*.

Bei *Pou3f4*, *Otos*, *Tbx1* und *Tbx18* handelt es sich somit um potentielle Mediatoren einer epithelial-mesenchymalen Wechselwirkung im Hinblick auf die Differenzierung der mesenchymalen Bestandteile des Innenohrs. Gene, die eine Funktion in der frühen Musterung und Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms besitzen oder an der Entwicklung der *Stria vascularis* beteiligt sind, wurden bisher jedoch nicht identifiziert

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Otische Fibrozyten besitzen eine essentielle Bedeutung für die Physiologie des Hörens. Bis heute ist jedoch nicht verstanden, wie diese Zellen im Verlauf der Entwicklung des Innenohrs aus einem homogenen Vorläufergewebe, dem periotischen Mesenchym, hervorgehen und wie die zugrunde liegenden Musterungs- und Differenzierungsprozesse auf molekularer Ebene reguliert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch die phänotypische Charakterisierung der *Tbx18*-Verlustmutante, neue Erkenntnisse über Musterungs- und Differenzierungsprozesse im periotischen Mesenchym sowie physiologische Konsequenzen der Fehldifferenzierung otischer Fibrozyten zu erlangen. Darüberhinaus sollen weitere Gene identifiziert und charakterisiert werden, die an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Computer:	Apple iMac
Software:	Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems), Office:mac v.X. (Microsoft), Filemaker pro 6.0 (Filemaker), Mac Vector 10.5.2 (Accelrys), Photoshop CS (Adobe), Illustrator CS (Adobe)
Geldokumentationskammer:	Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE
Gelelektrophoresezubehör:	Eigenbau
Glaswaren:	Objektträger: Superfrost plus (Menzel), Deckgläser: 24x60mm (Roth)
Heizplatte:	Schott
Hybridisierungsöfen:	mit Kippschüttler (Amersham) Mit Drehschüttler (Biometra)
Inkubatoren:	Wasserbäder (GfL), Rundschüttler (Infors HT), Trockeninkubatoren (Mettler)
Kryostat:	CM 3000 (Leica)
Laborbedarf, allgemein:	Multimed, KDL, Kimberly-Clark
Nylonmembran:	HybondN-Plus (Amersham)
Mikropipetten:	Eppendorf, Roth
Mikroskope:	Leica DM5000 mit Digitalkamera Leica DFC 300FX und DFC 350F, Leica MZ75, Leica M420 mit FUJI Digitalkamera HC3002, Leica MZFLIII mit UV-Lampe ebq 100 (Leistungselektronik Jena GmbH), Zeiss Axioplan mit Digitalkamera ProgRes C14 (Jenoptik) und UV-Lampe (Zeiss)
Mikrotom:	Leica RM2155
Mikrowellenofen:	LG
Netzteil:	Biorad Powerpack 300
pH-Meter:	WTW
Photometer:	Eppendorf BioPhotometer

---

Plastikwaren:	Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma
Präparierbestreck:	Fine Science Tools
Säulenmaterialien:	NucleoSpin-, NucleoBond-Säulen (Macherey&Nagel)
Schüttler und Rührer:	Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL
Thermoblock:	Eppendorf ThermoStat plus
Thermocycler:	Primus 96 plus (MWG-Biotech) peqSTAR 96 (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Thermomixer:	Eppendorf 5436, HLC
Trockenplatte:	Medax
UV-Lampen:	UV Stratalinker 2400 (Stratagene)
Waagen:	Kern
Zentrifugationszubehör:	50 ml und 400 ml Becher (Beckman)
Zentrifugen:	Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20, Heraeus Biofuge13 und Biofuge15

## 2.2 Chemikalien

Chemikalien des Reinheitsgrads p.A. sowie gebrauchsfertige Lösungen wurden von den Firmen Amersham, AppliChem, BioRad, Boehringer, Fisher Chemicals, Fluka, Invitrogen, J.T.Baker, Merck, Pharmacia, Riedel-de-Häen, Roth, Sigma-Aldrich und Vector bezogen.

## 2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie

5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (Roche), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente (Roche), Antigen unmasking solution (VectorLabs), Blocking Reagent (Roche), BM Purple AP Substrate (Roche), DIG-Labeling-NTP-Mix (Roche), DNase I (Roche), Klenow-Fragment (NEB), Lysozym, Oligonucleotide (Sigma), Proteinase K (Roche), Restriktionsendonukleasen (NEB, Fermentas), RNase A (Roth), Rnasin (Promega), SP6 RNA Polymerase (Roche), T3 RNA Polymerase (NEB), T4 DNA Ligase (Fermentas, Boehringer), T4 Polynukleotidkinase (Pharmacia), T7 RNA Polymerase (NEB), 1 kB Leiter (GibcoBRL), Taq DNA Polymerase (Sigma), Vectastain DAB Substrate Kit für Peroxidasen (VectorLabs), Vectastain Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (PK4001, Vector), Vectastain Peroxidase-Mouse-on-Mouse-Kit (PK2200, Vector)

## 2.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet::

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Herkunft	eingesetzte Vedünnung
Anti-Digoxigenin	Roche	1:5000
Esel-anti-Maus-IgG(H+L), Rhodamin-Red-X konjugiert	Dianova	1:200
Kaninchen-anti-Aqp1, polyklonal	Alomone Labs	1:200
Kaninchen-anti-Barttin, polyklonal	Friedhelm Hildebrand, (Birkenhager et al., 2001)	1:100
Kaninchen-anti-E-Cadherin, polyklonal	Rolf Kemler, (Vestweber und Kemler, 1984)	1:200
Kaninchen-anti-Glut1, polyklonal	Dianova	1:200
Kaninchen-anti-Kcc3, polyklonal	Thomas Jentsch, (Boettger et al., 2003)	1:500
Kaninchen-anti-Kcnq1, polyklonal	Thomas Jentsch, (Dedek und Waldegger, 2001)	1:250
Kaninchen-anti-Kir4.1, polyklonal	Alomone Labs	1:200
Kaninchen-anti-Otospiralin, polyklonal	Christian Hamel, (Delprat et al., 2002)	1:250
Kaninchen-anti-pan-Laminin, polyklonal	Sigma-Aldrich	1:100
Maus-anti-Atpa1a (a6F), monoklonal	Douglas M. Fambrough, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa	1:500
Maus-anti-BrdU-Antikörpers	Roche	1:200
Maus-anti-Cldn11 (37E3), monoklonal	Alexander Gow, (Gow et al., 2004)	1:500
Meerschweinchen-anti-Cx26, polyklonal	Johanna Brandner, (Brandner et al., 2004)	1:200
Ziege-anti-Kaninchen-IgG(H+L), Alexa488 konjugiert	Invitrogen	1:500
Ziege-anti-Kaninchen-IgG(H+L), FITC konjugiert	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Ziege-anti-Kaninchen-IgG(H+L), Rhodamin-Red-X konjugiert	Dianova	1:200
Ziege-anti-Maus-IgG(H+L), Alexa555 konjugiert	Invitrogen	1:500
Ziege-anti-Maus-IgG(H+L), FITC konjugiert	Dianova	1:200
Ziege-anti-Meerschweinchen-IgG(H+L), Cy3 konjugiert	Dianova	1:200

## 2.5 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme

### 2.5.1 Klonierungsvektoren

Als Plasmidvektor zur Subklonierung von DNA-Fragmenten und für *in vitro* Transkription wurden pBlueskript II KS/SK (Stratagene), pGem4z (Promega), pGem-T-Easy (Promega) verwendet.

### 2.5.2 Wirtssysteme

#### 2.5.2.1 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden *E. Coli*-Zellen der Stämme XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] und XL10-Gold (Tet<sup>r</sup> Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]<sup>a</sup>) von Stratagene verwendet.

## 2.6 Versuchstiere

Folgende rekombinanten Allele, die alle auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C57BL6/J und NMRI) gehalten wurden, fanden in dieser Arbeit Verwendung:

*Tbx18LacZ*<sup>( $\Delta$ neo)</sup>: MGI: *Tbx18*<sup>tm3Akis</sup>, Bussen *et al.*, 2004

*Tbx18Gfp*<sup>( $\Delta$ neo)</sup>: MGI: *Tbx18*<sup>tm2Akis</sup>, A. Kispert, unveröffentlicht

*Tbx18Cre*<sup>( $\Delta$ neo)</sup>: MGI: *Tbx18*<sup>tm4(cre)Akis</sup>, Wiese *et al.*, 2009

*Sox9*<sup>fllox</sup>: MGI: *Sox9*<sup>tm1Gsr</sup>, Kist *et al.*, 2002, erhalten von Prof. Dr. Gerd Scherer

*Ecad*<sup>fllox</sup>: MGI: *Cdh1*<sup>tm2Kem</sup>, Boussadia *et al.*, 2002, erhalten von Prof. Dr. Rolf Kemler

*$\beta$ -Catenin*<sup>fllox</sup>: MGI: *Ctnnb1*<sup>tm2Kem</sup>, Brault *et al.*, 2001, erhalten von Prof. Dr. Rolf Kemler

*msd::Tbx18*: MGI: *Tg(Dll1-Tbx18)2Akis*, Bussen *et al.*, 2004

*Rosa26*<sup>lacZ</sup>: MGI: *Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1Sor</sup>, Soriano, 1999

## 2.7 Synthetische Oligonukleotide

DNA Oligo-Nukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 2: Verwendete DNA Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung:
AKO0207	5'-ATT ACC CCT CAC TAA AGG GA-3'	Sequenzierung
AKO0208	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Sequenzierung
AKO0231	5'-CCG GCT TTG GTG ATG ATC-3'	Genotypisierung
AKO0429	5'-TTC ACT GGC CGT CGT TTT ACA ACG TCG TGA-3'	Genotypisierung
AKO0430	5'-ATG TGA GCG AGT AAC AAC CCG TCG GAT TCT-3'	Genotypisierung
AKO0487	5'-GCG CGG AAA AGG GCT CGG-3'	Genotypisierung
AKO0557	5'-GGA CAA CAA GAG ATA CAG GTA-3'	Genotypisierung
AKO0558	5'-TCT GAT AGG CAG TGA CAG TTG-3'	Genotypisierung
AKO0580	5'-GGG GAT TGG TGG CGA CG-3'	Genotypisierung
AKO0630	5'-GAC AAC CAC TAC CTG AGC AC-3'	Genotypisierung
AKO0698	5'-AGG AAG CTA CTG TCT GGG G-3'	Genotypisierung
AKO0745	5'-CCG GCT GCT GGG AAA GTA TAT G-3'	Genotypisierung
AKO0746	5'-CGC TGG TAT TCA GGG AGG TAC A-3'	Genotypisierung
AKO0747	5'-CTC CGG TAG CAA AGG CGT TTA G-3'	Genotypisierung
AKO0917	5'-GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'	Genotypisierung
AKO0918	5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3'	Genotypisierung
AKO0919	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'	Genotypisierung
AKO0969	5'-AAG GTA GAG TGA TGA AAG TTG TT-3'	Genotypisierung
AKO0970	5'-CAC CAT GTC CTC TGT CTA TCC-3'	Genotypisierung
AKO0971	5'-TAC ACT ATT GAA TCA CAG GGA CTT-3'	Genotypisierung
AKO0972	5'-CTT ATA CCG CTC GAG AGC CGG A-3'	Genotypisierung
AKO0973	5'-GTG TCC CTC CAA ATC CGA TA-3'	Genotypisierung
AKO1110	5'-CAG ATC TCG GGA GGC ATC G-3'	Genotypisierung
AKO1111	5'-ATT CTC CCA CCG TCA GTA CG-3'	Genotypisierung
AKO1112	5'-GAC TTC CTG GTG AGG GTG CGT G-3'	Genotypisierung
AKO1113	5'-GGA GAA TGG GCA CAC AGA ATC AAC-3'	Genotypisierung
AKO1114	5'-GGG AGC CGG TTG GCG CTA CCG GTG G-3'	Genotypisierung

## 2.8 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungs sonden

Folgende Plasmidkonstrukte wurden zur Herstellung von RNA-Hybridisierungs sonden verwendet:

**Tabelle 3: Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungs sonden**

Gen-Symbol	Gen-Name	Pl-Nr.	Lin-Nr.	Transkription
<i>AK030194</i>	AK030194	P02605	L0552	XhoI, T3
<i>Axin2</i>	Axin2	P03846	L0926	EcoRI, T7
<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4	P01801	L0262	EcoRI, SP6
<i>Bsnd</i>	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness (Barttin)	P01362	L0050	SpeI, T7
<i>Car3</i>	Carbonic anhydrase 3	P02560	L0531	NcoI, T7
<i>Ccdc72</i>	Coiled-coil domain containing 72	P03413	L0673	SacI, T7
<i>Cdh1, E-Cadherin</i>	Cadherin 1, E-Cadherin	P00468	L0349	SpeI, T7
<i>Cdh2, N-Cadherin</i>	Cadherin 2, N-cadherin	P02768	L0652	HindIII, T3
<i>Cdkn1b, P27</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, P27	P01658	L0160	EcoRI, T7
<i>Cldn11</i>	Claudin 11	P02513	L0506	NcoI, T3
<i>Coch</i>	Coagulation factor C homolog ( <i>Limulus polyphemus</i> )	P02084	L0424	EcoRV, T7
<i>Col2a1</i>	Procollagen, type II, alpha 1	P01750	L0230	StyI, T7
<i>Col4a5</i>	Procollagen, type IV, alpha 5	P02306	L0473	EcoRI, T3
<i>Cre</i>	cyclization recombinase ( <i>Enterobacteria phage P1</i> )	P00563	L0783	EcoRI, T7
<i>Creb5</i>	cAMP responsive element binding protein 5	P02257	L0443	EcoRI, T3
<i>Dct</i>	Dopachrome tautomerase	P02062	L0410	HindIII, T7
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	P02260	L0469	SmaI, T3
<i>Fzd1</i>	Frizzled homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	P00402	L0219	Not, T7
<i>Gjb2, Cx26</i>	Gap junction protein, beta 2, Connexin26	P01810	L0264	EcoRI, T7
<i>Gjb6, Cx30</i>	Gap junction protein, beta 6, Connexin30	P01811	L0265	XhoI, T7
<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	P02295	L0563	NcoI, T7
<i>Gsdma</i>	Gasdermin A	P02299	L0568	EcoRI, T3
<i>Id2</i>	Inhibitor of DNA binding 2	P01780	L0515	HindIII, T3
<i>Igf2</i>	Insulin like growth factor 2	P01932	L0943	Kpn, T7
<i>LacZ</i>	beta-D-galactosidase ( <i>Escherichia coli</i> )	P01712	L0251	ClaI, T7
<i>Lfng</i>	Lunatic fringe	P00756	L0094	EcoRI, T3
<i>Mrc2</i>	Mannose receptor, C type 2	P02265	L0446	XhoI, T3
<i>Myo7a</i>	Myosin VIIa	P03709	L0888	NcoI, T3
<i>Nedd4</i>	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	P02310	L0561	PstI, T3
<i>Npm1</i>	Nucleophosmin 1	P02598	L0576	XhoI, T3
<i>Otx2</i>	Orthodenticle homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	P00382	L0734	SalI, T7
<i>Postn</i>	Periostin	P02506	L0499	NcoI, T3
<i>Pou3f4, Brn4</i>	POU domain, class 3, transcription factor 4	P01769	L0244	XhoI, T3
<i>Rpl41</i>	Ribosomal protein L41	P02600	L0548	XhoI, T3
<i>Rplp1</i>	Ribosomal protein, large, P1	P02297	L0558	XhoI, T3
<i>Sepp1</i>	Selenoprotein P, plasma, 1	P03412	L0672	HincII, T7
<i>Set</i>	SET translocation	P02277	L0497	EcoRI, T3
<i>Slc26a4, Pds</i>	Solute carrier family 26, member 4	P02081	L0418	SacI, T7
<i>Sox9</i>	SRY-box containing gene 9	P00339	L0047	HindIII, T7
<i>Tbx18</i>	T-box18	P00568	L0043	HindIII, T7
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta induced	P03563	L0771	HindIII, T3
<i>Tmsb10</i>	Thymosin, beta 10	P03418	L0678	PstI, T7

Die angegebenen Nummern beziehen sich auf die laboreigene Plasmid-Datenbank. Pl-Nr., Plasmid- Nummer.; Lin-Nr., Linearisierungs- Nummer

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Lösungen

Nicht aufgeführte Lösungen wurden nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994).

10x PCR Puffer Nr.8:	100 mM TRIS.HCl pH8.5, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 mM KCl, 50% DMSO (Sigma),
10x PCR Puffer X:	100 mM TRIS.HCl pH9.5, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 mM KCl, 50% DMSO (Sigma)
dNTPs	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (für PCR)
EDTA:	0,5 M in H <sub>2</sub> O, pH 8,0.
G50-Puffer:	10 mM TRIS pH7,5, 10 mM EDTA, 20mM NaCl, 0,1% SDS
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2.
Transformations-Lösung:	50-500 ng rekombinanter Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz in 100 µl 1x KCM-Puffer
X-Gal:	2% in Dimethylformamid.
Antikörper-Lösung:	anti-DIG-AP Antikörper, 1:5000 in Block-Lösung, vor Verwendung 2h bei 4°C präadsorbiert
Block-Lösung:	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB, zum Lösen unter Rühren auf 50°C erhitzt
DEPC-H <sub>2</sub> O:	100 µl/L DEPC in bidest. H <sub>2</sub> O, über Nacht inkubiert, dann autoklaviert
DIG-dNTPs:	1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP (gebrauchsfertig, Roche)
DTT:	200 mM in H <sub>2</sub> O.
Hybridisierungslösung:	ca.1 µg/ml DIG-markierte-RNA-Sonde im jeweiligen Prähybridisierungspuffer
Lösung I:	50%Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS in ddH <sub>2</sub> O
Lösung II:	50%Formamid, 2x SSC pH 4,5, 0,2% SDS in ddH <sub>2</sub> O
MAB-Lösung:	100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5, frisch anzusetzen (+ 2mM Levamisol für Gesamtembryonen)

Millipore H <sub>2</sub> O:	bidest H <sub>2</sub> O gefiltert durch Millipore Filteranlage
Mowiol	
NTMT:	100 mM NaCl, 100 mM TRIS.HCl pH 9,5, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% Tween-20.
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2.
PBT pH 4,5:	PBS mit 0,1% Tween-20, pH-Wert mit HCl auf 4,5 einstellen, vor Gebrauch frisch anzusetzen
PBT:	PBS mit 0,1% Tween-20, vor Gebrauch frisch anzusetzen
PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd in PBS.
Prähybridisierungspuffer	Schnitte: 50% Formamid, 5x SSC pH 7,0, 1x Denhardt's- Lösung, 0,1% Tween-20, 0,1mg/ml tRNA, 1x Heparin in DEPC-H <sub>2</sub> O  Gesamtembryonen: 50% Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS, 50 µl/ml Hefe-tRNA, 50 µl/ml Heparin in DEPC-H <sub>2</sub> O
SSC (20x) pH 4.5.:	3 M NaCl, 0,3 M Nacitrat, pH 4.5
SSC (20x) pH7.0:	3 M NaCl, 0,3 M Nacitrat, pH 7,0.
TAE (50x):	2 M TRIS.Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8,0.
TE:	10 mM TRIS.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.
TNT-Puffer:	10mM TRIS.HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1% Tween-20
Triethanolamin:	mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

### 2.9.2 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Präparation genomischer DNA aus Gewebeproben, Präparation von Plasmid-DNA, Präzipitation von Nukleinsäuren, Agarosegelelektrophoresen, Restriktionsspaltungen von Plasmid-DNA, Dephosphorylierung restriktionsverdauter DNA, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994). Zur Isolierung von sehr reiner Plasmid-DNA wurden Plasmidaufreinigungs-Kits von Macherey&Nagel (NucleoSpin, NucleoBond) verwendet. Für die Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das 'Zymoclean Gel DNA Recovery' Kit (Zymo Research) verwendet. DNA Sequenzierung erfolgte im Haus unter Verwendung des 'BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing' Kits (PE Applied Biosystems).

### 2.9.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation allelspezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz enthielt ungefähr 500 ng genomische DNA, je 10 pmol der spezifischen Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x PCR-Puffer und 1,5 U Taq-Polymerase (Sigma) und wurde mit MQ-H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Alle PCR Reaktionsprotokolle beinhalteten eine 2-4 min Denaturierung bei 94°C, ungefähr 30-35 Amplifikationszyklen, einen abschließenden 8 min Syntheseschritt und eine Lagerungsphase bei 4°C. Die Oligonukleotide wurden allelspezifisch variiert (Tabelle 4):

**Tabelle 4: Verwendete Primerkombinationen für die Genotypisierung. Wt, Wildtypallel; mut, transgenes Allel; deletiert, Deletionsfragment (Cre-induzierte Rekombination).**

	Oligo1	Oligo2	Oligo3	Fragmentgröße [bp]		
				wt	mut	deletiert (flox)
<i>BATGal</i>	AKO0429	AKO0430			364	
<i>E-Cadherin<sup>flox</sup></i>	AKO0972	AKO0973		900	980	
<i>Msd::Tbx18</i>	AKO0557	AKO0558			500	
<i>Rosa<sup>LacZ</sup></i>	AKO0917	AKO0918	AKO0919	500	250	
<i>Sox9<sup>flox</sup></i>	AKO0745	AKO0746	AKO0747	247	419	314
<i>Tbx18<sup>Cre</sup></i>	AKO1110	AKO1111			1200	
<i>Tbx18<sup>Cfp</sup></i>	AKO0630	AKO0668			1200	
<i>Tbx18<sup>LacZ</sup></i>	AKO0580	AKO0689			1600	
<i>Tbx18<sup>Wildtyp</sup></i>	AKO0487	AKO0698		900		
<i>β-Catenin<sup>flox</sup></i>	AKO0969	AKO0970	AKO0971	221	324	500

### 2.9.4 Herstellung der Hybridisierungssonden

Für die RNA in situ Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierten RNA Sonden verwendet. Der 10 µl-Standardreaktionsansatz für die *in vitro* Transkription enthielt 1µl linearisierter Plasmid-DNA (500ng/µl), 1µl 10xTranskriptionspuffer, 1µl 10xDIG-Reaktionsmix, 1µl 0,1mM DTT, 0,5 µl Rnasin, 0,5µl RNA-Polymerase und 5µl Milipore H<sub>2</sub>O. Nach 2h Inkubation bei 37°C und dem Verdau der Plasmid-DNA (2µl DnaseI, 30 min, 37°C) wurde die RNA gefällt und in 60µl 50%igem Formamid/DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach der Beurteilung der Qualität durch gelelektrophoretische Auftrennung wurde die RNA bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.9.5 DNA- Microarray

Mithilfe der DNA-Microarray Technologie sollten Genexpressionsprofile des Innenohrs von *Tbx18* defizienten (*Tbx18<sup>Gfp/LacZ</sup>*) und Kontroll-Mausembryonen erstellt und verglichen werden. Um einen Einfluss der *Gfp*-Reportergenexpression auf das Expressionsprofil zu minimieren wurden *Tbx18<sup>Gfp/+</sup>*-Embryonen als Kontroll-Embryonen verwendet. Die Innenohren von E13.5 und E18.5 Embryonen (je 15 Embryonen pro Genotyp und Stadium) wurden isoliert, in RNAlater (Ambion, Applied Biosciences) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Extraktion der RNA, cDNA-Synthese und Cy3-bzw. Cy5-Markierung, Hybridisierung und Auslesen des Microarrays (Affymetrix 428) und Auswertung der Fluoreszenzsignale (ImaGene 4.2 Software, Biodiscovery) wurden nach Herstellerangaben in Kollaboration mit Herrn Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

## 2.10 Mausmethoden

### 2.10.1 Lösungen

PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd in PBS.
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2.
Bouins-Fixativ	gebrauchsfertig (Sigma)

### 2.10.2 Embryologische Methoden

#### 2.10.2.1 Verpaarungen

Embryonen für Expressionsanalysen gingen aus Verpaarungen von NMRI-Wildtypmäusen hervor. Für vergleichende Analysen wurden zur Gewinnung homozygot mutanter *Tbx18<sup>LacZ</sup>*-, *Tbx18<sup>Gfp</sup>*- und *Tbx18<sup>LacZ/Tbx18<sup>Gfp</sup></sup>*-Embryonen heterozygote Mäuse miteinander verpaart. Für die Generierung von überlebensfähigen *Tbx18*-Mutanten des Genotyps *Tbx18<sup>Gfp/Gfp</sup>*, *msd::Tbx18/msd::Tbx18* wurden *Tbx18<sup>Gfp</sup>*, *msd::Tbx18* doppelheterozygote Tiere verpaart. Konditionell mutante Embryonen der Genotypen *Tbx18<sup>Cre/+</sup>*, *E-Cadherin<sup>flox/flox</sup>*, *Tbx18<sup>Cre/+</sup>*, *Sox9<sup>flox/flox</sup>*, *Tbx18<sup>Cre/+</sup>*, *β-Catenin<sup>flox/flox</sup>* gingen aus Verpaarungen von für das *Tbx18<sup>Cre</sup>* und das entsprechende Flox-Allel doppelt heterozygoten Männchen und für das Flox-Allel homozygoten Weibchen hervor. Für die Generierung von *Tbx18<sup>Cre</sup>*, *ROSA26<sup>LacZ</sup>* Embryonen

wurden *Tbx18<sup>Cre</sup>* heterozygote Männchen mit *ROSA26<sup>LacZ</sup>* homozygoten Weibchen verpaart. Sofern nicht anders angegeben, wurden als Kontrolltiere *Tbx18<sup>+</sup>*- homozygote Geschwistertiere verwendet.

Für die Bestimmung der Trächtigkeitsperiode der Mäuse wurde die Vaginal-Plug-Methode angewandt. Ausgehend vom Tag, an dem ein mucoider Plug in der Vagina eines verpaarten Mausweibchens detektiert werden konnte (definitionsgemäß: Tag 0,5 *post coitum* (*p.c.*)), wurde der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet.

### **2.10.2.2 Gewinnung der Embryonen**

Für die Entnahme der Embryonen wurde die trächtige Maus durch Genickbruch getötet, die Bauchdecke durch einen medianen Schnitt geöffnet und die beiden Uteri entfernt.

Die Isolierung der Embryonen aus den maternalen und extraembryonalen Geweben erfolgte in gekühltem (4°C) PBS unter einem Stereomikroskop (Leica MZ75).

Um die Penetration des Fixatives zu erleichtern, wurde bei Embryonen älter als E11.5 standardmäßig der Kopf vom Rumpf abgetrennt, sofern keine unversehrten Embryonen benötigt wurden. Bei E18,5 Embryonen wurden zusätzlich die Haut entfernt und die Hirnhäute durchstoßen.

Mussten die Embryonen genotypisiert werden, wurde wahlweise embryonales oder extraembryonales Gewebe ( Dottersack) gesammelt.

### **2.10.2.3 PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben**

Präparierte Embryonen/Gewebe wurden mit 4%PFA/PBS (bei 4°C, ü.N.) fixiert, sofern nicht ausdrücklich anders gekennzeichnet.

Die fixierten Embryonen wurden in PBS gewaschen (2x für 10 min, RT) und über eine aufsteigende Methanolreihe (je 1x 25%, 50%, 75%, 100% Methanol/PBS, für je nach Größe 30 min bis 2 h pro Schritt) dehydriert. Anschließend wurden sie in frisches Methanol überführt und bei -20°C bis zur Durchführung der Experimente gelagert.

### **2.10.2.4 Bouins-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben**

Embryonen, bei denen diese Fixierungsmethode zum Einsatz kam, wurden später ausschließlich für histologische Färbungen von Paraffinschnitten (Hämatoxilin/Eosin, siehe 2.11.5) verwendet.

Die Fixierung der freipräparierten Embryonen erfolgte ü.N. bei RT. Die fixierten Embryonen wurden mehrmals in 70% Ethanol gewaschen (min. 3x für je 1 d) und in reines Ethanol überführt (1x 1 d). Bis zur Verwendung wurden die Objekte bei 4°C gelagert.

#### **2.10.2.5 Genotypisierung von Embryonen**

Die Genotypisierung von Embryonen erfolgte entweder über genomische DNA mittels PCR (siehe Abschnitte 2.9.3) oder über Auswertung von Fluoreszenzunterschieden bei mutanten Allelen mit *eGFP*-Marker. Für die Bestimmung des Genotyps anhand der *GFP*-Expression (Leica MZFLIII) wurden eindeutige Unterschiede in Fluoreszenzintensität und Expressionsdomänen berücksichtigt.

#### **2.10.3 Isolierung der Innenohren aus Embryonen und adulten Tieren**

Mausembryonen der Stadien E13.5 und älter wurden freipräpariert (2.10.2.2), die Köpfe abgetrennt und durch einen medialen Schnitt halbiert. Von der Innenseite ausgehend wurden dann die Innenohren, die sich bereits ab E13.5 durch die einsetzende Bildung der otischen Kapsel deutlich vom umgebenden Kopfmesenchym abgrenzen, in PBS unter Verwendung eines Stereomikroskopes freipräpariert.

Für die Isolation von Innenohren adulter Tiere wurden Tiere des entsprechenden Genotyps durch Genickbruch getötet, der Kopf vom Rumpf abgetrennt und die Haut abgezogen. Nach dem Öffnen des Schädeldachs und dem Entfernen des Gehirns wurde der Schädel durch einen medialen Schnitt zwischen den parietalen Schädelknochen entlang der rostrocaudalen Achse halbiert. Von der Innenseite ausgehend wurden dann die Innenohren in PBS unter Verwendung eines Stereomikroskopes freipräpariert. Rundes und ovales Fenster wurden geöffnet und die Innenohren für 1d in 4%-PFA/PBS bei 4°C fixiert, anschließend für 48h mit 0,5 M EDTA/PBS dekalzifiziert und dehydriert bzw. für die Anfertigung von Gefrierschnitten weiterverarbeitet.

#### **2.10.4 Hirnstammaudiometrie**

Die Hirnstammaudiometrie und die Bestimmung des Endocochleären Potentials für drei Wochen alte Mäuse des Genotyps *Tbx18<sup>Gfp/Gfp</sup>*, *msd::Tbx18/msd::Tbx18* und Kontrolltiere wurde nach Standardverfahren in Kollaboration mit Dr. Hannes Maier in der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

## 2.11 Histologische Methoden

### 2.11.1 Lösungen

Acetat-Lösung:	0,5% Natriumacetat, vor Gebrauch zu filtrieren
Alzian-Blau:	10g/l in 3% Essigsäure, pH 2,5
BrdU-Lösung:	10 mg/ml 5-Bromo-2'-DeoxyUridin (BrdU) in 0,9% NaCl/0,007N NaOH in ddH <sub>2</sub> O, die Lösung ist bei -20°C zu lagern und vor Gebrauch stark zu schütteln
DAPI:	0,5 mg/l in PBS, zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern
Färbelösung (X-Gal):	5mM Kalium-Ferrocyanid; 5 mM Kalium-Ferricyanid; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,01% NaDeoxycholat; 0,02% NP-40; 1mg/ml X-Gal
Fixierungslösung (X-Gal):	1% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM EGTA; 0,02% NP-40 in PBS, frisch vor Gebrauch anzusetzen
X-Gal:	2% in Dimethylformamid
Picro-Sirius Rot Färbung:	0.5g Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) in 500 ml gesättigter Pikrinsäurelösung

### 2.11.2 Paraffinschnitte

Dehydrierte Embryonen oder Gewebestücke wurden erst schrittweise bei RT in Isopropanol (50% MeOH/EtOH, EtOH, 50% EtOH/Isopropanol, je 1h, Isopropanol, ü.N.), dann bei 65°C in Paraffin überführt (Isopropanol, 25%, 50%, 75% Paraffin/Isopropanol, je 2h und 2x 100% Paraffin, 2h, ü.N.), in eine Einbettungsform überführt und ausgehärtet. Die Lagerung von Paraffinblöcken erfolgte eingewickelt in Frischhaltefolie bei 4°C. Angefertigte Paraffinschnitte (5 und 10µm, Mikrotom RM2155, Leica) wurden auf beschichtete Objektträger (SuperfrostPlus, Menzel) aufgezogen und ü.N. bei 42°C getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zur Durchführung der Experimente bei RT.

### 2.11.3 Kryoschnitte

Chemisch fixierte Embryonen und Gewebe wurden schrittweise in 30% Saccharose/PBS überführt (10%, 20%, je 2-3h, 30% ü.N.), in Einbettformen transferiert, in Gefriermedium inkubiert (Tissue freezing medium, Jung, 30 min) und mit durch flüssigen Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan eingefroren. Die Lagerung der Blöcke erfolgte bei -80°C.

Angefertigte Gefrierschnitte (5 und 10µm, Jung CM 3000, Leica) wurden auf beschichtete Objektträger (SuperfrostPlus, Menzel) aufgezogen und ü.N. bei RT getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zur Durchführung der Experimente bei -20°C.

#### **2.11.4 Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen**

Nach der Rehydrierung von Gewebeschnitten war ein Austrocknen der Gewebe zu vermeiden. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Waschschritte in Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Bei Schritten, die unter Einsatz eines möglichst geringen Volumens durchgeführt werden mussten, wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift (ImmEdgePen, VectorLabs) voneinander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgte in kleinen Kunststoff- Inkubationskammern. Sofern nicht anders gekennzeichnet fanden alle Schritte bei RT statt.

#### **2.11.5 Hämatoxilin-Eosin-Färbung**

Für diese Färbung wurden wahlweise PFA-fixierte (siehe Abschnitt: 2.10.2.3) oder Bouins-fixierte (siehe Abschnitt 2.10.2.4) Embryonen/Gewebe verwendet.

Die Paraffinschnitte wurden in Roti-Histol deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min), in Ethanol/H<sub>2</sub>O rehydriert (2x 100%, je 5min, 95%, 90%, 70%, je 2 min, 2x H<sub>2</sub>O, 5 min), in H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Hämatoxilin gefärbt (45 sec). Nach dem Waschen in H<sub>2</sub>O unter kontinuierlichem Wasseraustausch, einer Inkubation in Natriumacetat-Lösung (0,5%, 1min) und erneutem Waschen (2x H<sub>2</sub>O, je 1 min) schloss sich die Eosin-Färbung an (1% alkalische Eosin-Lösung, 1 min). Die Schnitte wurden dann unter kontinuierlichem Wasseraustausch gewaschen, dehydriert (100% Ethanol, 2x je 2 min), in Roti-Histol geklärt (2x, je 10 min) und mit Permout eingedeckt.

#### **2.11.6 Alzian-Blau-Färbung**

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte PFA-fixierter Gewebe/Embryonen verwendet.

Die Schnitte wurden deparaffiniert und rehydriert (siehe 2.11.5), in Alzian-Blau-Lösung gefärbt (10 g/L in 3% Essigsäure, pH 2,5, 30 min) und unter kontinuierlichem Wasseraustausch gewaschen. Nach einer Gegenfärbung mit Nuclear-Fast-Red (Sigma, 5 min) oder Eosin (siehe 2.11.5) wurden die Schnitte in Ethanol/H<sub>2</sub>O dehydriert (95%, 100%, 100%, je 3 min), in Rotihistol geklärt und mit Permout eingedeckt.

### **2.11.7 Sirius-Rot Färbung**

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte PFA-fixierter Gewebe/Embryonen verwendet.

Die Schnitte wurden deparaffiniert, rehydriert (siehe Abschnitt 2.11.5), in Picro-Sirius Rot Färbelösung inkubiert (1h), mit 0,05% Essigsäure gewaschen (2x 5 min), über eine Ethanolreihe dehydriert, in RotiHistol geklärt und mit Permount eingebettet.

### **2.11.8 $\beta$ -Galaktosidase-Färbung auf Gefrierschnitten**

Frisch isolierte Embryonen oder Gewebe wurden mit Fixierlösung (X-Gal) inkubiert (2-3h, 4°C) in und in PBS gewaschen (3x20min, 4°C) und gefriereschnitten (10µm). Die Schnitte wurden fixiert (0,2% Glutaraldehyd in kaltem PBS, 4°C, 10min), in Waschpuffer (X-Gal) gewaschen (3x5min, RT) und mit lacZ-Färbelösung unter Lichtausschluß inkubiert (37°C) und bei ausreichend starkem Signal durch das Überführen in PBS gestoppt. Nach einer Postfixierung in PFA (4%, 1h, RT) und anschließendem Waschen in PBS (2x 5 min) wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

### **2.11.9 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay**

Der Nachweis apoptotischer Zellen auf 5 µm Paraffinschnitten erfolgt unter Verwendung des ApopTag Plus Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits (Chemicon International). Die gefärbten Schnitte wurden in Mowiol mit Zusatz von DAPI (0,5µg/ml) eingedeckt.

### **2.11.10 BrdU–Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten**

Schwangeren Mäusen wurden 100 µl BrdU-Lösung pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Mäuse getötet, die Embryonen entnommen, fixiert und in Methanol überführt (vgl. 2.10.2.3). Die immunhistochemische BrdU-Detektion mit Zellkerngegenfärbung (DAPI) erfolgte auf 5µm Paraffinschnitten wie unter 2.11.12 beschrieben. Der BrdU- Markierungsindex ergab sich aus dem Verhältnis aller BrdU-positiven Zellkerne zur Gesamtzellkernzahl in einer definierten Fläche.

### **2.11.11 Elektronenmikroskopische Analyse der Innenohren adulter Tiere**

Gewebeaufbereitung, Anfertigung von Ultradünnschnitten und elektronenmikroskopische Dokumentation wurden in Kollaboration mit Frau Dr. Michaela Schweizer (Zentrum für

Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Universität Hamburg) durchgeführt. Für die Erstellung von Ultradünnschnitten wurden isolierte Cochlea durch das runde Fenster mit 3% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer perfundiert und ü.N. fixiert, dekalzifiziert (10%EDTA, pH7.3, 4°C, 3d), halbiert, postfixiert (2% Osmiumtetroxid, 30min), dehydriert, in Epon eingebettet und geschnitten (60nm). Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop analysiert.

#### **2.11.12 Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffin- und Gefrierschnitten**

Für immunhistochemische Färbungen auf 5µm Paraffin- und Gefrierschnitten wurden Vectastain Unmasking solution, Vectastain ABC kit (Kaninchen IgG) bzw. Vectastain Mouse-on-Mouse-IgG-Kit und das DAB Substrat Kit für Peroxidasen (VectorLabs) verwendet. Die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4) erfolgte i.d.R. bei 4°C ü.N..

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 5µm Paraffinschnitte deparaffiniert und rehydriert (siehe 2.11.5). Gefrierschnitte wurden in PBS rehydriert (2x10min). Epitopdemaskierung erfolgte unter Verwendung von Vectastain Unmasking Solution (100°C, 15 min) oder 2mM EDTA in 10mM Tris-HCl, pH 9 (1h, 80°C). Nach dem Waschen in PBST (2x 5 min) folgte der Block unspezifischer Proteinbindungen durch Inkubation mit geeignetem Normalserum (30min, RT, 2,5% in PBST) und die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4, 4°C, ü.N.). Nach dem Waschen mit PBST folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1h, RT), Waschen in PBST und das Eindecken in Mowiol (mit DAPI Zusatz, 0,5µg/ml). Für die Dokumentation durch konfokale Mikroskopie wurden AlexaFluor-konjugierte sekundäre Antikörper und ProLong Gold Einbettmedium (Invitrogen) verwendet.

#### **2.11.13 RNA *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

Das verwendete Protokoll ist abgeleitet aus Moorman *et al.*, 2001.

Alle Waschschritte wurden in sterilisierten Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Vor der Hybridisierungsreaktion wurden nur DEPC-behandelte Waschlösungen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Waschschritte bei RT durchgeführt. Bei Arbeitsschritten wie Prä- und Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift voneinander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden während dieser Inkubationsphasen in

flachen Kunststoff-Inkubationskammern aufbewahrt, die wiederum in größeren Inkubationskammern gelegt wurden. Um Verdunstungsvorgänge und damit verbundene Konzentrationsschwankungen zu verhindern, wurden mit den entsprechenden Puffer- oder Wasch-Lösungen befeuchtete Papiertücher in diese Kammern gelegt und die Kunststoffkammern während der Hybridisierung zusätzlich mit Frischhaltefolie eingeschlagen.

10µm Paraffinschnitte wurden in Rotihistol deparaffiniert (2x, je 10 min), in Ethanol gewaschen (50%Roti-Histol/Ethanol, 2 min, 2x 100%, 2 min), in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O: 95%, 90%, 70%, 50%, je 1min), anschließend in PBS gewaschen (2x je 5min), in Proteinase K-Lösung (10 µg/ml in 0,1M TRIS.HCl, pH7,5 für 10 min bei 37°C) und Glycin/PBS (0,2%, 10 min, RT) inkubiert, in PBS gewaschen (2x je 5min) und in PFA/Glutaraldehyd-Lösung postfixiert (4%-PFA, 0,2% Glutaraldehyd, in PBS, 20 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector) ein Kreis um die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger gezogen und die Objektträger bis zur Prähybridisierung in PBS aufbewahrt. Nach der Prähybridisierung (15µl Prähybridisierungspuffer pro Schnitt, 1h, 70°C) und Hybridisierung (10µl Hybridisierungspuffer pro Schnitt, ü.N., 70°C) wurden die Schnitte kurz in 2xSSC eingetaucht (65°C), mit 50% Formamide/ 2x SSC (2x 25min, 65°C) und PBS-T (3x 5 min) gewaschen und nach einer Vorinkubation mit Block-Lösung (30µl pro Schnitt, 30min) mit dem alkalische-Phosphatase-konjugiertem anti-DIG-Antikörper inkubiert (20µl, 1:5000 in Block-Lösung, 2h, RT). Die Schnitte wurden anschließend in PBST gewaschen (3x 5min) und durch das Waschen in NTMT in den alkalischen pH-Bereich überführt (2x 5 min, RT). Die Inkubation mit der Färbelösung BM-Purple (40 µl pro Schnitt, RT) fand unter Lichtausschluss statt und wurde bei ausreichend starkem Signal durch das Überführen in PBS gestoppt. Nach einer Postfixierung in PFA (4%, 1h, RT) und anschließendem Waschen in PBS (2x 5 min) wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

#### **2.11.14 Dokumentation**

Schnittpräparate wurden mit einem Axioplan (Zeiss) oder DM5000 (Leica) Stereomikroskop dokumentiert. Für die konfokale Mikroskopie wurde das MikroskopTCS SP2 (Leica) verwendet. Für die Dokumentation von Gesamtembryonen, isolierten Innenohren und Übersichtsbildern von Schnittpräparaten wurde das Mikroskop Leica M420 mit FUJI

Digitalkamera HC3002 verwendet. Eine Nachbearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit Photoshop CS.

#### **2.11.15 Dreidimensionale Geweberekonstruktion**

Die 3D-Geweberekonstruktion wurde mit der Software Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems) unter Verwendung von Alzian Blau/Eosin gefärbten Paraffinschnittserien (10 $\mu$ m) durchgeführt.

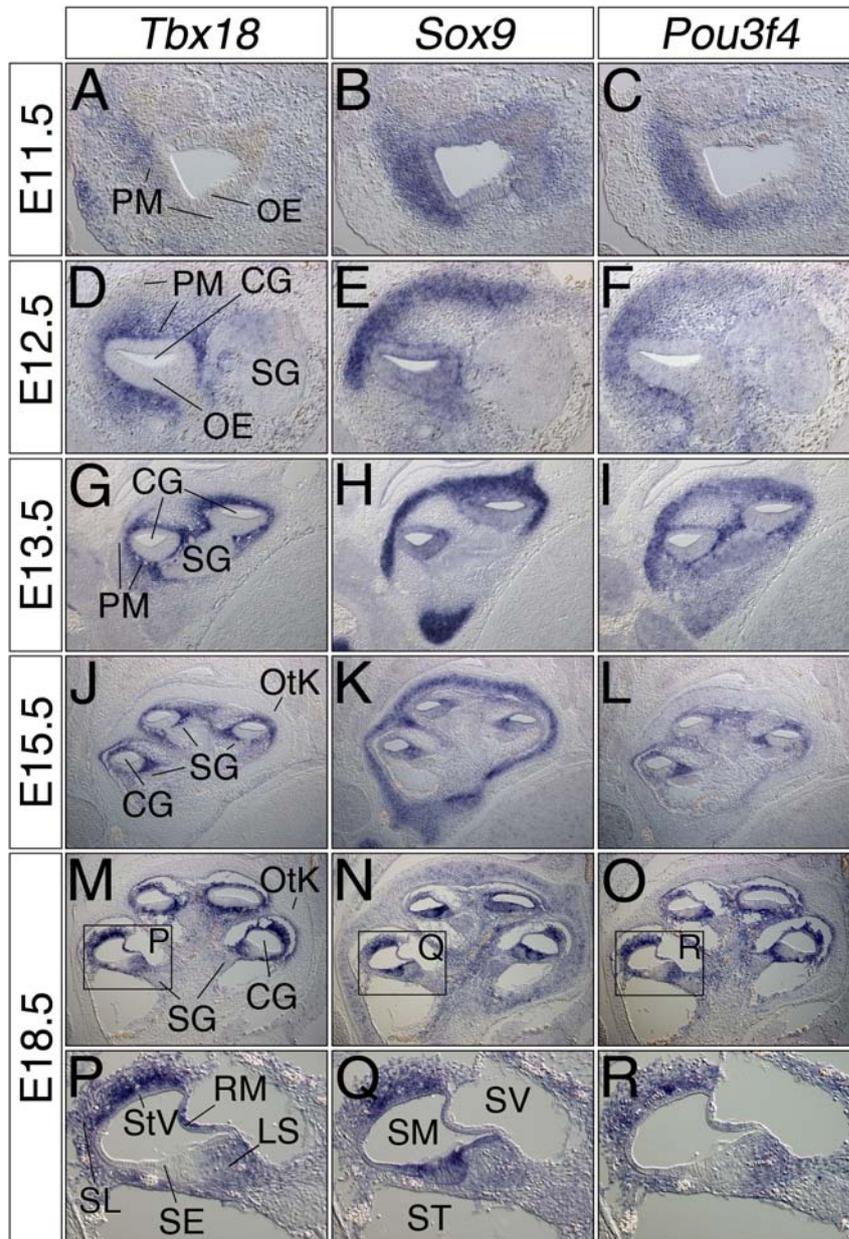
## 3. Experimente und Ergebnisse

### 3.1 Funktion von *Tbx18* während der Entwicklung des Innenohrs

#### 3.1.1 *Tbx18* wird in den Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten exprimiert

Eine RNA in situ Hybridisierungs-Expressionsanalyse aller bekannten Maus T-Box Gene für frühe Stadien der Innenohrentwicklung identifizierte *Tbx18* als einen Kandidaten mit potentieller Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms der Maus. Um die räumliche und zeitliche Expressionsverteilung von *Tbx18* im Detail zu analysieren, wurden Gewebeschnitte des Innenohrs verschiedener Stadien verwendet. Da *Tbx18* eine lokal begrenzte Expression im periotischen Mesenchym aufwies, wurden zur besseren Charakterisierung der Expressionsdomäne vergleichend *Sox9*, ein früher chondrogener Marker (Lefebvre und Crombrughe, 1998), und *Pou3f4* (Phippard *et al.*, 1998), ein Gen, das im gesamten periotischen Mesenchym exprimiert ist, auf benachbarten Schnitten analysiert.

*Tbx18* wurde ab E10.5 schwach im ventromedialen periotischen Mesenchym exprimiert (Abb. 6A) und überlappte mit den Domänen der stärker exprimierten Gene *Sox9* und *Pou3f4* (Abb. 6B,C). Im Gegensatz zu *Sox9* war *Tbx18* zu diesem Zeitpunkt nicht im lateralen periotischen Mesenchym exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ab E12.5 begannen die vormals überlappenden Expressionsdomänen von *Sox9* und *Tbx18* sich gegenseitig auszuschließen, wobei *Tbx18* Expression auf den inneren Bereich des periotischen Mesenchyms (Abb. 6D,G) und *Sox9* auf den äußeren Bereich beschränkt war (Abb. 6E,H), der ab E13.5 zu Knorpelgewebe differenziert. *Pou3f4* Expression markierte während beider Stadien das gesamte periotischen Mesenchym (Abb. 6C,F). Von E15.5 bis E18.5 war *Tbx18* in den Vorläuferzellender der otischen Fibrozyten von Spiralligament und Spirallimbus und stark in den kondensierenden Zellen der sich entwickelnden *Stria vascularis* exprimiert (Abb. 6J,M,P). Die Expression von *Sox9* in der verknöchernden otischen Kapsel nahm nach E15.5 ab, während die kondensierenden Zellen der *Stria vascularis* erneut *Sox9* exprimierten (Abb. 6K,N,Q). *Pou3f4* Expression war ab E15.5 auf die Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten beschränkt und damit mit *Tbx18* koexprimiert (Abb. 6L,O,R).



**Abb. 6: Die lokal begrenzte Expression von *Tbx18* belegt eine frühe Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms.** (A-R) Vergleichende Analyse der Expression von *Tbx18*, *Sox9* und *Pou3f4* während der Cochleaentwicklung auf benachbarten Sagittalschnitten von Wildtypembryonen. Verwendete Stadien sind in der Abbildung angegeben (A,D,G,J,M,P) *Tbx18* Expression ist zu allen Entwicklungsstadien auf die innere Zone des periotischen Mesenchyms bzw. die daraus abgeleiteten Vorläufer der otischen Fibrozyten beschränkt. (B,E,H,K,N,Q) Die mesenchymale Expression von *Sox9* ist auf Bereiche starker Zellkondensation wie das frühe periotische Mesenchym, die zukünftige otische Kapsel, den Spirallimbus und das kondensierende Mesenchym unterhalb der *Stria vascularis* beschränkt. (C,F,I,L,O,R) *Pou3f4* wird initial im gesamten periotischen Mesenchym, nach E13,5 in den zukünftigen otischen Fibrozyten exprimiert. CG, cochleärer Gang; LS, *Limbus spiralis*; OE, otisches Epithel; OtK, otische Kapsel; PM, periotisches Mesenchym; RM, Reissner-Membran; SE, (pro-) sensorisches Epithel; SG, Spiralganglion; SL, Spiralligament; SM, *Scala media*; ST, *Scala tympani*; StV, *Stria vascularis*; SV, *Scala vestibuli*

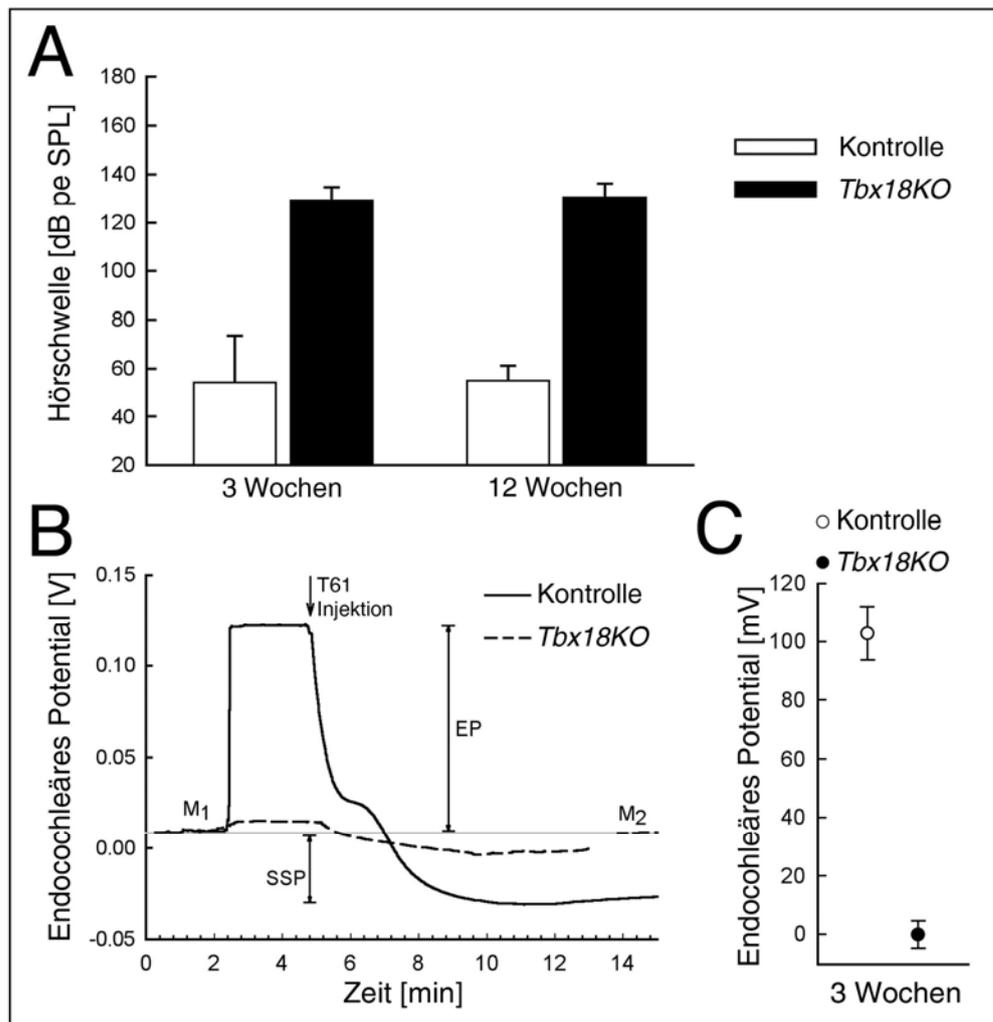
### 3.1.2 Der Verlust von *Tbx18* führt zu Taubheit durch den Verlust des EP

*Tbx18*-mutante Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund eines starken Wirbelsäulenphänotyps, der eine Inflation der Lunge verhindert. Dieser Phänotyp konnte auf eine Funktion von *Tbx18* in der Polarisierung der Somiten zurückgeführt werden (Bussen *et al.*, 2004). Um die Bedeutung der Expression von *Tbx18* im otischen Mesenchym für die Physiologie des Hörens zu untersuchen, wurde die perinatale Sterblichkeit der *Tbx18* Mutanten überwunden. Hierzu wurde die transgene *msd::Tbx18* Mauslinie, in der *Tbx18* unter Kontrolle des *msd*-Promotors im presomitischen und somitischen Mesoderm aber nicht im Innenohr exprimiert wird (Bussen *et al.*, 2004, Daten nicht gezeigt), in den *Tbx18*-mutanten Hintergrund eingekreuzt, und Tiere des Genotyps *Tbx18<sup>-/-</sup>, msd::Tbx18/msd::Tbx18* (*Tbx18KO*) generiert. Diese Mäuse wurden in einem normalen Mendelschen Verhältnis geboren und zeigten einen abgeschwächten Wirbelsäulenphänotyp, waren aber in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und deutlich kleiner als Geschwistertiere. Die Lebensdauer wurde durch den Nierenphänotyp der *Tbx18*-Mutante auf 3 bis 4 Monate begrenzt.

Eine offensichtliche Störung des Gleichgewichtssinns konnte in *Tbx18KO* Mäusen nicht beobachtet werden, allerdings zeigten die Tiere kein Zucken der Ohrmuscheln als Reaktion auf laute Geräusche (Preyer Reflex). Aus diesem Grund wurde eine Bestimmung des Hörvermögens durch Hirnstammaudiometrie, also das Messen akustisch im Hirnstamm evozierter Potentiale, an Mäusen drei und zwölf Wochen nach der Geburt durchgeführt. Als Schallsignale wurden breitbandige Klicks mit einer Maximalfrequenz von 5.5kHz verwendet. *Tbx18* Mutanten zeigten zu beiden Zeitpunkten eine Hörschwelle von 130dB und lagen damit um mehr als 75 dB über der Hörschwelle der Kontrolltiere (Abb. 7A).

Da die Erregbarkeit der Haarzellen von der Größe des endocochleären Potentials (EP) abhängt (Wangemann, 2002), kam eine Beeinträchtigung des EP als Ursache für den Anstieg der Hörschwelle in Frage. Die Bestimmung des EPs zeigte einen vollständigen Verlust des endocochleären Potentials (Abb. 7B,C).

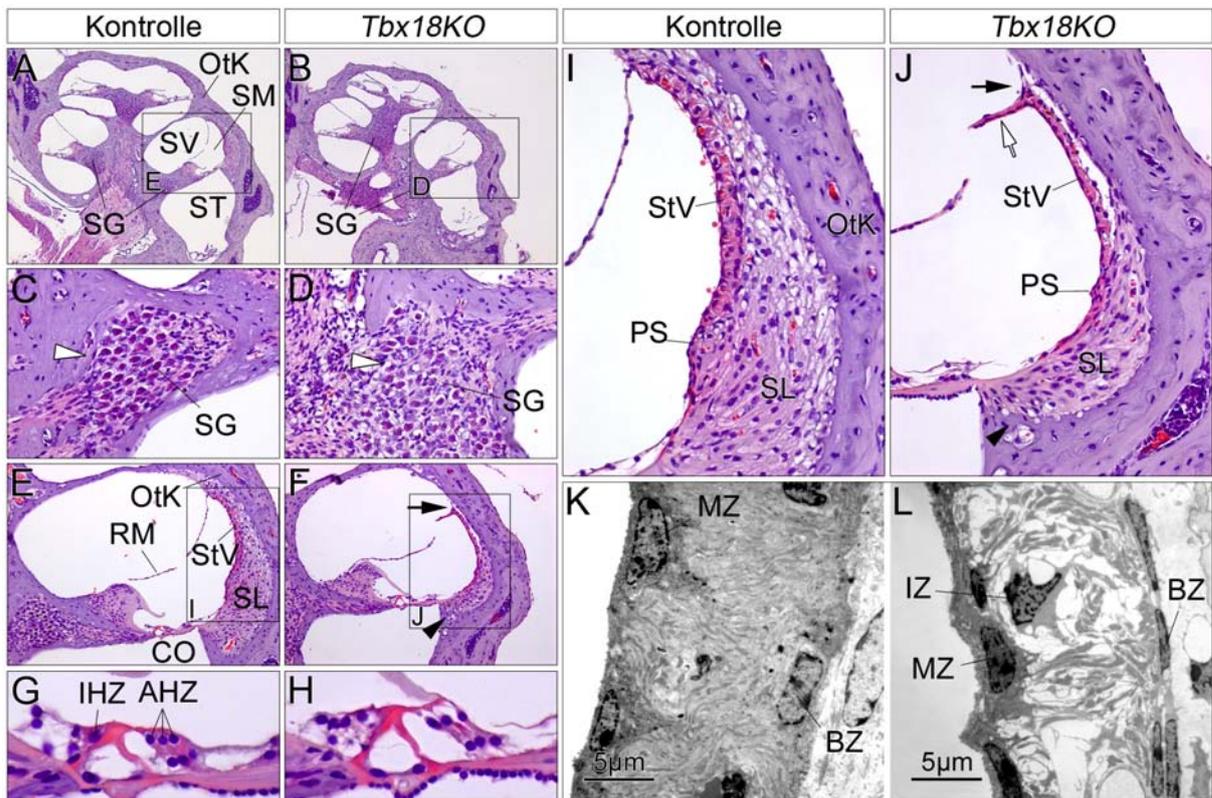
Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Tbx18* im otischen Mesenchym zu einer Störung der otischen Physiologie und einer starken Beeinträchtigung der Hörfunktion führt.



**Abb. 7: Verlust von *Tbx18* verursacht Taubheit.** (A-C) Untersuchung der Hörphysiologie von *Tbx18KO* Mäusen durch Audiometrie (A) und Messung des Endocochleären Potentials (B,C). (A) Die Hörschwelle von *Tbx18KO* Mäusen ist bei 3 und 12 Wochen nach der Geburt signifikant erhöht (3 Wochen: 54.2±19.2 dB pe SPL (Kontrolle) vs. 129.3±5.3 dB pe SPL (*Tbx18KO*), n=15; 12 Wochen: 54.9±6.4 dB pe SPL (Kontrolle) vs. 130.5±5.8 dB pe SPL (*Tbx18KO*), n=8). (B) Exemplarische Darstellung einer EP Messung einer *Tbx18KO* Maus (gestrichelte Linie) und eines Kontrolltieres (durchgezogene Linie) 3 Wochen nach der Geburt. Nach der Registrierung des Gleichstromreferenzpotentials im Flüssigkeitsmeniskus oberhalb der *Stria vascularis* (M1) wurde die aufzeichnende Elektrode vorwärts bewegt. Nach dem Durchdringen der *Stria vascularis* (P) wurde das EP in der *Scala media* für min. zwei Minuten gemessen, bevor die Maus durch die Injektion des Kombinationspräparates T61® getötet wurde. Innerhalb weniger Minuten verringerte sich das EP zu einem negativen Gleichgewichtspotentials (Steady-State-potential, SSP) mit einem Minimum bei 8-12 Minuten nach der Injektion. Zur Erkennung einer möglichen Nulllinienverschiebung wurde eine erneute Messung des Referenzpotentials nach der Aufzeichnung des EPs (M2) durchgeführt. (C) 3 Wochen alte *Tbx18KO* Mäuse zeigen einen Zusammenbruch des EPs und des SSPs (Kontrolle: EP=102.9±9.1 mV, SSP=-26.4±9.9 mV; *Tbx18KO*: EP=1.3±3.1 mV, SSP=-3.8±3.9 mV, n=10, P<0,001, Mann-Whitney Rangsummentest). Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung verwendet.

### 3.1.3 *Tbx18* Mutanten zeigen eine Hypoplasie der seitlichen Wand der Cochlea

Die Physiologie des Hörens beruht auf der hoch organisierten funktionellen Architektur der Cochlea und einem komplexen Zusammenspiel einer großen Anzahl differenzierter Zelltypen. Um zu untersuchen, ob die Beeinträchtigung der Hörphysiologie in der Mutante eine strukturelle Veränderung der Cochlea zu Grunde liegt, wurde eine histologische Analyse adulter Cochleae durchgeführt.



**Abb. 8: Histologische und ultrastrukturelle Defekte in der Cochlea von *Tbx18KO*-Mäusen.**

Hämatoxylin-Eosin Färbung (A-J) von midmodiularen Schnitten der Cochlea und ultrastrukturelle Analyse der *Stria vascularis* (K,L) von Kontrolltieren und *Tbx18KO* Mäusen bei P21. Vergrößerte Abschnitte sind durch Rahmen gekennzeichnet. (A,B) Die Cochlea der Mutante besitzt eine grundlegend normalen Aufbau ist aber in der Größe reduziert. (C,D) Das Spiralganglion ist in *Tbx18KO* Mäusen unvollständig vom Knochengewebe des Modiolus umgeben (weiße Pfeilspitzen). (E,F) Die seitliche Wand der mutanten Cochlea ist hypoplastisch. Pfeile und Pfeilspitzen in F deuten auf Verlust der Suprastrialen bzw. Typ IV Fibrozyten. (G,H) Das Cortische Organ der *Tbx18KO* Maus weist keine Veränderungen auf. (I,J) Die Seitliche Wand der Cochlea weist in der Mutante Defekte in *Stria vascularis* und otischen Fibrozyten auf. Der weiße Pfeil in J deutet auf eine Ausweitung der Marginalzellen in die Reissner-Membran. (K,L) Die *Stria vascularis* der Mutante weist in der basalen Windung große Hohlräume zwischen den zytoplasmatischen Fortsätzen der strialen Zellen auf. AHZ, äußere Haarzellen; BZ, Basalzellen; CO, Cortisches Organ; IHZ, innere Haarzellen; IZ, Intermedialzellen; LS, *Limbus spiralis*; MZ, Marginalzellen; OtK, otische Kapsel; PS, *Prominentia spiralis*; RM, Reissner-Membran; SG, Spiralganglion; SL, Spiralligament; SM, *Scala media*; ST, *Scala tympani*; StV, *Stria vascularis*; SV, *Scala vestibuli*.

Die histologische Analyse von drei Wochen alten *Tbx18*-Mutanten zeigten bis auf eine geringe Reduktion der Gesamtgröße keine grundlegenden Veränderungen in der Morphologie

der Cochlea (Abb. 8B), allerdings konnten deutliche Veränderungen im Feinaufbau detektiert werden. Das Spiralganglion war nicht vollständig vom Knochengewebe des Modiolus umgeben (Abb. 8D). Die seitliche Wand mit *Stria vascularis* und die otischen Fibrozyten waren stark hypoplastisch (Abb. 8F). Suprastriale Fibrozyten fehlten und Typ IV Fibrozyten lateral der Basilmembran waren teilweise durch Gewebe der Knochenkapsel ersetzt (Pfeil bzw. Pfeilspitze in Abb. 8F,J). Die Zahl der unterhalb der *Stria vascularis* liegenden Zellen war stark verringert und die *Prominentia spiralis* mit einer gewissen Variabilität in der Größe reduziert, was auf Defekte in der Differenzierung der Fibrozyten Subtypen I und II hindeutet (Abb. 8J). Die *Stria vascularis* war nicht ausdifferenziert und in der Größe variabel reduziert und setzte sich in Form eines dünnen Plattenepithels bis in den Bereich der Reissnermembran fort (weiße Pfeilspitze in Abb. 8J).

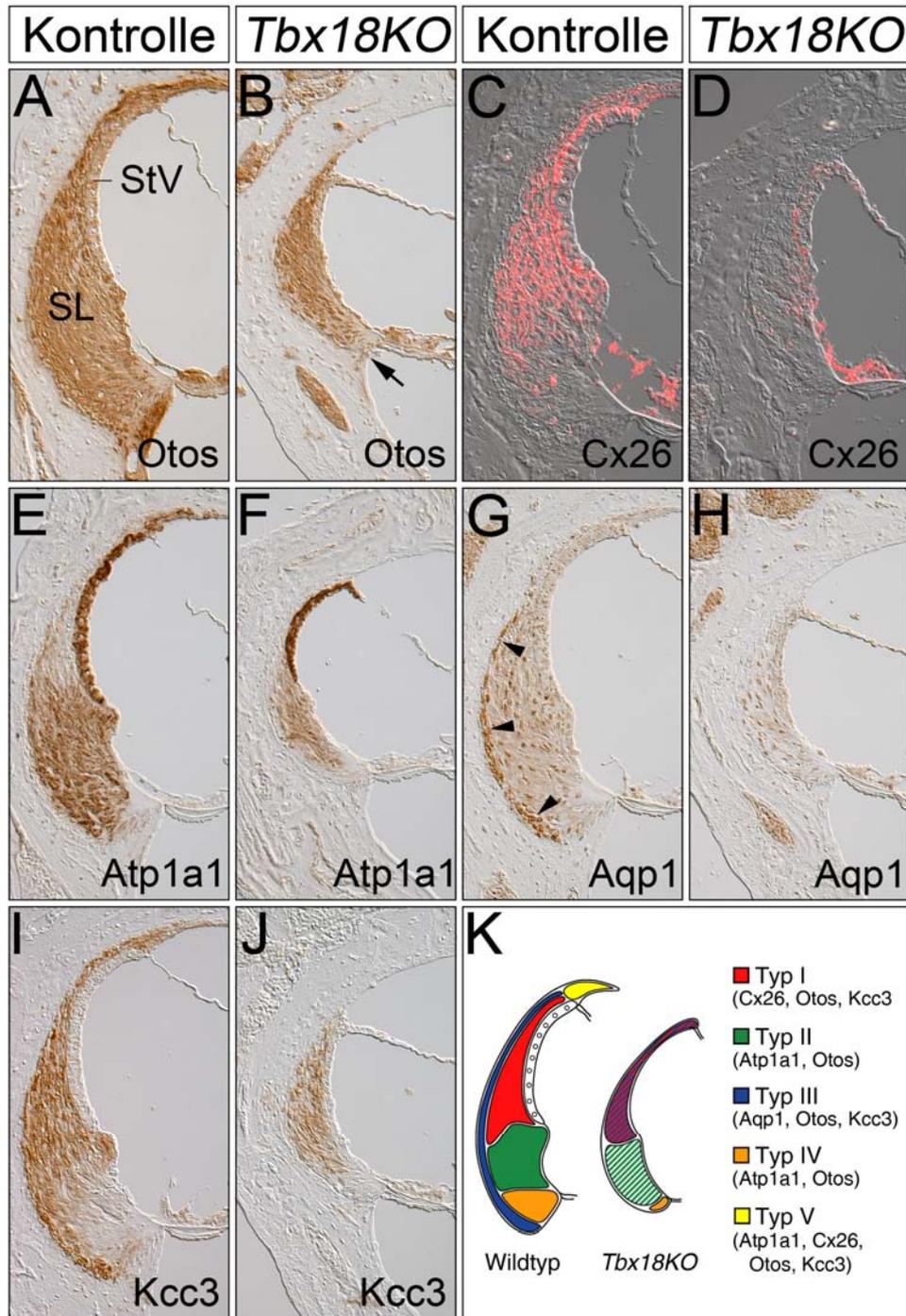
Eine Ultrastrukturanalyse der *Stria vascularis* bei drei Wochen alten *Tbx18* Mutanten bestätigte die Präsenz von Marginal-, Intermedial und Basalzellen, zeigte aber eine drastische Verringerung der normalerweise dicht gepackten Membranstapel und Zellprojektionen (Abb. 8L). Veränderungen im Cortischen Organ konnten zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden (Abb. 8H).

Insgesamt verstärkten sich die Veränderungen graduell in basaler Richtung und nahmen mit der Zeit weiter zu. So wurde die *Stria vascularis* in 12 Wochen alten Tieren nur von einem dünnen Plattenepithel gebildet. Intermedial- und Basalzellen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr histologisch identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Tbx18* zu schwerwiegenden Fehlbildungen im zellulären Aufbau von *Stria vascularis* und Fibrozyten des Spiralligaments führt.

#### **3.1.4 *Tbx18* Mutanten weisen eine Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten auf**

Die Expression von *Tbx18* in den Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten, der Verlust des EPs und die die histologischen Veränderungen in der seitlichen Wand der *Tbx18*-Mutante deuteten auf eine Funktion von *Tbx18* in der Differenzierung der otischen Fibrozyten hin. Um diese Hypothese genauer zu überprüfen, wurde die Verteilung von Fibrozytendifferenzierungsmarkern, die in Kombination die Identifikation von Fibrozytensubtypen ermöglichen, in drei Wochen alten Mutanten immunhistochemisch analysiert.



**Abb. 9: *Tbx18KO*-Mäuse weisen eine gestörte Fibrozytendifferenzierung auf.** (A-J) Detektion von Fibrozyten-Markern durch Immunhistochemie (A,B,E-J) und Immunfluoreszenz (C,D) auf midmodiularen Schnitten der Cochlea von Kontrolltieren und *Tbx18KO* Mäusen bei P21. Die Abbildungen zeigen die seitliche Wand in der basalen Windung. Die verwendeten Antikörper sind in der Abbildung angegeben. Der Pfeil in B markiert den Verlust der starken Otos Expression im Bereich der Typ IV Fibrozyten. (C,D) Überlagerung von Immunfluoreszenz und Durchlichtmikroskopie (DIC-Optik), Pfeilspitzen in G deuten auf Expression in Typ III Fibrozyten. (K) Schematische Zusammenfassung der Expressionsdomänen und Verteilung verschiedener Fibrozytenpopulationen im Wildtyp und in *Tbx18KO* Mäusen. SL, Spiralligament; StV, Stria vascularis

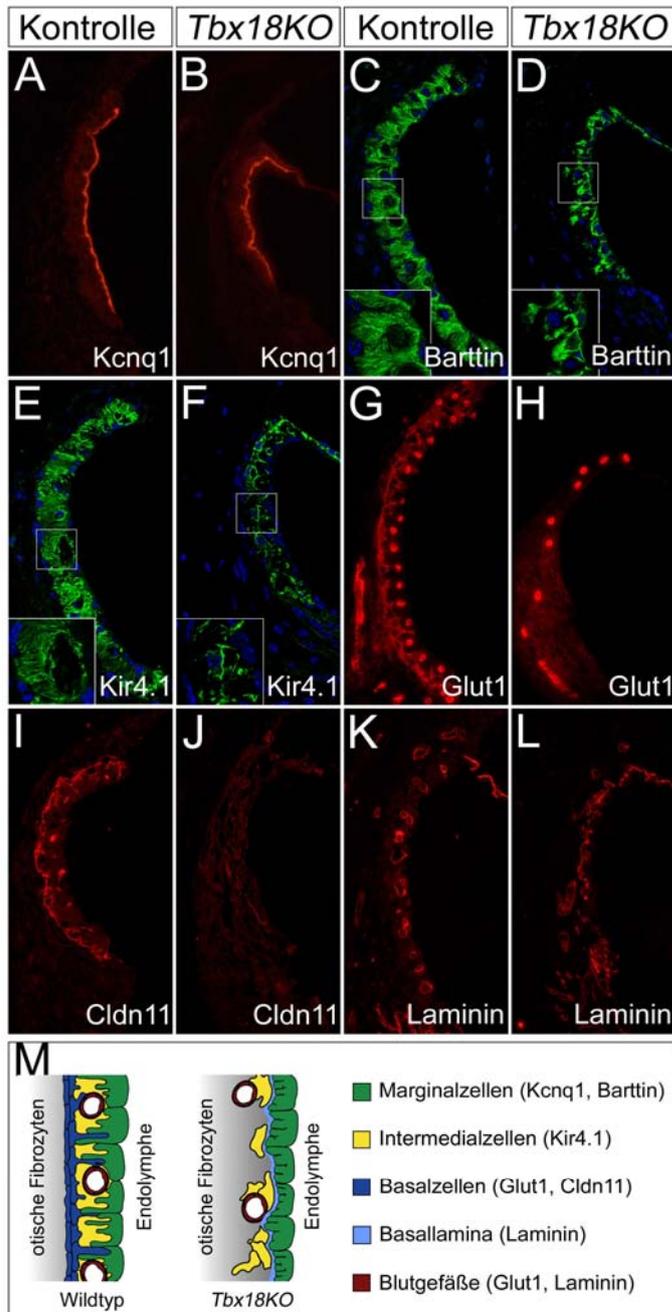
Otospiralin (Otos), ein Protein der extrazellulären Matrix mit unbekannter Funktion, wird in allen otischen Fibrozyten exprimiert (Delprat *et al.*, 2005). In *Tbx18KO* Mäusen konnte Otos im gesamten Spiralligament nachgewiesen werden (Abb. 9B), zeigte aber eine reduzierte Expression in der verknöcherten Projektion der otischen Kapsel unterhalb der Basilarmembran (Pfeil). Das Gap junction Protein Connexin 26 (Cx26, auch GJB2) markiert die Fibrozyten des Typs I unterhalb der *Stria vascularis* (Xia *et al.*, 1999) und konnte in den Fibrozyten der Mutante nicht nachgewiesen werden (Abb. 9D). Die Expression von Atp1a1, dem alpha1-Peptid der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, ist auf die Fibrozyten des Typs II, IV und V beschränkt (Xia *et al.*, 1999). In der Mutante erschien die Expressionsdomäne unverändert, aber die Signalintensität war reduziert (Abb. 9F). Aquaporin 1 (Aqp1) Expression, die normalerweise auf die der Knochenkapsel anliegenden Typ III Fibrozyten beschränkt ist (Li und Verkman, 2001), konnte in der Mutante nicht nachgewiesen werden (Abb. 9H). Kcc3 (auch Slc12a6), ein K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Kotransporter, wird in Fibrozyten der Typen I, III und V exprimiert (Boettger *et al.*, 2003). In der Mutante wurde eine homogene und reduzierte Expression im Spiralligament nachgewiesen (Abb. 9J).

Zusammen mit den Ergebnissen der histologischen Analyse zeigt diese Analyse, dass die Differenzierung der otischen Fibrozyten in klar voneinander abgegrenzte Subpopulationen in der *Tbx18*-Mutante gestört ist (Abb. 9K).

### 3.1.5 Der Verlust von *Tbx18* stört die Entwicklung der *Stria vascularis*

Die histologische Analyse der *Tbx18*-Mutante zeigte schwerwiegende Veränderungen in der Architektur der *Stria vascularis*. Um diese Veränderungen besser zu charakterisieren, wurde die Verteilung *Stria vascularis* spezifischer Differenzierungsmarker in drei Wochen alten *Tbx18KO*-Mäusen durch Immunfluoreszenz untersucht.

Der Kaliumkanal Kcnq1 und der Chlorid Kanal Barrtin sind an der apikalen bzw. basolateralen Oberfläche der Marginalzellen lokalisiert (Estevez *et al.*, 2001). Die subzelluläre Lokalisierung beider Proteine war in der Mutante unverändert (Abb. 10B,D), was auf die eine ungestörte Differenzierung von Marginalzellen mit etablierter apikobasaler Polarität hindeutet. Die stark reduzierte Barrtin positive Fläche deutete jedoch auf eine Störung in der Ausbildung der basolateralen Zellprojektionen in die darunterliegenden Zellschichten der *Stria vascularis* hin (Abb. 10D).



**Abb. 10: *Tbx18KO*-Mäuse weisen Fehlbildungen in der *Stria vascularis* auf.** (A-L) Detektion von strialen Proteinen durch Immunfluoreszenz auf midmodiolaren Schnitten der Cochlea von Kontrolltieren und *Tbx18KO*-Mäusen bei P21. Die Abbildungen zeigen die *Stria vascularis* in der basalen Windung. Die verwendeten Antikörper gegen Proteine der Marginal-, Intermedial- und Basalzellen sowie der Basallamina sind in der Abbildung angegeben. (C-F) Immunfluoreszenz auf DAPI gegengefärbten Schnitten detektiert mit konfokaler Mikroskopie. Die Vergrößerung der durch Rechtecke hervorgehobenen Bereiche der *Stria* zeigt eine gestörte Ausbildung der zytoplasmatischen Fortsätze von Marginal- (C,D) und Intermedialzellen (E,F). (M) Schematische Zusammenfassung der Expressionsdomänen und des Aufbaus der *Stria vascularis* von Wildtyp- und *Tbx18KO*-Mäusen.

Die Expression von Kir4.1 (auch Kcnj10), einem Kaliumkanal der Intermedialzellen (Ando und Takeuchi, 1999), war in der Mutante stark reduziert und Zellfortsätze konnten nicht

identifiziert werden (Abb. 10F), was eine Differenzierungsstörung der Intermedialzellen bestätigt. Glut1 (auch Slc2a1) wird stark in den Endothel- und Basalzellen der *Stria vascularis* exprimiert (Ito *et al.*, 1993). In der Mutante konnten nur Glut1 positive Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 10H). Zusammen mit dem Verlust des Basalzellspezifischen 'tight junction'-Proteins Cldn11 (Gow *et al.*, 2004; Kitajiri *et al.*, 2004, Abb. 10J) belegt dies eine drastische Reduktion der Basalzellschicht in der *Tbx18* Mutante. Voraussetzung für die Ausbildung und Interkalation zytoplasmatischer Zellfortsätze von strialen Zellen ist die kontrollierte Degradation der Basallamina im Bereich der epithelialen Marginalzellen zum Zeitpunkt der Geburt (Kikuchi und Hilding, 1966; Sagara *et al.*, 1995). Durch die Detektion von Laminin konnte in der Mutante unterhalb der Marginalzellen eine Basallamina nachgewiesen werden (Abb. 10L), was eine mögliche Ursache des gestörten Auswachsens zytoplasmatischer Projektionen darstellt.

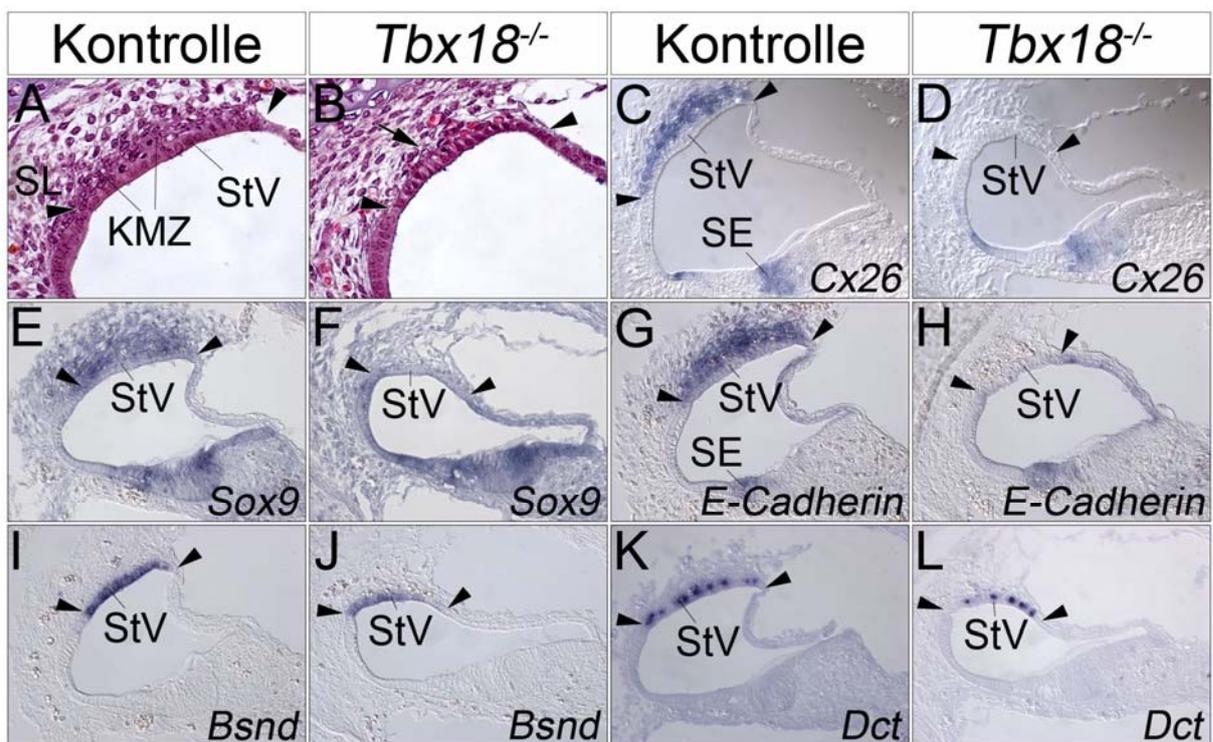
Insgesamt belegen die Ergebnisse eine stark veränderte zelluläre Architektur der *Stria vascularis* von *Tbx18KO*-Mäusen, die sich vor allem in einem fast vollständigen Verlust von Basalzellen und einer starken Verringerung zytoplasmatischer Projektionen von Marginal- und Intermedialzellen äußert (Abb. 10M).

### **3.1.6 Verlust der Kondensation mesenchymaler Zellen während der frühen Entwicklung der *Stria vascularis* in *Tbx18*-Mutanten**

Die aus dem den Verlust von *Tbx18* resultierenden strialen Defekte deuteten auf eine trophische oder zelluläre Beteiligung des periotischen Mesenchyms an der Bildung der *Stria vascularis* hin. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde der Phänotyp von *Tbx18*-Mutanten bei E18,5 analysiert, kurz nach dem Einsetzen der *Stria vascularis* Entwicklung (Kiernan *et al.*, 2002; Kikuchi und Hilding, 1966; Sher, 1971). Die histologische Analyse zu diesem Zeitpunkt zeigte in Kontrolltieren eine Kondensation mesenchymaler Zellen unterhalb der prospektiven Marginalzellen (Abb. 11A), während in der Mutante die Fibrozyten im Bereich der sich entwickelnden *Stria vascularis* weiterhin locker organisiert waren (Pfeil in Abb. 11B). Eine weitergehende molekulare Analyse dieser phänotypischen Veränderung ergab, dass diese mesenchymalen Kondensate in der Wildtypsituation durch die Expression der Gene *Sox9*, *E-Cadherin* und *Cx26* gekennzeichnet werden (Abb. 11C,E,G). Keines dieser Gene konnte in den mesenchymalen Zellen des Spiralligaments der *Tbx18*-Mutante nachgewiesen werden, während epitheliale Genexpression nicht beeinträchtigt war (Abb. 11D,F,H). Die Bestimmung der

Proliferationsrate mesenchymaler Zellen in diesem Abschnitt des Spiralligaments anhand eines BrdU-Inkorporationsassays detektierte keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Die Expressionsanalyse von molekularen Markern für die zukünftigen Marginal- und Intermedialzellen, BSND (Birkenhager *et al.*, 2001) und Dct (Steel *et al.*, 1992) zeigte in der *Tbx18*-Mutante eine unveränderte Expression und bestätigte die Präsenz und ungestörte Differenzierung dieser beiden Zelltypen (Abb. 11J,L). Die Verwendung weiterer epithelialer Differenzierungsmarker für verschiedene Abschnitte des otischen Epithels zeigte keine Veränderung und belegte damit eine korrekte Musterung und Differenzierung der epithelialen Anteile der sich entwickelnden Cochlea (Daten nicht gezeigt).



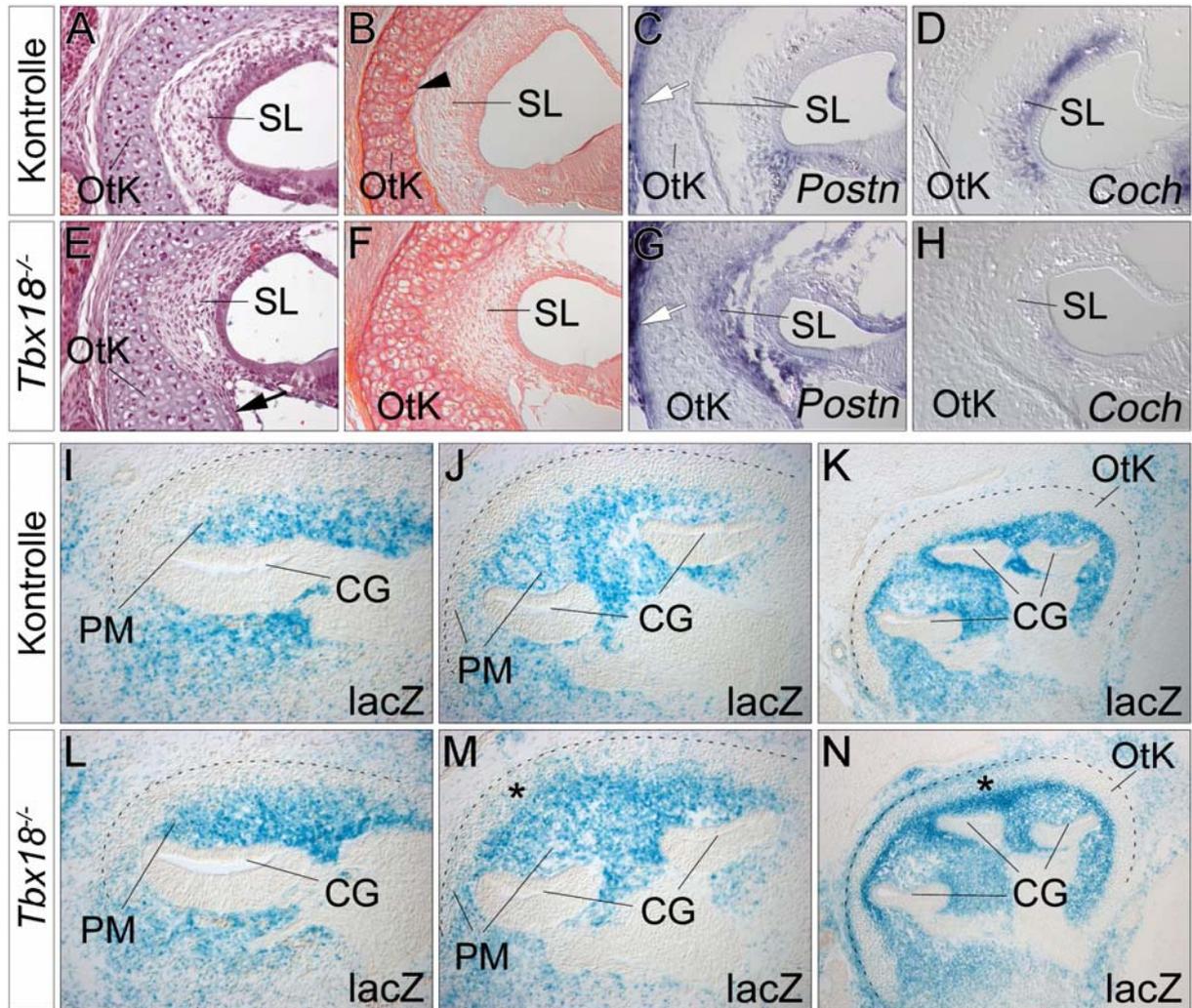
**Abb. 11:** *Tbx18*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen eine gestörte Entwicklung der *Stria vascularis* auf. Analyse der Histologie durch HE-Färbung (A,B) und Markergenexpression durch RNA in situ Hybridisierung (C-L) auf sagittalen Schnitten der Cochlea bei E18,5. Die Abbildungen zeigen die basale Windung (C-L) und den Bereich der *Stria vascularis* (A,B). Die Pfeilspitzen markieren die Grenzen der *Stria vascularis*. Die Mutanten Cochleae zeigen eine normale Differenzierung der Vorläufer von Marginal- und Intermedialzellen, weisen aber den Verlust der mesenchymalen Zellkondensation auf, die der Bildung der *Stria vascularis* vorausgeht (Pfeil in B). Die verwendeten Sonden sind in der Abbildung angegeben. KMZ, kondensierende Zellen des SL; SE, sensorisches Epithel; SL, Spiralligament; StV, *Stria vascularis*

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Tbx18* primär die Differenzierung der mesenchymalen Zellen des Innenohrs beeinträchtigt und deuten darauf hin, dass der Verlust von strialen Basalzellen auf die gestörte Kondensation und Differenzierung mesenchymaler Zellen im Bereich der Marginalzellen zurückzuführen ist.

### 3.1.7 *Tbx18* Mutanten zeigen eine gestörte Abgrenzung zwischen otischer Kapsel und otischen Fibrozyten

Die Expression von *Tbx18* zeigte eine frühe Beschränkung auf das innere Kompartiment des periotischen Mesenchyms, aus dem die otischen Fibrozyten abgeleitet werden. Es bestand daher die Möglichkeit, dass die beobachteten späten Defekte in den otischen Fibrozyten der Mutante Folge einer gestörten Musterung des periotischen Mesenchyms waren, was für eine frühe Funktion von *Tbx18* in der Kompartimentierung des Mesenchyms sprechen würde. Solche Störungen der radialen Musterung des otischen Mesenchyms sollten sich in einer veränderten Aufteilung der mesenchymalen Zellen zwischen innerem und äußerem Kompartiment und möglicherweise in einer gestörten Abgrenzung beider Kompartimente äußern.

Die histologische Analyse der *Tbx18*-Mutante bei E18,5 zeigte eine lokale Ausweitung der otischen Kapsel in das Spiralligament unterhalb der Basilmembran der basalen Windung (Pfeil in Abb. 12E). Die Fibrozyten des Spiralligaments waren stärker kondensiert und zeigten eine Ausrichtung parallel zur Grenze der otischen Kapsel (Abb. 12E). Ein Anfärben kollagener Fibrillen mit Piko-Sirius-Rot detektierte eine deutliche Grenze zwischen der verknöcherten otischen Kapsel und den Fibrozyten des Spiralligaments in Kontrolltieren (Pfeilspitze in Abb. 12B), während dieser Übergang in der *Tbx18* Maus kontinuierlich war (Abb. 12F). Aufgrund dieser Hinweise auf schwerwiegende histologische Veränderungen im Übergangsbereich zwischen der verknöcherten otischen Kapsel und den Fibrozyten des Spiralligaments wurde die Expression von *Periostin* (*Postn*) analysiert, einem Gen, das in verschiedenen Arten von fibrösen Bindegeweben, so z.B. dem Perichondrium (Knorpelhaut) und dem Periosteum (Knochenhaut), exprimiert ist (Blumer *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008). Diese zweischichtigen und stark von Kollagenfibrillen durchwirkten Gewebe umgeben sich entwickelnde bzw. ausgereifte Knochen und tragen zum einen über verschiedene Mechanismen zur Entwicklung bzw. Regeneration von Knochengewebe bei (Vortkamp, 2001). Zum anderen erfüllen sie die Funktion einer mechanischen Kopplung des Knochengewebes mit angrenzenden Geweben (Colnot, 2005). Die otische Expression von *Postn* war in Kontrolltieren auf eine dünne der otischen Kapsel lateral aufliegende Zellschicht (weißer Pfeil in Abb. 12C) und eine kleine Domäne im proximobasalen Spiralligament beschränkt (Abb. 12C).



**Abb. 12: Gestörte Abgrenzung zwischen der otischen Kapsel und den otischen Fibrozyten in *Tbx18*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** (A-H) Untersuchung der Histologie durch HE- (A,E) und Picro-Sirius-Rot-Kollagen-Färbung (B,F) und Analyse der Markergenexpression durch RNA in situ Hybridisierung (C,D,G,H) auf sagittalen Schnitten bei E18,5. Die Abbildungen zeigen das Spiralligament der basalen Windung. Die verwendeten RNA-Sonden sind in der Abb. Angegeben. (I-N) Analyse der Aktivität des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporters durch X-Gal Färbung auf sagittalen Schnitten von *Tbx18*<sup>lacZ/+</sup> (Kontrolle) und *Tbx18*<sup>lacZ/Gfp</sup> (*Tbx18*<sup>-/-</sup>) Embryonen der Stadien E12,5 (I,L), E13,5 (J,M) und E14,5 (K,N). (A,E) Die *Tbx18*-Mutante weist in der basalen Windung eine lokale Ausweitung der otischen Kapsel (Pfeil in E) und eine veränderte Anordnung der Fibrozyten des Spiralligaments auf und (B,F) zeigt eine gestörte Abgrenzung von otischen Fibrozyten zur otischen Kapsel. Der Pfeil in B markiert die Kompartimentgrenze im Wildtyp. (C,D,G,H) Die Fibrozyten des Spiralligaments der *Tbx18*-Mutante zeigen eine ektopische Expression von *Postn* (G) und einen fast vollständigen Verlust der *Coch* (H) Expression. Die weißen Pfeile in C,G deuten auf die Expressionsdomäne von *Postn* außerhalb der otischen Kapsel. (I-N) In der *Tbx18*-Mutante können (ehemals) *Tbx18* exprimierende Zellen im äußeren Kompartiment des periotischen Mesenchyms (Pfeil in M) und der otischen Kapsel (Stern in N) detektiert werden. CG, cochleärer Gang; OtK, otische Kapsel; PM, periotisches Mesenchym; SL, Spiralligament.

Im Innenohr der Mutante wurde *Postn* ektopisch im gesamten Spiralligament von distal nach proximal graduell abnehmend exprimiert (Abb. 12G). Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von *Coch*, die im Wildtyp bei E18.5 auf die epithelnahen, proximalen Zellen des

Spiralligaments beschränkt ist, in der *Tbx18* Maus nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 12D,H). Die Expression von allgemeinen molekularen Markern für otische Fibrozyten, wie *Pou3f4*, *Otos*, *Otor* war unverändert (Cohen-Salmon *et al.*, 2000; Delprat *et al.*, 2005; Phippard *et al.*, 1999), Daten nicht gezeigt). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass sich in der *Tbx18* Maus das äußere Kompartiment des otischen Mesenchyms, aus dem die Knochenkapsel hervorgeht, partiell zu Lasten des inneren Kompartiments ausgeweitet hat, und dass die mesenchymalen Zellen des inneren Kompartiments zwar grundlegende Eigenschaften otischer Fibrozyten besitzen, sich aber nicht in verschiedene Subtypen sondern vielmehr in perichondrale Zellen differenzieren.

Um aufzuklären, wie und zu welchem Zeitpunkt die Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms in der Mutante beeinträchtigt wird, wurde eine Kurzzeit-Schicksalskartierung *Tbx18* exprimierender Zellen durch die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in *Tbx18*<sup>LacZ/+</sup> (Kontrolle) und *Tbx18*<sup>LacZ/GFP</sup> (Verlustmutante mit normalisierter  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität) Embryonen der Stadien E12,5, E13,5 und E14,5 durchgeführt. Da die Expression des *LacZ* Reportergens unter Kontrolle des *Tbx18*-Promotors die otische Expression von *Tbx18* vollständig rekapituliert, dient es somit in *Tbx18*<sup>LacZ</sup> heterozygoten und homozygoten Embryonen als Marker für *Tbx18* exprimierende Zellen, und ermöglicht so, das Schicksal dieser Zellen in der Mutante zu untersuchen. Aufgrund einer geschätzten Halbwertszeit des Proteins von 24h-48h in Säugerzellen (Smith *et al.*, 1995) erlaubt es darüber hinaus mit zeitlicher Begrenzung die Identifizierung ehemals *Tbx18* exprimierender Zellen.

In den heterozygoten Kontrollen war die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zwischen E12,5 und E14,5 auf den inneren Bereich des periotischen Mesenchyms beschränkt (Abb. 12I,J), was darauf hinweist, dass die Kompartimentierung bzw. Etablierung und Aufrechterhaltung der Gewebegrenzen bereits ab E12,5 einsetzt. In der *Tbx18*-Mutante wurden ab E13,5 auch Zellen im äußeren, stärker kondensierenden Bereich des periotischen Mesenchyms und ab E14,5 sogar in einer dünnen Schicht außerhalb der zukünftigen otischen Kapsel detektiert (Sternchen in Abb. 12M,N).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Zellen, die normalerweise *Tbx18* exprimieren in der *Tbx18*-Mutante nicht mehr auf den inneren Bereich des periotischen Mesenchyms beschränkt sind, und *Tbx18* somit für die normale Kompartimentierung der mesenchymalen Bestandteile des Innenohrs gebraucht wird.

### 3.2 Funktionelle Analyse von *Sox9* in der Entwicklung des Innenohrs

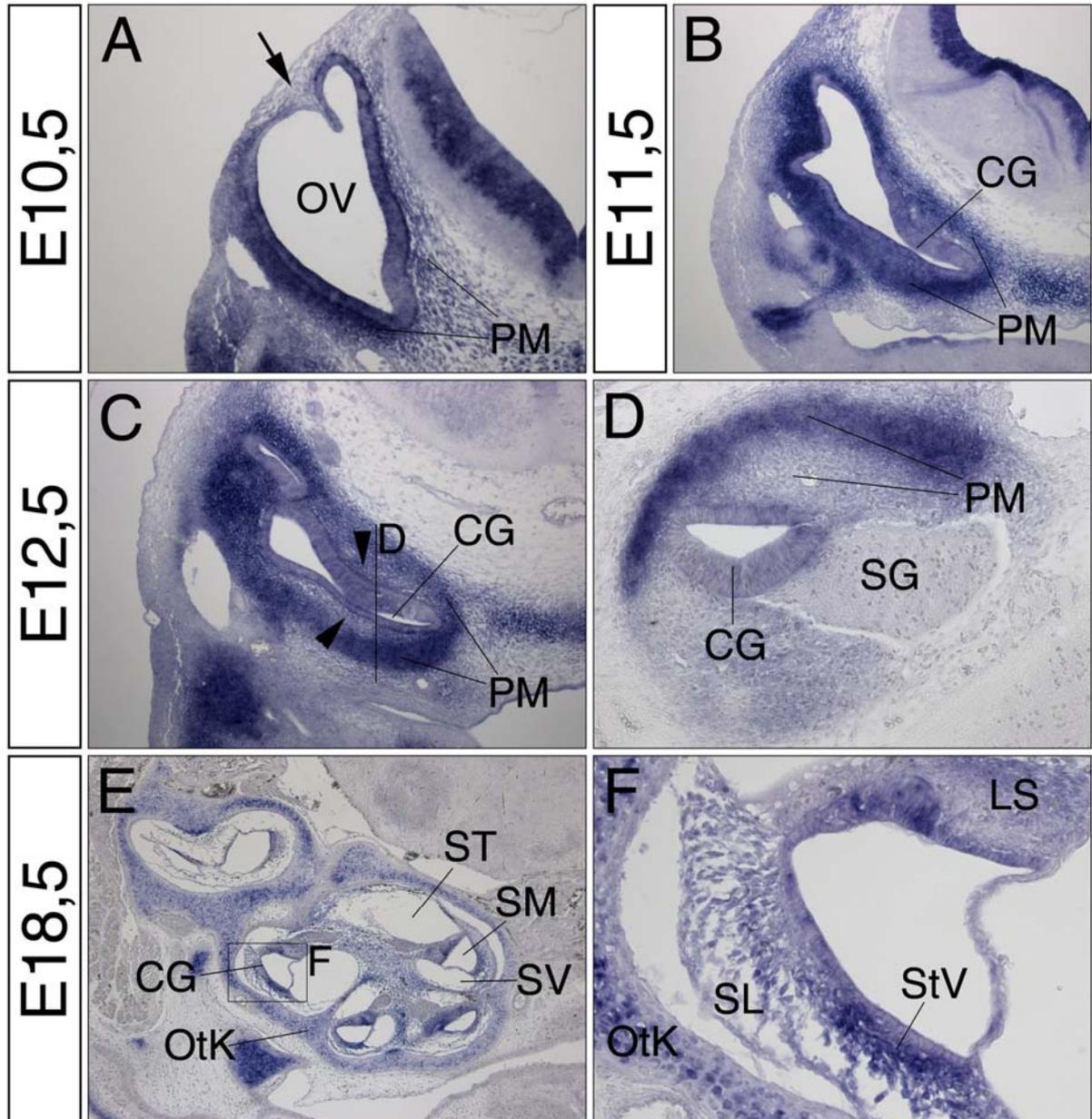
Im Rahmen der funktionellen Analyse von *Tbx18* wurde das Gen *Sox9* als ein weiterer Kandidat mit potentieller Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms der Maus identifiziert. Das Gen *Sox9* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der 'SRY-related-high-mobility-group box' (Sox) Gruppe, die sich durch ein HMG-DNA-Bindungsmotiv auszeichnen (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). *Sox9* spielt in der Knorpelzeldifferenzierung (Akiyama *et al.*, 2002), aber auch in anderen Prozessen in der Entwicklung embryonaler Gewebe und Organe eine entscheidende Rolle (Akiyama *et al.*, 2004; Seymour *et al.*, 2007). Der homozygote Verlust von *Sox9* in der Maus ist embryonal letal, heterozygote Tiere sterben perinatal und dienen als Tiermodell für die Kampomele Dysplasie, ein menschliches Skelettmissbildungssyndrom (Bi *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Im Epithel des sich entwickelnden Innenohrs wird *Sox9* für die Invagination der otischen Plakode benötigt (Barrionuevo *et al.*, 2008). Eine Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

*Sox9* weist eine differentielle Expression in den mesenchymalen Anteilen des sich entwickelnden Innenohrs auf (Abb. 6). Um zu überprüfen, ob *Sox9* für die normale Entwicklung des Gewebes funktionell relevant ist, wurde mit Hilfe der *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie eine konditionelle, auf das Innenohr bezogene mesenchymspezifische *Sox9*-Verlustmutante generiert und funktionell charakterisiert.

#### 3.2.1 *Sox9* ist im Mesenchym des sich entwickelnden Innenohrs in Bereichen starker Zellkondensation und Knorpelzeldifferenzierung exprimiert

*Sox9* weist ab E12,5 eine lokal begrenzte und zu *Tbx18* komplementäre Expression im periotischen Mesenchym auf und ist später während der *Stria vascularis* Entwicklung in den kondensierenden Zellen des Spiralligaments exprimiert (Abb. 6). Um die otische Expression von *Sox9* während früherer Stadien der Innenohrentwicklung zu beschreiben, wurde eine Expressionsanalyse mittels RNA-in situ Hybridisierung auf Gewebeschnitten durchgeführt.

*Sox9* wurde ab E10,5 stark im ventrolateralen und schwächer im medialen, nicht jedoch im dorsalen periotischen Mesenchym (Pfeil) exprimiert (Abb. 13A), wobei sich die mediale Expression auch auf das benachbarte zentrale Kopfmesenchym erstreckte.



**Abb. 13: Mesenchymale Expression von Sox9 während der Innenohrentwicklung.** Expressionsanalyse für *Sox9* durch RNA in situ Hybridisierung während der Cochleaentwicklung auf transversalen (A-C, E,F) und sagittalen (D) Paraffinschnitten. Verwendete Stadien sind in der Abbildung angegeben. Vergrößerte Abschnitte sind durch Rahmen gekennzeichnet. (A-F) Die mesenchymale Expression von *Sox9* ist auf Bereiche starker Zellkondensation und Bereiche differenzierenden Knorpelgewebes wie das frühe periotische Mesenchym, die (zukünftige) otische Kapsel, den Spirallimbus und das kondensierende Mesenchym unterhalb der *Stria vascularis* beschränkt. Der Pfeil in A markiert die *Sox9* negative Domäne des periotischen Mesenchyms. Pfeilspitze in C markiert die sukzessive Beschränkung der *Sox9* Expression auf das äußere Kompartiment im basalen Bereich der Cochlea. Der in D dargestellte Bereich ist in C gekennzeichnet. Die Schnittebene in D ist als Linie in C gekennzeichnet. CG, cochleärer Gang; PM, periotisches Mesenchym; OtK, otische Kapsel; SG, Spiralganglion; SL, Spiralligament; SM, *Scala media*; ST, *Scala tympani*; StV, *Stria vascularis*; SV, *Scala vestibuli*.

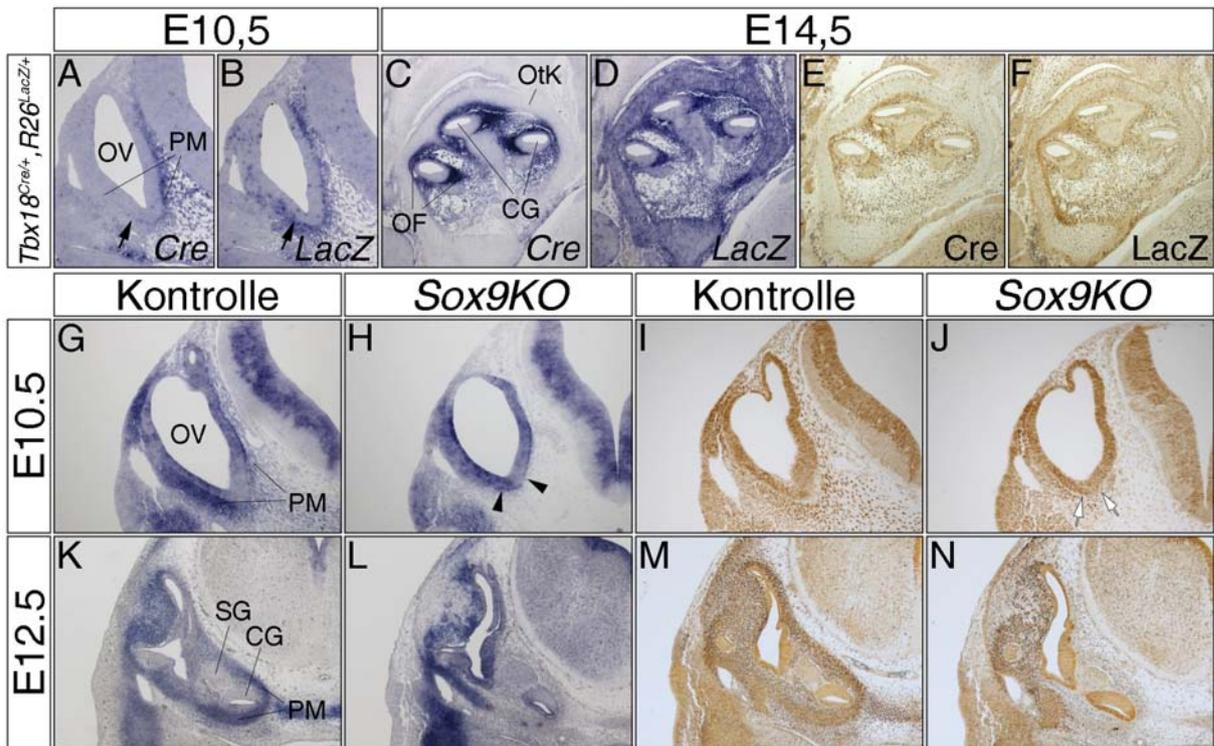
Ab E11.5 war *Sox9* im gesamten periotischen Mesenchym exprimiert (Abb. 13B), beschränkte sich aber im Bereich des cochleären Ganges ab E12,5 graduell vom Apex zur

Basis auf den äußeren, epithelfernen Anteil des periotischen Mesenchyms (Pfeilspitzen in Abb. 13C, Abb. 13D), aus dem sich die otische Kapsel ableitet. In dieser Domäne nahm die Expression bis E18,5 kontinuierlich ab, während die kondensierenden mesenchymalen Zellen im Bereich der sich entwickelnden *Stria vascularis* erneut *Sox9* exprimierten (Abb. 13E,F). Aus der festgestellten Expressionsverteilung von *Sox9* lassen sich damit mögliche Funktionen von *Sox9* in der Kondensation und Musterung des periotischen Mesenchyms, der Differenzierung der otischen Knochenkapsel und der Rekrutierung mesenchymaler Zellen im Rahmen der *Stria vascularis* Entwicklung ableiten.

### 3.2.2 Konditionelle Inaktivierung von *Sox9* im periotischen Mesenchym

Die homozygote Deletion von *Sox9* ist embryonal letal (Bi *et al.*, 2001). Um die Funktion von *Sox9* im periotischen Mesenchym analysieren zu können, wurde daher mithilfe einer im Labor generierten *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie (Wiese *et al.*, 2009) eine konditionelle, mesenchymspezifische *Sox9*-Verlustmutante des Genotyps *Tbx18<sup>Cre/+</sup>, Sox9<sup>flax/flax</sup>* (*Sox9KO*) generiert.

*Sox9KO*-Mäuse werden in einem normalen Mendelschen Verhältnis geboren, sterben aber kurz nach der Geburt aus unbekanntem Grund. Die Mutanten besitzen eine verkürzte Körperachse und verkürzte Gliedmaßen, weisen aber abgesehen von dieser Größenreduktion eine weitestgehend normale Skelettentwicklung auf. Die phänotypische Analyse des Urogenitalsystems detektierte einen proximalen Hydroureter und eine Hydronephrose (Airik *et al.*, unveröffentlicht). Voraussetzung für die Analyse und Bewertung eines otischen Phänotyps der *Sox9KO*-Maus war die Charakterisierung der Rekombinationseigenschaften der *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie. Dies erfolgte durch Kreuzung mit der *ROSA26<sup>LacZ</sup>*-Reporterlinie und dem Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase Expression durch RNA in situ Hybridisierung und Immunhistochemie. *Tbx18* weist eine frühe, der otischen Expression vorausgehende Expression im intermediären und paraxialen kranialen Mesenchym ab E7,75 auf (Kraus *et al.*, 2001). Die Analyse bestätigte, dass die Verwendung dieser *Cre*-Mauslinie aufgrund der frühen Expression von *Tbx18* eine Rekombination im gesamten prospektiven periotischen Mesenchym vermittelt, bevor die periotische Expression von *Tbx18* (Pfeile in Abb. 14A,B) und *Sox9* einsetzt (Abb. 14B,D,F).



**Abb. 14: Die *Sox9KO*-Maus zeigt den vollständigen Verlust der *Sox9* Expression im periotischen Mesenchym der Cochlea.** (A-F) Nachweis der Expression von *Cre* (A,C,E) und *LacZ* (B,D,F) mRNA und Protein durch RNA in situ Hybridisierung (A-D) und Immunhistochemie (E,F) im sich entwickelnden Innenohr von *Tbx18<sup>Cre/+</sup>, ROSA26<sup>LacZ/+</sup>*-Embryonen verschiedener Stadien. (G-N) Nachweis der Expression von *Sox9* mRNA und Protein in der Cochlea von *Tbx18<sup>Cre/+</sup>, Sox9<sup>flox/flox</sup>* (*Sox9KO*) (K-N) und Kontrolltieren (G-J) durch RNA in situ Hybridisierung (G,H,K,L) und Immunhistochemie (I,J,M,N). (A-B) Aufgrund der frühen Expression von *Tbx18* im kranialen Mesenchym hat die den LacZ-Reporter aktivierende Rekombination bei E10,5 bereits stattgefunden und geht damit der periotisch mesenchymalen Expression von *Tbx18* bzw. der *Cre*-Rekombinase voraus (Pfeil in A,B). (C-F) Die *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Linie vermittelt Rekombination in beiden Kompartimenten des periotischen Mesenchyms. (G,H,K,L) Ab E10,5 weist die *Sox9KO* Maus einen vollständigen Verlust der *Sox9* Expression im periotischen Mesenchym der (prospektiven) Cochlea auf (Pfeilspitzen in H). (I,J,M,N) Bei E10,5 kann in vereinzelt Zellen im Bereich der prospektiven Cochlea noch *Sox9* Protein nachgewiesen werden (weiße Pfeile in J). CG, cochleärer Gang; OF, otische Fibrozyten; OV, otisches Vesikel/Otozyste; Otk, otische Kapsel; PM, periotisches Mesenchym; SG, Spiralganglion.

Da die otische Kapsel anteilig von einwandernden Neuralleistenzellen gebildet wird (O'Gorman, 2005), die *Tbx18* möglicherweise gar nicht oder erst verhältnismäßig spät exprimieren, musste der Anteil und die Verteilung *Sox9* exprimierender Zellen im periotischen Mesenchym der *Sox9KO*-Maus bestimmt werden. Der Nachweis von *Sox9* mRNA und Protein in Wildtyp- und mutanten Embryonen bestätigte, dass *Tbx18<sup>Cre</sup>* vermittelte Rekombination in *Sox9KO*-Mäusen bereits ab E10,5, also vor dem Einsetzen der Cochleaentwicklung, zu einem vollständigen Verlust der *Sox9* Expression im periotischen Mesenchym der Cochlea führt (Pfeilspitzen in Abb. 14H, Abb. 14J,L,N). Im dorsolateralen

Mesenchym des Vestibularapparates wurde dagegen auch bei E12,5 eine Vielzahl *Sox9* exprimierender Zellen detektiert (Abb. 14L,N).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie geeignet ist, die Funktion von *Sox9* im periotischen Mesenchym zu analysieren.

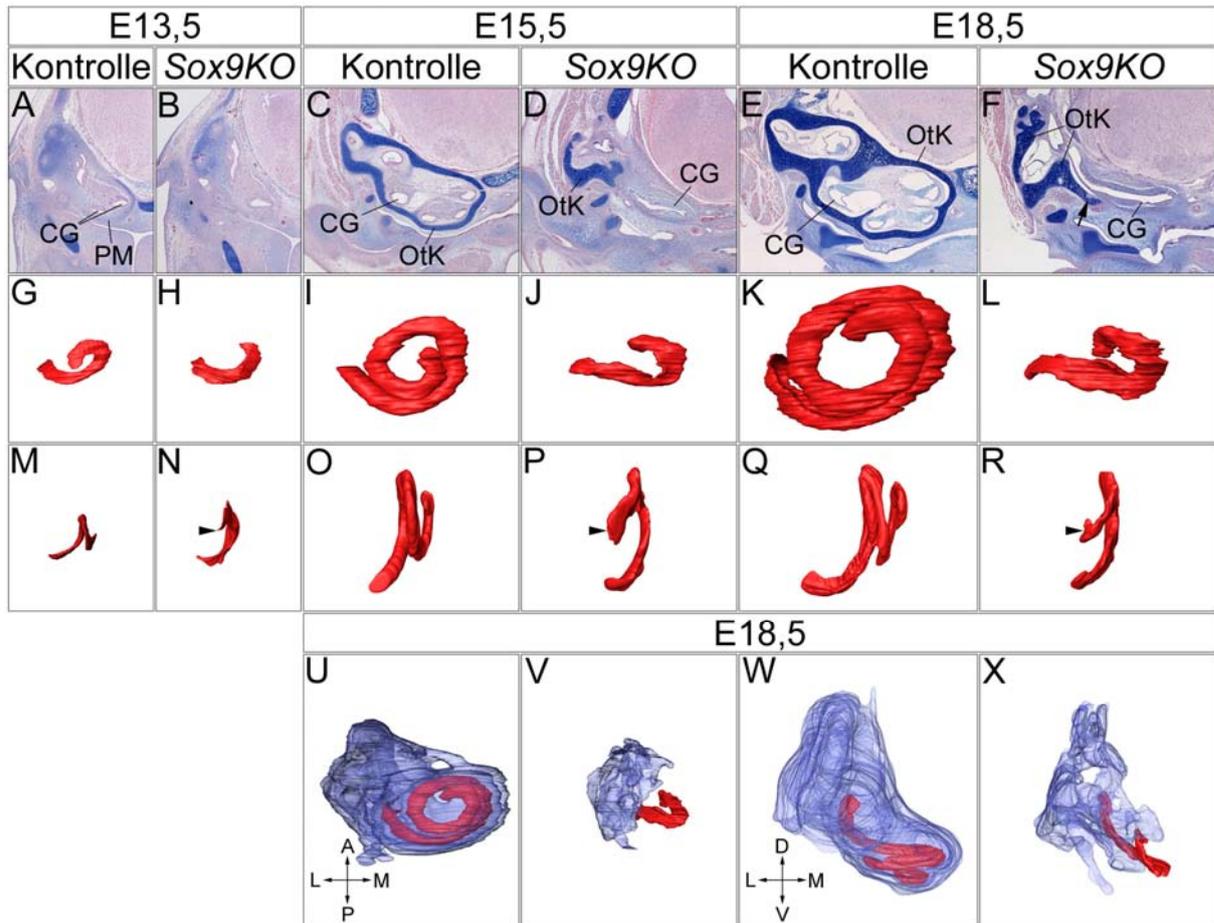
### **3.2.3 Der konditionelle Verlust von *Sox9* beeinträchtigt die Differenzierung der otischen Kapsel und die Windungsmorphologie des cochleären Ganges**

*Sox9* ist notwendig für die Differenzierung von Knorpelzellen (Akiyama *et al.*, 2002), daher wurde erwartet, dass der Verlust von *Sox9* im periotischen Mesenchym die Bildung der otischen Knochenkapsel beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde eine histologische Analyse von transversalen Schnittpräparaten verschiedener Entwicklungsstadien der *Sox9*-Mutante mit Alzian-Blau durchgeführt, einem histologischen Farbstoff, der in Knorpelgewebe stark angereicherte sulfatierte Glukosaminoglykane bindet.

Bei E13,5, d.h. kurz vor dem Einsetzen der Knorpelzellendifferenzierung, ließen sich keine Unterschiede im Vergleich zur Wildtypsituation nachweisen (Abb. 15B). Bei E15,5 und E18,5 zeigte sich zum einen jedoch ein fast vollständiger Verlust der otischen Knochenkapsel im Bereich des Cochlea, zum anderen wies der cochleäre Gang eine gestörte Windungsmorphologie und eine Reduktion der benachbarten Gangsysteme, *Scala vestibuli* und *Scala tympani*, auf. Im Gegensatz dazu war der dorsolateral gelegene vestibuläre Anteil des Innenohrs zu beiden Zeitpunkten weiterhin von Knorpelgewebe umgeben (Abb. 15D,F). Bei E18,5 weitete sich die Verknöcherung auch auf die dorsalen, basalen Bereiche des cochleären Ganges aus (Pfeil in Abb. 15F), was vermutlich auf die Beteiligung von weiterhin *Sox9* exprimierenden Neuralleistenzellen an der Bildung der otischen Kapsel zurückzuführen ist.

Da der Verlust von mesenchymal exprimiertem *Sox9* einen deutlichen Effekt auf die Morphologie der Cochlea hatte, wurde zur besseren Charakterisierung dieser Unterschiede eine 3D-Rekonstruktion des cochleären Ganges anhand histologischer Schnittserien für verschiedene Stadien durchgeführt. Der Vergleich zeigte bereits bei E13,5 eine deutliche Längenreduktion des Ganges der Mutante und ein stark beeinträchtigtes Längenwachstum bis E18,5, was sich durch die Verringerung der Windungszahl von 1,7 auf ungefähr 1 äußerte (Abb. 15H,J,L). Zusätzlich wurde in der Mutante ein Auswachsen des Apex in dorsaler statt in ventraler Richtung beobachtet, was in einer veränderten Topologie resultierte (Pfeilspitzen).

Die dreidimensionale Rekonstruktion der otischen Kapsel bei E18,5 zeigte, dass nur in den dorsal der basalen Cochlea liegenden Bereichen Knorpelgewebe vorhanden ist und bestätigte damit den fast vollständigen Verlust der Knochenkapsel im ventralen und medialen Bereich der Cochlea (Abb. 15V,X).



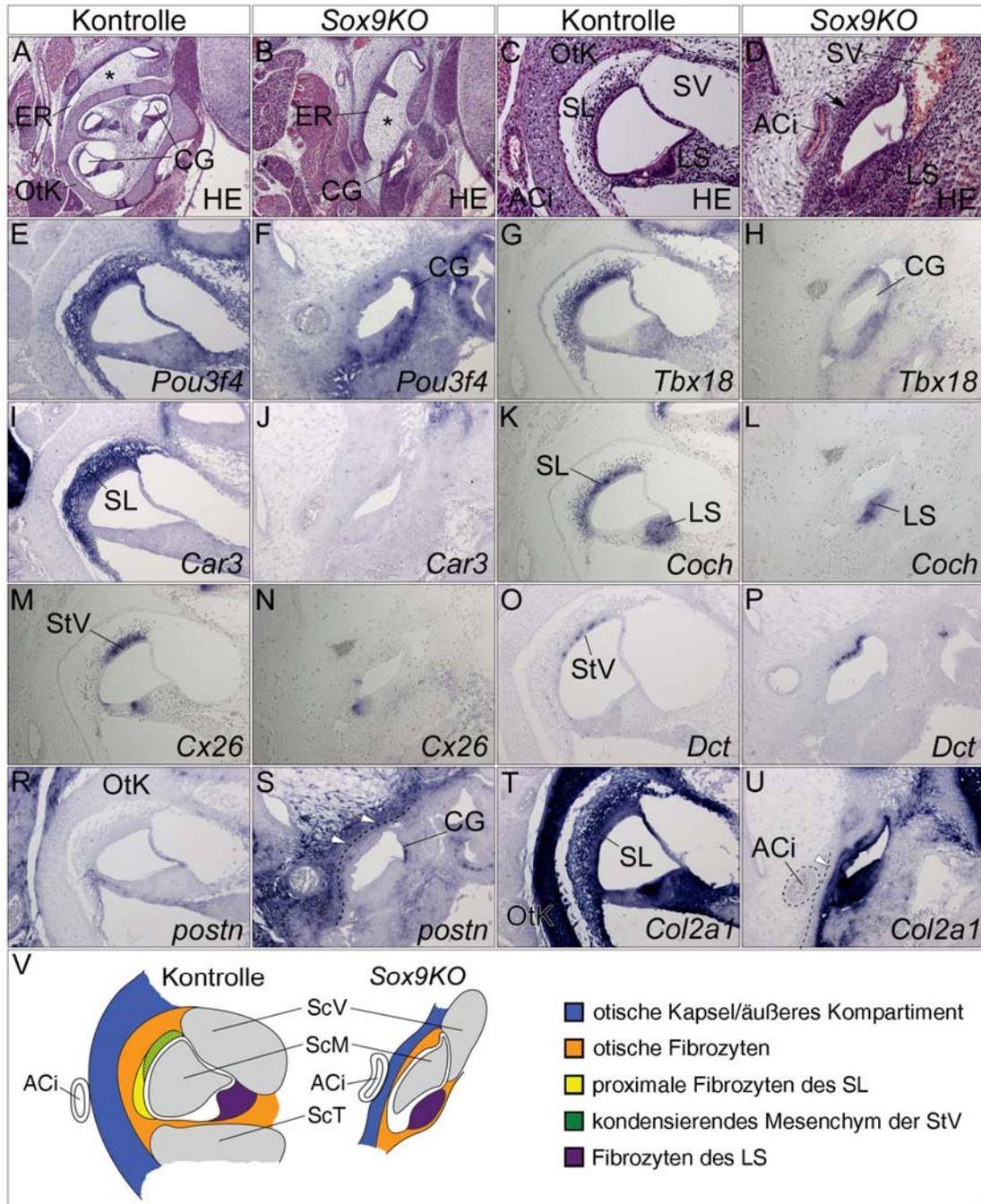
**Abb. 15: Gestörte Differenzierung der otischen Knochenkapsel und veränderte Windungsmorphogenese des cochleären Ganges in der *Sox9*-Mutante.** (A-F) Histologische Detektion von Knorpelgewebe durch Alzianblau-Färbung auf transversalen Schnitten im Bereich der Cochlea von Kontrollembryonen (A,C,E) und *Sox9KO*-Embryonen (B,D,F) verschiedener Entwicklungsstadien. (G-X) Dreidimensionale Rekonstruktion des cochleären Ganges anhand transversaler Schnittserien von *Sox9*-Mutanten (H,J,L,N,P,R) und Kontrollen (G,I,K,M,O,Q,) verschiedener Stadien aus den Perspektiven parallel (G-L) und senkrecht (M-R) zur Windungsachse der Cochlea. (U-X) Dreidimensionale Rekonstruktion des cochleären Ganges und der otischen Knochenkapsel von *Sox9*-Mutanten und Kontrollen bei E18,5 aus frontaler (U,V) und dorsaler (W,X) Perspektive. (A-F) und (G-R) sind jeweils maßstabsgetreu dargestellt. (A-F, U-X) Verlust der otischen Knochenkapsel im Bereich der Cochlea von *Sox9*-Mutanten. Der Pfeil in F markiert die Ausweitung der otischen Kapsel in den basalen Bereich der Cochlea. (G-R) Verzögertes und fehlgerichtetes Auswachsen des cochleären Ganges in der Mutante. Die Pfeilspitzen in N,P,R markieren den Apex des cochleären Ganges. Die Embryonalstadien sind in der Abbildung angegeben. A, anterior; CG, cochleärer Gang; D, dorsal; L, lateral; M, medial; Otk, otische Kapsel, PM, periotesches Mesenchym; V, ventral.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von mesenchymal exprimiertem *Sox9* die Bildung der otischen Knochenkapsel beeinträchtigt und sekundär zu einer gestörten Windungsmorphogenese des epithelialen cochleären Ganges führt.

### **3.2.4 Der Verlust von *Sox9* beeinträchtigt die Differenzierung des periotischen Mesenchyms**

Die Expression von *Sox9* im periotischen Mesenchym, der Verlust der otischen Kapsel und die Reduktion der nicht-epithelialen Gangsysteme der Cochlea deuteten auf eine wichtige Funktion von *Sox9* in der Differenzierung der mesenchymalen otischen Anteile hin. Um diese Veränderungen genauer zu charakterisieren, wurden Histologie und Expression verschiedener mesenchymaler Differenzierungsmarker in sagittalen Schnittpräparaten der Mutante bei E18,5 analysiert.

Die histologische Analyse zeigte eine dramatische Veränderung der Cochleamorphologie (Abb. 16B). Der Raum, der im Kopf der Mutante durch otisches Gewebe eingenommen wurde, war stark reduziert und es zeigte sich eine vermutlich kompensatorische Ausweitung des benachbarten, lockeren Bindegewebes, das in der Wildtypsituation zwischen der otischen Kapsel und dem prospektive Mukosaepithel der Eustachischen Röhre liegt (Sternchen in Abb. 16B). Die Ausrichtung des cochleären Ganges entsprach in etwa der Ausrichtung der basalen Windung im Wildtyp und war bzgl. seines Umfangs unverändert (Abb. 16D). Der cochleäre Gang war fast vollständig von kondensiertem Bindegewebe umgeben, das dorsal von der rudimentär entwickelten *Scala vestibuli* unterbrochen war. Die *Scala tympani* war in der Mutante nicht ausgebildet. Im otischen Mesenchym zwischen dem Epithel des cochleären Ganges und dem Ast der *Arteria carotis interna*, das vermutlich dem Mesenchym der seitlichen Wand gleichzusetzen ist, konnte histologisch keine offensichtliche Kompartimentierung detektiert werden. Im Gegensatz dazu grenzten sich die größeren, runden Zellen des Spirallimbus deutlich vom umliegenden, kleinzelligem Bindegewebe ab (Abb. 16D). Die Expressionsanalyse verschiedener molekularer Marker belegte die Etablierung verschiedener Subkompartimente im Mesenchym der *Sox9*-Mutante. *Pou3f4* und *Tbx18*, die in otischen Fibrozyten exprimiert werden, wurden in der *Sox9* Mutante in epithelnahen Bereichen des otischen Bindegewebes exprimiert (Abb. 16F,H), und identifizierten Zellen mit grundlegendem Charakter otischer Fibrozyten. Das Gen *Car3*, das für die im Ohr funktionell nicht charakterisierte Carboanhydrase III kodiert, wurde im



**Abb. 16: Gestörte Differenzierung des periotischen Mesenchyms in der Sox9-Mutante.** (A-V) Untersuchung der Histologie durch HE-Färbung (A-D) und Analyse mesenchymaler Differenzierungsmarker durch RNA in situ Hybridisierung (E-U) auf sagittalen Schnitten von Kontroll- und *Sox9KO*-Embryonen des Stadiums E18,5. Die Abbildungen zeigen den basalen Abschnitt des cochleären Gangs. Die verwendeten RNA-Sonden sind in der Abb. angegeben. (A-U) In der *Sox9*-Mutante sind Expansion und Differenzierung der mesenchymalen Anteile der Cochlea gestört. (E-U) Die Expression von Differenzierungsmarkern belegt die gestörte Differenzierung der otischen Kapsel und des Spiralligaments in der *Sox9KO*-Maus. Die gestrichelte Linie in S markiert die äußere Grenze des otischen Mesenchyms und den Ast der *Arteria carotis interna* (V) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse. ACi, Ast der *Arteria carotis interna*; CG, cochleärer Gang; ER, Eustachische Röhre; LS, *Limbus spiralis*; Otk, otische Kapsel; SL, Spirallimbus; StV, *Scala vestibuli*.

Innenohr des Wildtyps ausschließlich von den otischen Fibrozyten des Spiralligaments exprimiert (Abb. 16I). In der *Sox9* Mutante war *Car3* nicht exprimiert, was eine Fehldifferenzierung dieser Zellpopulation andeutet (Abb. 16J). Die Expression von *Coch*, die im proximalen Bereich des Spiralligaments und in den kondensierenden Zellen des Spirallimbus zu finden ist, konnte in der Mutante nur noch im Mesenchym des Spirallimbus nachgewiesen werden (Abb. 16L). Zusammen mit dem Verlust der mesenchymalen Expression von *Cx26* (Abb. 16N) weist dies ebenfalls auf eine Differenzierungsstörung der otischen Fibrozyten des Spiralligaments hin. Der Verlust der über der *Stria vascularis* kondensierenden mesenchymalen Zellen, konnte durch den Verlust der *E-Cadherin* Expression in diesem Bereich bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression von *Dct*, das die von den Neuralleistenzellen abgeleiteten Vorläufer der strialen Intermedialzellen markiert (Steel *et al.*, 1992), erschien in der Mutante hingegen unverändert (Abb. 16P).

Die histologische Analyse der Mutante zeigte ein Ausbleiben der Knorpelzellendifferenzierung im äußeren Bereich des otischen Mesenchyms. Die ektopische Expression von *Postn* in dieser Region (Abb. 16S) zeigte, dass diese Zellen im *Sox9KO* den Charakter fibrösen Bindegewebes aufweisen. Im Gegensatz zur *Tbx18*-Mutante erstreckte sich die ektopische Expression nur teilweise (unterhalb des prosensorischen Epithels) auf die epithelnahen Abschnitte des otischen Mesenchyms.

In der Knorpelzellendifferenzierung aktiviert *Sox9* die Transkription des Gens *Col2a1*, welches das für die Chondrogenese essentielle Knorpelmatrixprotein KollagenII kodiert (Bell *et al.*, 1997). Erwartungsgemäß war die Expression von *Col2a1* in der *Sox9KO*-Maus im äußeren Bereich des otischen Mesenchyms zwischen dem Epithel des cochleären Ganges und dem Ast der *Arteria carotis interna* herunterreguliert (weiße Pfeilspitze in Abb. 16U), im epithelnahen Bereich erschien sie jedoch unverändert. Zusammen mit der lokal begrenzten Expression von *Pou3f4* und *Tbx18* in der Mutante bestätigt dies zum einen, dass das Mesenchym in diesem Bereich keinen homogenen sondern einen zweigliedrigen Aufbau besitzt, zum anderen, dass die *Col2a1* Expression in otischen Fibrozyten unabhängig von *Sox9* ist.

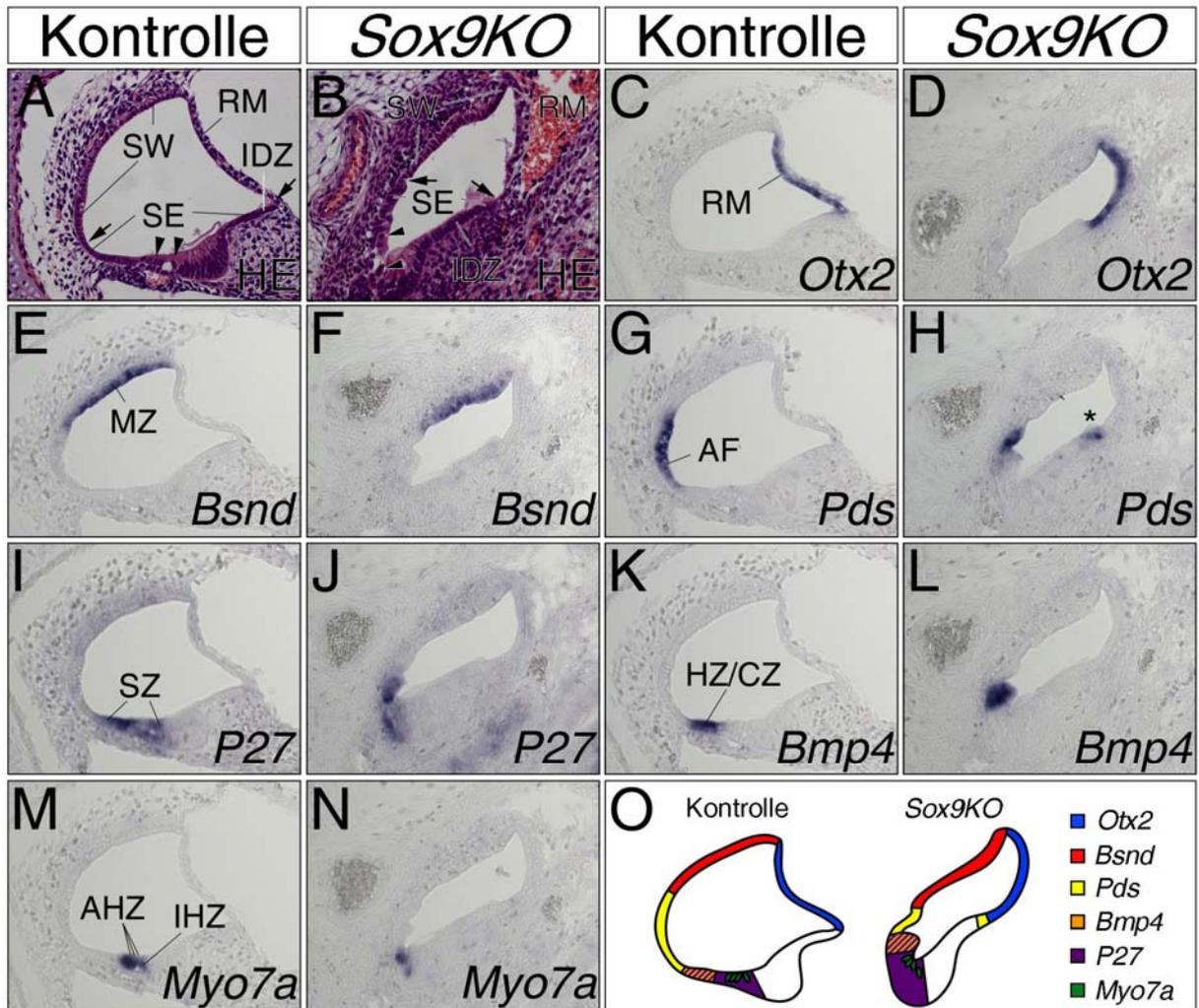
Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von mesenchymal exprimiertem *Sox9* die Entwicklung der mesenchymalen Bestandteile der Cochlea stark beeinträchtigt. Es kommt zu einer gestörten Expansion und Differenzierung von otischer Kapsel und Fibrozyten sowie zu einer eingeschränkten Bildung der mesenchymalen Hohlräume.

### 3.2.5 *Sox9*KO-Mäuse weisen Veränderungen in der Musterung des otischen Epithels auf

Zusätzlich zu den primären Veränderungen im Mesenchym der *Sox9* Mutante zeigten sich auch sekundäre Auswirkungen des mesenchymalen Verlusts von *Sox9* auf die morphologische Entwicklung des epithelialen cochleären Ganges. Um die Folgen des *Sox9* Verlustes auf die Differenzierung des Epithels zu bestimmen, wurde die Histologie des otischen Epithels und die Expression epithelialer Differenzierungsmarker analysiert. Die histologische Analyse zeigte, dass der verformte cochleäre Gang der Mutante einen annähernd normalen Umfang besitzt und kein homogenes Gewebe darstellt, sondern deutlich in einen nicht-sensorischen und einen prosensorischen Abschnitt unterteilt ist (Abb. 17B). Das prosensorische Epithel war wiederum in das einreihige Epithel der späteren Interdentalzellen oberhalb des Spirallimbus und in das die Haarzellen tragende pseudogeschichtete Epithel der sensorischen Stützzellen gegliedert. Das prosensorische Epithel war von einer Tektorialmembran bedeckt und wies im zentralen bis lateralen Abschnitt eine zweite Reihe epithelialer Zellen auf, bei denen es sich um äußere und innere Haarzellen handeln könnte (Pfeilspitzen in Abb. 17B). Im nicht-sensorischen Epithel ließen sich die von zwei mesenchymalen Zellschichten bedeckte Reissnermembran und das Epithel der seitlichen Wand voneinander abgrenzen. Eine Abgrenzung der späteren Marginalzellen vom restlichen Epithel der seitlichen Wand war anhand zytologischer Unterschiede nicht möglich.

Zur molekularen Charakterisierung der epithelialen Zellen wurde eine RNA in situ Hybridisierungsanalyse einer Reihe von Differenzierungsmarkern durchgeführt, deren Expression die Ergebnisse der histologischen Analyse im Wesentlichen bestätigten. Das für einen Transkriptionsfaktor der Homeobox-Klasse kodierende Gen *Otx2* war in der Reissner-Membran von Wildtyp und Mutante exprimiert (Abb. 17C,D, Morsli *et al.*, 1999). Die Expression von *BSND* in der benachbarten seitlichen Wand der Mutante belegte die Präsenz differenzierter Marginalzellvorläufer (Abb. 17F). Das für einen Ionentransporter kodierende *Pds* wird in den Zellen der äußeren Furche exprimiert (Everett *et al.*, 1999). In der Mutante wies es eine zu *BSND* benachbarte Expression auf, die Domäne war in ihrer Ausweitung jedoch deutlich reduziert (Abb. 17H). Zusätzlich wurde eine ektopische Expression im Übergangsbereich zwischen Reissnermembran und zukünftigen Interdentalzellen des *Limbus spiralis* detektiert (Sternchen in Abb. 17H) Die Expression von *P27* (auch *Cdkn1b*), das für eine Cyclin-abhängige Kinase kodiert, und *Bmp4* markiert die Stützzellen des prosensorischen Epithels bzw. nur Hensen und Claudius Zellen (Morsli *et al.*, 1998). Beide Gene wurden in

der Mutante exprimiert und bestätigten eine normale Differenzierung dieser Zellen (Abb. 17J,L). *Myo7a* kodiert für Protein der Myosin-Familie und wird in äußeren und inneren Haarzellen exprimiert (Hasson *et al.*, 1995). Die unveränderte Expression in der Mutante zeigte, dass differenzierte Haarzellen existieren (Abb. 17N). Eine Unterscheidung von äußeren und inneren Haarzellen war jedoch nicht möglich.



**Abb. 17: Geringe Störung der Differenzierung und Musterung des otischen Epithels in der *Sox9*-Mutante.** Untersuchung der Histologie durch HE-Färbung (A,B) und Analyse epithelialer Differenzierungsmarker durch RNA in situ Hybridisierung (C-N) auf sagittalen Schnitten von Kontroll- und *Sox9KO*-Embryonen des Stadiums E18,5. Die Abbildungen zeigen den basalen Abschnitt des cochleären Gangs. Die verwendeten RNA-Sonden sind in der Abb. angegeben. (A-N) Der verformte cochleäre Gang in der *Sox9* Mutante zeigt eine normale Kompartimentierung (A-B) und Zelldifferenzierung (C-N). Pfeilspitzen in A u B markieren die Grenzen der Reissnermembran. Der Weiße Pfeil in A und B markiert die Grenze zwischen Seitenwandepithel und sensorischem Epithel. Der Pfeil in H markiert die ektopische *Pds* Expression. (O) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse. AF, äußere Furche; AHZ, äußere Haarzellen; CZ, Claudiuszellen; HZ, Hensenzellen; IDZ, Interdentalzellen; IHZ, innere Haarzellen; MZ, Marginalzellen; RM, Reissnermembran; SE, sensorisches Epithel; SW, seitliche Wand; SZ, Stützzellen.

Zusammengenommen zeigt diese Expressionsanalyse, dass das periotische Mesenchym einen von *Sox9* abhängigen Einfluss auf die Musterung des otischen Epithels besitzt.

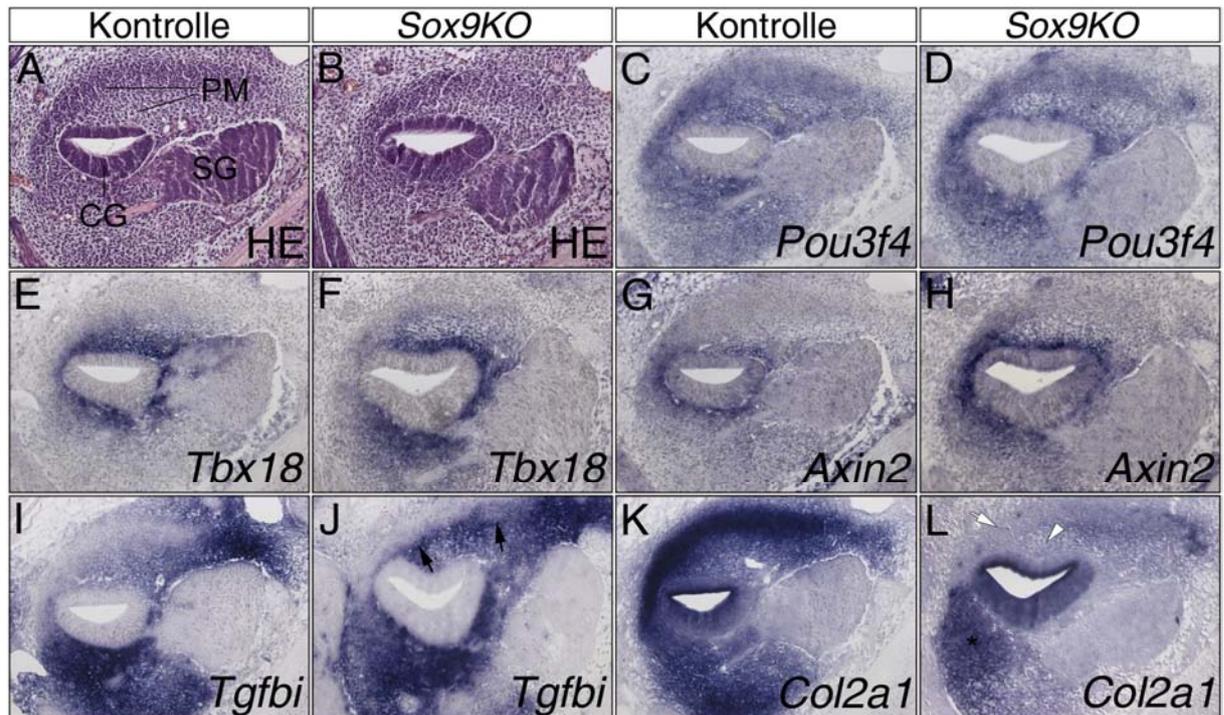
### 3.2.6 Der konditionelle Verlust von *Sox9* verursacht Störungen in der Entwicklung des frühen periotischen Mesenchyms

Die initial homogene, dann auf das äußere Kompartiment begrenzte Expression von *Sox9* im periotischen Mesenchym, sowie die phänotypischen Veränderungen in der *Sox9* Mutante deuteten auf eine frühe Funktion von *Sox9* in der Rekrutierung und Kondensation sowie der Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms.

Die histologische Analyse der Cochlea bei E12,5 zeigte in der Mutante eine normale Kondensation des periotischen Mesenchyms mit einer der Wildtypsituation entsprechenden Gliederung in ein äußeres Kompartiment mit hoher und ein inneres Kompartiment mit geringerer Zelldichte (Abb. 18B). Im Vergleich zum Wildtyp erschien die Ausdehnung des periotischen Mesenchyms jedoch reduziert. Darüberhinaus war eine Verdickung des otischen Epithels und Erhöhung des Durchmessers des cochleären Ganges zu erkennen.

Die Expressionsanalyse für *Pou3f4* ergab, dass dieses Mesenchym in der *Sox9KO*-Maus otischen Charakter besitzt (Abb. 18D). Die Expression von *Tbx18* und *Axin2*, das für ein Protein aus dem  $\beta$ -Catenin Degradationskomplexes kodiert (Behrens *et al.*, 1998), war in Wildtyp und Mutante auf das innere Kompartiment beschränkt (Abb. 18F,H), was eine normale Kompartimentierung des Mesenchyms belegt. Da es sich bei *Axin2* um ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges handelt (Jho *et al.*, 2002), könnte die erhöhte Expression in der Mutante ein Hinweis auf eine gesteigerte Aktivität dieses Signalweges sein (Abb. 18H). *Tgfb1*, ein Gen mit unbekannter Funktion, ist homogen im periotischen Mesenchym im Bereich des prosensorischen Epithels und deutlich schwächer und graduell nach distal abnehmend im Bereich des nichtsensorischen Epithels exprimiert (Abb. 18I). In der Mutante wurde eine erhöhte Expression mit Ausweitung in das äußere Kompartiment des ventralen periotischen Mesenchyms beobachtet (Pfeile in Abb. 18J). Dies deutet auf eine frühe Differenzierungsstörung des inneren Kompartiments hin. *Col2a1*, das bei E12,5 stark im äußeren und schwächer im inneren Kompartiment des periotischen Mesenchyms exprimiert ist (Abb. 18K), war in der Mutante nur noch basolateral des prosensorischen Epithels, jedoch nicht mehr oberhalb des nicht-sensorischen Epithel zu finden (Abb. 18L). Dies belegt die Differenzierungsstörung der zukünftigen otischen Kapsel, und zeigt, dass die Expression von *Col2a1* im inneren Kompartiment initial von *Sox9* abhängt.

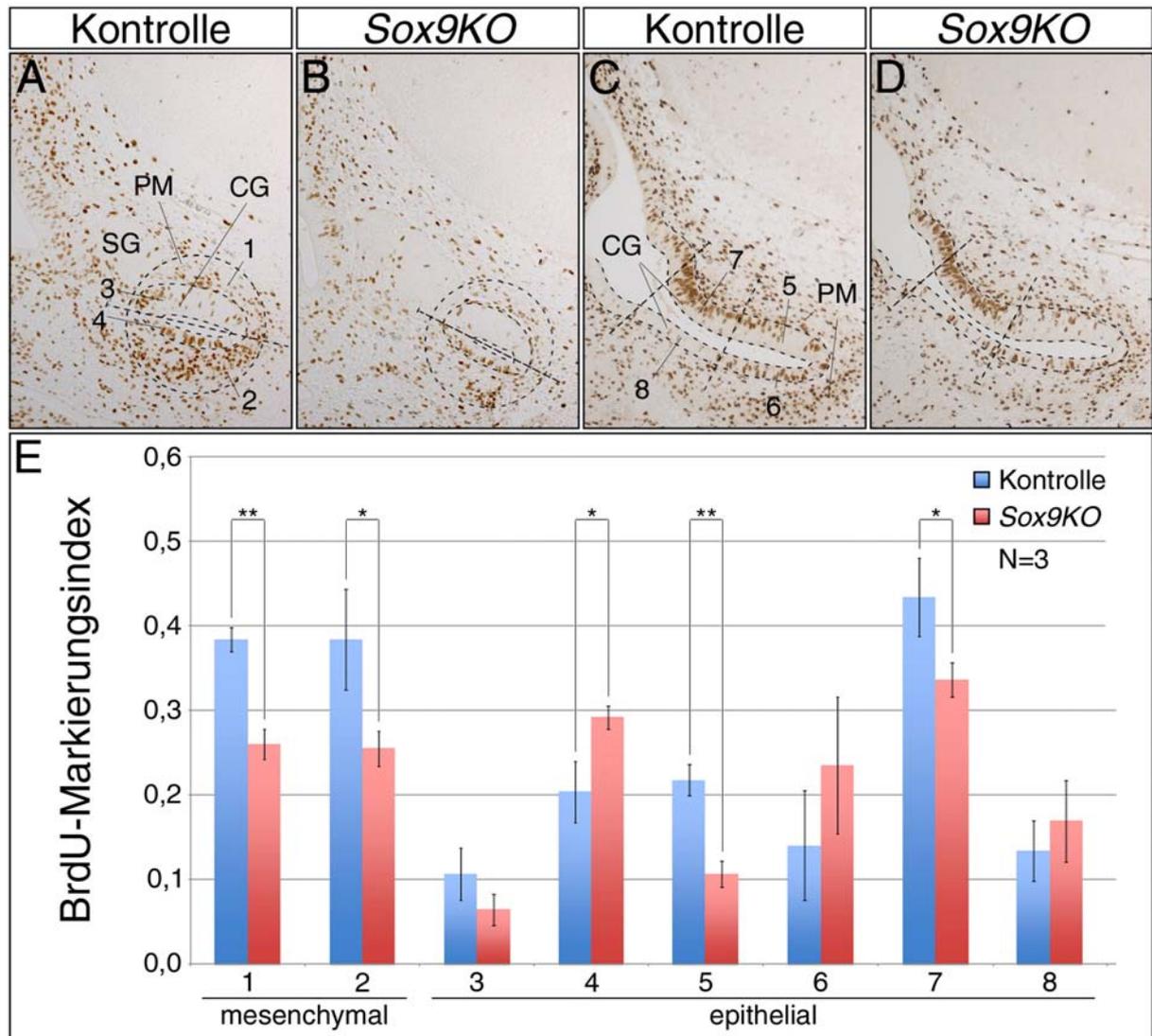
Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass *Sox9* keine Rolle in der Kondensation und Kompartimentierung periotisch-mesenchymaler Zellen spielt, sondern vielmehr in der frühen Differenzierung dieses Gewebes.



**Abb. 18: Normale Kondensation und Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms von *Sox9KO*-Mäusen.** (A-L) Untersuchung der Histologie durch HE-Färbung (A-B) und Analyse früher mesenchymaler Differenzierungsmarker durch RNA in situ Hybridisierung (C-L) auf sagittalen Schnitten von Kontroll- und *Sox9KO*-Embryonen des Stadiums E12,5. Die verwendeten RNA-Sonden sind in der Abb. angegeben. (A-B) Die Mutante weist ein kompartimentiertes und differentiell kondensiertes periotisches Mesenchym von verringerter Größe auf. Die Pfeilspitzen in A und B markieren die äußere Grenze des periotischen Mesenchyms. (C-L) Die Expression von Differenzierungsmarkern belegt die normale Musterung aber gestörte Differenzierung des periotischen Mesenchyms. Pfeile in J markieren die ausgeweitete Expression von *Tgfbi*, die weißen Pfeilspitzen in L markieren den Verlust von *Col2a1* Expression. CG, cochleärer Gang; PM, periotisches Mesenchym; SG, Spiralganglion.

### 3.2.7 *Sox9KO*-Mäuse zeigen eine deregulierte Zellproliferation in periotischem Mesenchym und otischem Epithel

Die Störung der Windungsmorphogenese und eine gestörte Expansion der mesenchymalen Kompartimente in der Mutante ließen vermuten, dass *Sox9* während der Innenohrentwicklung auf vielfältige Weise an der Regulation von Zellproliferation beteiligt ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde mithilfe eines BrdU-Inkorporationsassays die relative Proliferation mesenchymaler und epithelialer Kompartimente in der *Sox9*-Mutante zum Stadium E12,5 analysiert, einem Zeitpunkt, der vor der Manifestation der schwerwiegenden phänotypischen Veränderungen liegt. Für die Analyse wurden zwei mesenchymale Domänen unter bzw. oberhalb des apikalen cochleären Ganges definiert (Abb. 19A), sowie drei epitheliale Abschnitte (basal, medial und apikal), die zusätzlich jeweils in den prosensorischen und den nicht-sensorischen Bereich unterteilt wurden (Abb. 19A,C).



**Abb. 19: Sox9KO-Mäuse zeigen eine deregulierte Zellproliferation in periotischem Mesenchym und otischem Epithel.** BrdU-Inkorporationsassay für *Sox9*-Mutanten und Kontrollembryonen bei E12,5 (A-E). (A-D) Transversale Schnitte des Innenohrs im apikalen (A,B) und basalen und medialen (C,D) Bereich der Cochlea von Kontroll- (A,C) und *Sox9KO*-Embryonen (B,D). Die ausgewerteten Abschnitte sind durch Nummern gekennzeichnet (periotisches Mesenchym im Bereich des prosensorischen/nicht-sensorischen (1/2) Epithels; prosensorisches/nicht-sensorisches Epithel im apikalen (3/4), medialen (5/6) und basalen (7/8) Bereich des cochleären Ganges). (E) Statistische Auswertung der BrdU-Markierungsindices für das Stadium E12,5. Der BrdU-Markierungsindex entspricht dem Verhältnis aller BrdU positiven Zellkerne zur Gesamtheit aller Zellkerne in einem definierten Abschnitt. Es wurden 3 Embryonen je Genotyp mit jeweils 5 benachbarten Schnitten je Region ausgewertet. Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung verwendet. Die p-Werte wurden mittels beidseitigem Student-t-Test berechnet und signifikante Veränderungen durch einen ( $p < 0,05$ ) bzw. zwei Sterne ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet. Die Proliferation im PM der *Sox9*-Mutante ist reduziert. Die epitheliale Proliferation ist in der Mutante im prosensorischen Epithel erhöht, im basalen, nicht-sensorischen Epithel reduziert (Kontrolle vs. Mutante, (1):  $0,384 \pm 0,014$  vs.  $0,261 \pm 0,018$ ; (2):  $0,384 \pm 0,059$  vs.  $0,25,6 \pm 0,021$ ; (3):  $0,107 \pm 0,031$  vs.  $0,065 \pm 0,019$ ; (4):  $0,204 \pm 0,036$  vs.  $0,292 \pm 0,014$ ; (5):  $0,218 \pm 0,018$  vs.  $0,107 \pm 0,015$ ; (6):  $0,141 \pm 0,065$  vs.  $0,236 \pm 0,081$ ; (7):  $0,434 \pm 0,46$  vs.  $0,337 \pm 0,020$ ; (8):  $0,134 \pm 0,036$  vs.  $0,170 \pm 0,048$ ;  $n=3$ ). CG, cochleärer Gang; PM, periotisches Mesenchym; SG, Spiralganglion.

Die Proliferation in der *Sox9KO*-Maus war im periotischen Mesenchym um 32%, im prosensorischen Epithel um 22% (basal) bzw. 51% (medial) reduziert (Abb. 19E). Im

apikalen, nicht-sensorischen Epithel wurde eine Erhöhung der Proliferation um 43% detektiert. Dies zeigt, dass *Sox9* direkt an der Proliferationsregulation und der korrekten Expansion des frühen mesenchymalen Kompartiments beteiligt ist. Darüberhinaus belegen die Ergebnisse einen von *Sox9* abhängigen Einfluss des periotischen Mesenchyms auf die Proliferation des Epithels des auswachsenden cochleären Ganges. In Verbindung mit der Steigerung der Proliferation im nicht-sensorischen Bereich einerseits und der Reduktion im sensorischen Bereich des Epithels andererseits, deutet dies zusätzlich darauf hin, dass die Asymmetrie des differenzierenden periotischen Mesenchyms eine entscheidende Funktion in der Regulation der Windungsmorphogenese der Cochlea besitzt.

### 3.3 Funktionelle Charakterisierung von *E-Cadherin* in der Entwicklung des Innenohrs

*E-Cadherin* kodiert für ein überwiegend epithelial exprimiertes, transmembranes Calcium-abhängiges Adhäsionsmolekül, das als wichtige Komponente von 'adherens junctions' homophile, interzelluläre Adhäsion vermittelt (Tepass *et al.*, 2000). Der homozygote Verlust von *E-Cadherin* ist embryonal (zum Zeitpunkt der Implantation) letal (Larue *et al.*, 1994). Der konditionelle, postnatale Verlust von *E-Cadherin* in Keratinozyten der Haut führt zu pathologischen Veränderungen dieser Zellen mit Verlust von 'adherens junctions' (Young *et al.*, 2003), die embryonale Ablation in Keratinozyten verhindert die Bildung funktionsfähiger 'tight junctions' und beeinträchtigt die epitheliale Barrierefunktion der Haut (Tunggal *et al.*, 2005).

*E-Cadherin* spielt eine wichtige Rolle in epithelial-mesenchymalen und mesenchymal-epithelialen Transitionen und wurde daher bei Metastasierungen von Tumoren ausführlich untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *E-Cadherin* in diesen Prozessen eine übergeordnete Funktion besitzt. So ist einerseits die Repression der *E-Cadherin* Transkription notwendig zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (Thiery und Sleeman, 2006), auf der anderen Seite ist die Überexpression von *E-Cadherin* in Fibroblasten ausreichend, um diesen Zellen einen epithelialen Phänotyp zu vermitteln (Vanderburg und Hay, 1996).

Im Rahmen der funktionellen Analyse von *Tbx18* wurde *E-Cadherin* (auch *Cdh1*) als ein Gen identifiziert, das in den kondensierenden mesenchymalen Zellen der *Stria vascularis* exprimiert wird (Abb. 11). Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie als epitheliale Basalzellen am Aufbau der *Stria vascularis* teilnehmen (Jin *et al.*, 2007; Sher, 1971), was eine mesenchymal-epitheliale Transition impliziert. Der Verlust der mesenchymalen *E-Cadherin*-

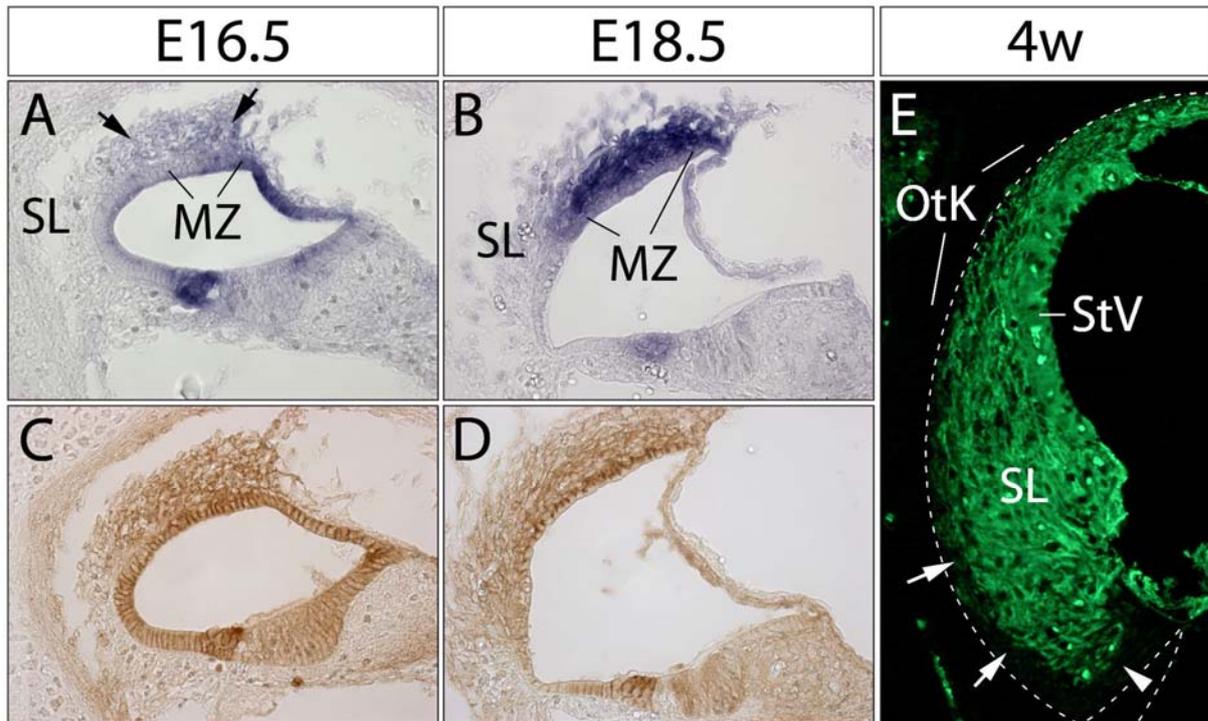
*Expression* im Innenohr der *Tbx18*-Mutante (Abb. 11), legte die Vermutung nahe, dass *E-Cadherin* einen wichtigen Mediator der Funktion von *Tbx18* in diesem Prozess darstellt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression von *E-Cadherin* in der Innenohrentwicklung genau analysiert und mit Hilfe der *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie eine konditionelle, auf das Innenohr bezogen mesenchymspezifische *E-Cadherin*-Verlustmutante generiert und funktionell charakterisiert.

### 3.3.1 *E-Cadherin* wird ab E16, 5 in otischen Fibrozyten exprimiert.

*E-Cadherin* ist während der Ohrentwicklung um E18,5 in den unterhalb der Marginalzellen kondensierenden mesenchymalen Zellen des Spiralligaments exprimiert (Abb. 11). Darüber hinaus wurde eine Expression in den epithelialen Marginal- und Basalzellen der ausgereiften *Stria vascularis* beschrieben (Kitajiri *et al.*, 2004). Um die mesenchymale Verteilung von *E-Cadherin* Transkripten und Proteinen in der Cochlea früherer Embryonalstadien und von adulten Tieren genauer zu charakterisieren erfolgte eine Expressionsanalyse durch RNA *in situ* Hybridisierung und Immunfärbung auf Gewebeschnitten von Wildtypembryonen.

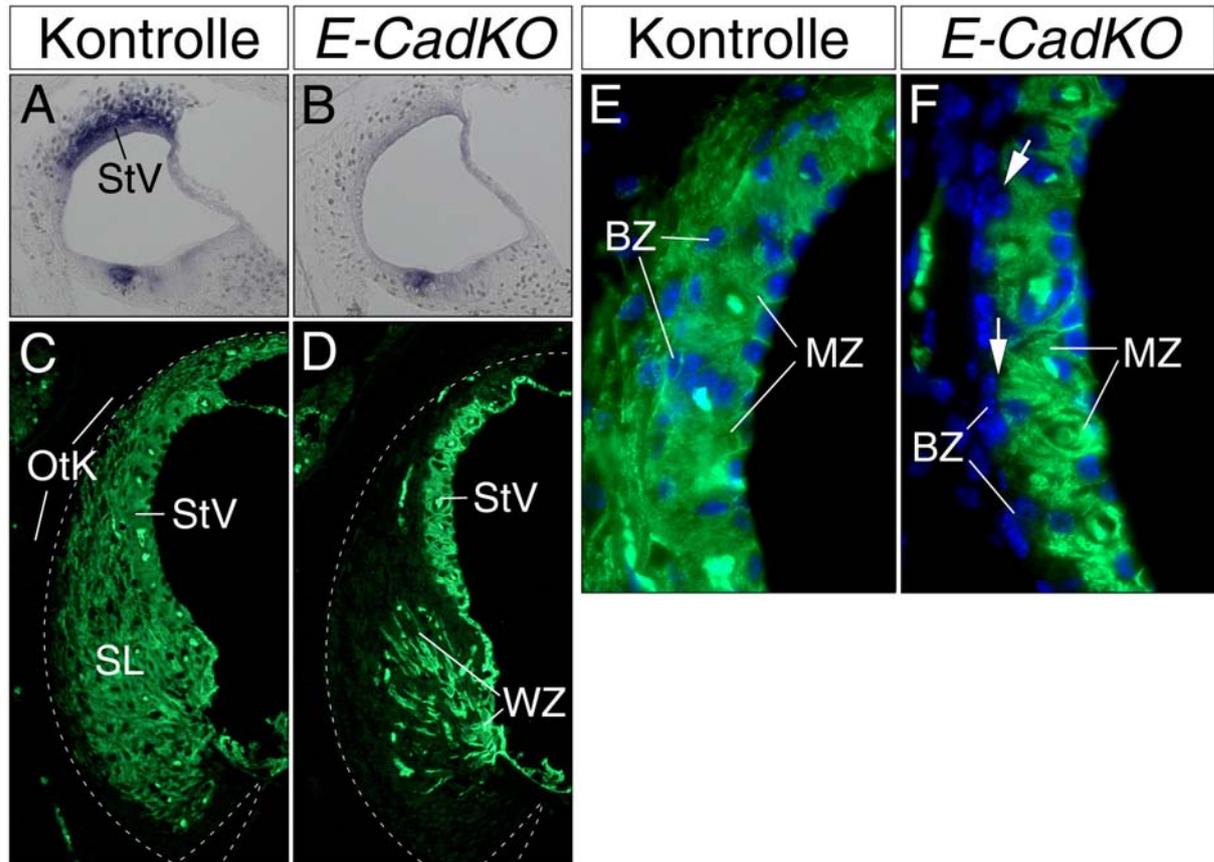
Ab E16,5 wurde *E-Cadherin* mRNA und Protein in mesenchymalen Zellen unterhalb der Marginalzellen detektiert (Abb. 20A,C). Diese Expression geht damit der ab E17,5 beginnenden Kondensation dieser mesenchymaler Zellen voraus, und reflektiert vermutlich den Beginn der *Stria vascularis* Entwicklung. Ab E18,5 war die Expression ausgeweitet, nahm jedoch graduell in Richtung des basalen Spiralligaments ab (Abb. 20B,D). Vier Wochen nach der Geburt wurde *E-Cadherin* Protein mit Ausnahme der Typ III Fibrozyten (Pfeil) und einer Subpopulation der Typ IV Fibrozyten (Pfeilspitze) im gesamten Spiralligament und in allen Zellen der *Stria vascularis* exprimiert (Abb. 20E). Die Ergebnisse zeigen, dass *E-Cadherin* in der Cochlea nicht auf epitheliale Gewebe beschränkt ist, sondern eine breite Expression in mesenchymalen Zellen des sich entwickelnden und ausdifferenzierten Spiralligaments aufweist.



**Abb. 20: *E-Cadherin* wird ab E16,5 in otischen Fibrozyten exprimiert.** Nachweis der *E-Cadherin* Expression durch RNA in situ Hybridisierung (A,B) und Immunfärbung (C-E) in der Cochlea von Wildtypembryonen/-Mäusen. Dargestellt ist die basale Windung der Cochlea. Die untersuchten Stadien sind in der Abbildung angegeben. (A,C) Ab E16,5 wird *E-Cadherin* im kondensierenden Mesenchym unterhalb der Marginalzellen exprimiert. (B,D) Bei E18,5 ist die Expression ausgeweitet, nimmt jedoch graduell in Richtung des basalen Spiralligaments ab. (E) 4 Wochen nach der Geburt ist *E-Cadherin* mit Ausnahme der Typ III Fibrozyten (Pfeil) und einer Subpopulation der Typ IV Fibrozyten (Pfeilspitze) im gesamten Spiralligament und in allen Zellen der *Stria vascularis* exprimiert. Die gestrichelte Linie in E markiert die innere Grenze der otischen Kapsel. MZ, Marginalzellen; SL, Spiralligament; StV, *Stria vascularis*.

### 3.3.2 Konditionelle Inaktivierung von *E-Cadherin* im Spiralligament und strialen Basalzellen der Cochlea

Um die Funktion von *E-Cadherin* im periotischen Mesenchym zu analysieren, wurde mithilfe der *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie eine konditionelle, mesenchymspezifische *E-Cadherin* Verlustmutante des Genotyps *Tbx18<sup>Cre/+</sup>, E-Cadherin<sup>flox/flox</sup>* (*EcadKO*) generiert. *EcadKO*-Mäuse wurden in einem normalen Mendelschen Verhältnis geboren und waren anhand des Körperbaus nicht von Geschwistertieren zu unterscheiden. Eine offensichtliche Störung des Gleichgewichtssinns oder der Verlust des Preyer-Reflexes konnte bei vier Wochen alten Tieren nicht beobachtet werden.



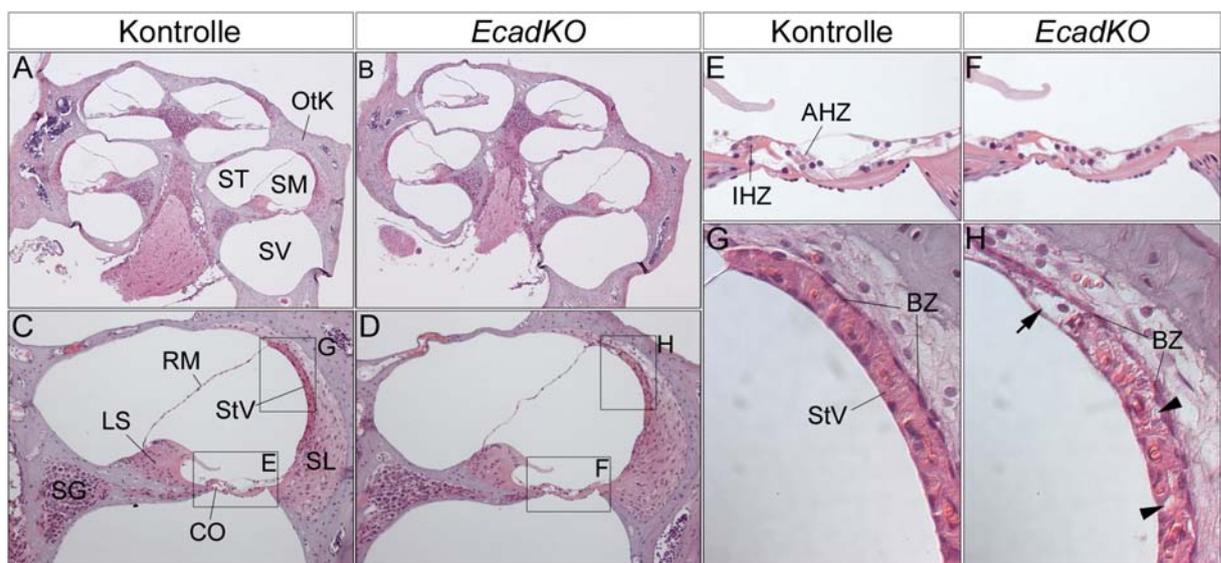
**Abb. 21: Konditionelle Inaktivierung von *E-Cadherin* im Spiralligament.** Nachweis der Expression von *E-Cadherin* mRNA und Protein durch RNA in situ Hybridisierung (A,B) und Immunhistochemie (B-F) in der Cochlea von Wildtyp- (A,C,E) und *Tbx18<sup>Cre/+</sup>, E-Cadherin<sup>flx/flx</sup>*-Mäusen (B,D,F) bei E18,5 und vier Wochen nach der Geburt. Die Abbildungen zeigen die basale Windung des cochleären Ganges. (A-F) Verlust der *E-Cadherin*-Expression in den Fibrozyten des Spiralligaments (B,D) und in den Basalzellen der *Stria vascularis* (F) der *EcadKO*-Maus. Die Linien in C,D markieren die Grenze zwischen Knochenkapsel und otischen Fibrozyten. Der Pfeil in F markiert *E-Cadherin* negative Basalzellen. BZ, Basalzellen; MZ, Marginalzellen; Otk, otische Kapsel; SL, Spiralligament; StV, *Stria vascularis*; WZ, Wurzelzellen.

Die konditionelle Inaktivierung von *E-Cadherin* im Spiralligament der Cochlea wurde durch den Verlust der *E-Cadherin* Expression in mesenchymalen Anteilen des Spiralligaments auf mRNA-Ebene bei E18,5 bestätigt (Abb. 21B). Die epitheliale Expression von *E-Cadherin* war unverändert. Vier Wochen nach der Geburt wurde *E-Cadherin* Protein nur in den epithelialen Wurzelzellen der äußeren Furche und in der *Stria vascularis* detektiert, nicht aber in otischen Fibrozyten (Abb. 21D). Die Basalzellen der *Stria vascularis* zeigten im Gegensatz zu den Marginalzellen ebenfalls einen Verlust der *E-Cadherin* Expression (Abb. 21F).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Linie geeignet ist, die Funktion von *E-Cadherin* in den otischen Fibrozyten und in der *Stria vascularis* zu analysieren und geben darüber hinaus Hinweise darauf, dass die epithelialen, strialen Basalzellen aus den mesenchymalen Vorläufern der otischen Fibrozyten hervorgehen.

### 3.3.3 Partielle Hypoplasie der *Stria vascularis* in *EcadKO*-Mäusen

In vier Wochen alten *E-Cadherin* Mutanten detektierte eine histologische Analyse keine grundlegenden Veränderungen in der Morphologie der Cochlea (Abb. 22B). Das Spiralligament und das Cortische Organ waren normal entwickelt (Abb. 22D,F). Die *Stria vascularis* besaß eine ausgebildete Basalzellschicht, zeigte jedoch Anzeichen einer Hypoplasie und wies im Bereich der Reissner-Membran große intrastriale Hohlräume (Pfeile in Abb. 22H) und fehdifferenzierte Marginalzellen (Pfeilspitzen in Abb. 22H) auf. Die Stärke der phänotypischen Veränderungen nahm graduell in Richtung der *Prominentia spiralis* und in Richtung Apex des cochleären Ganges ab.



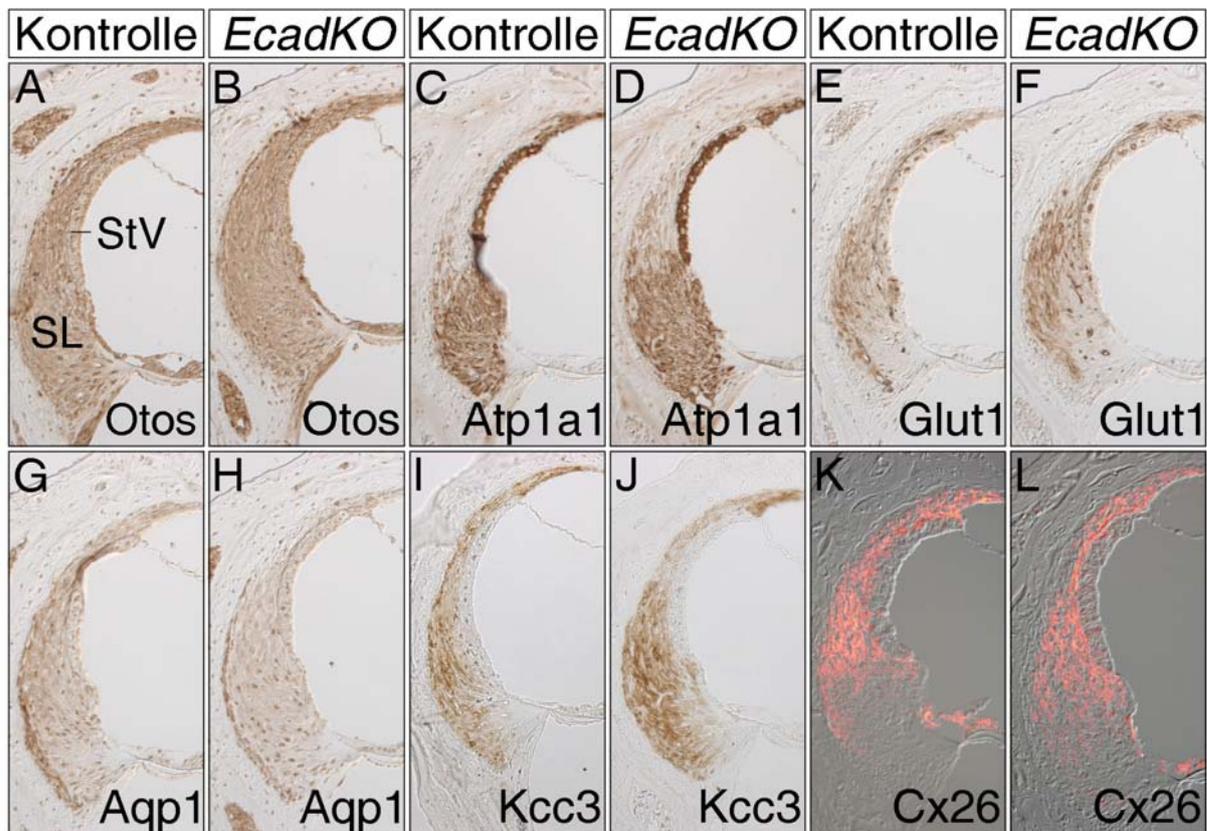
**Abb. 22: Partielle Hypoplasie der *Stria vascularis* in *EcadKO*-Mäusen.** (A-G) Histologische Analyse der Cochlea von Kontrolltieren (A,C,E,G) und *EcadKO* Mäusen (B,D,F,H) 4 Wochen nach der Geburt durch HE-Färbung von midmodiularen Schnitten. Vergrößerte Bereiche sind durch Rechtecke gekennzeichnet. Die Cochlea der Mutante weicht im Aufbau nicht vom Wildtyp ab (A-D), das Spiralligament ist normal entwickelt (C,D) und das Cortische Organ ist unverändert (E,F). (G,H) Die *Stria vascularis* der Mutante ist hypoplastisch und weist im Bereich der Reissner-Membran große intrastriale Hohlräume (Pfeile in H) und fehdifferenzierte Marginalzellen (Pfeilspitzen in H) auf. Die Stärke der phänotypischen Veränderungen nimmt graduell in Richtung der *Prominentia spiralis* und in Richtung Apex des cochleären Ganges ab. AHZ, äußere Haarzellen; BZ, Basalzellen; CO, Corti-Organ; IHZ, innere Haarzellen; OtK, otische Kapsel; RM, Reissnermembran; SL, Spiralligament; SG, Spiralganglion; SM, *Scala media*; ST, *Scala tympani*; StV, *Stria vascularis*; SV, *Scala vestibuli*.

Subtile Veränderungen im Aufbau der Fibrozyten des Spiralligaments der *EcadKO*-Maus konnten zwar aufgrund der histologischen Befunde nicht ausgeschlossen werden, jedoch belegten die Ergebnisse, dass der Verlust von *E-Cadherin* primär die Entwicklung der *Stria vascularis* beeinträchtigt.

### 3.3.4 *EcadKO*-Mäuse weisen eine normale Fibrozytendifferenzierung auf

Um die Auswirkungen des Verlusts der *E-Cadherin* Expression in den mesenchymalen Zellen des Spiralligaments genauer zu untersuchen, wurde die Verteilung von Fibrozytendifferenzierungsmarkern in drei Wochen alten Mutanten immunhistochemisch analysiert.

Die immunhistochemische Detektion von *Otos*, *Atp1a1*, *Glut*, *Aqp1*, *Kcc3* und *Cx26* zeigte jedoch keine Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp und *E-Cadherin*-Mutante (Abb. 23). Damit scheint *E-Cadherin* keine offensichtliche Funktion in der Differenzierung der otischen Fibrozyten zu besitzen.



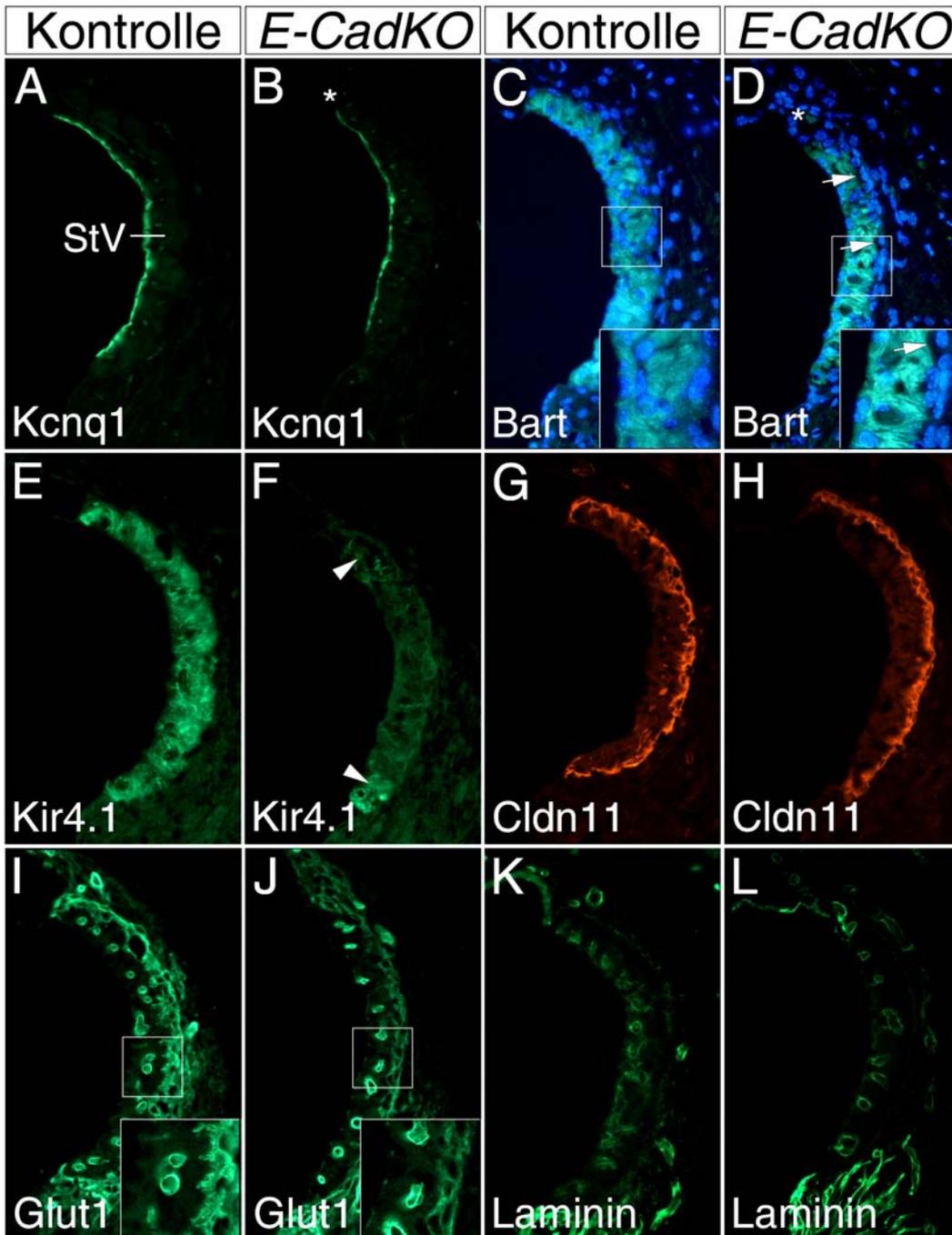
**Abb. 23: *EcadKO*-Mäuse weisen eine normale Fibrozytendifferenzierung auf.** (A-L) Detektion von Fibrozyten-Markern durch Immunhistochemie (A-J) und Immunfluoreszenz (K,L) auf midmodiolaren Schnitten der Cochlea von Kontrolltieren und *EcadKO*-Mäusen 4 Wochen nach der Geburt. Die Abbildungen zeigen die seitliche Wand in der basalen Windung. Die verwendeten Antikörper sind in der Abbildung angegeben. (K,L) Überlagerung von Immunfluoreszenz und Durchlichtmikroskopie (DIC-Optik).

### 3.3.5 *EcadKO*-Mäuse zeigen Veränderungen in der *Stria vascularis*

Die histologische Analyse der *Tbx18<sup>Cre/+</sup>,E-Cadherin<sup>flox/flox</sup>*-Maus zeigte eine Hypoplasie der *Stria vascularis*. Um diese Veränderungen detailliert zu charakterisieren, wurde die Verteilung *Stria vascularis* spezifischer Differenzierungsmarker in vier Wochen alten *EcadKO*- Mäusen durch Immunfluoreszenz untersucht.

Die normale Lokalisierung von Kcnq1 und Barrtin in der apikalen bzw. basolateralen Zelloberfläche der Marginalzellen der Mutante (Abb. 24B,D) belegten die ungestörte Differenzierung von Marginalzellen mit etablierter apikobasaler Polarität. Die basolateralen Zellprojektionen reichten jedoch größtenteils nicht bis an die Zellkerne der Basalzellschicht heran (Pfeile in Abb. 24D). In den abgeflachten epithelialen Marginalzellen im Bereich der Reissner-Membran wurde dagegen weder Kcnq1 noch Barrtin detektiert (Sternchen in Abb. 24B,D). Die Expression von Kir4.1 (*Kcnj10*) wurde in der *Stria vascularis* der Mutante nur im Bereich der *Prominentia spiralis* und der Reissner-Membran detektiert (Pfeilspitzen in Abb. 24F), was einen Verlust oder eine Fehldifferenzierung der Intermedialzellen anzeigt. Die Expression von *Cldn11* und *Glut1* in der Mutante belegte die Präsenz von Basalzellen (Abb. 24H,J). Allerdings zeigten diese in der *EcadKO*-Maus einen Verlust zytoplasmatischer Zellfortsätze (Abb. 24J), was zum einen auf einen Differenzierungsdefekt hinweist, zum anderen zeigt, dass normal differenzierte Basalzellen der *Stria vascularis* über eine ausgeprägte (apikobasale) Polarität verfügen. Die im Vergleich zur Kontrollsituation unveränderte Expression von Laminin belegte die korrekte Degradation der Basallamina (Abb. 24L).

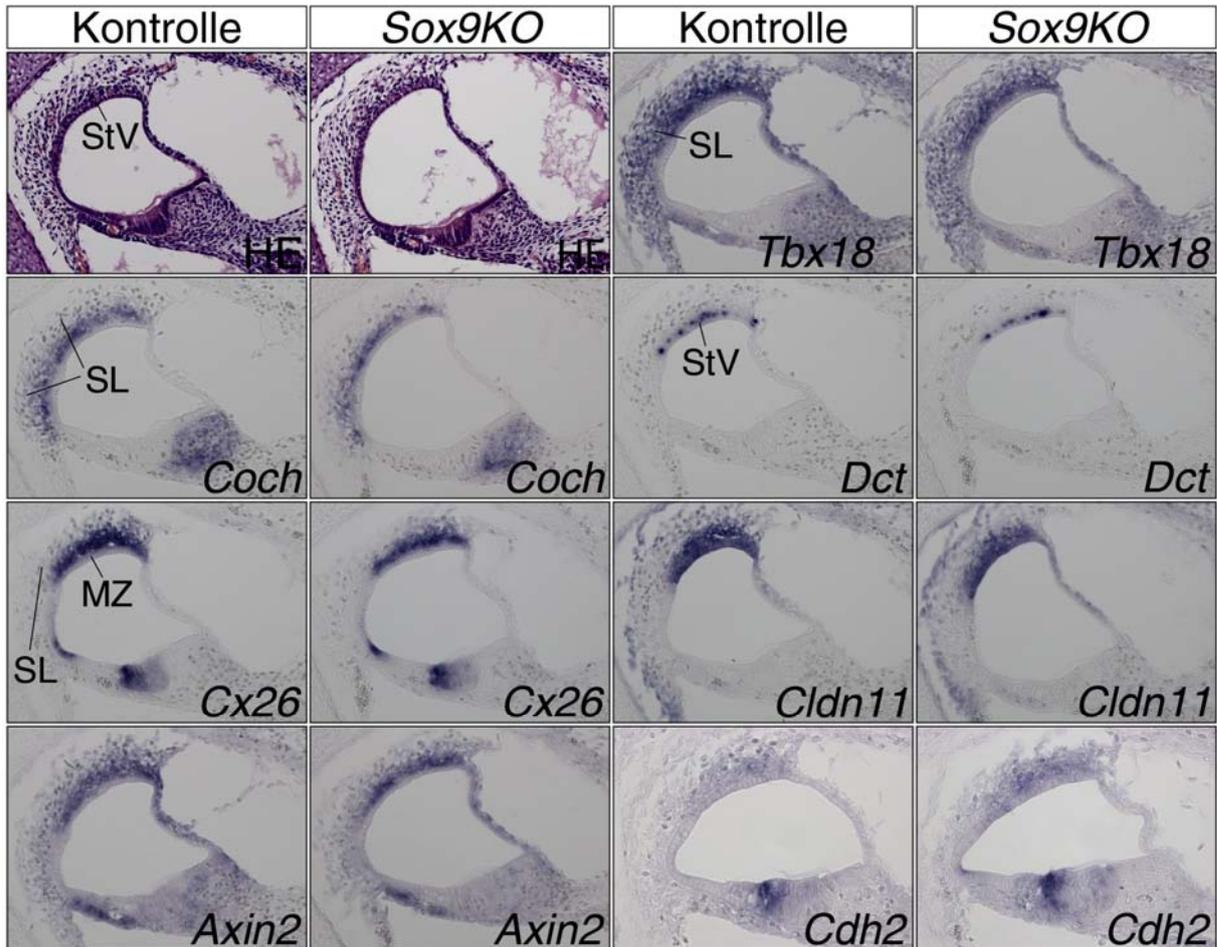
Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine veränderte zelluläre Architektur der *Stria vascularis* von *EcadKO*-Mäusen, die sich durch den fast vollständigen Verlust von Intermedialzellen und die gestörte Differenzierung von Basalzellen äußert. Darüberhinaus deutete das veränderte Auswachsen zytoplasmatischer Projektionen der Marginalzellen in Verbindung mit dem Verlust der Zellfortsätze von Basalzellen auf eine gestörte Adhäsion zwischen Marginal- und Basalzellen hin.



**Abb. 24: *EcadKO* Mäuse weisen Fehlbildungen in der *Stria vascularis* auf.** (A-L) Detektion von strialen Proteinen durch Immunfluoreszenz auf midmodiolarer Schnitten der Cochlea von Kontrolltieren und *EcadKO* Mäusen vier Wochen nach der Geburt. Die Abbildungen zeigen die *Stria vascularis* in der basalen Windung. Die verwendeten Antikörper gegen Proteine der Marginal-, Intermedial- und Basalzellen sowie der Basallamina sind in der Abbildung angegeben. (C-D) Immunfluoreszenz auf DAPI gegengefärbten Schnitten. Vergrößerte Abschnitte sind durch Rechtecke hervorgehoben. (A,D) Die Marginalzellen sind ausdifferenziert und weisen eine apikobasale Polarität auf. Die zytoplasmatischen Fortsätze reichen größtenteils nicht bis zu an die Zellkerne der Basalzellschicht heran (Pfeile in D). (E,F) Verlust von Intermedialzellen in der Mutante. (G-J) Basalzellen sind in *EcadKO*-Maus vorhanden, bilden aber keine zytoplasmatischen Fortsätze (Pfeilspitzen in G,H) (K,L) Normale Degradation der Basallamina. StV, *Stria vascularis*

### 3.3.6 *E-Cadherin* besitzt eine späte Funktion in der Entwicklung der *Stria vascularis*

Um zu untersuchen, ob die postnatalen strialen Defekte sich auf gestörte Prozesse in der embryonalen Entwicklung zurückführen lassen, wurde die Histologie und Expression verschiedener strialer Differenzierungsmarker in der *E-Cadherin* Mutante bei E18,5 untersucht.



**Abb. 25: *E-Cadherin* besitzt eine späte Funktion in der Entwicklung des Mesenchyms der seitlichen Wand** (A-R) Untersuchung der Histologie durch HE-Färbung (A,B) und Analyse mesenchymaler Differenzierungsmarker durch RNA in situ Hybridisierung (C-R) auf sagittalen Schnitten von Kontroll- und *EcadKO*-Embryonen des Stadiums E18,5. Die Abbildungen zeigen den basalen Abschnitt des cochleären Gangs. Die verwendeten RNA-Sonden sind in der Abb. angegeben. SL, Spirallimbus; StV, *Stria vascularis*

Bei E18,5 konnten keine histologischen Unterschiede in der *E-Cadherin* Mutante detektiert werden (Abb. 25B). Die normale Expression von *Tbx18* und *Coch* im Spiralligament belegte die Präsenz normal differenzierter otischer Fibrozyten (Abb. 25D,F). Die Expression von *Dct* in prospektiven Intermedialzellen und von *Cx26*, *Claudin11* und *Axin2* in kondensierenden mesenchymalen Zellen unterhalb der Marginalzellen war unverändert (Abb. 25G-N).

Aufgrund einer möglichen funktionellen Redundanz von *E-Cadherin* mit anderen klassischen Cadherinen wurde die Expression von *N-Cadherin* untersucht. *N-Cadherin* zeigte in kondensierenden mesenchymalen Zellen unterhalb der Marginalzellen eine Koexpression mit *E-Cadherin*, die Expressionsstärke war jedoch gering (Abb. 25O). In der Mutante erschien die Expression erhöht (Abb. 25P).

Der Verlust von *E-Cadherin* hat somit keine detektierbare Veränderung in der Entwicklung der otischen Fibrozyten und prospektiven Basalzellen zur Folge. Dies deutet damit entweder auf funktionelle Redundanz mit anderen klassischen Cadherinen oder aber eine ausschließlich späte Funktion von *E-Cadherin* in der Entwicklung der *Stria vascularis*.

### **3.4 Identifikation von Genen mit potentieller Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms**

Diese Arbeit zeigte, dass *Tbx18* eine wichtige Funktion für die Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms besitzt. *Tbx18*-Defizienz führt zu Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten sowie einer gestörten Differenzierung der strialen Basalzellen. Die *Tbx18*-Mutante bot damit einen guten Ausgangspunkt für die Identifizierung weiterer Faktoren, die an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind und möglicherweise als Zielgene von *Tbx18* dessen Funktion vermitteln. Mithilfe der DNA-Microarray-Technologie wurden deshalb Genexpressionsprofile isolierter Innenohren von *Tbx18*<sup>Gfp/LacZ</sup>-Mutanten und Kontrollembryonen der Stadien E13.5 (n=15) und E18.5 (n=15) erstellt. Um einen Einfluss der *Gfp*-Reportergenexpression zu minimieren, wurden als Kontrollen phänotypisch normale *Tbx18*<sup>Gfp/+</sup>-Embryonen verwendet.

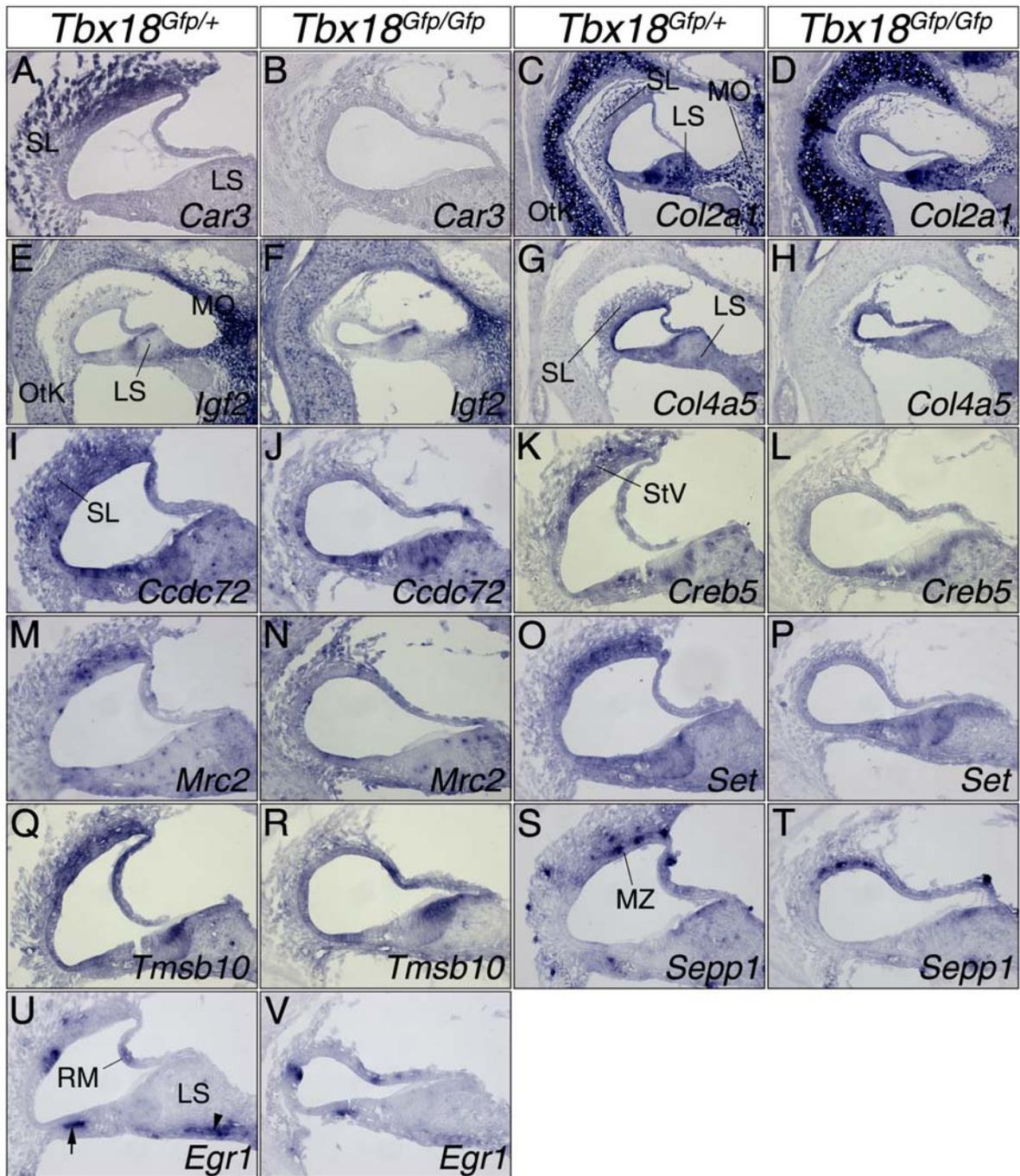
Insgesamt wurden im Stadium E18,5 40 deregulierte Gene identifiziert, davon 11 mit einer mindestens zweifach erhöhten und 29 mit einer mindestens um den Faktor zwei erniedrigten relativen Expressionsstärke. Für das Stadium E13,5 wurden 325 deregulierte Gene identifiziert, davon 6 mit gesteigerter und 319 mit erniedrigter relativer Expressionsstärke. Zusätzlich wurde für beide Stadien eine Auswahl weiterer Gene als Kandidaten in Betracht gezogen, deren relative Expressionsstärke um den Faktor 1,5 verändert war. Identifizierte Gene, deren otisch-mesenchymale Expression bereits durch eine Expressionsanalyse mittels RNA *in situ* Hybridisierung validiert wurde (Abb. 26, Abb. 27), sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die vollständige Auflistung siehe Anhang A.

**Tabelle 5: Identifizierte und validierte Gene mit deregulierter Expression in *Tbx18*-Mutanten.**

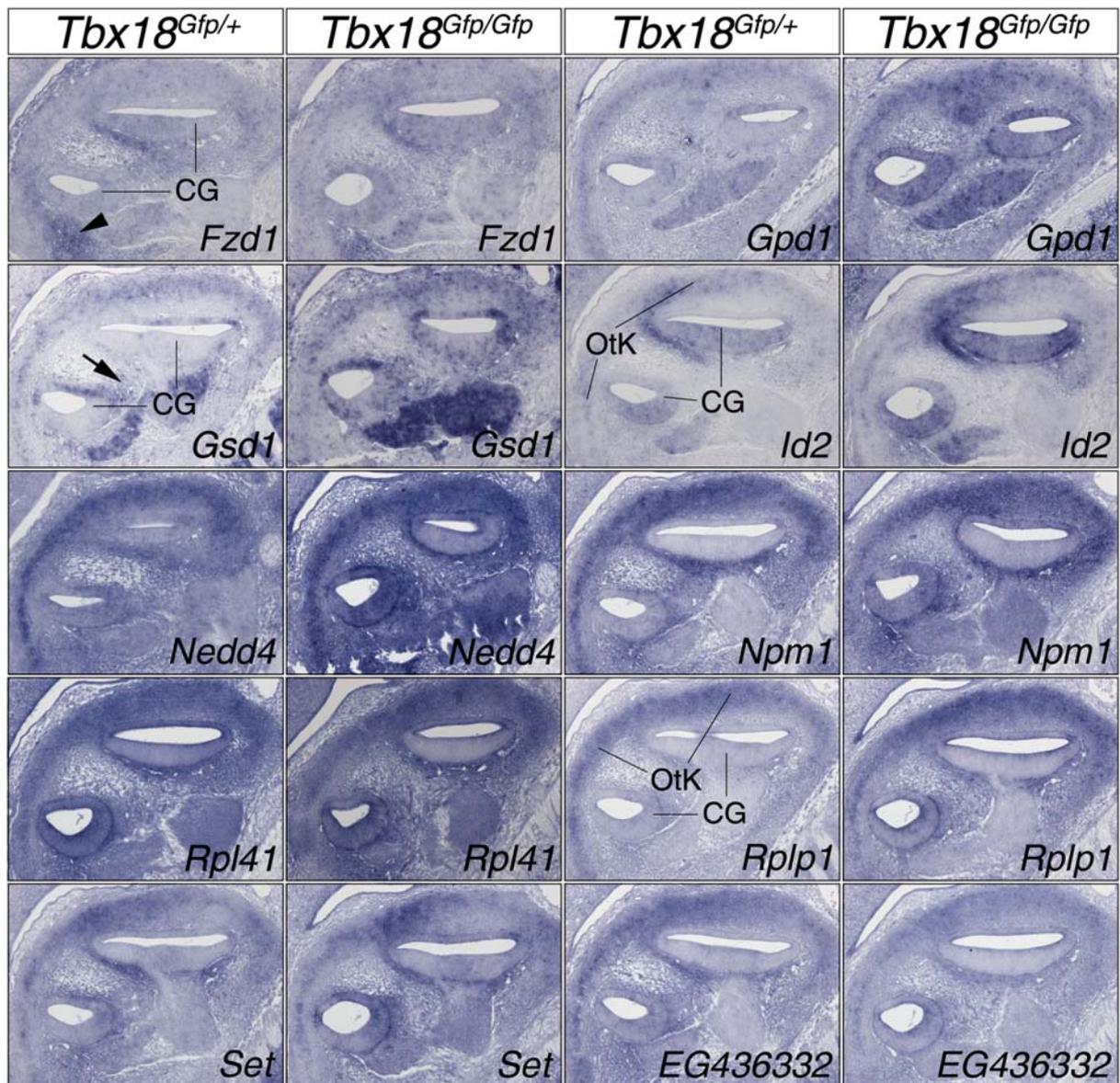
Gen	Gen Symbol	Gen Identifikationsnummer Genbank	MGI	Prozeß/Funktion	Ratio E13,5	Ratio E18,5
cAMP responsive element binding protein 5	<i>Creb5</i>	NM_172728	MGI:2443973	Transkription	<b>0,67</b>	<b>0,45</b>
Carbonic anhydrase 3	<i>Car3</i>	NM_007606	MGI:88270	Säure-Base-Homöostase	0,79	<b>0,41</b>
Coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)	<i>Coch</i>	NM_007728	MGI:1278313	EZM/unbekannt	<b>0,55</b>	<b>0,23</b>
Coiled-coil domain containing 72	<i>Ccdc72</i>	NM_183250	MGI:1913417	unbekannt	0,80	0,72
Collagen, type II, alpha 1	<i>Col2a1</i>	NM_031163	MGI:88452	EZM/Struktur	1,13	<b>3,42</b>
Collagen, type IV, alpha 4	<i>Col4a5</i>	NM_007736	MGI:88456	EZM/Struktur	<b>0,44</b>	0,76
Early growth response 1	<i>Egr1</i>	NM_007913	MGI:95295	Transkription	0,74	<b>2,12</b>
Frizzled homolog 1 (Drosophila)	<i>Fzd1</i>	NM_021457	MGI:1196625	Signaltransduktion	<b>0,48</b>	0,79
Gasdermin A	<i>Gsdma</i>	NM_021347	MGI:1889509	unbekannt	<b>0,15</b>	1,10
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	<i>Gpd1</i>	NM_010271	MGI:95679	Kohlenhydratmetabolismus	1,15	<b>0,40</b>
Inhibitor of DNA binding 2	<i>Id2</i>	NM_010496	MGI:96397	Transkription	<b>0,58</b>	0,78
Insulin-like growth factor 2	<i>Igf2</i>	NM_010514	MGI:96434	Signalmolekül	1,19	<b>1,87</b>
Mannose receptor, C type 2	<i>Mrc2</i>	AK129195	MGI:107818	Endozytose	1,21	<b>0,11</b>
Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	<i>Nedd4</i>	NM_010890	MGI:97297	Proteinkatabolismus	<b>2,31</b>	<b>1,56</b>
Nucleophosmin 1	<i>Npm1</i>	NM_008722	MGI:106184	Translation	<b>0,48</b>	0,74
Ribosomal protein L41	<i>Rpl41</i>	NM_018860	MGI:1915195	Translation	<b>2,04</b>	1,49
Ribosomal protein, large, P1	<i>Rplp1</i>	NM_018853	MGI:1927099	Translation	<b>2,08</b>	1,47
SET translocation	<i>Set</i>	NM_023871	MGI:1860267	Nucleosomenbildung	<b>0,33</b>	<b>0,48</b>
Tmsb10	<i>Tmsb10</i>	NM_025284	MGI:109146	Zytoskelettmodifikation	0,94	<b>0,63</b>

Die Expression von *Coch* wurde bereits beschrieben (Abb. 12). *Car3* und *Col2a1* wurden im Rahmen der funktionellen *Sox9*-Analyse als Differenzierungsmarker verwendet. *Car3* zeigte eine differentielle Expression in den Fibrozyten des Spiralligaments (Abb. 26A). In der Mutante war es nicht exprimiert. *Col2a1*, das in der otischen Kapsel und in otischen Fibrozyten exprimiert ist, zeigte keine qualitativ veränderte Expression in der *Tbx18*-Mutante (Abb. 26C,D). *Igf2* wies eine starke Expression in den mesenchymalen Zellen des Modiolus und eine schwächere Expression in der otischen Kapsel, der daran angrenzenden Fibrozytenschicht sowie dem basalen Spiralligament auf. In der Mutante zeigte sich eine Ausweitung der Expression von den distalen in die proximalen Bereiche des Spiralligaments (Abb. 26E,F). *Col4a5* war in Wildtyp und Mutante in allen otischen Fibrozyten exprimiert (Abb. 26G,H). *Ccdc72* war nur im Wildtyp spezifisch in Fibrozyten des apikalen Spiralligaments exprimiert (Abb. 26I,J). Die Gene *Creb5*, *Mrc2*, *Set* und *Tmsb10* zeigten eine spezifische Expression im kondensierenden Mesenchym im Bereich der sich entwickelnden *Stria vascularis*. In der *Tbx18KO* konnte keine Expression dieser Gene detektiert werden (Abb. 26K-R). *Sepp1* war in vereinzelt, über das gesamte innere Kompartiment der Cochlea verteilten Zellen exprimiert, bei denen es sich vermutlich um Neuralleistenzellen handelt. Abgesehen vom Bereich der sich entwickelnden *Stria vascularis* war die Zahl dieser Zellen in der *Tbx18*-Mutante reduziert (Abb. 26S,T). *Egr1* wies eine spezifische Expression in den mesenchymalen Zellen unterhalb des *Limbus spiralis* und in einer kleinen Zellpopulation unterhalb der prospektiven Hensen- und Claudiuszellen auf. Die Expression wies in der

Mutante keine qualitativen Unterschiede auf, war jedoch im Vergleich zur Kontrollsituation abgeschwächt (Abb. 26U,V).



**Abb. 26: Validierung der Microarraydaten.** Nachweis differentieller Genexpression durch RNA in situ Hybridisierungsanalyse (A,V) in der Cochlea von Wildtyp- und *Tbx18*-mutanten Embryonen des Stadiums E18,5. Dargestellt ist die basale Windung der Cochlea. Verwendete Sonden und Genotypen sind in der Abb. angegeben. SL, Spiralligament; LS, *Limbus spiralis*; MO, Modiolus; RM, Reissner-Membran; MZ, Marginalzellen; StV, *Stria vascularis*; Otk, otische Kapsel.



**Abb. 27: Validierung der Microarraydaten.** Nachweis differentieller Genexpression durch RNA in situ Hybridisierungsanalyse (A,T) in der Cochlea von Wildtyp- und *Tbx18* mutanten Embryonen des Stadiums E13,5. Verwendete Sonden und Genotypen sind in der Abb. angegeben. CG, cochleärer Gang; OtK, otische Kapsel.

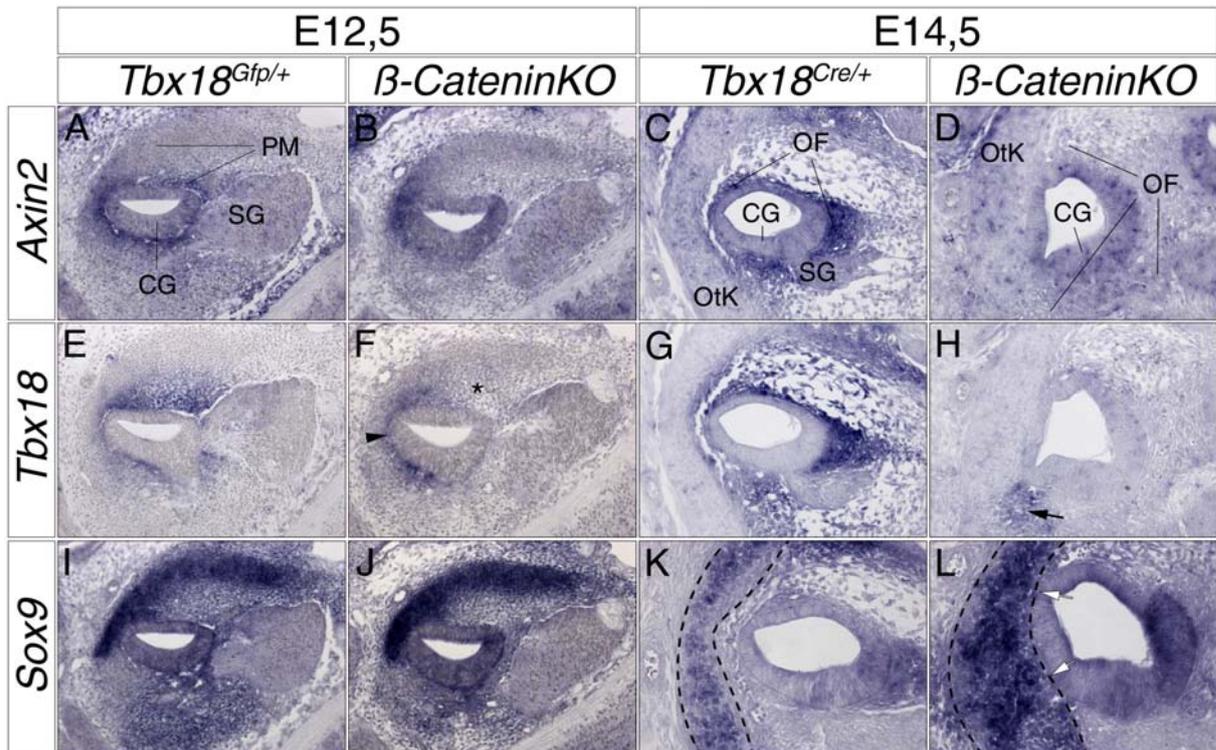
Bei E13,5 war *Fzd1* im periotischen Mesenchym im Bereich des apikalen und basalen cochleären Ganges exprimiert (Abb. 27A,B). *Gpd1* und *Gsdm1* wurde in der prospektiven otischen Kapsel und *Gsdm1* zusätzlich im zentralen periotischen Mesenchym gefunden (Abb. 27C-F). Die Gene *Id2*, *Rplp1*, *Set*, *Rpl41*, *Npm1* und *Nedd4* und das vorhergesagte Gen *EG436332* zeigten eine differentielle Expression in der prospektiven otischen Kapsel und im periotischen Mesenchym im Bereich des apikalen cochleären Ganges (Abb. 27G-T). Die Expression aller bei E13,5 validierten Gene war in der *Tbx18* mutanten Embryonen qualitativ unverändert.

Insgesamt wurden durch den gewählten Versuchsansatz bisher 19 Gene mit differentieller periotischer Expression identifiziert, die möglicherweise an Musterungs- und Differenzierungsprozessen im periotischen Mesenchym beteiligt sind und zusätzlich als molekulare Differenzierungsmarker in zukünftigen Experimenten Verwendung finden könnten.

### 3.5 $\beta$ -Catenin ist notwendig für die Aufrechterhaltung der *Tbx18*

#### Expression im periotischen Mesenchym

Geweberekombinationsexperimente zeigten, dass das Epithel des cochleären Ganges notwendig für die Induktion des periotischen Mesenchyms ist und über reziproke epithelial-mesenchymale Wechselwirkung an der Differenzierung der verknöcherten otischen Kapsel beteiligt ist (McPhee und Van de Water, 1986). Die dosisabhängige und stadienspezifische Wirkung einiger bereits identifizierter epithelialer Signalmoleküle legte darüber hinaus nahe, dass diese Signalfaktoren über die Generierung von Aktivitätsgradienten innerhalb des periotischen Mesenchyms an der Musterung dieses Gewebes beteiligt sein könnten (Frenz *et al.*, 1992). Für den kanonischen *Wnt*-Signalweg wurde eine Beteiligung an ähnlichen epithelial-mesenchymalen Wechselwirkungen in der Entwicklung anderer Organsysteme beschrieben (Rajagopal *et al.*, 2008; Geetha-Loganathan *et al.*, 2008). Im Zentrum dieses Signalwegs steht der konstitutiv exprimierte transkriptionelle Co-Aktivatoren  $\beta$ -Catenin, dessen schnelle Degradation durch die Interaktion von sekretierten *Wnt*-Liganden mit Zelloberflächenrezeptoren der *Frizzled*-Familie verhindert wird. Um zu überprüfen, ob der kanonische *Wnt*-Signalweg eine Funktion in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms besitzt, wurde eine konditionelle  $\beta$ -Catenin-Mutante (*Tbx18*<sup>Cre/+</sup>,  $\beta$ -Catenin<sup>flox/flox</sup>) generiert und phänotypisch untersucht. Die initiale Analyse zeigte Veränderungen in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms, die Aspekte des *Tbx18*KO-Phänotyps rekapitulieren (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass *Tbx18* möglicherweise durch den kanonischen *Wnt*-Signalweg reguliert werden könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine vergleichende Analyse der Expression von *Tbx18* und *Axin2*, dessen Expression eine starke Aktivität des  $\beta$ -Catenin-abhängigen *Wnt* Signalweges reflektiert, auf Gewebeschnitten von *Tbx18*-heterozygoten Kontrolltieren (*Tbx18*<sup>Gfp/+</sup> und *Tbx18*<sup>Cre/+</sup>) und  $\beta$ -CateninKO-Embryonen der Stadien E12,5 und E14,5 durchgeführt. Als molekularer Marker für die (prospektive) otische Kapsel wurde zusätzlich *Sox9* verwendet.



**Abb. 28: *β-Catenin* ist notwendig für die Aufrechterhaltung der periotischen Expression von *Tbx18*.** Vergleichende Analyse der Expression von *Axin2* (A-D), *Tbx18* (E-H) und *Sox9* (I-L) durch RNA in situ Hybridisierungsanalyse (C-N) auf sagittalen Schnitten von Kontroll-(A,C,E,G) und *β-Catenin*KO (B,D,F,H)-Embryonen der Stadien E12,5 und E14,5. (A-D) *Axin2*-Expression reflektiert die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs im periotischen Mesenchym bei E12,5 (A) und Vorläufern der otischen Fibrozyten bei E14,5 (C) und dessen Verlust in *β-Catenin*KO-Embryonen (B,D). (E,H) Die Expression von *Tbx18* wird in *β-Catenin*KO-Embryonen nicht aufrechterhalten. (K-L) Die Expressionsdomäne von *Sox9* ist ausgedehnt bzw. die otische Kapsel ist zu Lasten der Fibrozyten ausgeweitet (weißer Pfeile in L). Pfeilspitze und Sternchen in F markieren *Tbx18* Expression im periotischen Mesenchym lateral des cochleären Ganges bzw. den Verlust der *Tbx18* Expression im zentralen periotischen Mesenchym. Der Pfeil in H markiert *Tbx18*-exprimierende Zellen in der basalen Windung des cochleären Ganges. Die gestrichelten Linien in K,L markieren die Grenzen der otischen Kapsel. CG, cochleärer Gang; OF, otische Fibrozyten; OtK, otische Kapsel; PM, periotisches Mesenchym; SG, Spiralganglion

Bei E12,5 zeigte *Axin2* eine starke Expression in epithelnahen Abschnitten des periotischen Mesenchyms (Abb. 28A), was auf einen epithelialen Ursprung der/des aktivierenden *Wnt*-Liganden hinweist. Bei E14,5 wurde *Axin2* in den Vorläufern der otischen Fibrozyten exprimiert (Abb. 28C). In der *β-Catenin*KO Maus war *Axin2* in periotischem Mesenchym oder otischen Fibrozyten, abgesehen von einer kleiner Domäne im äußeren Kompartiment lateral des cochleären Ganges bei E12,5 nicht exprimiert (Abb. 28B,D). Dies reflektierte einerseits den Verlust der Aktivität des kanonischen *Wnt*-Signalwegs im Mesenchym der Cochlea, andererseits wies es auf einen lokalen von *β-Catenin* unabhängigen Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle von *Axin2* hin. Die mesenchymale Expression von *Tbx18* war

---

in der  $\beta$ -Catenin Mutante bei E12,5 deutlich reduziert (Sternchen in Abb. 28F). Bei E14,5 war sie auf eine kleine Domäne unterhalb des cochleären Ganges beschränkt (Pfeil in Abb. 28H). Die Expression von *Sox9* war bei E12,5 unverändert. Bei E14,5 war die Expressionsdomäne bis an das Epithel des cochleären Ganges ausgedehnt und zeigte eine deutliche Ausweitung der *Sox9* exprimierenden otischen Kapsel zu Lasten der otischen Fibrozyten.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der  $\beta$ -Catenin-abhängige *Wnt*-Signalweg notwendig für die Aufrechterhaltung der *Tbx18* Expression ist und eine Funktion in der Musterung und/oder Differenzierung des periotischen Mesenchyms besitzt.

## 4. Diskussion

Die Etablierung und Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials als Voraussetzung für den Hörprozess hängt von der strukturellen und funktionellen Integrität der otischen Fibrozyten des Spiralligaments und der *Stria vascularis* ab. Diese Arbeit zeigt, dass der T-Box-Transkriptionsfaktor *Tbx18*, der HMG-Box-Transkriptionsfaktor *Sox9* und das Zelladhäsionsprotein *E-Cadherin* funktionell an der Kompartimentierung des periotischen Mesenchyms, der Differenzierung von otischer Knochenkapsel und otischen Fibrozyten und der Entwicklung der *Stria vascularis* beteiligt sind.

Darüberhinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die normale Entwicklung des mesenchymalen Innenohranteils die Konsequenz einer präzisen Koordination verschiedener Prozesse wie initialer Aggregation und Musterung des periotischen Mesenchyms, Aufrechterhaltung mesenchymaler Kompartimentsgrenzen, Musterung und Expansion mesenchymaler Subkompartimente sowie der Spezifizierung und Differenzierung einer Vielzahl verschiedener Zelltypen darstellt.

### 4.1 Die Funktion von *Tbx18* in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms

Die frühe radial beschränkte Expression von *Tbx18* zeigt, dass das periotische Mesenchym bereits kurz nach der mesenchymalen Aggregation um das otische Vesikel regionalisiert wird (vgl. Ficker *et al.*, 2004). Aufgrund der Expression von *Tbx18* im kranialen Mesenchym, konnte die *Tbx18<sup>Cre</sup>*-Mauslinie nicht verwendet werden, um eine genetische Schicksalskartierung der *Tbx18* exprimierenden Zellen des inneren Kompartiments durchzuführen. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass *Tbx18* ab E12,5 prospektive otische Fibrozyten markiert. Hinweis dafür ist die komplementäre Expression von *Tbx18* und des chondrogenen Differenzierungsmarkers *Sox9*, der ab E12,5 auf das äußere Kompartiment beschränkt wird, aus dem die otischen Kapsel hervorgeht. Darüberhinaus zeigte eine Kurzzeitschicksalskartierung unter Verwendung des *LacZ*-Reportergens aus dem *Tbx18<sup>LacZ</sup>*-Allel eine frühe Beschränkung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität auf das innere Kompartiment des periotischen Mesenchyms.

Die frühe Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx18* im sich entwickelnden Innenohr legt eine Funktion in der Musterung des periotischen Mesenchyms in otische Kapsel vs. Fibrozyten und/oder in der Spezifikation/Differenzierung otischer Fibrozyten nahe.

Die schwerwiegende Störung in der Differenzierung otischer Fibrozyten in distinkte Subtypen im Spiralligament der *Tbx18*-Mutante spricht für eine Funktion in der Differenzierung otischer Fibrozyten. Aus folgenden Gründen erscheint es aber wahrscheinlicher, dass die späten Differenzierungsstörungen durch den Verlust einer frühen Funktion von *Tbx18* in der Musterung und Kompartimentierung ausgelöst werden.

Zum einen zeigt der Verlust der Fibrozytentypen I, III und V, dass primär die Fibrozytenpopulationen betroffen sind, die an die otische Kapsel angrenzen, obwohl *Tbx18* im Spiralligament homogen exprimiert wird. Zum anderen kommt es zum Verlust der Beschränkung *Tbx18* exprimierender Zellen auf das innere Kompartiment in der *Tbx18*-Mutante ab E12,5 und dem Fehlen einer ausgeprägten Grenze zwischen otischer Kapsel und Spiralligament bei E18,5. In Verbindung mit den histologischen Veränderung der Fibrozyten, der ektopischen *Postn* Expression und dem Verlust der Expression von *Cx26* und *Coch* im proximalen Spiralligament deutet dies auf eine Beeinträchtigung in der radialen Musterung des periotischen Mesenchyms und eine Störung in der Aufrechterhaltung der Grenze zwischen den beiden Kompartimenten, aus denen otische Kapsel bzw. otische Fibrozyten hervorgehen. Die Störung der Fibrozytendifferenzierung wäre damit auf eine indirekte durch den Verlust von *Tbx18* ausgelöste Fehldifferenzierung der Spiralligamentzellen in Bindegewebszellen der Knochenhaut zurückzuführen.

Der Verlust der Beschränkung *Tbx18* exprimierender Zellen auf das innere Kompartiment könnte mehrere molekulare Ursachen haben. Es könnte sein, dass die *Tbx18*-mutanten Zellen nicht mehr in der Lage sind, ein repulsives von der otischen Kapsel ausgehendes Signal zu erkennen, das sie normalerweise davon abhält, in dieses Kompartiment zu migrieren und sich mit den dortigen Zellen zu vermischen. Alternativ könnten *Tbx18*-mutante Zellen ihre selektive Adhäsion verloren haben. Schließlich könnte der Verlust eines inhibitorischen Signals, das von *Tbx18* exprimierenden Zellen ausgeht, in der Mutante zu einer ektopischen Aktivierung der *Tbx18*-Expression im äußeren Kompartiment führen. Welcher dieser Mechanismen am wahrscheinlichsten ist, kann bisher nicht beantwortet werden.

Interessanterweise wurde *Tbx18* auch in anderen Entwicklungsprozessen mit der Aufrechterhaltung von Kompartimentsgrenzen in Verbindung gebracht. So kommt es in der *Tbx18*-Mutante zu einer Ausweitung der posterioren Somitenhälfte in die anteriore (Bussen *et al.*, 2004), und im metanephrischen Feld aggregiert das Uretermesenchym nicht gezielt am Ureterepithel, sondern verteilt sich über die Oberfläche der Nieren (Airik *et al.*, 2006). Bisher ist jedoch unklar, ob all diese Phänotypen auf die Störung eines gemeinsamen molekularen Programms zurückzuführen sind.

Bisher wurde nur dem Transkriptionsfaktor *Pou3f4* eine Rolle in der Differenzierung otischer Fibrozyten zugeschrieben (Minowa *et al.*, 1999; Phippard *et al.*, 1999). Ähnlich der Situation in *Pou3f4*-mutanten Mäusen, zeigt sich in *Tbx18*-Mutante eine Störung in der Differenzierung otischer Fibrozyten. Die unveränderte Expression von *Pou3f4* in der *Tbx18*-Mutante und die deutlich schwerwiegenderen Veränderungen nach Verlust von *Tbx18* sprechen aber gegen eine einfache epistatische Beziehung zwischen diesen beiden Genen. Vielmehr scheinen beide Gene in parallelen genetischen Schaltkreisen, die Musterung und Differenzierung des otischen Mesenchyms regulieren, eine essentielle Rolle zu spielen.

## 4.2 Die Entwicklung der *Stria vascularis*

Trotz der essentiellen Funktion der *Stria vascularis* für die Physiologie des Hörens ist wenig über die Entwicklungsprozesse und die genetischen Regulationsmechanismen bekannt, die der Bildung dieses trilaminaren Gewebes zu Grunde liegen. Auch der embryologische Ursprung der Basalzellen ist bisher unklar (Jin *et al.*, 2007; Sher, 1971). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass sich die epithelialen Basalzellen in einer Abfolge von Aggregation und Epithelialisierung aus den mesenchymalen Vorläufern der otischen Fibrozyten ableiten.

Für einen embryologischen Ursprung in otischen Fibrozyten spricht die Kondensation otischer Fibrozyten im Bereich der Marginalzellen des Spiralligaments im Wildtyp, sowie die Korrelation von Verlust des Aggregats und Verlust der Basalzellen in der *Tbx18*-Mutante. Das Ergebnis einer aktuellen Arbeit spricht zwar für eine Abstammung der Basalzellen von den Neuralleistenzellen, da in einer genetischen Schicksalskartierung mit Hilfe einer *Pou3f4*<sup>Cre</sup>-transgenen Maus keine *LacZ* exprimierenden Zellen in der *Stria vascularis* nachgewiesen wurden (Ahn *et al.*, 2009). Dies steht jedoch im Widerspruch zu der Tatsache, dass Basalzellen sich auch in Abwesenheit von Neuralleistenzellen entwickeln (Motohashi *et al.*, 1994; Steel und Barkway, 1989; Tachibana, 1999; Tachibana, 2001) und dem Verlust der *E-Cadherin* Expression in den Basalzellen der *Tbx18*<sup>Cre/+</sup>, *E-Cadherin*<sup>flox/flox</sup>-Maus. Die Herkunft der Basalzellen soll zukünftig durch eine genetische Schicksalskartierung otischer Fibrozyten unter Verwendung der *Tbx18*<sup>Cre</sup>-Mauslinie analysiert werden.

Hinweise auf Entwicklungsprogramme, die der Bildung der epithelialen Basalzellen aus mesenchymalen Vorläuferzellen zugrunde liegen, ergeben sich aus der Expression der Gene *Sox9*, *Cx26* und *E-Cadherin* in den prospektiven Basalzelle.

Ähnlich der bekannten Rolle von *Sox9* in einer Reihe von mesenchymalen Zellkondensationsprozessen (Akiyama *et al.*, 2007; Bi *et al.*, 2001), könnte dieser Transkriptionsfaktor auch in der *Stria vascularis* einen solchen Prozess regulieren. Es ist möglich, dass *Tbx18* dabei *Sox9* direkt transkriptionell aktiviert. Jedoch erscheint es wahrscheinlicher, dass der Verlust von *Sox9* in der *Tbx18*-Mutante auf eine Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten zurückzuführen ist. Die Expression von *Cx26* in dieser Domäne geht dem Einsetzen des Kaliumkreislaufes durch das 'gap junction' Netzwerks des Spiralligaments zeitlich deutlich voraus (Sadanaga und Morimitsu, 1995; Yamasaki *et al.*). Daher könnte *Cx26* zu diesem Zeitpunkt eher eine Funktion in der Kompartimentierung durch 'gap junction' vermittelte Zell-Zell-Kommunikation besitzen (Ackert *et al.*, 2001; Übersichtsartikel siehe Levin, 2007). *E-Cadherin* ist ein zentraler Regulator der Transition zwischen epitheliale und mesenchymalem Zellphänotyp (Thiery und Sleeman, 2006). Auch wenn *E-Cadherin* selbst nicht für die Epithelialisierung der prospektiven Basalzellen notwendig ist, könnte es zumindest einen solchen Prozess anzeigen.

Der fast vollständige Verlust von Basalzellen in *Tbx18KO*-Mäusen ermöglichte es, die Bedeutung dieser Zellen für die Differenzierung und Reifung von Intermedialzellen und Marginalzellen zu untersuchen. Die Anzahl der Intermedialzellen war in der ausgereiften *Stria vascularis* der *Tbx18KO*-Maus reduziert und die Bildung zytoplasmatischer Projektionen stark beeinträchtigt. Expansion, Überleben und Differenzierung dieser Zellen hängen somit von einer intakten Basalzellschicht ab. Marginalzellen zeigten hingegen einen ausdifferenzierten Phänotyp mit einer Vielzahl basolateraler Projektionen und der Expression der Differenzierungsmarker *Barttin*, *Kcnq1* und der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-alpha1-Isoform (Erichsen *et al.*, 1996). Der Kollaps der Reissnermembran, wie er bei Mutanten mit stark beeinträchtigter  $\text{K}^+$ -Sekretion auftritt (Delpire *et al.*, 1999; Vetter *et al.*, 1996), wurde in der *Tbx18KO*-Maus nicht beobachtet und belegt, dass die Marginalzellen funktionell sind. Das Auswachsen der zytoplasmatischen Projektionen und deren Interkalation mit den Projektionen anderer strialer Zellen war jedoch aufgrund der vorhandenen Basallamina eingeschränkt. Dies zeigt, dass die Degradation der Basallamina nicht autonom von Marginalzellen reguliert wird und damit ein Teil des Differenzierungsprogramms dieser Zellen von Basal- und/oder Intermedialzellen abhängt.

### 4.3 Die Bedeutung von *Tbx18* für das Hören

Die Hirnstammaudiometrie detektierte eine schwere Hörfunktionsstörung in *Tbx18*-defizienten Mäusen. Drei Wochen nach der Geburt, damit kurz nach Einsetzen der Hörfunktion, war kein EP detektierbar. Es ist wahrscheinlich, dass die Defekte in der Differenzierung otischer Fibrozyten und strialer Basalzellen die Bildung eines endocochleären Potentials verhindern. Dies könnte zum einen in Defekten in der Generierung des Potentials durch die *Stria vascularis* begründet sein, zum anderen könnte ein Verlust des  $K^+$ -Transports durch die Fibrozyten des Spiralligaments eine Ursache sein.

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass der in Intermedialzellen exprimierte einwärtsgerichtete Kaliumkanal Kir4.1 notwendig für die striale Generierung des EPs ist (Marcus *et al.*, 2002). Die funktionelle Integrität der strialen Basalzellschicht ist notwendig für die Abgrenzung des intrastrialen Kompartiments vom Extrazellularraum des Spiralligaments. Dies wiederum wird als eine Voraussetzung für die Generierung des EPs diskutiert. Der Verlust des 'tight junction'-Proteins Cldn11 in Basalzellen hat folglich eine Störung der epithelialen Barrierefunktion und ein reduziertes EP zur Folge (Gow *et al.*, 2004; Kitajiri *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die Differenzierung der otischen Fibrozyten in verschiedene Subtypen als eine Anpassung an verschiedene strukturelle und funktionelle Erfordernisse im Hinblick auf unterschiedliche Funktionen im Kaliumkreislauf zu verstehen ist, so z.B. Aufnahme und Transport von perilymphatischen  $K^+$ -Ionen (Kikuchi *et al.*, 2000; Spicer und Schulte, 1996). Der Verlust von Cx30, das mit Cx26 koexprimiert ist und mit diesem funktionelle heteromere 'gap junctions' bildet, stört die Bildung des EP und belegt die Bedeutung des mesenchymalen 'gap junction'-Netzwerks (Forge *et al.*, 2003; Teubner *et al.*, 2003).

Der Verlust von Kir4.1 exprimierenden Intermedialzellen und Claudin11 exprimierenden Basalzellen in der *Stria vascularis*, die Störung der terminalen Fibrozytendifferenzierung und die Abwesenheit von Cx26 im Spiralligament erklären somit zusammen den Zusammenbruch des EP in der *Tbx18KO*-Maus.

### 4.4 *Sox9* und die Differenzierung der otischen Knochenkapsel

*Sox9* weist ein räumlich-zeitlich sehr dynamisches Expressionsmuster im otischen Mesenchym auf. Ab E10,5 wird *Sox9* im gesamten periotischen Mesenchym exprimiert. Kurze Zeit später ab E12,5 zeigt sich eine Beschränkung auf die (prospektive) otische Kapsel. Ab E17,5 wird *Sox9* zusätzlich im Spiralligament und in den kondensierenden Zellen der

*Stria vascularis* exprimiert. Daraus leiten sich mögliche Funktionen in der Aggregation und Musterung des periotischen Mesenchyms, der Differenzierung der otischen Kapsel sowie der Kondensation strialer Zellen ab. Die Cochlea der *Sox9* Mutante zeigt einen Verlust der endochondralen otischen Kapsel, eine gestörte Expansion und beeinträchtigte Differenzierung der Fibrozyten des Spiralligaments, was eine wichtige Funktion von *Sox9* in der Differenzierung der otischen Kapsel und der Expansion der mesenchymalen Subkompartimente nahe legt. Die unveränderte *Tbx18*-Expression im inneren Kompartiment, sowie die normal ablaufende zelluläre Kompaktation im äußeren Segment der *Sox9*-Mutante bei E12,5, lassen eine Funktion in der frühen Regionalisierung des otischen Mesenchym hingegen eher unwahrscheinlich erscheinen.

Die Bildung der otischen Knochenkapsel aus mesodermalen Zellen und Neuralleistenzellen des periotischen Mesenchyms wird durch Signale aus dem otischen Epithel induziert (Frenz und Van De Water, 1991; Frenz *et al.*, 1992; Frenz *et al.*, 1994). Die Bildung der Kapsel folgt dem Mechanismus der endochondralen Ossifikation, d.h. es wird zunächst eine knorpelige Matrise angelegt, die in der Folge schrittweise durch Knochengewebe ersetzt wird (Sher, 1971). Der Chondrogeneseprozess, der vor allem in der Bildung der Langknochen der Gliedmaßen erforscht wurde, umfasst die Abfolge verschiedener zellulärer Programme wie Zellsortierung, Aggregation und Kompaktation mesenchymaler Vorläuferzellen sowie Knorpelzeldifferenzierung (Akiyama *et al.*, 2002; Barna und Niswander, 2007; Bi *et al.*, 2001). Durch die direkte transkriptionelle Aktivierung von *Sox5*, *Sox6* und *Coll2a1* nimmt der Transkriptionsfaktor *Sox9* eine zentrale Rolle in diesem Prozess ein (Akiyama *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2004). Für die vorangehende durch Bmp-Signale vermittelte Aggregation und Kompaktation mesenchymaler Vorläuferzellen ist *Sox9* hingegen nicht notwendig (Barna und Niswander, 2007; Smits *et al.*, 2001). *Sox9* kann jedoch in ektopischen Expressionsexperimenten eine mesenchymale Aggregation in den Gliedmaßenanlagen induzieren (Akiyama *et al.*, 2007). Die konditionelle Deletion von *Sox9* hat den Verlust sämtlicher Skelettelemente in den Gliedmaßen zur Folge (Akiyama *et al.*, 2002).

Die normale Aggregation des periotischen Mesenchyms, die Kompaktation des äußeren Kompartiments sowie der späte Verlust der otischen Kapsel im Bereich der Cochlea der *Sox9KO* Maus belegen, dass *Sox9* in der Differenzierung von Knorpelzellen der otischen Knochenkapsel eine entsprechende, wichtige Funktion einnimmt.

Eine zur *Sox9KO*-Maus ähnliche, aber deutlich schwächere Hypoplasie von otischer Kapsel und otischen Fibrozyten mit Reduktion der perilymphatischen Räume und veränderter Morphologie des cochleären Ganges wurde im Innenohr verschiedener *Col2a1* -

Mausmutanten detektiert (Berggren *et al.*, 1997; Maddox *et al.*, 1998; Van De Water und Galinovic-Schwartz, 1987). Dies spricht dafür, dass die Funktion von *Sox9* in der Entwicklung des periotischen Mesenchyms zu einem wesentlichen Anteil durch die Modulation der Extrazellulärmatrix vermittelt wird.

Während die Defekte in der Bildung der otischen Kapsel auf eine primäre Rolle in der Chondrogenese des äußeren Kompartiments des otischen Mesenchyms hinweist, ist eine primäre Funktion von *Sox9* in der Differenzierung der otischen Fibrozyten eher unwahrscheinlich. Zwar zeigte die Cochlea der *Sox9KO*-Maus den Verlust der *Scala tympani*, histologische Veränderungen der Fibrozyten im Bereich der seitlichen Wand, einen Verlust der Expression von *Car3*, *Coch*, *Cx26*, und *E-Cadherin* und ektopische Expression von *Postn* im Spiralligament, d.h. molekulare und histologische Veränderungen des inneren mesenchymalen Kompartiments. Jedoch spricht die nur transiente Expression von *Sox9* in otischen Fibrozyten zwischen E10.5 und E12.5 eher für eine sekundäre Natur dieser Veränderungen.

Dies legt nahe, dass die Fehldifferenzierung der Fibrozyten in der *Sox9KO*-Maus durch den Verlust der endochondralen otischen Kapsel verursacht wird. Dies könnte darin begründet sein, dass essentielle Signale für Differenzierung der otischen Fibrozyten aus der endochondralen otischen Kapsel stammen.

Die Expression von *Tbx18* und *Pou3f4* in der *Sox9*-Mutante zeigte eine drastische Größenreduktion des Spiralligaments. Zusätzlich wurde bereits bei E12,5 eine Größenreduktion des frühen periotischen Mesenchym und eine verminderte Proliferation detektiert. Insgesamt deutet auf eine mögliche Rolle von *Sox9* bzw. des otischen Kapselgewebes in der Expansion des inneren mesenchymalen Kompartiments, aus dem sich die otischen Fibrozyten ableiten. Die Fehldifferenzierung der otischen Fibrozyten wäre damit auf einen Mangel an Fibrozytenvorläuferzellen zurückzuführen

In einem anderen Kontext wurde gezeigt, dass *Sox9* über einen zellautonomen Mechanismus an der Regulation von Proliferation beteiligt ist, und damit die Expansion von Vorläuferzellen kontrolliert (Seymour *et al.*, 2007). Die verringerte Proliferation im periotischen Mesenchym könnte daher auf den Verlust einer direkten Funktion von *Sox9* in der Regulation der Proliferation zurückzuführen sein. Aufgrund der Exklusion von *Sox9* vom inneren Kompartiment ab E12,5 erscheint eine nicht-zellautonome Regulation der Proliferation durch *Sox9*, d.h. einen trophischen Einfluss der otischen Kapsel, wahrscheinlicher.

Eine Funktion von *Sox9* in der Kondensation der mesenchymalen Zellen der *Stria vascularis* ist sehr wahrscheinlich, ließ sich aufgrund der starken frühen phänotypischen Veränderungen hier jedoch nicht adressieren.

#### **4.5 Der Einfluss des periotischen Mesenchyms auf Windungsmorphogenese und Musterung des cochleären Ganges**

Neben den phänotypischen Veränderungen im mesenchymalen Anteil der Cochlea zeigte die *Sox9* Mutante eine gestörte Windungsmorphologie des cochleären Ganges und geringe Veränderungen der epithelialen Musterung.

Auswachsen und Windungsmorphogenese des cochleären Ganges beruhen auf einer präzisen zeitlichen und räumlichen Koordination von Zellproliferation und zellulären Umstrukturierungen des otischen Epithels (Lang *et al.*, 2000; McKenzie *et al.*, 2004; Kelly und Chen, 2007; McKenzie *et al.*, 2004). Die veränderte epitheliale Proliferation, die Verdickung des sensorischen Epithels und die Zunahme des Durchmessers des cochleären Ganges in der *Sox9*-Mutante bei E12,5 zeigen, dass beide Prozesse durch den Verlust von *Sox9* gestört werden und erklären das reduzierte Auswachsen des cochleären Ganges in der Mutante. Die Windungszahl des cochleären Ganges ist in der Mutante verringert. Der Windungsprozess als solcher findet jedoch statt und ist damit unabhängig von *Sox9* im periotischen Mesenchym. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus Gewebekulturexperimenten, die zeigen, dass das Windungswachstum eine intrinsische Eigenschaft des cochleären Epithels darstellt (Miura *et al.*, 2004).

Da *Sox9* ausschließlich im mesenchymalen Kompartiment deletiert wurde, legt der epitheliale Phänotyp der *Sox9*-Mutante eine Störung der Wechselwirkung zwischen mesenchymalem und epithelialelem Innenohr nahe. Dies könnte auf den Verlust einer direkten Funktion von *Sox9* in der Wechselwirkung deuten oder aber eine indirekte Folge einer anderen Funktion von *Sox9* in der Entwicklung des mesenchymalen Innenohrs sein. Folgende Gründe deuten darauf hin, dass die gestörte Windungsmorphogenese auf eine Störung der Differenzierung des periotischen Mesenchyms zurückzuführen ist.

Im Epithel der *Sox9* Mutante wurde bei E12,5 ein Veränderung der Proliferationsrate detektiert. Die Steigerung der Proliferation im nicht-sensorischen Epithel der Mutante und die Reduktion der Proliferation im sensorischen Anteil sind schwer mit einer direkten proliferationsregulierenden Funktion von *Sox9* zu vereinbaren.

Mesenchymfreie Gewebekulturexperimente des otischen Vesikels, in denen das Mesenchym durch verschiedene Extrazellulärmatrixsubstanzen substituiert wurde, zeigten, dass das Auswachsen des Innenohrs stark von der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix abhängt (Orr, 1976; Hemond und Morest, 1992; Miura *et al.*, 2004). Der Verlust von *Col2a1* im PM verursacht im Mausmodell eine gestörte Windungsmorphogenese (Van De Water und Galinovic-Schwartz, 1987). Für *Sox9* ist bekannt, dass es die Zusammensetzung der EZM reguliert (Hanley *et al.*, 2008), indem es Gene wie z.B. *Col2a1* und *Col4a2* direkt transkriptionell aktiviert (Bell *et al.*, 1997; Sumi *et al.*, 2007). Die reduzierte Expression von *Col2a1* im periotischen Mesenchym bei E12,5 belegt eine Veränderung in der Zusammensetzung der EZM in der *Sox9* Mutante und zeigt, dass *Sox9* auch im periotischen Mesenchym diese Funktion besitzt. Es ist daher anzunehmen, dass die gestörte Windungsmorphogenese in der *Sox9* Mutante eine Funktion von *Sox9* in der Modulation der Extrazellulärmatrix anzeigt.

Es ist wahrscheinlich, dass darüber hinaus Signale aus der otischen Kapsel notwendig für die normale Morphogenese und Musterung des cochleären Ganges sind. Dafür spricht, dass die Längenreduktion des cochleären Ganges, das Auswachsen des Apex in dorsaler Richtung und die Veränderung in der Proliferationsrate des otischen Epithels der *Sox9* Mutante und die Entstehung der otischen Kapsel zeitlich korrelieren. Zusätzlich deutet die Musterungsstörung des otischen Epithels, d.h. die ektopische Expression von *Pds* in den basalen Zellen der Reissnermembran darauf hin, dass die otische Kapsel räumliche Bezugspunkte für den sich entwickelnden cochleären Gang bietet, die in der *Sox9*-Mutante fehlen.

Bisher wurden erst wenige otisch-mesenchymal exprimierte Gene identifiziert, die einen Einfluss auf das Auswachsen des cochleären Ganges besitzen. Der Verlust der im periotischen Mesenchym exprimierten Transkriptionsfaktorgene *Tbx1* und *Pou3f* verursacht Störungen in der Windungsmorphogenese, die ebenfalls auf eine Fehldifferenzierung des periotischen Mesenchyms zurückzuführen sind (Phippard *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2007a). In der *Sox9* Mutante waren beide Gene normal exprimiert (für *Tbx1*, Daten nicht gezeigt), womit auszuschließen ist, dass es sich bei diesen beiden Genen um Zielgene von *Sox9* handelt. Ob die Expression von *Sox9* in diesen Mutanten verändert ist, ist nicht bekannt.

#### 4.6 Die Funktion von *E-Cadherin* in der Entwicklung der Basalzellen

Während der Entwicklung des Innenohrs wird *E-Cadherin* in den otischen Fibrozyten des Spiralligaments und den prospektiven Basalzellen exprimiert. In der *Tbx18KO* Maus kommt es zu einem Verlust von *E-Cadherin* Expression und Basalzellen, was die Annahme nahe legte, dass *E-Cadherin* für die Epithelialisierung und/oder Differenzierung der Basalzellen wichtig ist. Die Analyse der *EcadKO*-Maus zeigte, dass Basalzellen in der *Stria vascularis* gebildet werden aber einen Verlust zytoplasmatischer Projektionen aufweisen. Zusätzlich wurden eine Reduktion von Intermedialzellen, eine lokale Fehldifferenzierung der Marginalzellen im Bereich der Reissner-Membran, und ein verändertes Auswachsen der Fortsätze der übrigen Marginalzellen detektiert. Dies zeigt, dass *E-Cadherin* nicht die Epithelialisierung der Basalzellen reguliert, sondern eine wichtige Rolle für der Ausdifferenzierung und Homöostase dieser und interagierender Zellen in der *Stria vascularis* spielt.

##### ***E-Cadherin* ist nicht für die Bildung von Basalzellen notwendig**

Die *Stria vascularis* besitzt einen trilaminaren Aufbau. Die epithelialen Zellschichten der Marginal- und Basalzellen grenzen die *Stria vascularis* vom Lumen bzw. den Fibrozyten des Spiralligaments ab. Zwischen diesen beiden Schichten sind die Intermedialzellen lokalisiert. Marginalzellen und Intermedialzellen leiten sich embryologisch aus dem Epithel des cochleären Ganges bzw. Neuralleistenzellen ab.

Die epithelialen Basalzellen entstehen vermutlich aus den mesenchymalen Vorläuferzellen der otischen Fibrozyten. Die mesenchymale Herkunft der epithelialen Basalzellen impliziert einen mesenchymalen-epithelialen Übergang dieser Zellen. Dieser Prozess ist vor allem durch den Erwerb einer apikobasalen Polarität, die Umstrukturierung des Zytoskeletts, einer verstärkten Adhäsion mit den umgebenden Zellen sowie der Formation funktioneller 'tight junction'-Komplexe gekennzeichnet. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass *E-Cadherin* eine übergeordnete Rolle in epithelial-mesenchymal und mesenchymal-epithelialen Transitionen spielt (Thiery und Sleeman, 2006). So ist einerseits die transkriptionelle Repression von *E-Cadherin* Voraussetzung für die Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen, auf der anderen Seite ist die Überexpression von *E-Cadherin* in Fibroblasten ausreichend, um diesen Zellen einen epithelialen Phänotyp zu vermitteln (Thiery und Sleeman, 2006; Vanderburg und Hay, 1996). Die Expression von *E-Cadherin* in den kondensierenden prospektiven Basalzellen und der Verlust von *E-Cadherin* Expression und Basalzellen in der

*Tbx18*-Mutante führten daher zu der Annahme, dass *E-Cadherin* eine entscheidende Funktion in der Epithelialisierung der Basalzellen besitzt.

Die histologische Untersuchung und die immunhistochemische Detektion der epithelialen Differenzierungsmarker ZO1 und Claudin11 zeigten jedoch eindeutig, dass in der *Stria vascularis* der *E-Cadherin* Mutante Basalzellen mit epithelialem Charakter gebildet werden. Dies zeigt, dass *E-Cadherin* nicht für diesen Prozess notwendig ist.

Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass andere klassische Cadherine oder Mitglieder einer anderen Proteinklasse im Epithelialisierungsprozess eine redundante Funktion besitzen, oder dass *E-Cadherin* funktionell nicht an diesem Prozess beteiligt ist.

Andere Arbeiten haben gezeigt, dass auch das klassische Cadherin N-Cadherin in der Somitenentwicklung eine Funktion in der mesenchymal-epithelialen Transition besitzt (Nakaya *et al.*, 2004; Radice *et al.*, 1997). Da *N-Cadherin* ebenfalls in den prospektiven Basalzellen exprimiert wird, wäre eine Beteiligung an diesem Prozess möglich. Funktionelle Daten liegen aber bisher nicht vor.

#### ***E-Cadherin* spielt eine essentielle Rolle für die terminale Differenzierung von Basal- und Intermedialzellen**

Basalzellen stellen einen hochgeordneten epithelialen Zelltyp der *Stria vascularis* dar, der mit den anderen strialen Zelltypen durch zytoplasmatische Fortsätze eng assoziiert ist. Darüberhinaus bildet die Basalzellschicht eine epitheliale Barriere gegen parazelluläre Diffusion und grenzt durch die Ausbildung von 'tight junctions' den intrastrialen Raum vom Extrazellularraum des Spiralligaments ab.

Die immunhistochemische Detektion von Glut1 zeigte, dass Basalzellen im Wildtyp zytoplasmatische Projektionen in den intrastrialen Raum ausbilden, was einen Beleg für die etablierte apikobasale Polarität dieser Zellen darstellt. In den Basalzellen der Mutante wurde hingegen ein Verlust dieser Fortsätze detektiert. Dies legt eine Funktion von *E-Cadherin* in der Bildung und/oder der Aufrechterhaltung dieser zytoplasmatischen Projektionen nahe. Dies könnte entweder auf eine zellautonome Funktion von *E-Cadherin* oder auf eine durch *E-Cadherin* vermittelte Interaktion mit anderen strialen Zelltypen zurückzuführen sein.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass *E-Cadherin* eine Funktion in der Etablierung der epithelialen apikobasalen Polarität besitzt (Larue *et al.*, 1994; Nejsum und Nelson, 2007; Tunggal *et al.*, 2005). Diese Polarität ist die Voraussetzung für die Etablierung funktionell unterschiedlicher Membrankompartimente und damit essentiell für die zelluläre Morphologie. Die veränderte Zellarchitektur der Basalzellen in der *EcadKO* Maus könnte daher die direkte

Folge einer gestörten apikobasalen Polarität sein. Die bisher verwendeten molekularen Differenzierungsmarker erlauben jedoch keine Aussage über eine Störung der Polarität in den Basalzellen der *E-Cadherin*-Mutante.

*E-Cadherin* ist ein transmembranes Adhäsionsprotein, das interzelluläre, homophile Interaktion vermittelt (Tepass *et al.*, 2000). Bei der Bildung neuer epithelialer Zell-Zell-Kontakte hat *E-Cadherin* vermittelte Adhäsion einen direkten Einfluss auf die Umstrukturierung des Aktinskeletts und ist dadurch an der Ausbildung von Filopodien beteiligt (Adams *et al.*, 1998; Raich *et al.*, 1999; Yeaman *et al.*, 1999; Vasioukhin *et al.*, 2000). Da auch die epithelialen Marginalzellen *E-Cadherin* exprimieren ist eine Adhäsion zwischen den Fortsätzen der Marginalzellen und den Basalzellen sehr wahrscheinlich. Diese könnte für Umstrukturierungen des Zytoskeletts und damit die Ausbildung und/oder Aufrechterhaltung der normalen Zellmorphologie notwendig sein. Die Tatsache, dass in der Mutante die basolateralen Fortsätze der Marginalzellen nicht bis in die Basalzellschicht reichen, gibt einen Hinweis darauf, dass in der *E-Cadherin* Mutante tatsächlich eine gestörte Adhäsion der beiden strialen Zelltypen vorliegt. Der Verlust der zytoplasmatischen Projektionen der Basalzellen in der *E-Cadherin* Mutante könnte daher auch als indirekte Folge aus der gestörten Adhäsion zwischen Basalzellen und Marginalzellen resultieren.

In den Keratinozyten der Haut verursacht der konditionelle Verlust von *E-Cadherin* eine gestörte Rekrutierung von ZO-1 und Claudin1 in 'tight junction'-Komplexe und beeinträchtigt die epitheliale Barrierefunktion gegen parazelluläre Diffusion (Tunggal *et al.*, 2005). Analog zu den Keratinozyten der Epidermis sind die striale Basalzellschicht und die Ausbildung funktioneller 'tight-junction'-Komplexe notwendig für die Abgrenzung des intrastriales Kompartiments vom Extrazellularraum des Spiralligaments. In den Basalzellen der *E-Cadherin*-Mutante wurde jedoch keine offensichtliche Fehllokalisierung von ZO-1 (Daten nicht gezeigt) und Claudin11 in den Basalzellen detektiert. Dies zeigt, dass *E-Cadherin* in diesem Kontext vermutlich keine Funktion in der Bildung der 'tight-junction'-Komplexe besitzt.

Bisher liegen keine funktionellen Daten vor, die auf eine gestörte Barrierefunktion der Basalzellschicht hinweisen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die *E-Cadherin* Mutante eine subtile Störung in der Bildung funktioneller 'tight junction'-Komplexe aufweist. Dies soll in Zukunft experimentell untersucht werden.

Die Integrität der Basalzellschicht hat eine essentielle Bedeutung für die Differenzierung und Homöostase der anderen strialen Zelltypen. Der Verlust von Basalzellen in der *Tbx18KO*-

Maus führt zu einem sekundären Verlust der Intermedialzellen und einem gestörten Auswachsen der zytoplasmatischen Fortsätze von Marginalzellen. Der Störung der terminalen Differenzierung der Basalzellen in der *EcadKO* Maus ermöglichte es zusätzlich, die Bedeutung der zellkontaktabhängigen Interaktion mit den Basalzellen für die Differenzierung und Reifung von Intermedialzellen und Marginalzellen zu untersuchen.

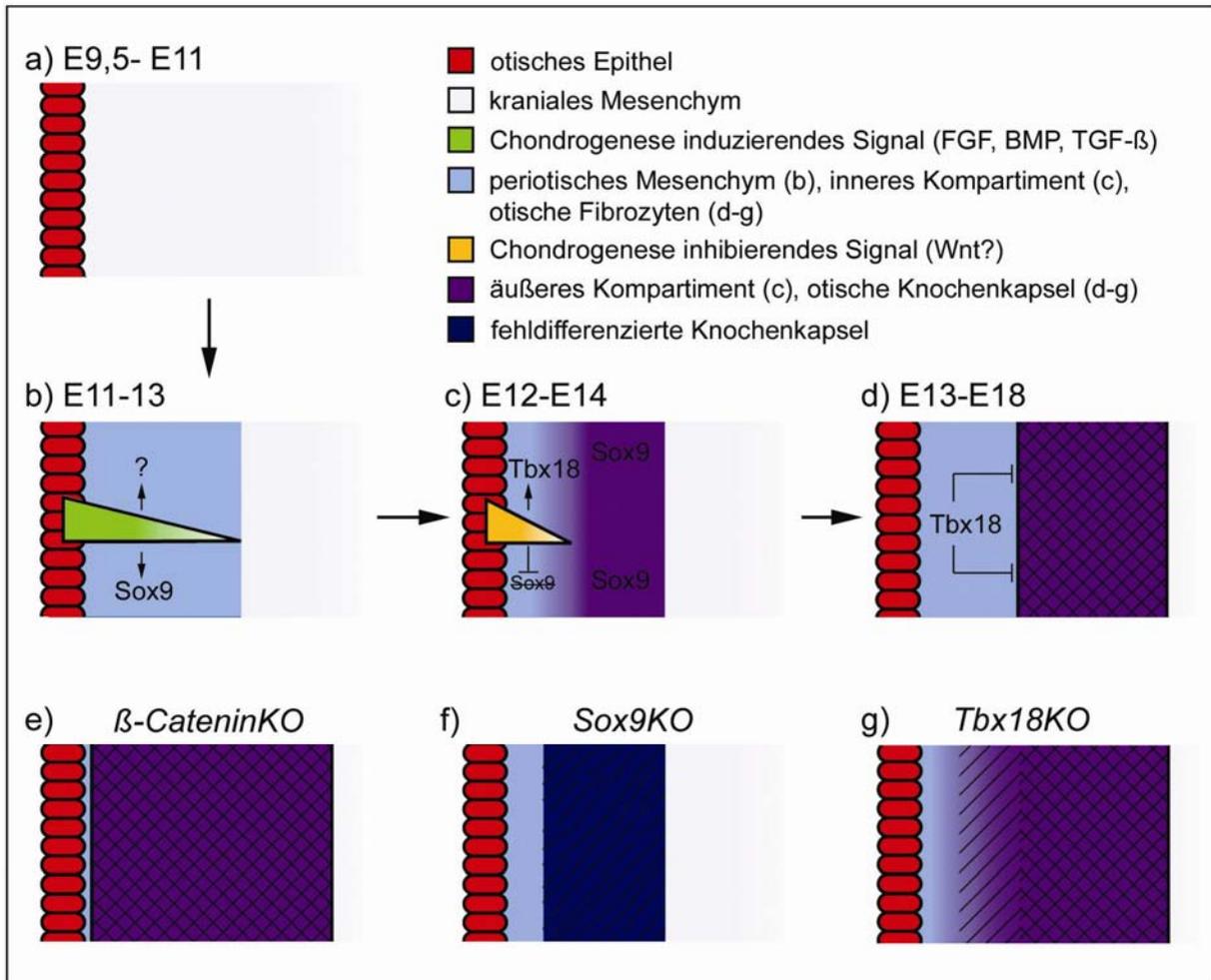
Die phänotypischen Veränderungen in der *Stria vascularis* der *E-Cadherin* und *Tbx18-Mutante* sind sich sehr ähnlich. Die Anzahl der Intermedialzellen in der *Stria vascularis* der Mutante ist drastisch reduziert, in der Nähe zur Reissner-Membran weisen die Marginalzellen einen abgeflachten Phänotyp und den Verlust der Expression der Differenzierungsmarker *Kcnq1* und *Bartin* auf. Die übrigen Marginalzellen zeigten hingegen einen ausdifferenzierten Phänotyp mit einer Vielzahl jedoch verkürzter basolateraler Projektionen und der Expression der Differenzierungsmarker *Bartin*, *Kcnq1* und der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Atpase-alpha1}$ -Isoform.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Expansion, Differenzierung und/oder Überleben von Intermedialzellen und Marginalzellen von der Interaktion mit terminal differenzierten Basalzellen abhängt.

#### 4.7 Die Musterung des periotischen Mesenchyms

Die vergleichende Analyse der Expression von *Sox9* und *Tbx18* zeigte, dass das periotische Mesenchym schon sehr früh in seiner Entwicklung in eine innere und eine äußere Region unterteilt wird, die in der Folge zu otischen Fibrozyten bzw. Chondrozyten der otischen Kapsel differenzieren. Die *Tbx18* vermittelte Kompartimentierung der inneren Region ist von essentieller Bedeutung für die weitere Differenzierung der otischen Fibrozyten und die räumliche Begrenzung der otischen Kapsel. Unklar war jedoch bisher, wie die Musterung des periotischen Mesenchyms in ein äußeres und ein inneres Kompartiment etabliert und molekular reguliert wird. Die initiale Analyse einer *Tbx18<sup>Cre/+</sup>*,  *$\beta$ -Catenin<sup>lox/lox</sup>*-Maus ( *$\beta$ -CateninKO*) zeigte den spezifischen Verlust der Expression von *Tbx18* und *Axin2* im inneren Kompartiment des otischen Mesenchyms und eine Ausweitung des äußeren auf Kosten des inneren Kompartiments. Dies legt nahe, dass der  *$\beta$ -Catenin* abhängige kanonische Wnt-Signalweg eine entscheidende Funktion in der Etablierung und/oder der Aufrechterhaltung der Kompartimentierung des otischen Mesenchyms einnimmt. Die Wirkung des kanonischen Wnt-Signalwegs lassen sich auf mindestens zwei Weisen konzeptualisieren. Zum einen könnte ein Signal aus dem äußeren Bereich des periotischen Mesenchyms den kanonischen Wnt-Signalweg im äußeren Kompartiment hemmen, zum anderen wäre es möglich, dass die

Chondrofykierung gezielt im inneren Kompartiment durch den kanonischen Wnt-Signalweg verhindert wird.



**Abb. 29: Modell für die Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms.** (a) Die Otozyste ist umgeben von kranialen Mesenchym. (b) Signale aus dem otischen Epithel induzieren die Expression unbekannter Zielgene und vermitteln die Aggregation des periotischen Mesenchyms. *Sox9* Expression wird induziert, ist jedoch für den Aggregationsprozess nicht notwendig. (c) Die Chondrogenese schreitet in Abhängigkeit von *Sox9* fort. Dies wird aber durch Signale aus dem otischen Epithel im inneren Bereich des periotischen Mesenchyms unterbunden. Es bilden sich zwei Kompartimente. *Tbx18* wird im inneren Kompartiment induziert, besitzt aber keine Funktion in der Inhibition der Chondrogenese. (d) Inneres und äußeres Kompartiment expandieren in Abhängigkeit von *Sox9* und Zelldifferenzierungsprozesse führen zur Bildung von otischen Fibrozyten und otischer Knochenkapsel. *Tbx18* erhält während dieser Prozesse die Kompartimentsgrenzen und verhindert eine Vermischung der Zellen. (e) Der Verlust von  $\beta$ -Catenin führt zum Verlust des Chondrogenese-inhibierenden Signals und führt zu einer Ausweitung des äußeren Kompartiments/der otischen Knochenkapsel zu Lasten des inneren Kompartiments/der otischen Fibrozyten. (f) Der Verlust von *Sox9* verhindert die Differenzierung der otischen Knochenkapsel und stört die Expansion der mesenchymalen Subkompartimente. Die Differenzierung otischer Fibrozyten ist gestört. (g) *Tbx18*-Defizienz führt zum Verlust einer distinkten Grenze zwischen otischen Fibrozyten und otischer Knochenkapsel. Die Differenzierung otischer Fibrozyten ist gestört. Legende, siehe Abbildung.

Interessanterweise wurde für den  $\beta$ -Catenin-abhängigen, kanonischen Wnt-Signalweg eine Chondrogenese inhibierende Wirkung in der Entwicklung der Langknochen beschrieben, die

u.a. auf die spezifische Degradation von *Sox9* zurückzuführen ist (Guo *et al.*, 2004; Hartmann und Tabin, 2001; Hill *et al.*, 2005; Topol *et al.*, 2009). Dies unterstützt die Ergebnisse einer früheren Arbeit, die ebenfalls nahe legte, dass die Unterteilung des otischen Mesenchyms auf eine Hemmung der Chondrogenese im inneren Bereich zurückzuführen ist. Hier wurde in Gewebekulturexperimenten gezeigt, dass das periotische Mesenchym stadienspezifisch auf Chondrogenese induzierende Signalfaktoren des Epithels mit einem Arrest der Chondrogenese reagiert (Frenz *et al.*, 1994). Die räumlich beschränkte Expression des Wnt-Zielgen *Axin2* im epithelnahen otischen Mesenchym, lässt vermuten, dass das otische Epithel eine Quelle eines radiär sezernierten Wnt-Signals darstellen könnte.

Die drastischen qualitativen Unterschiede der otischen Phänotypen der *Tbx18-Mutante* und einer Maus mit konditioneller Ablation von  $\beta$ -*Catenin* im otischen Mesenchym, legen nahe, dass *Tbx18* lediglich einen Aspekt der molekularen Programms des kanonischen Wnt-Signalwegs in diesem Gewebe vermittelt, nämlich die Kompartimentierung der beiden Regionen (Für eine zusammenfassendes Modell zur Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms, siehe Abb. 29).

Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs bzw. von *Tbx18* in der Musterung des periotischen Mesenchyms und seiner Kompartimentierung lassen sich zukünftig gezielt in Experimenten überprüfen, die durch konditionelle Misexpression im kompletten otischen Mesenchym zur räumlichen Ausweitung der Aktivitätsdomäne führen.

## 5. Literatur

- Ackert, C. L., Gittens, J. E., O'Brien, M. J., Eppig, J. J. und Kidder, G. M.** (2001). Intercellular Communication Via connexin43 Gap Junctions is Required for Ovarian Folliculogenesis in the Mouse. *Dev. Biol.* **233**, 258-270.
- Adams, C. L., Chen, Y. -, Smith, S. J. und Nelson, W. J.** (1998). Mechanisms of Epithelial Cell-Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-Resolution Tracking of E-Cadherin-Green Fluorescent Protein. *J. Cell Biol. ; J. Cell Biol.* **142**, 1105-1119.
- Ahn, K. J., Passero, F., Jr und Crenshaw, E. B., 3rd.** (2009). Otic Mesenchyme Expression of Cre Recombinase Directed by the Inner Ear Enhancer of the Brn4/Pou3f4 Gene. *Genesis* **47**, 137-141.
- Airik, R., Bussen, M., Singh, M. K., Petry, M. und Kispert, A.** (2006). Tbx18 Regulates the Development of the Ureteral Mesenchyme. *J. Clin. Invest.* **116**, 663-674.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. -, Martin, J. F., Schedl, A. und De Crombrugge, B.** (2002). The Transcription Factor Sox9 has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and is Required for Expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813-2828.
- Akiyama, H., Stadler, H. S., Martin, J. F., Ishii, T. M., Beachy, P. A., Nakamura, T. und de Crombrugge, B.** (2007). Misexpression of Sox9 in Mouse Limb Bud Mesenchyme Induces Polydactyly and Rescues Hypodactyly Mice. *Matrix Biology* **26**, 224-233.
- Akiyama, H., Chaboissier, M., Behringer, R. R., Rowitch, D. H., Schedl, A., Epstein, J. A. und Crombrugge, B. d.** (2004). Essential Role of Sox9 in the Pathway that Controls Formation of Cardiac Valves and Septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6502-6507.
- Ando, M. und Takeuchi, S.** (1999). Immunological Identification of an Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channel (Kir4.1) in the Intermediate Cell (Melanocyte) of the Cochlear Stria Vascularis of Gerbils and Rats. *Cell Tissue Res.* **298**, 179-183.
- Asher, D. L. und Sando, I.** (1981). Perilymphatic Communication Routes in the Auditory and Vestibular System. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **89**, 822-830.
- Ausubel, F. M.** (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York : John Wiley & Sons.
- Barna, M. und Niswander, L.** (2007). Visualization of Cartilage Formation: Insight into Cellular Properties of Skeletal Progenitors and Chondrodysplasia Syndromes. *Developmental Cell* **12**, 931-941.
- Barrionuevo, F., Naumann, A., Bagheri-Fam, S., Speth, V., Taketo, M. M., Scherer, G. und Neubuser, A.** (2008). Sox9 is Required for Invagination of the Otic Placode in Mice. *Dev. Biol.* **317**, 213-224.
- Bedoui, S.** (2006). Sobotta Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb (Atlas of Human Anatomy (Sobotta)), pp. 419: Fischer Gustav Verlag GmbH & Co. KG.
- Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. und Birchmeier, W.** (1998). Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with Beta-Catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-599.
- Bell, D. M., Leung, K. K. H., Wheatley, S. C., Ling Jim Ng, Zhou, S., Kam Wing Ling, Mai Har Sham, Koopman, P., Tam, P. P. L. und Cheah, K. S. E.** (1997). SOX9 Directly Regulates the Type-II Collagen Gene. *Nat. Genet. ; Nat. Genet.* **16**, 174-178.
- Berggren, D., Frenz, D., Galinovic-Schwartz, V. und Van De Water, T. R.** (1997). Fine Structure of Extracellular Matrix and Basal Laminae in Two Types of Abnormal Collagen Production: L-Proline Analog-Treated Otocyst Cultures and Disproportionate Micromelia (Dmm/Dmm) Mutants. *Hear. Res. ; Hear. Res.* **107**, 125-135.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. und Crombrugge, B. d.** (2001). Haploinsufficiency of Sox9 Results in Defective Cartilage Primordia and Premature Skeletal Mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6698-6703.
- Birkenhager, R., Otto, E., Schurmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D. et al.** (2001). Mutation of BSND Causes Bartter Syndrome with Sensorineural Deafness and Kidney Failure. *Nat. Genet.* **29**, 310-314.
- Blumer, M. J., Schwarzer, C., Perez, M. T., Konakci, K. Z. und Fritsch, H.** (2006). Identification and Location of Bone-Forming Cells within Cartilage Canals on their Course into the Secondary Ossification Centre. *J. Anat.* **208**, 695-707.
- Boettger, T., Rust, M. B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D. J., Faulhaber, J., Ehmke, H., Pfeffer, C., Scheel, O. et al.** (2003). Loss of K-Cl Co-Transporter KCC3 Causes Deafness, Neurodegeneration and Reduced Seizure Threshold. *The {EMBO} Journal* **22**, 5422-5434.
- Boussadia, O., Kutsch, S., Hierholzer, A., Delmas, V. und Kemler, R.** (2002). E-Cadherin is a Survival Factor for the Lactating Mouse Mammary Gland. *Mech. Dev.* **115**, 53-62.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O. und Kemler, R.** (2001). Inactivation of the Beta-Catenin Gene by Wnt1-Cre-Mediated Deletion Results in Dramatic Brain Malformation and Failure of Craniofacial Development. *Development* **128**, 1253-1264.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A. und Kispert, A.** (2004). The T-Box Transcription Factor Tbx18 Maintains the Separation of Anterior and Posterior Somite Compartments. *Genes & Development* **18**, 1209-1221.
- Cohen-Salmon, M., Frenz, D., Liu, W., Verpy, E., Voegelings, S. und Petit, C.** (2000). Fdp, a New Fibrocyte-Derived Protein Related to MIA/CD-RAP, has an in Vitro Effect on the Early Differentiation of the Inner Ear Mesenchyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 40036-40041.
- Colnot, C.** (2005). Cellular and Molecular Interactions Regulating Skeletogenesis. *J. Cell. Biochem.* **95**, 688-697.

- Crouch, J. J., Sakaguchi, N., Lytle, C. und Schulte, B. A. (1997). Immunohistochemical Localization of the Na-K-Cl Co-Transporter (NKCC1) in the Gerbil Inner Ear. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 773-778.
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C. und Thorne, T. (1999). Deafness and Imbalance Associated with Inactivation of the Secretory Na-K-2Cl Co-Transporter. *Nat. Genet.* **22**, 192-195.
- Delprat, B., Ruel, J., Guitton, M. J., Hamard, G., Lenoir, M., Pujol, R., Puel, J., Brabet, P. und Hamel, C. P. (2005). Deafness and Cochlear Fibrocyte Alterations in Mice Deficient for the Inner Ear Protein Otospiralin. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 847-853.
- Doetzlhofer, A., White, P. M., Johnson, J. E., Segil, N. und Groves, A. K. (2004). In Vitro Growth and Differentiation of Mammalian Sensory Hair Cell Progenitors: A Requirement for EGF and Periostic Mesenchyme. *Dev. Biol.* **272**, 432-447.
- Erichsen, S., Zuo, J., Curtis, L., Rarey, K. und Hultcrantz, M. (1996). Na,K-ATPase Alpha- and Beta-Isoforms in the Developing Cochlea of the Mouse. *Hear. Res.* **100**, 143-149.
- Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F. und Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl- Channel Beta-Subunit Crucial for Renal Cl- Reabsorption and Inner Ear K+ Secretion. *Nature* **414**, 558-561.
- Everett, L. A., Glaser, B., Beck, J. C., Idol, J. R., Buchs, A., Heyman, M., Adawi, F., Hazani, E., Nassir, E., Baxevanis, A. D. et al. (1997). Pendred Syndrome is Caused by Mutations in a Putative Sulphate Transporter Gene (PDS). *Nat. Genet.* **17**, 411-422.
- Everett, L. A., Morsli, H., Wu, D. K. und Green, E. D. (1999). Expression Pattern of the Mouse Ortholog of the Pendred's Syndrome Gene (Pds) Suggests a Key Role for Pendrin in the Inner Ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9727-9732.
- Ficker, M., Powles, N., Warr, N., Pirvola, U. und Maconochie, M. (2004). Analysis of Genes from Inner Ear Developmental-Stage cDNA Subtraction Reveals Molecular Regionalization of the Otic Capsule. *Dev. Biol.* **268**, 7-23.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Evans, W. H., Lench, N. und Souter, M. (1999). Gap Junctions and Connexin Expression in the Inner Ear. *Novartis Found. Symp.* **219**, 134-50; discussion 151-6.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N. und Nevill, G. (2003). Gap Junctions in the Inner Ear: Comparison of Distribution Patterns in Different Vertebrates and Assessment of Connexin Composition in Mammals. *J. Comp. Neurol.* **467**, 207-231.
- Forge, A. und Wright, T. (2002). The Molecular Architecture of the Inner Ear. *Br. Med. Bull.* **63**, 5-24.
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D. und Goodfellow, P. N. (1994). Campomelic Dysplasia and Autosomal Sex Reversal Caused by Mutations in an SRY-Related Gene. *Nature* **372**, 525-530.
- Frenz, D. A., Galinovic-Schwartz, V., Liu, W., Flanders, K. C. und Van de Water, T. R. (1992). Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is an Epithelial-Derived Signal Peptide that Influences Otic Capsule Formation. *Dev. Biol.* **153**, 324-336.
- Frenz, D. A., Liu, W., Williams, J. D., Hatcher, V., Galinovic-Schwartz, V., Flanders, K. C. und Van De Water, T. R. (1994). Induction of Chondrogenesis: Requirement for Synergistic Interaction of Basic Fibroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor-Beta. *Development* **120**, 415-424.
- Frenz, D. A. und Van De Water, T. R. (1991). Epithelial Control of Periostic Mesenchyme Chondrogenesis. *Dev. Biol.* **144**, 38-46.
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S. und Scaal, M. (2008). Wnt Signaling in Limb Organogenesis. *Organogenesis* **4**, 109-115.
- Gow, A., Davies, C., Southwood, C. M., Frolenkov, G., Chrustowski, M., Ng, L., Yamauchi, D., Marcus, D. C. und Kachar, B. (2004). Deafness in Claudin 11-Null Mice Reveals the Critical Contribution of Basal Cell Tight Junctions to Stria Vascularis Function. *J. Neurosci.* **24**, 7051-7062.
- Guo, X., Day, T. F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L. und Yang, Y. (2004). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling is Sufficient and Necessary for Synovial Joint Formation. *Genes and Development* **18**, 2404-2417.
- Hanley, K. P., Oakley, F., Sugden, S., Wilson, D. I., Mann, D. A. und Hanley, N. A. (2008). Ectopic SOX9 Mediates Extracellular Matrix Deposition Characteristic of Organ Fibrosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 14063-14071.
- Hartmann, C. und Tabin, C. J. (2001). Wnt-14 Plays a Pivotal Role in Inducing Synovial Joint Formation in the Developing Appendicular Skeleton. *Cell* **104**, 341-351.
- Hasson, T., Heintzelman, M. B., Santos-Sacchi, J., Corey, D. P. und Mooseker, M. S. (1995). Expression in Cochlea and Retina of Myosin VIIa, the Gene Product Defective in Usher Syndrome Type 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9815-9819.
- Hemond, S. G. und Morest, D. K. (1992). Trophic Effects of Otic Epithelium on Cochleo-Vestibular Ganglion Fiber Growth in Vitro. *Anat. Rec.* **232**, 273-284.
- Hequembourg, S. und Liberman, M. C. (2001). Spiral Ligament Pathology: A Major Aspect of Age-Related Cochlear Degeneration in C57BL/6 Mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: {JARO}* **2**, 118-129.
- Hill, T. P., Später, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. und Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes. *Developmental Cell* **8**, 727-738.
- Hirose, K. und Liberman, M. C. (2003). Lateral Wall Histopathology and Endocochlear Potential in the Noise-Damaged Mouse Cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: {JARO}* **4**, 339-352.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S. und Chung, U. -. (2004). The Combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX Trio) Provides Signals Sufficient for Induction of Permanent Cartilage. *Arthritis Rheum. ; Arthritis Rheum.* **50**, 3561-3573.
- Ito, M., Spicer, S. S. und Schulte, B. A. (1993). Immunohistochemical Localization of Brain Type Glucose Transporter in Mammalian Inner Ears: Comparison of Developmental and Adult Stages. *Hear. Res.* **71**, 230-238.

- Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N. und Costantini, F.** (2002). Wnt/beta-catenin/Tef Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1172-1183.
- Jin, Z., Mannström, P., Järlebark, L. und Ulfendahl, M.** (2007). Malformation of Stria Vascularis in the Developing Inner Ear of the German Waltzing Guinea Pig. *Cell Tissue Res.* **328**, 257-270.
- Kahle, W. und Frotscher, M.** (2002). *Taschenatlas Der Anatomie 3. Nervensystem Und Sinnesorgane.*, pp. 419: Thieme, Stuttgart.
- Kelly, M. und Chen, P.** (2007). Shaping the Mammalian Auditory Sensory Organ by the Planar Cell Polarity Pathway. *Int. J. Dev. Biol.* **51**, 535-547.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F. und Leigh, I. M.** (1997). Connexin 26 Mutations in Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Deafness. *Nature* **387**, 80-83.
- Kiernan, A. E., Steel, K. P. und Fekete, D. M.** (2002). Development of the Mouse Inner Ear. In *Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis.* (ed. J. Rossant), pp. 539-566. San Diego: San Diego, CA: Academic Press.
- Kikuchi, K. und Hilding, D. A.** (1966). The Development of the Stria Vascularis in the Mouse. *Acta Otolaryngol. ; Acta Otolaryngol.* **62**, 277-291.
- Kikuchi, T., Adams, J. C., Miyabe, Y., So, E. und Kobayashi, T.** (2000). Potassium Ion Recycling Pathway Via Gap Junction Systems in the Mammalian Cochlea and its Interruption in Hereditary Nonsyndromic Deafness. *Med. Electron. Microsc.* **33**, 51-56.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L. und Adams, J. C.** (1995). Gap Junctions in the Rat Cochlea: Immunohistochemical and Ultrastructural Analysis. *Anat. Embryol. (Berl)* **191**, 101-118.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., Takasaka, T. und Adams, J. C.** (2000). Gap Junction Systems in the Mammalian Cochlea. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **32**, 163-166.
- Kist, R., Schrewe, H., Balling, R. und Scherer, G.** (2002). Conditional Inactivation of Sox9: A Mouse Model for Campomelic Dysplasia. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **32**, 121-123.
- Kitajiri, S., Miyamoto, T., Mineharu, A., Sonoda, N., Furuse, K., Hata, M., Sasaki, H., Mori, Y., Kubota, T., Ito, J. et al.** (2004). Compartmentalization Established by Claudin-11-Based Tight Junctions in Stria Vascularis is Required for Hearing through Generation of Endocochlear Potential. *J. Cell. Sci.* **117**, 5087-5096.
- Kraus, F., Haenig, B. und Kispert, A.** (2001). Cloning and Expression Analysis of the Mouse T-Box Gene Tbx18. *Mech. Dev.* **100**, 83-86.
- Lang, H., Bever, M. M. und Fekete, D. M.** (2000). Cell Proliferation and Cell Death in the Developing Chick Inner Ear: Spatial and Temporal Patterns. *J. Comp. Neurol.* **417**, 205-220.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirschhain, J. und Kemler, R.** (1994). E-Cadherin Null Mutant Embryos Fail to Form a Trophectoderm Epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8263-8267.
- Lefebvre, V. und Crombrughe, B. d.** (1998). Toward Understanding SOX9 Function in Chondrocyte Differentiation. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **16**, 529-540.
- Levin, M.** (2007). Gap Junctional Communication in Morphogenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 186-206.
- Li, J. und Verkman, A. S.** (2001). Impaired Hearing in Mice Lacking Aquaporin-4 Water Channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 31233-31237.
- Liu, W., Li, G., Chien, J. S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C. und Frenz, D. A.** (2002). Sonic Hedgehog Regulates Otic Capsule Chondrogenesis and Inner Ear Development in the Mouse Embryo. *Dev. Biol.* **248**, 240-250.
- Liu, W., Oh, S. H., Kang Yk, Y., Li, G., Doan, T. M., Little, M., Li, L., Ahn, K., Crenshaw, E. B., 3rd und Frenz, D. A.** (2003). Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4): A Regulator of Capsule Chondrogenesis in the Developing Mouse Inner Ear. *Dev. Dyn.* **226**, 427-438.
- Maddox, B. K., Garofalo, S., Horton, W. A., Richardson, M. D. und Trune, D. R.** (1998). Craniofacial and Otic Capsule Abnormalities in a Transgenic Mouse Strain with a Col2a1 Mutation. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. ; J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **18**, 195-201.
- Mansour, S. L., Goddard, J. M. und Capecchi, M. R.** (1993). Mice Homozygous for a Targeted Disruption of the Proto-Oncogene Int-2 have Developmental Defects in the Tail and Inner Ear. *Development* **117**, 13-28.
- Marcus, D. C., Sunose, H., Liu, J., Bennett, T., Shen, Z., Scofield, M. A. und Ryan, A. F.** (1998). Protein Kinase C Mediates P2U Purinergic Receptor Inhibition of K<sup>+</sup> Channel in Apical Membrane of Strial Marginal Cells. *Hear. Res.* **115**, 82-92.
- Marcus, D. C., Wu, T., Wangemann, P. und Kofuji, P.** (2002). KCNJ10 (kir4.1) Potassium Channel Knockout Abolishes Endocochlear Potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**,
- McGuirt, J. P. und Schulte, B. A.** (1994). Distribution of Immunoreactive Alpha- and Beta-Subunit Isoforms of Na,K-ATPase in the Gerbil Inner Ear. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 843-853.
- McKenzie, E., Krupin, A. und Kelley, M. W.** (2004). Cellular Growth and Rearrangement during the Development of the Mammalian Organ of Corti. *Dev. Dyn.* **229**, 802-812.
- McPhee, J. R. und Van de Water, T. R.** (1986). Epithelial-Mesenchymal Tissue Interactions Guiding Otic Capsule Formation: The Role of the Otocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97**, 1-24.
- Minowa, O., Ikeda, K., Sugitani, Y., Oshima, T., Nakai, S., Katori, Y., Suzuki, M., Furukawa, M., Kawase, T., Zheng, Y. et al.** (1999). Altered Cochlear Fibrocytes in a Mouse Model of DFN3 Nonsyndromic Deafness. *Science* **285**, 1408-1411.
- Miura, T., Shiota, K. und Morriss-Kay, G.** (2004). A Mesenchyme-Free Culture System to Elucidate the Mechanism of Otic Vesicle Morphogenesis. *J. Anat.* **205**, 297-312.
- Mizuta, K., Adachi, M. und Iwasa, K. H.** (1997). Ultrastructural Localization of the Na-K-Cl Cotransporter in the Lateral Wall of the Rabbit Cochlear Duct. *Hear. Res.* **106**, 154-162.

- Moorman, A. F., Houweling, A. C., de Boer, P. A. und Christoffels, V. M.** (2001). Sensitive Nonradioactive Detection of mRNA in Tissue Sections: Novel Application of the Whole-Mount in Situ Hybridization Protocol. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1-8.
- Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. und Wu, D. K.** (1998). Development of the Mouse Inner Ear and Origin of its Sensory Organs. *J. Neurosci.* **18**, 3327-3335.
- Morsli, H., Tuorto, F., Choo, D., Postiglione, M. P., Simeone, A. und Wu, D. K.** (1999). Otx1 and Otx2 Activities are Required for the Normal Development of the Mouse Inner Ear. *Development* **126**, 2335-2343.
- Motohashi, H., Hozawa, K., Oshima, T., Takeuchi, T. und Takasaka, T.** (1994). Dysgenesis of Melanocytes and Cochlear Dysfunction in Mutant Microphthalmia (Mi) Mice. *Hear. Res. ; Hear. Res.* **80**, 10-20.
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K. und Takahashi, Y.** (2004). Mesenchymal-Epithelial Transition during Somitic Segmentation is Regulated by Differential Roles of Cdc42 and Rac1. *Dev. Cell.* **7**, 425-438.
- Nejsum, L. N. und Nelson, W. J.** (2007). A Molecular Mechanism Directly Linking E-Cadherin Adhesion to Initiation of Epithelial Cell Surface Polarity. *J. Cell Biol. ; J. Cell Biol.* **178**, 323-335.
- O'Gorman, S.** (2005). Second Branchial Arch Lineages of the Middle Ear of Wild-Type and Hoxa2 Mutant Mice. *Dev. Dyn.* **234**, 124-131.
- Orr, M. F.** (1976). The Influence of Mesenchyme on the Development of the Embryonic Chick Otocyst Epithelium. *J. Cell Biol.* **70**, 155a.
- Phippard, D., Heydemann, A., Lechner, M., Lu, L., Lee, D., Kyin, T. und Crenshaw, E. B.** (1998). Changes in the Subcellular Localization of the Brn4 Gene Product Precede Mesenchymal Remodeling of the Otic Capsule. *Hear. Res.* **120**, 77-85.
- Phippard, D., Lu, L., Lee, D., Saunders, J. C. und Crenshaw, E. B.** (1999). Targeted Mutagenesis of the POU-Domain Gene Brn4/Pou3f4 Causes Developmental Defects in the Inner Ear. *J. Neurosci.* **19**, 5980-5989.
- Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M. und Hynes, R. O.** (1997). Developmental Defects in Mouse Embryos Lacking N-Cadherin. *Dev. Biol.* **181**, 64-78.
- Raft, S., Nowotschin, S., Liao, J. und Morrow, B. E.** (2004). Suppression of Neural Fate and Control of Inner Ear Morphogenesis by Tbx1. *Development* **131**, 1801-1812.
- Raich, W. B., Agbunag, C. und Hardin, J.** (1999). Rapid Epithelial-Sheet Sealing in the Caenorhabditis Elegans Embryo Requires Cadherin-Dependent Filopodial Priming. *Current Biology* **9**, 1139-1146.
- Rajagopal, J., Carroll, T. J., Guseh, J. S., Bores, S. A., Blank, L. J., Anderson, W. J., Yu, J., Zhou, Q., McMahon, A. P. und Melton, D. A.** (2008). Wnt7b Stimulates Embryonic Lung Growth by Coordinately Increasing the Replication of Epithelium and Mesenchyme. *Development* **135**, 1625-1634.
- Raphael, Y. und Altschuler, R. A.** (2003). Structure and Innervation of the Cochlea. *Brain Res. Bull.* **60**, 397-422.
- Riccomagno, M. M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D. K. und Epstein, D. J.** (2002). Specification of the Mammalian Cochlea is Dependent on Sonic Hedgehog. *Genes Dev.* **16**, 2365-2378.
- Ross, M. W. und Reith, E. J.** (1985). *Histology: A Text and Atlas*, pp. 766: New York : Harper & Row, c1985.
- Sadanaga, M. und Morimitsu, T.** (1995). Development of Endocochlear Potential and its Negative Component in Mouse Cochlea. *Hear. Res.* **89**, 155-161.
- Sagara, T., Furukawa, H., Makishima, K. und Fujimoto, S.** (1995). Differentiation of the Rat Stria Vascularis. *Hear. Res.* **83**, 121-132.
- Salt, A. N. und Ohyama, K.** (1993). Accumulation of Potassium in Scala Vestibuli Perilymph of the Mammalian Cochlea. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **102**, 64-70.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schiebler, T. H., Schmidt, W. und Zilles, K. J.** (1999). Anatomie. Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, Makroskopische Und Mikroskopische Anatomie Des Menschen. Unter Berücksichtigung Des Gegenstandskatalogs (Springer-Lehrbuch): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggreffe, M. et al.** (1997). KCNE1 Mutations Cause Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Nat. Genet.* **17**, 267-268.
- Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G. und Sander, M.** (2007). SOX9 is Required for Maintenance of the Pancreatic Progenitor Cell Pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1865-1870.
- Sher, A. E.** (1971). The Embryonic and Postnatal Development of the Inner Ear of the Mouse. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **285**, 1-77.
- Smith, R. L., Geller, A. I., Escudero, K. W. und Wilcox, C. L.** (1995). Long-Term Expression in Sensory Neurons in Tissue Culture from Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Promoters in an HSV-1-Derived Vector. *J. Virol.* **69**, 4593-4599.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., De Crombrughe, B. und Lefebvre, V.** (2001). The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 are Essential for Cartilage Formation. *Developmental Cell* **1**, 277-290.
- Soriano, P.** (1999). Generalized lacZ Expression with the ROSA26 Cre Reporter Strain. *Nat. Genet.* **21**, 70-71.
- Spicer, S. S. und Schulte, B. A.** (1991). Differentiation of Inner Ear Fibrocytes According to their Ion Transport Related Activity. *Hear. Res.* **56**, 53-64.
- Spicer, S. S. und Schulte, B. A.** (1996). The Fine Structure of Spiral Ligament Cells Relates to Ion Return to the Stria and Varies with Place-Frequency. *Hear. Res.* **100**, 80-100.
- Steel, K. P. und Barkway, C.** (1989). Another Role for Melanocytes: Their Importance for Normal Stria Vascularis Development in the Mammalian Inner Ear. *Development; Development* **107**, 453-463.

- Steel, K., Davidson, D. und Jackson, I. (1992). TRP-2/DT, a New Early Melanoblast Marker, shows that Steel Growth Factor (c-Kit Ligand) is a Survival Factor. *Development* **115**, 1111-1119.
- Sumi, E., Iehara, N., Akiyama, H., Matsubara, T., Mima, A., Kanamori, H., Fukatsu, A., Salant, D. J., Kita, T., Arai, H. et al. (2007). SRY-Related HMG Box 9 Regulates the Expression of Col4a2 through Transactivating its Enhancer Element in Mesangial Cells. *Am. J. Pathol.* **170**, 1854-1864.
- Swanson, G. J., Howard, M. und Lewis, J. (1990). Epithelial Autonomy in the Development of the Inner Ear of a Bird Embryo. *Dev. Biol.* **137**, 243-257.
- Tachibana, M. (1999). Sound Needs Sound Melanocytes to be Heard. *Pigm. Cell Res.* **12**, 344-354.
- Tachibana, M. (2001). Cochlear Melanocytes and MITF Signaling. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **6**, 95-98.
- Takahashi, T. und Kimura, R. S. (1970). The Ultrastructure of the Spiral Ligament in the Rhesus Monkey. *Acta Otolaryngol.* **69**, 46-60.
- ten Cate, W. J., Curtis, L. M. und Rarey, K. E. (1994). Effects of Low-Sodium, High-Potassium Dietary Intake on Cochlear Lateral Wall Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **251**, 6-11.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. und Peifer, M. (2000). Cadherins in Embryonic and Neural Morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 91-100.
- Taubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Sohl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J. et al. (2003). Connexin30 (Gjb6)-Deficiency Causes Severe Hearing Impairment and Lack of Endocochlear Potential. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 13-21.
- Thiery, J. P. und Sleeman, J. P. (2006). Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* **7**, 131-142.
- Topol, L., Chen, W., Song, H., Day, T. F. und Yang, Y. (2009). Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting  $\beta$ -Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **284**, 3323-3333.
- Torres, M. und Giraldez, F. (1998). The Development of the Vertebrate Inner Ear. *Mech. Dev.* **71**, 5-21.
- Tunggal, J. A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Gunzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T. und Niessen, C. M. (2005). E-Cadherin is Essential for in Vivo Epidermal Barrier Function by Regulating Tight Junctions. *EMBO J.* **24**, 1146-1156.
- Van De Water, T. R. und Galinovic-Schwartz, V. (1987). Collagen Type II in the Otic Extracellular Matrix. Effect on Inner Ear Development. *Hear. Res.* **30**, 39-48.
- Van de Water, T. R. und McPhee, J. R. (1987). Determinants of Otic Capsule Formation. *Laryngoscope* **97**, 315-322.
- Vanderburg, C. R. und Hay, E. D. (1996). E-Cadherin Transforms Embryonic Corneal Fibroblasts to Stratified Epithelium with Desmosomes. *Acta Anat.* **157**, 87-104.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. und Fuchs, E. (2000). Directed Actin Polymerization is the Driving Force for Epithelial Cell- Cell Adhesion. *Cell; Cell* **100**, 209-219.
- Vetter, D. E., Mann, J. R., Wangemann, P., Liu, J., McLaughlin, K. J., Lesage, F., Marcus, D. C., Lazdunski, M., Heinemann, S. F. und Barhanin, J. (1996). Inner Ear Defects Induced by Null Mutation of the Isk Gene. *Neuron* **17**, 1251-1264.
- Vitelli, F., Viola, A., Morishima, M., Pramparo, T., Baldini, A. und Lindsay, E. (2003). TBX1 is Required for Inner Ear Morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2041-2048.
- Vortkamp, A. (2001). Interaction of Growth Factors Regulating Chondrocyte Differentiation in the Developing Embryo. *Osteoarthritis Cartilage* **9 Suppl A**, S109-117.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J. und Hustert, E. (1994). Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia are Caused by Mutations in and Around the SRY-Related Gene SOX9. *Cell* **79**, 1111-1120.
- Wangemann, P. (1995). Comparison of Ion Transport Mechanisms between Vestibular Dark Cells and Strial Marginal Cells. *Hear. Res.* **90**, 149-157.
- Wangemann, P. (2002). K<sup>+</sup> Cycling and the Endocochlear Potential. *Hear. Res.* **165**, 1-9.
- Wangemann, P. (2006). Supporting Sensory Transduction: Cochlear Fluid Homeostasis and the Endocochlear Potential. *J. Physiol.* **576**, 11-21.
- Wiese, C., Grieskamp, T., Airik, R., Mommersteeg, M. T., Gardiwal, A., de Gier-de Vries, C., Schuster-Gossler, K., Moorman, A. F., Kispert, A. und Christoffels, V. M. (2009). Formation of the Sinus Node Head and Differentiation of Sinus Node Myocardium are Independently Regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ. Res.* **104**, 388-397.
- Wright, T. J. und Mansour, S. L. (2003). Fgf3 and Fgf10 are Required for Mouse Otic Placode Induction. *Development* **130**, 3379-3390.
- Xia, A., Katori, Y., Oshima, T., Watanabe, K., Kikuchi, T. und Ikeda, K. (2001). Expression of Connexin 30 in the Developing Mouse Cochlea. *Brain Res.* **898**, 364-367.
- Xia, A., Kikuchi, T., Hozawa, K., Katori, Y. und Takasaka, T. (1999). Expression of Connexin 26 and Na,K-ATPase in the Developing Mouse Cochlear Lateral Wall: Functional Implications. *Brain Res.* **846**, 106-111.
- Xu, H., Chen, L. und Baldini, A. (2007a). In Vivo Genetic Ablation of the Periotic Mesoderm Affects Cell Proliferation Survival and Differentiation in the Cochlea. *Dev. Biol.* **310**, 329-340.
- Xu, H., Viola, A., Zhang, Z., Gerken, C. P., Lindsay-illingworth, E. A. und Baldini, A. (2007b). Tbx1 Regulates Population, Proliferation and Cell Fate Determination of Otic Epithelial Cells. *Dev. Biol.* **302**, 670-682.

- 
- Yamasaki, M., Komune, S., Shimozone, M., Matsuda, K. und Haruta, A.** (2000) Development of Monovalent Ions in the Endolymph in Mouse Cochlea. *ORL; } Journal for {Oto-Rhino-Laryngology} and Its Related Specialties* **62**, 241-246.
- Yeaman, C., Grindstaff, K. K. und Nelson, W. J.** (1999). New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiol. Rev. ; Physiol. Rev.* **79**, 73-98.
- Young, P., Boussadia, O., Halfter, H., Grose, R., Berger, P., Leone, D. P., Robenek, H., Charnay, P., Kemler, R. und Suter, U.** (2003). E-Cadherin Controls Adherens Junctions in the Epidermis and the Renewal of Hair Follicles. *EMBO J.* **22**, 5723-5733.
- Zhu, S., Barbe, M. F., Amin, N., Rani, S., Popoff, S. N., Safadi, F. F. und Litvin, J.** (2008). Immunolocalization of Periostin-Like Factor and Periostin during Embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* **56**, 329-345.
- Zidanic, M. und Brownell, W. E.** (1990). Fine Structure of the Intracochlear Potential Field. I. the Silent Current. *Biophys. J.* **57**, 1253-1268.

## 6. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mark-Oliver Trowe  
Geburtsdatum: 22.12.1978  
Geburtsort: Gifhorn  
Eltern: Astrid Trowe, geb. Wilske und Heinz-Peter Trowe  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1985-1989 Besuch der Grundschule Fallersleben  
1989-1991 Besuch der Orientierungsstufe Fallersleben  
1991-1998 Besuch des Gymnasiums Fallersleben  
1998 Abitur am Gymnasium Fallersleben

### Zivildienst

1998-1999 Zivildienst in der Lebenshilfe Wolfsburg gGmbH im Bereich der Betreuung von Schwerstbehinderten

### Hochschulstudium

1999-2004 Studium der Biologie an der Leibniz Universität Hannover  
2001 Diplom-Vorprüfungen  
2003 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Zell- und Entwicklungsbiologie, Zoologie und Verhaltensbiologie  
2004 Anfertigung der Diplomarbeit: "Funktionelle Analyse von *Tbx18* in der Entwicklung des Innenohrs der Maus" am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Prof. Dr. A. Kispert  
2004-2009 Wissenschaftliche Tätigkeit im Rahmen meiner Dissertation im Labor von Prof. Dr. A. Kispert am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

## 7. Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms der Maus“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

---

(Mark-Oliver Trowe)

## 8. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### ***Tbx20* is Essential for Cardiac Chamber Differentiation and Repression of *Tbx2*.**

Singh, M. K., Christoffels, V. M., Dias, J. M., **Trowe, M. O.**, Petry, M., Schuster-Gossler, K., Bürger, A., Ericson, J. und Kispert, A. (2005).  
Development **132**, 2697-2707.

### **Formation of the Venous Pole of the Heart from an *Nkx2-5*-Negative Precursor Population Requires *Tbx18*.**

Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T. M., **Trowe, M. O.**, Prall, O. W. J., Vries, C. d. G., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F. M. und Kispert, A. (2006).  
Circ. Res. **98**, 1555-1563.

### **Deafness in Mice Lacking the T-Box Transcription Factor *Tbx18* in Otic Fibrocytes.**

**Trowe, M. O.**, Maier, H., Schweizer, M. und Kispert, A. (2008).  
Development **135**, 1725-1734.

## 9. Anhang

Identifizierte Zielgene mit 2fach deregulierter Expression in Tbx18<sup>-/-</sup> Embryonen.

Gen/Bezeichnung	Gen-Symbol	alternatives Gen Symbol	Genbank ID	Ratio E13,5	Ratio E18,5
0610007P08Rik	0610007P08Rik		AK006112	0.49	0.80
1110014L15Rik	1110014L15Rik		AK003710	0.35	0.81
1700029I01	1700029I01	LOC195534	XM_112241	0.36	0.62
2810405F04	2810405F04	AK012991	AK012991	0.48	0.71
2810408B13Rik	2810408B13Rik		AK013043	0.32	0.55
2900022M07Rik	2900022M07Rik		AK013576	0.49	0.93
4933421E11Rik	4933421E11Rik		AK008209	0.42	0.74
5430403G16Rik	5430403G16Rik		AK019943	0.34	0.57
603348771F1 NCI_CGAP_Mam2 cDNA clone IMAGE:5376568	603348771F1		BI697602	0.49	0.85
6720487G11Rik	6720487G11Rik		AK032995	0.43	0.72
9530096H18	9530096H18		AK035725	0.49	0.91
A130099H15	A130099H15	AK038372	AK038372	0.48	0.73
A630090O22	A630090O22		TC1331487	0.13	1.11
ACN9 homolog (S. cerevisiae)	A.cn9		AK028031	0.50	0.76
acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	A.cb5		NM_028793	0.48	0.77
acylphosphatase 2, muscle type	A.cyp2		NM_029344	0.47	0.78
ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 6	A.rl6ip6		NM_022989	0.39	0.75
anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	Anln		NM_028390	0.49	0.82
antagonist of mitotic exit network 1 homolog (S. cerevisiae)	Amn1	C730024G19Rik	XM_132975	0.43	0.76
anti-DNA monoclonal antibody G6-23 heavy chain variable region mRNA	AF289178		AF289178	1.16	0.02
asporin	A.spn		NM_025711	0.37	0.77
AT motif binding factor 1	Abf1		NM_007496	0.50	0.53
AT rich interactive domain 4B (Rbp1 like)	A.rid4b		NM_194262	0.50	0.75
ATPase family, AAA domain containing 2	Atad2		NM_027435	0.44	0.68
ATPase subunit 6 (Alpase6) mRNA, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein	mt-Atp6		AF093677	1.28	3.11
ATPase, (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 4 polypeptide	Atp1b4		NM_133690	1.02	0.44
autophagy-related 16-like 1 (yeast)	Atg16l1	App16l	AK048873	1.05	0.02
AW476689	AW476689		AW476689	0.49	0.72
axin2	A.xin2		NM_015732	0.50	0.54
BB290591	BB290591		BB290591	0.46	0.80
beta-2 microglobulin	B.2m		NM_009735	0.39	0.66
bone morphogenetic protein 5	Bmp5		NM_007555	0.47	0.70
bone morphogenetic protein receptor, type 1A	Bmpr1a		NM_009758	0.49	0.71
c-myc binding protein	Myebp		NM_019660	0.47	0.71
C1q and tumor necrosis factor related protein 3	C1qtnf3		NM_030888	0.39	0.91
C330012M03	C330012M03	TC1296273	TC1296273	0.49	0.77
cadherin 11	Cdh11		NM_009866	0.34	0.64
calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	Caen1a		NM_007578	2.29	1.21
caldesmon 1	Cald1		NM_145575	0.36	0.86
cAMP responsive element binding protein 5	Creb5		NM_172728	0.67	0.45
carbonic anhydrase 3	Car3		NM_007606	0.79	0.41
casein kinase 1, gamma 3	Csnk1g3		NM_152809	0.49	0.68
catenin beta	Catnb		NM_007614	0.48	0.78
caveolin 2	Cav2		NM_016900	0.47	0.84
CCR4-NOT transcription complex, subunit 7	Cnct7		NM_011135	0.45	0.69
CD164 antigen	Cd164		NM_016898	0.39	0.57
cDNA clone IMAGE:1282549	BC068026		BC068026	0.47	0.76
cDNA clone MGC:60813 IMAGE:30044792	2610036A22Rik		BC058613	0.25	0.50
cDNA clone MGC:7593 IMAGE:3493893	BC004015		BC004015	0.40	0.79
cDNA clone MGC:76792 IMAGE:30106557	BC066874		BC066874	0.32	0.57
cDNA clone MGC:90082 IMAGE:6418362	4930432021Rik		BC066031	0.29	0.51
cDNA sequence BC002059 (BC002059)	BC002059		NM_145397	0.46	0.65
cDNA sequence BC002199 (BC002199)	BC002199		NM_145964	0.43	0.64
cDNA sequence BC029127	BC029127		BC029127	0.38	0.57
cDNA sequence BC031441	BC031441		NM_146249	0.38	0.62
cerebral cavernous malformations 1	Ccm1		NM_030675	0.38	0.63
Ceruloplasmin precursor (Ferroxidase), complete [TC1346305]	TC1346305		TC1346305	0.96	0.42
choline phosphotransferase 1	Chpt1		NM_144807	0.48	0.84
chondroitin sulfate proteoglycan 6	Cspg6		NM_007790	0.42	0.81
chondroitin sulfate synthase 3	Chsy3	4833446K15Rik	AK019528	0.44	0.90
chromosome condensation 1-like	Chc1l		NM_134083	0.46	0.75
clathrin, heavy polypeptide (Hc)	Clhc		NM_001003908	0.49	0.78
cleavage and polyadenylation factor subunit homolog (S. cerevisiae)	Pef11	2500001H09Rik	NM_029078	0.47	0.70
coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)	Coch		NM_007728	0.55	0.23
coiled coil domain containing 88A	Ccdc88a	A430106J12Rik	AK129310	0.44	0.48
coiled-coil domain containing 150	Ccdc150	4930511H11Rik	AK019675	1.04	0.11
coiled-coil domain containing 90A	Ccdc90a	6230416A05Rik	XM_127325	0.96	0.46
collectin sub-family member 12	Colec12		NM_130449	0.39	0.57
complement factor H-related protein	Cfh		M29009	0.61	0.45
COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 2 (Arabidopsis thaliana)	Cops2		AK084421	0.25	0.56
cortactin binding protein 2	Cttnbp2	Cttnbp2	AK032356	0.43	0.77
CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	Cri1		NM_025613	0.48	0.78
cryptochrome 1 (photolyase-like)	Cry1		NM_007771	0.38	0.66
CWF19-like 2, cell cycle control (S. pombe)	Cwf19l2		NM_027545	0.48	0.81
cyclin E2	Cne2		AK011883	0.46	0.80
cyclin-dependent kinase 2	Cdk2		NM_016756	0.37	0.69
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70	Cyp2c70		NM_145499	1.25	2.15

Gen/Bezeichnung	Gen-Symbol	alternatives Gen Symbol	Genbank ID	Ratio E13,5	Ratio E18,5
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	Cyp2E2		NM_007817	1.08	0.46
D14Ert4581e	Pjbf1	D14Ert4581e	NM_029320	0.44	0.66
D330022K07Rik	D330022K07Rik		AK084625	0.42	0.78
D330040H18Rik	D330040H18Rik		AK084765	0.46	0.84
D730030D23	D730030D23	AK085728	AK085728	0.95	0.27
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	Ddx3y		AK020213	0.27	0.62
dedicator of cytokinesis 11	Dock11		NM_001009947	0.44	0.70
deoxycytidine kinase	Dck		NM_007832	0.36	0.64
DEP domain containing 1a	Depdc1a		NM_029523	0.42	0.84
DEP domain containing 7	Depdc7	AV216087	NM_144804	0.46	0.67
dermatan sulphate proteoglycan 3	Dspg3		NM_007884	0.33	0.87
dihydrofolate reductase	Dhfr		NM_010049	0.50	0.66
dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)	Dus1l	AK179723	AK179723	1.64	2.09
Dmx-like 1	Dmxl1	C630007L23Rik	BC056490	0.46	0.78
DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 681, expressed	D4Ert4681e	D4Ert4681e	AK078562	0.45	0.80
DnaJ (Hsp40) homolog, sub family B, member 6	Dnajb6		NM_011847	0.49	0.71
E1A binding protein p300	Ep300		NM_177821	0.46	0.76
E2F transcription factor 4	E2f4		NM_148952	0.48	0.79
early growth response 1	Egr1		NM_007913	0.74	2.12
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	Eps8		NM_007945	0.48	0.58
ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	Edem3	2310050N11Rik	BC022925	0.46	1.07
ErbB2 interacting protein	ErbB2ip		NM_001005868	0.50	0.64
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked	Eif2s3y		NM_012011	0.45	0.73
expressed sequence AI593442	AI593442		AK031845	0.92	2.37
expressed sequence AI987944	AI987944		NM_183167	0.34	0.58
F-box and leucine-rich repeat protein 3	Fbxl3		NM_015822	0.48	0.86
family with sequence similarity 115, member A	Fam115a	3321401G04Rik	AK173013	0.49	0.84
family with sequence similarity 126, member B	Fam126b	BC049806	NM_172513	0.49	0.73
family with sequence similarity 18, member B	Fam18b	1810036I24Rik	NM_026210	0.30	0.67
family with sequence similarity 73, member A	Fam73a	C030011O14Rik	AK083909	0.45	0.72
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos		NM_010234	0.38	4.22
FCH domain only 2	Fcho2	5832424M12Rik	NM_172591	0.47	0.72
FK506 binding protein 11	Fkbp11		NM_024169	0.47	0.67
forkhead box P2	Foxp2		NM_053242	0.45	0.67
fragile X mental retardation syndrome 1 homolog	Fmr1		NM_008031	0.48	0.87
frizzled homolog 1 (Drosophila)	Fzd1		NM_021457	0.48	0.79
fucose-1-phosphate guanylyltransferase	Fpgt		AJ276067	0.47	0.76
G protein-coupled receptor 23	Gpr23		NM_175271	0.49	1.02
gamma-aminobutyric acid (GABA-A) transporter 4	Gabt4		NM_172890	1.19	0.35
gasdermin 1	Gsdm1		NM_021347	0.15	1.10
glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1		NM_010271	1.15	0.40
golgi phosphoprotein 4	Golph4		NM_175193	0.45	0.75
growth arrest-specific 2 like 3	Gas2l3		AK018456	0.62	0.46
GTP-binding protein RAP1b	Rap1b		M79314	0.47	0.66
helicase, lymphoid specific	Hells		NM_008234	0.47	0.86
hemoglobin alpha, adult chain 1	Hba-a1		NM_008218	1.64	2.16
hemoglobin, beta adult major chain	Hbb-b1		NM_008220	1.31	2.66
high mobility group box 2	Hmgb2		AK011467	0.44	0.67
histone deacetylase 2	Hdac2		NM_008229	0.49	0.69
homeobox (Pmx)	Prrx1		U03873	0.49	0.78
homeodomain interacting protein kinase 1	Hipk1	AK122333	AK122333	0.47	0.79
hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Hapl1		NM_013500	0.31	1.05
hydrocephalus inducing	Hydin	AK006604	AK006604	0.45	0.57
hypothetical LOC434179	LOC434179		NM_001008427	0.31	0.54
hypothetical protein LOC230595	LOC230595		BC024681	0.39	0.64
inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	Inpa1		NM_018864	0.38	0.65
inositol polyphosphate-1-phosphatase	Inpp1	230002C06Rik	AK009002	0.31	0.78
intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)	Ifit80	4921524P20Rik	NM_026641	0.45	0.71
iron responsive element binding protein 2	Ireb2	BC044665	BC044665	0.50	0.87
jumonji domain containing 1C	Jmj1d1c		AK077400	0.47	0.74
karyopherin (importin) beta 1	Kpnb1		NM_008379	0.49	0.55
leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	Lrrcc1	1200008A14Rik	NM_028915	0.49	0.67
leucine rich repeat containing 58	Lrrc58	BC008232	BC008232	0.48	0.87
leucine zipper transcription factor-like 1	Lztlf1		NM_033322	0.46	0.78
leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 2	Lrch2		AK122516	0.38	0.68
limb and neural patterns	Lnp		NM_027133	0.48	0.74
lymphoid nuclear protein related to AF4-like	Laf4l		NM_033565	0.45	0.74
lysine (K)-specific demethylase 3A	Kdm3a	Jmj1d1a	AK129204	0.50	0.77
LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3	Lysmd3	1110030H10Rik	AK003980	0.36	0.81
lysophospholipase 1	Lyp1a1		NM_008866	0.48	0.72
lysosomal-associated membrane protein 3	Lamp3		NM_177356	0.47	0.78
lysosomal-associated protein transmembrane 4A	Laptn4a		NM_008640	0.47	0.78
M-phase phosphoprotein	Mphosph1		AY259532	0.41	0.69
MAD homolog 7 (Drosophila)	Smad7		NM_008543	0.48	0.71
mannosidase, endo-alpha	Manea		NM_172865	0.43	0.77
MAP kinase-activated protein kinase 2	Mapkapk2		NM_008551	0.17	1.15
matrilin 3 (Matn3)	Matn3		NM_010770	0.35	1.21
matrin 3 (Matr3)	Matr3		NM_010771	0.45	0.71

Gen/Bezeichnung	Gen-Symbol	alternatives Gen Symbol	Genbank ID	Ratio E13,5	Ratio E18,5
mediator complex subunit 13	Med13	1110067M05R.ik	AK042549	0.49	0.86
melanoma antigen family F, 1	Magef1	6430590I03R.ik	AK018285	0.41	0.70
membrane-associated ring finger (C3HC4) 6	March6	F830029L24R.ik	NM_172606	0.47	0.74
mitochondrial fission regulator 1	Mtfr1	I300002C08R.ik	NM_026182	0.46	0.94
mitochondrial gene for subunit I of cytochrome c oxidase	mt-Cytb		X57780	1.47	2.24
mitochondrial ribosomal protein L1 (Mrp11)	Mrp11		NM_053158	0.49	0.72
mitogen-activated protein kinase 6	Mapk6	2610021I23R.ik	AK011505	2.05	1.20
mitotic checkpoint component Mad2	Mad2l1		U83902	0.50	0.75
motile sperm domain containing 2	Mospd2		AK031405	0.49	0.85
Mouse alpha-globin mRNA	M10466		M10466	2.25	2.44
mRNA for mKIAA0225 protein	Nup205		AK129093	0.49	0.85
mRNA for mKIAA0562 protein	BC046331		AK129163	0.45	0.72
mRNA for mKIAA0709 protein	Mrc2		AK129195	1.21	0.11
mRNA for mKIAA1033 protein	A230046K03R.ik		AK129269	0.44	0.78
mRNA for mKIAA1461 protein	Mb45		AK173176	0.38	0.70
mRNA for mszf33, partial cds. [AB010352]	AB010352		AB010352	0.39	0.63
mRNA for mszf79-1, partial cds. [AB010324]	AB010324		AB010324	0.34	0.57
mRNA for mszf80-2, partial cds. [AB010370]	AB010370		AB010370	0.44	0.58
mRNA for mszf81, partial cds. [AB010340]	AB010340		AB010340	0.36	0.61
mRNA for mszf84, partial cds. [AB010342]	AB010342		AB010342	0.37	0.62
mRNA for mszf85, partial cds. [AB010343]	AB010343		AB010343	0.37	0.61
mRNA for mszf87, partial cds. [AB010372]	AB010372		AB010372	0.49	0.63
mRNA for mszf92, partial cds. [AB010356]	AB010356		AB010356	0.45	0.73
mRNA for zinc finger protein	D10627		D10627	0.36	0.58
MTEF domain containing 1	Mterfd1	2410017I18R.ik	NM_025547	0.38	0.62
muscleblind-like 2	Mbnl2		NM_175341	1.04	0.45
myosin, light polypeptide 1	My1l		NM_021285	0.94	0.49
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	Ndufa12	2410011G03R.ik	NM_025551	0.49	0.56
NCK-associated protein 1	Nckap1		NM_016965	0.46	0.60
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	Nedd4		NM_010890	2.31	1.56
Ng23	Ng23		AK019275	0.29	0.97
Nik related kinase	Nrk		NM_013724	0.47	0.83
ninein	Nin	3110068G20R.ik	AK014241	0.49	0.67
nuclear receptor coactivator 4	Ncoa4		NM_019744	0.49	0.72
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Nr2f1		NM_010151	0.46	0.61
nucleophosmin 1	Npm1		NM_008722	0.48	0.74
nucleoporin 107	Nup107		NM_134010	0.46	0.70
OL-protocadherin isoform	Pcdh10		AF334801	0.49	0.87
osteomodulin	Omd		NM_012050	0.44	1.12
PC4 and SFRS1 interacting protein 1	Psip1	TC1306614	TC1306614	0.48	0.67
pentaxin related gene	Ptx3		NM_008987	0.48	0.72
peroxisomal biogenesis factor 3	Pex3		NM_019961	0.47	0.79
PHD finger protein 20-like 1	Phf20l1		AK053606	0.49	0.80
PHD finger protein 6 (Phf6), mRNA [NM_027642]	Phf6		NM_027642	0.48	0.71
phosphatase and tensin homolog	Pten		AK030750	0.46	0.60
phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	Picalm		NM_146194	0.43	0.74
phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited	Pde3a		AK052718	0.50	0.85
phospholipase A2, group IVA	Pla2g4a		NM_008869	0.43	0.78
pleckstrin homology domain interacting protein	Phip		AK012667	0.47	0.77
pleiomorphic adenoma gene-like 1	Plagl1		BC065150	0.40	1.63
poly(rC) binding protein 1	Pcbp1		NM_011865	0.46	0.64
polyadenylate binding protein-interacting protein 1	Paip1		NM_145457	0.42	0.62
predicted gene, EG435366	EG435366	BC032201	BC032201	0.32	0.59
predicted gene, EG436332	EG436332	AK030194	AK030194	0.50	0.61
predicted gene, EG547091	EG547091	AB010317	AB010317	0.42	0.65
predicted gene, OTTMUSG00000010965	OTTMUSG00000010965	BC049807	NM_001002008	0.43	0.75
predicted gene, OTTMUSG00000010965	OTTMUSG00000010965	BC055069	BC055069	0.49	0.76
predicted gene, OTTMUSG00000016571	OTTMUSG00000016571	BC025828	BC025828	0.48	0.70
PREDICTED: ataxia telangiectasia and rad3 related	Atr		XM_147046	0.49	0.70
PREDICTED: RIKEN cDNA 1190002N15 gene	1190002N15R.ik		XM_147036	0.44	1.02
PREDICTED: similar to 14-3-3 protein tau (14-3-3 protein theta)	LOC383707		XM_487650	0.41	0.77
PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	LOC271022		XM_194845	0.36	0.63
PREDICTED: similar to hypothetical protein FLJ14345	LOC240038		XM_139814	0.30	0.55
PREDICTED: similar to hypothetical protein FLJ38281	LOC245305		XM_143022	0.33	0.50
PREDICTED: similar to hypothetical protein FLJ90396	LOC436153		XM_488274	0.45	0.63
PREDICTED: similar to inner nuclear membrane protein	LOC380664		XM_354566	0.44	0.92
PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 1700029I01	LOC385211		XM_358120	0.36	0.60
PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 1700029I01	LOC433783		XM_485478	0.38	0.63
PREDICTED: similar to zinc finger protein	LOC435917		XM_487962	0.35	0.59
PREDICTED: similar to zinc finger protein 125	LOC436141		XM_488260	0.33	0.57
PREDICTED: similar to zinc finger protein 14,	LOC240676		XM_140768	0.35	0.64
PREDICTED: similar to zinc finger protein 97	LOC240498		XM_140546	0.40	0.64
PREDICTED: similar to zinc finger protein 97	LOC270474		XM_194572	0.35	0.63
PREDICTED: similar to zinc finger protein 97	LOC382161		XM_356261	0.48	0.74
procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	Plod2		NM_011961	0.49	0.86
procollagen, type II, alpha 1	Col2a1		NM_031163	1.13	3.42
procollagen, type IV, alpha 5	Col4a5		NM_007736	0.44	0.76
programmed cell death 10	Pcdcd10		NM_019745	0.44	0.78

Gen/Bezeichnung	Gen-Symbol	alternatives Gen Symbol	Genbank ID	Ratio E13,5	Ratio E18,5
protein kinase C, beta 1	Prkcb1		NM_008855	1.29	0.26
protein kinase N2	Pkn2		AK083425	0.42	0.72
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	Ppp1r2		NM_025800	0.34	0.57
protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	Ppp3r1	TC1276767	TC1276767	0.50	0.76
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	Ptpn12		NM_011203	0.47	0.80
PTPRF interacting protein, binding protein 1	Ppfbp1		NM_026221	0.49	0.81
Q62512 (Q62512) Zinc finger protein (Fragment), partial (65%) [TC1259828]	TC1259828		TC1259828	0.35	0.59
Q6ZPT7 (Q6ZPT7) MKIAA1333 protein (Fragment), partial (86%) [TC1261736]	TC1261736		TC1261736	0.46	0.82
Q9UA50 (Q9UA50) Engrailed-related 1 protein (Fragment), partial (13%) [TC1264587]	TC1264587		TC1264587	0.45	0.83
quaking	Qk		AF090402	0.49	0.66
RAB11a, member RAS oncogene family	Rab11a		AK031143	0.42	0.84
RAB28, member RAS oncogene family	Rab28		AK012286	0.48	0.80
RAB5A, member RAS oncogene family	Rab5a		NM_025887	0.43	0.85
RB-associated KRAB repressor	Rbak		NM_021326	0.42	0.51
RB1-inducible coiled-coil 1	Rb1cc1		NM_009826	0.42	0.50
receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	Ror1		AK012979	0.46	0.61
reduced expression 2	Rex2		BC067397	0.37	0.66
retinitis pigmentosa 2 homolog	Rp2h		NM_133669	0.32	0.63
retinoic acid induced 14	Rai14		NM_030690	0.49	0.76
Rho GTPase activating protein 5 (Arhgap5)	Arhgap5		NM_009706	0.48	0.74
ribosomal protein L41	Rpl41		NM_018860	2.04	1.49
ribosomal protein, large, P1	Rplp1		NM_018853	2.08	1.47
RIKEN cDNA 0610037P05 gene	0610037P05Rik		NM_025345	0.39	0.54
RIKEN cDNA 1300003B13 gene	1300003B13Rik		NM_198003	0.31	0.59
RIKEN cDNA 1700001E04 gene	1700001E04Rik		NM_029288	0.47	0.65
RIKEN cDNA 1700023M03 gene	1700023M03Rik		NM_027078	0.45	0.83
RIKEN cDNA 1700029I01 gene	1700029I01Rik		NM_027285	0.36	0.62
RIKEN cDNA 2210403N09 gene	Ccdc64	2210403N09Rik	BC024804	0.46	0.55
RIKEN cDNA 2210418O10 gene	2210418O10Rik		NM_029813	0.41	0.64
RIKEN cDNA 2310001H12 gene	2310001H12Rik		BC012405	0.34	0.59
RIKEN cDNA 2410017P07 gene	2410017P07Rik		NM_026643	0.47	0.58
RIKEN cDNA 2410042D21 gene	2410042D21Rik		NM_024254	0.42	0.69
RIKEN cDNA 3100002L24 gene	3100002L24Rik		BC042711	0.40	0.65
RIKEN cDNA 3110082I17 gene	3110082I17Rik		NM_028469	0.48	0.65
RIKEN cDNA 3830406C13 gene	3830406C13Rik		NM_146051	0.49	0.72
RIKEN cDNA 4930520O04 gene	4930520O04Rik	BC020150	BC020150	0.48	0.48
RIKEN cDNA 4930544G11 gene	4930544G11Rik		NM_026294	0.43	0.66
RIKEN cDNA 6330416L07 gene	6330416L07Rik		NM_176962	0.49	0.78
RIKEN cDNA 6720457D02 gene	6720457D02Rik		NM_175252	0.34	0.60
RIKEN cDNA A630089N07 gene	630089N07Rik	BC027541	BC027541	0.31	0.57
RIKEN cDNA A930038C07 gene	A930038C07Rik		NM_172399	0.42	0.92
RIKEN cDNA A930041I02 gene	A930041I02Rik	AI662729	AK031226	0.44	0.70
RIKEN cDNA B230315N10 gene	B230315N10Rik	AK045871	AK045871	0.40	0.62
RIKEN cDNA C330027C09 gene	C330027C09Rik		NM_172616	0.43	0.71
RIKEN cDNA D830030K20 gene	D830030K20Rik		NM_177135	0.48	0.78
round spermatid basic protein 1-like	Rsbn1	C330002G24Rik	AK039994	0.43	0.95
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	Ahcy1l		NM_145542	0.43	0.54
S-adenosylmethionine decarboxylase 1	Amd1	Amd1	NM_009665	0.43	0.72
sarcophilin	Sln		NM_025540	1.00	0.44
scavenger receptor class A, member 3	Scara3	TC1330431	TC1330431	0.44	0.75
SEC23A (S. cerevisiae)	Sec23a		NM_009147	0.49	0.79
Sec24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	Sec24a		AK090341	0.46	1.10
SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	Sec24d		NM_027135	0.47	0.96
secernin 3, mRNA	Sern3		BC015296	0.49	0.75
SEH1-like (S. cerevisiae)	Shh1l		BC027244	0.44	0.69
septin 7	Sep7		NM_009859	0.45	0.79
serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog)	Stk3		NM_019635	0.46	0.62
SET translocation	Set		NM_023871	0.33	0.48
<b>SFT2 domain containing 1</b>	Sft2d1	5630401J11Rik	NM_134114	0.40	0.50
SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like	Sh3bgr1		NM_019989	0.47	0.71
signal recognition particle 54	Srp54		NM_011899	0.34	0.58
Similar to gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1, clone IMAGE:1495092	BC027545		BC027545	0.41	0.64
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	Slc16a4		NM_146136	0.49	1.00
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Graves disease autoantigen), member 16	Slc25a16		NM_175194	0.40	0.77
solute carrier family 26, member 7	Slc26a7		AK054327	0.48	0.97
solute carrier family 33, member 1	Slc33a1		NM_015728	0.40	0.85
sorbin and SH3 domain containing 2	Sorbs2	9430041O17Rik	AK122369	0.50	0.80
sorbin and SH3 domain containing 2	Sorbs2	AK052336	AK052336	0.48	0.90
SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein in testis	Solt		NM_021790	0.48	0.76
sprouty homolog 4 (Drosophila)	Spry4		NM_011898	0.38	0.51
structural maintenance of chromosomes 3	Smc3	Cthrc1	AK003674	0.43	0.85
structural maintenance of chromosomes 4	Smc4l1		AK048650	0.37	0.57
suppressor of hairy wing homolog 3 (Drosophila)	Suhw3		NM_153532	0.50	0.79
SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1	Smarca1		X69942	0.49	0.68
T-box18	Tbx18		NM_023814	0.27	0.33

Gen/Bezeichnung	Gen-Symbol	alternatives Gen Symbol	Genbank ID	Ratio E13,5	Ratio E18,5
t-complex-associated-testis-expressed 1-like	Tcte11		NM_025975	0.46	0.78
TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Taf9		NM_027139	0.43	0.69
TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, D	Taf1d	4930553M18Rik	NM_029248	0.46	0.63
thioredoxin domain containing 1	Txndc1		NM_028339	0.49	0.62
thioredoxin domain containing 4	Txndc4		NM_029572	0.49	0.79
thioredoxin-like 1	Txnl1		NM_016792	0.48	0.87
thrombospondin, type I, domain 2	Tths2		NM_028351	0.46	0.75
titin immunoglobulin domain protein (myotilin)	Ttid		NM_021484	0.88	0.41
transcription elongation factor A (SII)-like 7	Tceal7		XM_136051	0.57	0.42
transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3	Trpm3		AK053673	0.70	1.45
translocating chain-associating membrane protein 1	Tram1		NM_028173	0.47	0.83
transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	Tmed7		XM_128959	0.41	0.66
transmembrane protein 30A	Tmem30a	D9Wsu20e	NM_133718	0.36	0.84
transmembrane protein 67	Tmem67	5330408M12Rik	NM_177861	0.47	0.75
tripartite motif protein 23	Trim23		NM_030731	0.48	0.81
tripartite motif-containing 59	Trim59		NM_025863	0.41	0.71
tropinin T3, skeletal, fast	Tnnt3		NM_011620	1.01	0.48
TSC22 domain family, member 2	Tsc22d2	1810043J12Rik	AK007760	0.43	0.88
tudor domain containing 6	Tdrd6		NM_198418	1.16	0.07
tumor suppressor candidate 3	Tusc3		NM_030254	0.46	0.75
tumor susceptibility gene 101	Tsg101		NM_021884	0.47	0.68
ubiquitin specific protease 45	Usp45		NM_152825	0.43	0.86
ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ube2v2	XM_489768	XM_489768	0.47	0.63
ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	Uba6	5730469D23Rik	AK017687	0.39	0.73
v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	Araf	AK004741	AK004741	0.30	0.71
vacuolar protein sorting 35	Vps35		NM_022997	0.46	0.72
valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	Vcpip1	5730538E15Rik	NM_173443	0.46	0.75
WD repeat domain 44	Wdr44		AK033628	0.50	0.76
WD repeats and SOF domain containing 1	Wdsof1	Gm83	NM_198606	0.49	0.81
Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncogene homolog 1	Yes1		NM_009535	0.48	0.87
zinc finger and BTB domain containing 1	Zbtb1		NM_178744	0.45	0.76
zinc finger homeobox 3	Zfx3	AK040869	AK040869	0.49	0.72
zinc finger homeodomain 4	Zfx4		NM_030708	0.46	0.68
zinc finger protein 146	Zfp146		NM_011980	0.43	0.61
zinc finger protein 26	Zfp26		AK029298	0.43	0.58
zinc finger protein 273	Zfp273	6820416H06Rik	NM_198322	0.32	0.55
zinc finger protein 442	Zfp442	BC023805	BC023805	0.35	0.58
zinc finger protein 51	Zfp51		NM_009558	0.33	0.57
zinc finger protein 518	Zfp518	6330417C12Rik	AK041506	0.41	0.77
zinc finger protein 52	Zfp52		NM_144515	0.41	0.65
zinc finger protein 53	Zfp53		NM_013843	0.30	0.52
zinc finger protein 58	Zfp58		M28513	0.38	0.53
zinc finger protein 595	Zfp595	A230042K10Rik	NM_177622	0.49	0.69
zinc finger protein 72	Zfp72		XM_138712	0.36	0.61
zinc finger protein 74	Zfp74		NM_178384	0.36	0.56
zinc finger protein 758	Zfp758	BC021442	NM_145484	0.39	0.67
zinc finger protein 820	Zfp820	2610036F08Rik	BC019219	0.29	0.58
zinc finger protein 825	Zfp825	BC012278	NM_146231	0.39	0.57
zinc finger protein 862	Zfp862	AK041055	AK041055	0.35	0.58
zinc finger protein 97	Zfp97		NM_011765	0.36	0.60