

Aus dem Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie

Die Verankerung von Aquaporin-4 durch den Dystrophin-
assoziierten Proteinkomplex im *Ductus cochlearis*
des Menschen und der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wagner, Andreas Peter

2017

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Müller

Tag der Disputation: 16.05.2017

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
II. TABELLENVERZEICHNIS	II
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Anatomie des Felsenbeins	3
1.1.1 Makroskopisch-topografische Anatomie des humanen Mittelohres	3
1.1.2 Mikroskopische Anatomie des Innenohrs der Ratte und des Menschen	5
1.2 Physiologische Prinzipien der mechanoelektrischen Transduktion im <i>Ductus cochlearis</i>.....	7
1.3 Aquaporin-4 und der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex.....	9
1.3.1 AQP4-Expression und OPK-Formation im <i>DC</i>	9
1.3.2 Der DAPK als Verankerungsmechanismus von AQP4	10
1.3.3 Aufbau des DAPKs und Interaktion seiner Komponenten.....	10
1.3.3.1 Dystrophin.....	11
1.3.3.2 Syntrophin.....	12
1.3.3.3 Dystroglykan	12
1.3.3.4 Laminin.....	13
1.3.3.5 Agrin.....	14
1.3.3.6 Dystrobrevin.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
1.4.1 Die Verankerung von AQP4 in den epithelialen Stützzellen des <i>DCs</i> – in Analogie zur <i>Retina</i> und den Gliazellen des ZNS.....	15
1.4.2 Konkrete methodische Fragestellungen.....	15
2. MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Zur Organentnahme verwendete Tiere	17
2.1.2 Gewebe von Körperspendern.....	17

2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	18
2.1.5 Einbettmedium, Fettstift, Eindeckelmedium und Immersionsöl	19
2.1.6 Antikörper für die Immunhistochemie	19
2.1.7 Puffer für die Molekularbiologie	20
2.1.8 RNase freie Glaswaren und Präparationsbesteck	20
2.1.9 Kits für die Molekularbiologie	20
2.1.10 Agarose-Gel	21
2.1.11 Primer für die RT-PCR	21
2.1.11 TaqMan® Sonden	22
2.1.12 Verbrauchsmaterial	22
2.1.13 Geräte	23
2.1.14 Software	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Gewebegewinnung	25
2.2.1.1 Organentnahme aus der adulten Ratte (P31)	25
2.2.1.2 Organentnahme aus Körperspendern	27
2.2.1.3 RNA-Isolation	28
2.2.1.4 RT-Reaktion	29
2.2.1.5 RT-PCR – Polymerase Kettenreaktion	30
2.2.1.6 qPCR – Real-Time Polymerase Kettenreaktion	30
2.2.2 Immunhistochemische Methoden	31
2.2.2.1 Immunfluoreszenzmarkierung	31
2.2.2.2 Konfokale cLSM-Aufnahme der Immunfluoreszenzmarkierung	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1 Analyse der Kolokalisation von AQP4 und seinem membranären DAPK-Ankerprotein, Syntrophin	33
3.1.1 Die zelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin im <i>Ductus cochlearis</i> der funktionell adulten Ratte (p31)	33
3.1.2 Zelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin im Kontrollgewebe, <i>Retina</i> , der adulten Ratte (p31)	34
3.2 mRNA-Analyse der Komponenten des DAPK's	35
3.2.1 Qualitative RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten	35
3.2.1.1 – des <i>Ductus cochlearis</i> der funktionell adulten Ratte (p31)	35
3.2.1.2 – des Kontrollgewebes, der <i>Retina</i> der funktionell adulten Ratte (p31)	36

3.2.2 Qualitative Taq-Man® Real-Time PCR Analyse der DAPK-Komponenten.....	36
3.2.2.1 – des humanen Ductus cochlearis.....	36
3.2.2.2 – des Kontrollgewebes, der humanen Retina.....	37
3.3 Subzelluläre Lokalisation einzelner Komponenten des DAPK's.....	38
3.3.1 – in den epithelialen Stützzellen im <i>Ductus cochlearis</i> der funktionell adulten Ratte (p31).....	38
3.3.1.2 Die subzelluläre Lokalisation des membranären AQP4-Ankermoleküls, Syntrophin, im Ductus cochlearis der Ratte	39
3.3.1.3 Die subzelluläre Lokalisation der intrazellulären Dystrophine im Ductus cochlearis der Ratte	40
3.3.1.4 Die subzelluläre Lokalisation des transmembranären β -Dystroglykans im Ductus cochlearis der Ratte.....	41
3.3.1.5 Die subzelluläre Expression des extrazellulären Laminins im Ductus cochlearis der Ratte	42
3.3.1.6 Zusammenfassung der subzellulären Expression von AQP4 und der DAPK-Komponenten im DC der Ratte	42
3.3.2 – im Kontrollgewebe, Retina der funktionell adulten Ratte (p31).....	43
3.3.3 – im humanen <i>Ductus cochlearis</i>	44
3.3.3.1 Die zelluläre Lokalisation des membranären AQP4-Ankermoleküls, Syntrophin im humanen Ductus cochlearis.....	44
3.3.3.2 Die zelluläre Lokalisation von AQP4 im humanen Ductus cochlearis	45
3.3.3.3 Die zelluläre Kolokalisation von Syntrophin und Aquaporin-4 im humanen Ductus cochlearis.....	46
4. DISKUSSION	47
4.1 Die subzelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin in den epithelialen Stützzellen des DCs der Ratte – Funktionelle Bedeutung für die Verankerung von AQP447	
4.2 Die Expression der einzelnen DAPK-Mitglieder in den epithelialen Stützzellen des DCs der Ratte – weitere Hinweise für eine Verankerung von AQP4 über den DAPK.	49
4.2.1 Die Dystrophin-Expression im DC der Ratte	49
4.2.2 Die Dystroglykan-Expression im DC der Ratte.....	51
4.2.3 Die Laminin-Expression im DC der Ratte.....	53
4.2.4 Die Agrin-Expression im DC der Ratte.....	54
4.2.5 Die Lokalisation der DAPK-Komponenten im DC der Ratte im funktionellen Zusammenhang und zukünftigem Ausblick	55
4.3 Einfluss des DAPKs auf die OPK-Formierung im DC der Ratte.....	56

4.4 Die zelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin im humanen <i>DC</i>	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS	63
7. ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL.....	71

I. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 – OPERATIONSMIKROSKOPISCHE SICHT IN DAS HUMANE MITTELOHR...4	
ABBILDUNG 2 – SCHEMA EINES MIDMODIOLAREN SCHNITTES DES HÄUTIGEN LABYRINTHS FOKUSSIERT AUF DAS HÖRORGAN (MODIFIZIERT NACH HIRT ET AL. [11]).....6	6
ABBILDUNG 3 – SCHEMA DER VERANKERUNG VON AQP4 ÜBER DEN VON INTRAZELLULÄR NACH EXTRAZELLULÄR ÜBERSPANNENDEN DAPK (MODIFIZIERT NACH NAGELHUS ET AL. [29]). 11	11
ABBILDUNG 4 – ZELLULÄRE EXPRESSION VON AQP4 (GRÜN) UND SYNTROPHIN (ROT) IN DEN EPITHELIALEN STÜTZZELLEN DES <i>DUCTUS COCHLEARIS</i>33	33
ABBILDUNG 5 – IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER AQP4- (GRÜN) UND SYNTROPHIN-EXPRESSION (ROT) UND DEREN KOLOKALISATION IN DER <i>RETINA</i> DER RATTE (P31).34	34
ABBILDUNG 6 – RT-PCR ANALYSE DER DAPK-KOMPONENTEN DES <i>DUCTUS</i> <i>COCHLEARIS</i> DER FUNKTIONELL ADULTEN RATTE (P31).35	35
ABBILDUNG 7 – RT-PCR ANALYSE DER DAPK-KOMPONENTEN DER <i>RETINA</i> DER RATTE (P31).36	36
ABBILDUNG 8 – TAQ-MAN® RT-PCR ANALYSE DER DAPK-KOMPONENTEN DES HUMANEN <i>DCS</i>37	37
ABBILDUNG 9 – TAQ-MAN® RT-PCR ANALYSE DER DAPK-KOMPONENTEN DER HUMANEN <i>RETINA</i>38	38
ABBILDUNG 10 – IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE MIT KONFOKALER (CLSM) AUFNAHME DER SUBZELLULÄREN EXPRESSION VON SYNTROPHIN IM <i>DC</i> DER RATTE (P31).39	39
ABBILDUNG 11 – SUBZELLULÄRE IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG DER DYSTROPHIN-EXPRESSION IM <i>DC</i> DER RATTE (P31).40	40
ABBILDUNG 12 – B-DYSTROGLYKAN-EXPRESSION UND DESSEN SUBZELLULÄRE LOKALISATION IM <i>DC</i> DER FUNKTIONELL ADULTEN RATTE (P31).41	41
ABBILDUNG 13 – IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE UND KONFOKALE (CLSM) AUFNAHME DER LAMININ-EXPRESSION IM <i>DC</i> DER FUNKTIONELL ADULTEN RATTE (P31).42	42
ABBILDUNG 14 – IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE UND KONFOKALE (CLSM) AUFNAHME EINZELNER KOMPONENTEN DES DAPKS IN DER <i>RETINA</i> DER RATTE (P31).44	44
ABBILDUNG 15 – IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER SYNTROPHIN-EXPRESSION DES HUMANEN <i>DCS</i>44	44
ABBILDUNG 16 – AQP4-EXPRESSION ENTLANG DES HUMANEN <i>DCS</i>45	45

ABBILDUNG 17– KOLOKALISATION VON SYNTROPHIN (ROT) UND AQUAPORIN-4 (GRÜN) IM HUMANEN DC.	46
ABBILDUNG 18– EXPRESSION VON AQP4, OPKS UND DES DAPKS IM DC IM VERGLEICH (MODIFIZIERT NACH HIRT ET AL [11]).	60

II. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 – ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE.....	19
TABELLE 2 – PRIMERSEQUENZEN DER RT-PCR.....	21
TABELLE 3 – GENE UND ASSAY-NUMMERN DER TAQMAN® SONDEN.	22
TABELLE 4 – ZUSAMMENFASSUNG DER SUBZELLULÄREN EXPRESSION VON AQP4 UND DER DAPK-KOMPONENTEN IM <i>DUCTUS COCHLEARIS</i> DER RATTE.....	43

III. Abkürzungsverzeichnis

(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
°C.....	Temperatur (in Grad Celsius)
Agrn.....	aus dem Agrin-Gen stammende Proteine
ÄHZ.....	Äußere Haarsinneszelle
ÄPZ.....	Äußere Pfeilerzelle
ÄSZ.....	Äußere Sulkuszelle
cLSM.....	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CZ.....	Claudiuszelle
DAG1.....	Vorläuferprotein Dystroglykan 1
DAPK.....	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DFN4.....	Genlocus Xp21.2 - Angeborene nichtsyndromale X-chromosomale Taubheit
DMD.....	Gen der Proteine der Dystrophinfamilie
dNTP.....	Desoxynukleosidtriphosphate
Dp140.....	Dystrophin-Isoform 140
Dp260.....	Dystrophin-Isoform 260
Dp71.....	Dystrophin Isoform 71
DTT.....	Dithiothreitol
DZ.....	Deiterszelle
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat-Lösung
g.....	Erdbeschleunigung ungefähr 9,81 m/s ²
HZ.....	Hensenzellen
IDZ.....	Interdentalzelle
IHZ.....	Innere Haarsinneszelle
IPhZ.....	Innere Phalangenzelle
IPZ.....	Innere Pfeilerzelle
ISZ-lat.....	Innere Grenzzelle: Limbusferne an das Corti-Organ angrenzende innere Sulkuszelle
ISZs-med.....	Limbusnahe kubische innere Sulkuszelle
KCl.....	Kaliumchlorid
Lam.....	Proteine der Lamininfamilie
mdx.....	Dystrophin-Knock-out-Maus mit depletierter Isoform 427

mdx^{3cv}Dystrophin-Knock-out-Maus mit nahezu vollständiger Depletion aller Isoformen,
Dystrophin-Knock-out-Maus mit nahezu vollständiger Depletion aller Isoformen.
mdx-βgeo..... Dystrophin-knock-out-Maus mit Depletion aller Isoformen
MgCl₂..... Magnesiumchlorid
NDS..... Normal Donkey Serum
NGS.....Normal Goat Serum
OPK..... Orthogonale Partikelkomplexe
p31 Postnataler Tag 31
PBS..... Phosphat gepufferte Salzlösung
PDZ.....Kombiniertes Akronym aus Anfangsbuchstaben von: „post synaptic density
protein 95, Drosophila disc large suppressor 1 und zonula occludens-1 pro-tein“
PFA Paraformaldehyd
rpm Umdrehungen pro Minute
SSVProteinsequenz in Primärstruktur von Serin, Serin, Valin
Syn Syntrophin
SZ.....Stützzellen
TBE Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEM..... Transmissionselektronenmikroskopie
TJ.....Zellkontakte "Tight Junctions"
Tris-HClTris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
α-Dg α-Dystroglykan
β-Dg β-Dystroglykan

1. Einleitung

Die Cochlea als Hörorgan des Innenohrs vermittelt mit ihrem Corti-Organ, das im *Ductus cochlearis* (DC) zwischen den Perilymphräumen, *Scala vestibuli* und *Scala tympani*, lokalisiert ist, die für das Hören essenzielle mechanoelektrische Transduktion. Für die Aufrechterhaltung dieser spielt der kontinuierliche intraepitheliale Abtransport des Ions Kalium, K^+ , über den K^+ -Kanal $K_{ir}4.1$ aus dem basolateralen Flüssigkeitsraum der Haarsinneszellen durch das Stützzellsynzytium des DCs eine tragende Rolle [1-5]. Für den dabei entstehenden intrazellulären osmotischen Druck bedarf es gleichzeitig dazu ausgleichender Wasserflüsse. Die Kolo-kalisation des K^+ -Kanals $K_{ir}4.1$ mit dem Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP4) im basalen beziehungsweise basolateralen Membranabschnitt der Stützzellen des DCs dient hierbei als Kanalsystem, das die Ionen- und Wasserhomöostatische Funktion der Stützzellen während der auditiven sensorischen Transduktion erfüllt [5-11]. Funktionell führte das Fehlen beziehungsweise ein Funktionsverlust von AQP4 in AQP4-Knock-out-Mäusen und einem punktmutierten AQP4-Gen beim Menschen zur nahezu vollständigen Ertaubung [12-14]. Graduell konnte in einem Mausmodell mit steigendem Alter der Tiere ein Zusammenhang zwischen einem zunehmenden Hörverlust und einer Reduktion der AQP4-Expression in den Stützzellen des DCs beobachtet werden [10, 15]. Daten aus dem ZNS und der *Retina* zeigten die Koexistenz mehrerer AQP4-Isoformen (AQP4-M23 und AQP4-M1) mit jeweils unterschiedlicher Wasserpermeabilität; AQP4-M23 8-fach höher als AQP4-M1 [16, 17]. Ultrastrukturell konnten beide AQP4-Isoformen als Teil von Aggregationen von AQP4-Tetrameren zu rechteckigen „Floß-artigen“ Strukturen, den orthogonalen Partikelkomplexen (OPKs), nachgewiesen werden [18-21]. Die Größe und Form der OPKs wird maßgeblich durch deren AQP4-Isoformenverhältnis von AQP4-M23 zu AQP4-M1 bestimmt. Transmissionselektronenmikroskopisch analysierte Gefrierbruch-Replikas von Stützzellen aus dem ZNS (Astrozyten), der *Retina* (Müllerzellen) und des DCs zeigten OPKs in deren Zellmembranen [11, 20, 22-24]. Im Innenohr konnten OPKs bislang nur in den Stützzellen der lateralen Hälfte des DCs detektiert werden [11, 24].

Die Ergebnisse dieser Analyse stehen teilweise im Widerspruch zu den immunhistochemischen AQP4-Expressionsanalysen im *DC*, da ein Stützzelltyp der lateralen Hälfte des *DCs*, die Claudiuszellen (CZs), AQP4 basal exprimieren, in ihnen allerdings keine OPKs detektiert werden konnten [11]. Studien über Stützzellen des ZNS zeigten, dass der Kontakt mit extrazellulären Makromolekülen aus der Basallamina einen direkten Einfluss sowohl auf die Polarität in der AQP4-Verteilung als auch auf die OPK-Bildung in den Gliazellmembranen, vorwiegend Astrozyten, und den Müllerzellen der *Retina* hat [25-27]. Dabei handelt es sich um eine Verankerung von AQP4 an einem über die Zellmembran bis hin zum Zytoskelett reichenden Makromolekülkomplex, dem Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex (DAPK). AQP4 ist dabei von intrazellulär über Syntrophin (Syn) an Dystrophin (in Astrozyten und Müllerzellen über die Isoform Dp71) gekoppelt, welches über die transmembranären Proteine β -Dystroglykan (β -Dg), gefolgt von α -Dystroglykan (α -Dg), nach extrazellulär an weitere Proteine der Lamininfamilie (Lam) und Agrinfamilie (Agrn) gekoppelt ist [28, 29]. Studien an knock-out Mäusen zeigten, dass der Funktionsverlust einzelner DAPK-Komponenten in Astrozyten und Müllerzellen zu einer teils stark ausgeprägten Reduktion der Polarität und Dichte von AQP4 und OPKs führte [26, 27, 30-32]. Die Erkenntnisse über den DAPK im Innenohr sind bisher sehr beschränkt. Funktionell kann trotz widersprüchlicher Datenlage zu Hörmessungen an Dystrophin-knock-out-Mäusen, *mdx* und *mdx*^{3cv}, von einer erhöhten Vulnerabilität des auditiven Systems nach Schalleexposition ausgegangen werden [33-35]. Weiter konnte eine humane X-chromosomal vererbte nichtsyndromale Schwerhörigkeit durch den Genloкус DFN4 mit dem DMD-Lokus, dem Genloкус der Dystrophinfamilie, assoziiert werden [36, 37]. Immunhistochemisch wurde bisher im *DC* die Expression einzelner DAPK-Komponenten nachgewiesen: Dystrophinisoformen [38] in den Haarsinneszellen des Meerschweinchens, α -Dg in Stützzellen des humanen *DCs* [39], α -Dg und β -Dg [40, 41] in Stützzellen des *DCs* der Maus und Lamininisoformen [39, 42] extrazellulär entlang der Basilarmembrankontakte der Stützzellen des *DCs* des Menschen und des Meerschweinchens. Allerdings wurde bislang weder eine detaillierte Analyse der molekularen Bausteine des DAPKs, noch seine Rolle als Verankerungsmechanismus für AQP4 im *DC* des

Menschen und der Ratte untersucht. Weiter könnte der im ZNS bekannte starke Einfluss der AQP4-Verankerung durch den DAPK auf die AQP4-Polarität und die OPK-Formation im DC mit Hinblick auf die widersprüchliche AQP4-Expression und OPK-Formation ebenfalls eine Bedeutung haben. Ziel dieser Studie war deshalb die molekularen Bausteine des DAPKs als strukturelle Grundvoraussetzung für eine mögliche Verankerung von Aquaporin-4 im DC des Menschen sowie der Ratte zu identifizieren.

Das humane Material für diese Untersuchung wurde *postmortem* aus Körper Spendern des Anatomischen Instituts der Universität Tübingen gewonnen. Hierzu wurde ein operativer Zugang zum Innenohr über den äußeren Gehörgang und das Mittelohr gewählt. Um diese Technik besser erläutern zu können, wird in den nachfolgenden Kapiteln, detailliert auf die Anatomie des humanen Felsenbeins eingegangen, bevor die makro- und mikroskopische Anatomie des Innenohrs von Mensch und Ratte beschrieben wird. In weiteren Kapiteln wird näher auf die Physiologie des Hörens, auf AQP4 und dessen Verankerung über den DAPK eingegangen.

1.1 Anatomie des Felsenbeins

1.1.1 Makroskopisch-topografische Anatomie des humanen Mittelohres

Das Mittelohr, ein luftgefüllter und mit Schleimhaut ausgekleideter Raum im Felsenbein des Schädels, besteht aus den Paukennebenhöhlen (*Cellulae mastoideae*), der Ohrtrumpete (*Tuba auditiva*) und der Paukenhöhle (*Cavitas tympani*). Die Paukenhöhle nimmt den Großteil des Mittelohrs ein und in ihr befinden sich die beweglich verbundenen Gehörknöchelchen: Hammer (*Malleus*), Ambos (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*). Der Hammer ist am Trommelfell (*Membrana tympani*) und der Steigbügel am ovalen Fenster (*Fenestra vestibuli*) verankert. Ähnlich einem Quader können in der Paukenhöhle idealisiert sechs Wandabschnitte und von kranial nach kaudal drei Etagen unterschieden werden. Die mittlere Etage des Mittelohres (*Mesotympanon*) wird von lateral durch den Wandabschnitt des Trommelfells (*Paries membranaceus*) und von medial durch die Labyrinthwand (*Paries labyrinthicus*) eingegrenzt. Nach kranial erstreckt sich das

Mesotympanon bis zur Sehne des *Musculus tensor tympani* und geht von dort fließend bis zu einer dünnen Knochenplatte, *Tegmen tympani*, in die kraniale Etage (Epitympanon) über. Nach kaudal erstreckt sich das *Mesotympanon* bis zum unteren Trommelfellrand und geht weiter im occipito-kaudalen Bodenabschnitt in die untere Etage (*Hypotympanon*) über.

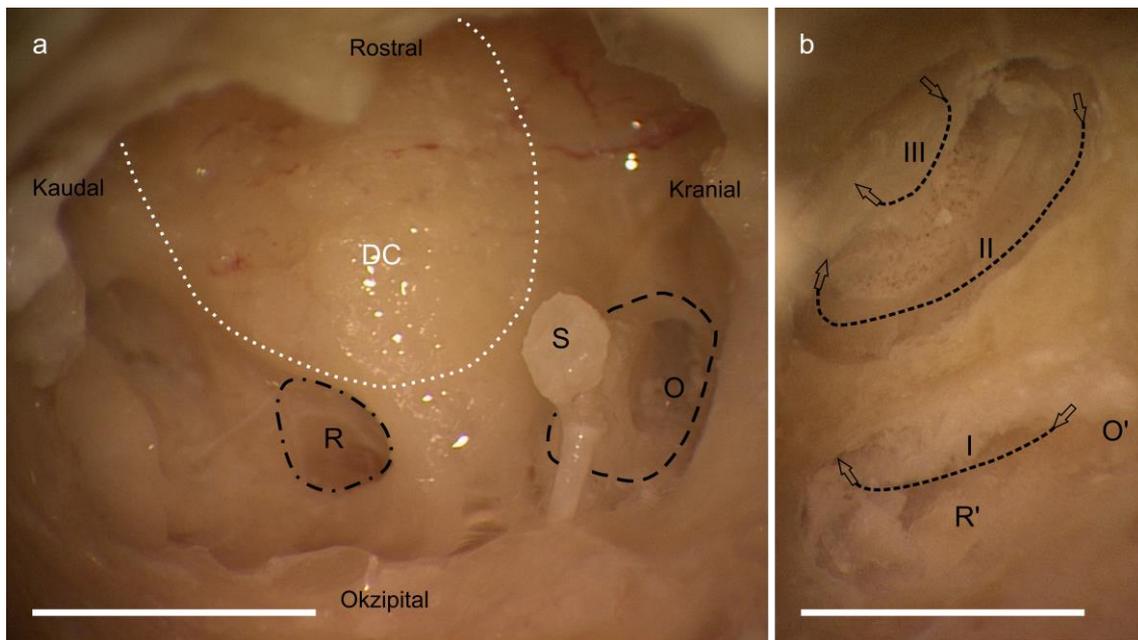


Abbildung 1 – Operationsmikroskopische Sicht in das humane Mittelohr. (a) Blick in die linke humane Paukenhöhle durch den äußeren Gehörgang nach Entfernung des Trommelfells, des Hammers und Amboss. Zu den Rändern des Bildes ist die anatomische Orientierung gegeben – medial/lateral in/aus die/der Bildebene hinein/-aus. Die weiß-gepunktete Linie zeigt die Projektion der Cochlea auf das noch intakte *Promontorium*. Die schwarz-gestrichelte Linie umgrenzt die *Stapes-Fußplatte*, die das ovale Fenster (O) bedeckt. Die schwarze Linie um Strich-Punkten umgrenzt das runde Fenster (R). (b) Linke Paukenhöhle nach Abtragung der Knochen-decke im Gebiet der weiß-gepunkteten Linie aus (a). Zu erkennen ist der *Ductus cochlearis* mit Teilen seiner basalen I, mittleren II, und apikalen III Windung. O' – ehemaliges ovale Fenster. R' – ehemaliges rundes Fenster. (Maßstab 10 mm)

Der hintere Wandabschnitt der Paukenhöhle, *Paries mastoideus*, wird durch knöchernen Wand des luftgefüllten Warzenfortsatzes (*Processus mastoideus*) begrenzt. Den vorderen Wandabschnitt der Paukenhöhle bildet der *Paries caroticus*, der die *Arteria carotis interna* und die Ohrtrompete beinhaltet. Ein Großteil des *Paries labyrinthicus* besteht aus einer knöchernen Vorwölbung, dem *Promontorium*, unter der sich die basale Windung der Hörschnecke (*Cochlea*) befindet (Abbildung 1). Das *Promontorium* flankieren zwei Vertiefungen, von kranial das ovale Fenster (*Fenestra vestibuli*) und von kaudal das runde Fenster

(*Fenestra cochleae*). Dahinter befindet sich das knöcherne Labyrinth des Innenohrs, das aus dem Vorhof (*Vestibulum*), der Schnecke (*Cochlea*) und den Bogengängen (*Canales semicirculares*) besteht, und das häutige Labyrinth durch sein Gangsystem in das Felsenbein einbettet [43, 44].

1.1.2 Mikroskopische Anatomie des Innenohrs der Ratte und des Menschen

Das häutige Labyrinth besteht aus dem *Labyrinthus vestibularis* und *cochlearis*, die funktionell das Gleichgewichts- und Hörorgan bilden [43, 44]. Das *Labyrinthus cochlearis* windet sich bei der Ratte 3- und beim Menschen 2,5-mal um die *Modiolus*-Achse und besteht weiter aus drei parallel verlaufenden Flüssigkeitsräumen, *Scala vestibuli*, *Ductus cochlearis (DC)* und *Scala tympani*. Diese schrauben sich ähnlich einer Wendeltreppe um das knöchern gestützte *Ganglion cochleare* im *Modiolus*. Die Zellen des *Ductus cochlearis*, der auch als *Scala media* bezeichnet wird, bilden ein kommunizierendes und durch Zellkontakte aus Tight Junctions, TJ, nach extrazellulär abgeschlossenes Flüssigkeitskompartiment, den Endolymphraum [24]. Dieser grenzt an den Perilymphraum der *Scala vestibuli* durch die Reissnermembran und den Perilymphraum der *Scala tympani* durch die Basilarmembran an. Weiter bildet die Gesamtheit der Stützzellen und der Haarsinneszellen an ihren basolateralen Zellmembranabschnitten ein Flüssigkeitskompartiment, das der Perilymphe in seiner Ionenzusammensetzung sehr ähnelt und als Nuel-Raum bezeichnet wird. Auf der *Lamina spiralis ossea*, eine aus dem *Modiolus* aussprossende und den Windungen des *DCs* radiär folgende Knochenlamelle, sitzt der entsprechend verlaufende bindegewebige *Limbus spiralis* und markiert den medialen, an den *Modiolus* angrenzenden, Pol des *DCs*. Den lateralen Pol des *DCs* markiert das *Ligamentum spirale*, das mit dem *Periost* der *Cochlea* verwachsen ist. Die Basilarmembran, die sich zwischen den beiden Polen aufspannt, trägt das neurosensorische Corti-Organ und komplettiert das tympanale Ende des *DCs*, das medial und lateral in zwei Furchen, innerer und äußerer *Sulkus*, ausläuft.

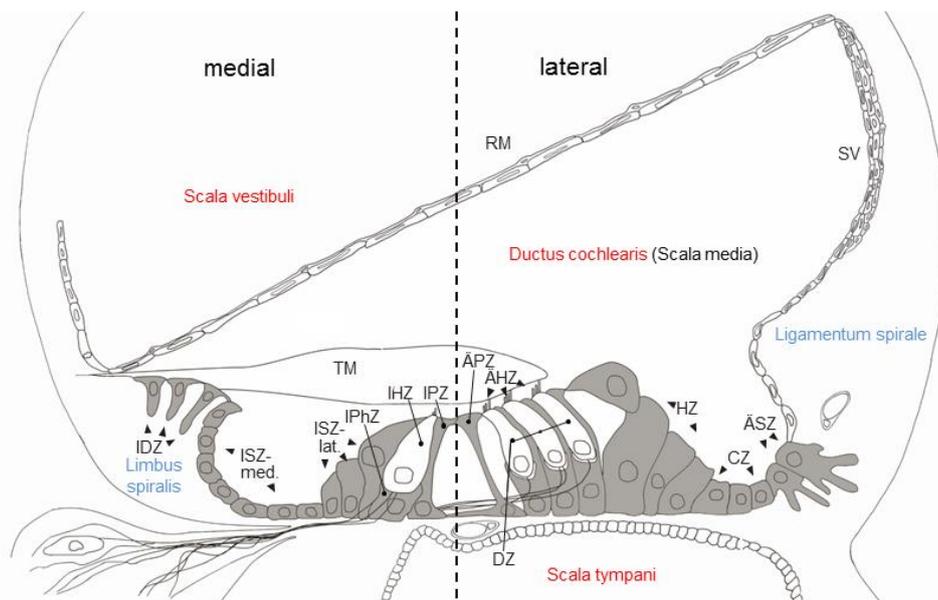


Abbildung 2 – Schema eines midmodiolaren Schnitts des häutigen Labyrinths fokussiert auf das Hörorgan (Modifiziert nach Hirt et al. [11]). Gestrichelte Linie – fiktive der Basilarmembran orthogonale Achse durch den inneren Tunnel. RM – Reissnermembran; SV – Stria vascularis; TM – Tektorialmembran; IDZ – Interdentalzellen; ISZ-med. – Innere Sulkuszellen; ISZ-lat. – Innere Grenzstellen; IPhZ – Innere Phalangenzelle; IHZ – Innere Haarsinneszelle; IPZ – Innere Pfeilerzelle; ÄPZ – Äußere Pfeilerzelle; ÄHZ – Äußere Haarsinneszellen; DZ – Deiterszellen; HZ – Hensenzellen; CZ – Claudiuszellen; ÄSZ – Äußere Sulkuszellen.

Bei der Betrachtung eines histologischen, midmodiolaren Schnitts durch die *Modiolus*-Achse (Abbildung 2) besteht das Corti-Organ aus epithelialen Stützzellen (SZs) und sensorischen Haarsinneszellen, drei äußere Haarsinneszellen (ÄHZs) und einer inneren Haarsinneszelle (IHZ). Die innere und die drei äußeren Haarsinneszellen werden von epithelialen Stützzellen, der inneren Phalangenzelle (IPhZ) und den Deiterszellen (DZs), getragen und durch diese in der Basilarmembran befestigt. An einer fiktiven der Basilarmembran orthogonalen Achse durch das Corti-Organ flankieren sich auf der Seite der äußeren Haarsinneszellen die äußere Pfeilerzelle (ÄPZ), auf der Seite der inneren Haarsinneszellen

die innere Pfeilerzelle (IPZ). Diese bilden so den inneren Tunnel. An die Region der inneren Haarsinneszellen des Corti-Organs grenzt von medial eine Epithelzellgruppe an, die im weiteren Verlauf die kubische Form der inneren Sulkuszellen (ISZs-med.) annimmt, und in dieser Arbeit als innere Grenzzellen bezeichnet werden (ISZ-lat.). Die inneren Sulkuszellen verlaufen bis zur Spitze des *Limbus spiralis*, an der die Zellreihe der Interdentalzellen (IDZs) beginnt. Die ähnlich den inneren Grenzzellen verlaufenden Hensenzellen (HZs) grenzen an das Corti-Organ von lateral an die Seite der äußeren Haarsinneszellen an und werden im weiteren Verlauf in Richtung des äußeren Sulkus durch die kubischen Claudiuszellen (CZs) abgelöst. Bis zur *Prominentia spiralis* bekleiden die äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) den äußeren Sulkus und ragen mit ihren Wurzelfortsätzen tief in das *Ligamentum spirale* hinein. Nach der *Prominentia spiralis* schließt sich die *Stria vascularis* an.

1.2 Physiologische Prinzipien der mechanoelektrischen Transduktion im *Ductus cochlearis*

Die mechanoelektrische Transduktion hängt maßgeblich von der Ionenhomöostase des Endolymphraums, überwiegend K^+ , und dem daraus resultierenden endocochleären Potenzial ab. Der Zellverbund der *Stria vascularis* pumpt das im Vorfeld vom Fibrozytensynzytium aus dem *Ligamentum spirale* aufgenommene K^+ entgegen seines Konzentrationsgradienten in den Endolymphraum, DC [1, 3]. Bei der mechanoelektrischen Transduktion strömt K^+ durch mechanosensitive Kationenkanäle der Stereozilien in die Haarsinneszellen von apikal, aus dem DC, nach intrazellulär und sorgt für eine basolaterale Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, der ein Signal an der postsynaptischen Membran der afferenten Fasern des *Nervus cochlearis* generiert [45]. In die Haarsinneszellen eingeströmte K^+ -Ionen werden kontinuierlich, meist während der Repolarisation, in den Nuel-Raum abgegeben und müssen für deren regelrechte Funktion von dort weiter transportiert werden [46]. Zwei bisher bekannte Konzepte beschreiben einerseits einen intraepithelialen über Gap Junctions vermittelten und andererseits einen extraepithelialen,

weiter über die Basiliarmembran und durch die *Scala tympani*, K⁺-Rückführungsweg zum *Limbus spiralis* beziehungsweise *Ligamentum spirale* [2, 4, 47]. Unterstützend für das intraepitheliale Konzept ist die Expression des einwärtsrektifizierenden Kaliumkanals K_{ir}4.1 im DC. Die Expression von K_{ir}4.1 konnte in den Stützzellen des Corti-Organs (basolateral: innere Pfeiler- und Deiterszellen; innere Phalangenzelle: K_{ir}4.1-expression, Zellkompartiment nicht eindeutig abgrenzbar) und den Stützzellen des DCs (basolateral: innere Sulkus-, Interdental-, Hensen- und äußere Sulkuszellen; basal: innere Grenzzellen) nachgewiesen werden [5, 48]. Zusätzlich dazu scheint die Expression des Wasserkanals AQP4, für die funktionierende mechanoelektrische Transduktion zwingend erforderlich zu sein. Dies zeigte sich anhand einer humanen Fallstudie eines nichtsyndromalen Hörverlusts und in tierexperimentellen AQP4-knock-out-Studien an der Maus, die durch den Verlust von AQP4 nahezu ertaubten [12, 13]. In der Fallstudie führte eine Punktmutation eines Patienten, eine D184E „missense“-Mutation, im humanen AQP4-Gen durch eine Leserasterverschiebung zu einem Funktionsverlust des AQP4-Kanals und damit zur Taubheit des Patienten. Weiter konnte in einem Mausmodell, CBA/CaJ-Mauslinie, bei steigendem Alter sowohl eine zunehmende Reduktion der AQP4-Expression in den Stützzellen des DCs als auch ein zunehmender Hörverlust beobachtet werden [10, 15]. Folglich geht man davon aus, dass für eine funktionierende mechanoelektrische Transduktion der beim KaliumEinstrom entstehende osmotische Druck im Stützzellsynzytium durch einen parallelen Wassereinstrom, analog zu den Stützzellen des ZNS, ausgeglichen werden muss [10, 12, 49, 50]. Die membranäre Kolo-kalisation von K_{ir}4.1 und AQP4 in den epithelialen Stützzellen im inneren und äußeren Sulkus des *Ductus cochlearis* unterstreichen diese Theorie. Interessanterweise konnte in den Stützzellen des Corti-Organs, innere Phalangen- und Deiterszellen, keine Kolo-kalisation von K_{ir}4.1 und AQP4 detektiert werden, sondern lediglich eine membranäre Expression von K_{ir}4.1 [5].

1.3 Aquaporin-4 und der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex

1.3.1 AQP4-Expression und OPK-Formation im *DC*

Für die Bildung eines AQP4-Kanals lagern sich je vier AQP4-Monomere zu einem AQP4-Tetramer zusammen und formen somit eine Pore im Mittelbereich. Bisher konnten sechs mögliche cDNA-Isoformen von AQP4 identifiziert werden, von denen allerdings nur die Expression von drei Proteinen (M1, M23 und Mz) in den Gliazellen des ZNS, überwiegend Astrozyten, und den Müllerzellen der *Retina*, nachgewiesen werden konnte [16]. Im *DC* der Ratte konnte eine Expression von AQP4-Mz auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden [11]. Hinsichtlich ihrer Wasserpermeabilität weist die AQP4-Isoform M23 eine 8-fach höhere Wasserpermeabilität auf als M1 [17]. Die subzelluläre AQP4-Expression findet sich ebenfalls in den Stützzellen außerhalb des Corti-Organs, im Detail: basolateral in den Hensen- und den inneren Grenzzellen, basal in den inneren Sulkus- und Claudiuszellen, basolateral in den Interdental- und den äußeren Sulkuszellen entlang ihrer Wurzelfortsätze [5-12]. Ultrastrukturell konnte AQP4 anhand von transmissionselektronenmikroskopischer (TEM) Gefrierbruchstudien identifiziert werden. AQP4-Tetramere lagern sich dabei zu großen rechteckigen Floß-artigen Strukturen höherer Ordnung zusammen, die als orthogonale Partikelkomplexe (OPKs) bezeichnet werden [20, 22, 51]. OPKs wurden im ZNS und dem ZNS verwandten Geweben bisher in Astrozyten und Müllerzellen nachgewiesen [21, 24]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das exprimierte AQP4-Isoformenverhältnis einen deutlichen Einfluss auf die Größe, Form und Dichte der OPKs hat. Eine erhöhte Expression der AQP4-Isoform M23 führt zu sehr großen OPKs, die erhöhte Expression von AQP4-M1 hingegen zu sehr kleinen bis fehlenden OPKs [18]. Im Innenohr konnte die Expression von OPKs in den Stützzellen des lateralen *DCs* der Ratte, allerdings nicht in den Deiters- und den Claudiuszellen, nachgewiesen werden [11]. Immunhistochemisch konnte in den Deiterszellen keine AQP4 Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, konnte in den Claudiuszellen eine basale Expression von AQP4 gezeigt

werden, was im Widerspruch zum Fehlen der OPKs in diesen Zellen steht [5, 6, 11]

1.3.2 Der DAPK als Verankerungsmechanismus von AQP4

AQP4 ist über seine C-terminale Proteinsequenz Serin, Serin, Valin, kurz SSV, über Syntrophin beziehungsweise dessen PDZ-Domäne am DAPK verankert [31]. In Astrozyten und Müllerzellen ist dies ein essenzieller Mechanismus zur Generierung einer Zellmembranpolarität, beispielsweise in den perivaskulären Astrozyten- und Müllerzellendfußmembranen [52, 53]. In den Endfußmembranen kann so eine sehr viel höhere AQP4-Dichte als in den übrigen Membranabschnitten erreicht werden. Studien an Syntrophin-knock-out-Mäusen, Syntrophin – dem unmittelbaren AQP4-Ankerpartner, zeigten, dass der Verlust von Syntrophin zu einem AQP4-Polaritätsverlust an den perivaskulären Astrozyten- und Müllerzellendfußmembranen führte, jedoch nicht zur Reduktion der Gesamt-AQP4-Konzentration entlang aller Membranabschnitte [31, 32, 54]. Der gleiche Sachverhalt zeigte sich bei Dystrophin-knock-out-Mäusen, mdx- β geo mit einem Verlust aller Dystrophine und deren Isoformen [55, 56]. Bei der Untersuchung der extrazellulären DAPK-Komponente, Agrin, konnte bei Agrin-knock-out-Mäusen kein direkter Einfluss auf die AQP4-Polarität in astrozytären Endfußmembranen beobachtet werden. Jedoch konnte eine Reduktion der OPK-Dichte in diesen nachgewiesen werden [26].

1.3.3 Aufbau des DAPKs und Interaktion seiner Komponenten

Der DAPK erstreckt sich vom Aktinzytoskelett bis in die Basallamina und kann grob in drei Abschnitte gegliedert werden: einen intrazellulären, einen transmembranären und einen extrazellulären Abschnitt (Abbildung 3). AQP4 ist von intrazellulär an das Protein α_1 -Syntrophin gebunden, das weiter an Mitglieder der intrazellulären Dystrophinfamilie gekoppelt ist. Die Mitglieder der Dystrophinfamilie sind einerseits an das transmembranäre β -Dystroglykan und andererseits isoformenabhängig frei endend (unter anderem Dp71) oder an das Aktinzytoskelett (unter anderem Dp427) gebunden.

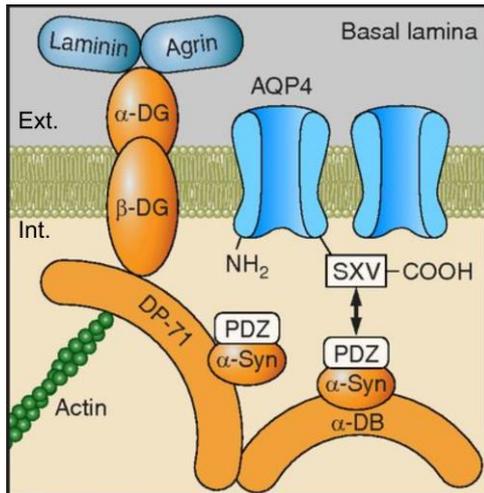


Abbildung 3 – Schema der Verankerung von AQP4 über den von intrazellulär nach extrazellulär überspannenden DAPK (Modifiziert nach Nagelhus et al. [29]). AQP4 – Aquaporin-4; α-Dg – α-Dystroglykan; β-Dg – β-Dystroglykan; Dp-71 – Kurze Dystrophin-Isoform 71; α-Syn – α₁-Syntrophin. α-Db – α-Dystrobrevin.

Von extrazellulär sind die Proteine aus der Laminin- und Agrinfamilie über α-Dystroglykan an das transmembranäre β-Dystroglykan gebunden [28, 29, 57].

1.3.3.1 Dystrophin

Das Gen der Dystrophine, DMD-Gen, mit einer Länge von mehr als zwei Millionen Basenpaaren ist Ursprung vieler gewebeabhängiger Dystrophinisoformen, die sich anhand ihrer unterschiedlich nah an das 3'-Ende des DMD-Gens verlagerten Promotoren und folglich der Länge ihres Transkripts unterscheiden lassen [58, 59]. Im ZNS sind die längsten bekannten Dystrophinisoformen (Dp427) überwiegend in kortikalen Neuronen exprimiert [60, 61]. Dp427 kann in vier funktionelle Domänen im Rahmen der Proteininteraktion mit dem Aktinzytoskelett, β-Dystroglykan, der Syntrophinfamilie und der Dystrobrevinfamilie gegliedert werden [57, 59]. Allen Dystrophinisoformen mit Promotorursprung innerhalb des DMD-Gens fehlt die Aktinbindungsdomäne. Die kleineren Dystrophinisoformen (Dp260, Dp140, Dp116 und Dp71) haben ihren Promotorursprung innerhalb des DMD-Gens und weitere Dp71-Isoformen gehen zusätzlich durch alternatives Spleißing hervor [59]. Dp71-Isoformen werden ubiquitär in den Neuronen und den Gliazellen des ZNS, perivaskulär in den Astrozytenendfüßen und der *Retina*, exprimiert [61, 62]. In beiden Haarsinneszelltypen des DCs des Meerschweinchens wurden bis jetzt verschiedene Dystrophinisoformen, darunter Dp427 detektiert [38].

1.3.3.2 Syntrophin

Die Syntrophinfamilie (Syn) besteht aus fünf Proteinen, α_1 -, β_1 -, β_2 -, γ_1 - und γ_2 -Syntrophin, von denen jedes Mitglied eine PDZ-Domäne trägt, die eine Interaktion mit anderen Proteinen, beispielsweise Ionenkanälen oder Signalmolekülen, ermöglicht [28, 63-65]. Weiter ist jedes Protein aus der Syntrophinfamilie mit einer einzigartigen C-terminalen Region ausgestattet, die andererseits die Interaktion mit Proteinen aus der Dystrophin- und Dystrobrevinfamilie ermöglicht [66-68]. Im ZNS weisen alle Mitglieder der Syntrophinfamilie ein großes Spektrum an Wechselwirkungspartnern auf [28], beispielsweise interagiert in Astrozyten α_1 -Syntrophin mit $K_{ir}4.1$ [69] und mit AQP4 [31, 32]. α_1 -Syntrophin konnte in den Endfußmembranen der Astrozyten und Müllerzellen, unter anderem perivaskulär, nachgewiesen werden [31, 32]. Im *DC* liegen aktuell keine Informationen über die Expression von Mitgliedern der Syntrophinfamilie vor [54].

1.3.3.3 Dystroglykan

Die Dystroglykanfamilie besteht aus extrazellulären α -, und dem transmembranären β -Dystroglykan und geht aus einem gemeinsamen Präpeptid hervor, das im DAG1-Gen kodiert ist und im weiteren Verlauf proteolytisch gespalten wird [70]. Beide Spaltprodukte werden unterschiedlich weiter posttranslational modifiziert und erhalten dadurch ihre charakteristischen Eigenschaften. α -Dystroglykan erfährt eine starke Glykosylierung und kann in drei Domänen gegliedert werden: eine N-terminale, eine Muzin-ähnliche und eine C-terminale Domäne. Die N-terminale Domäne von α -Dystroglykan ermöglicht die Bindung an eine Reihe von extrazellulären Matrixproteinen, wie den Lamininen, Agrinen, Perlekanen und Neurexinen [70-76]. Über seine C-terminale Domäne bindet α -Dystroglykan, nicht kovalent, an die extrazelluläre N-terminale Domäne von β -Dystroglykan, die weiter in die transmembranäre Domäne übergeht [77]. Der zyttoplasmatisch gelegene C-terminale Abschnitt von β -Dystroglykan beinhaltet die Regionen, die eine Interaktion mit Proteinen aus der Dystrophinfamilie ermöglichen [78]. Im ZNS sind α -Dystroglykan und β -Dystroglykan in den perivaskulären Astrozytenendfußmembranen exprimiert [79]. In der *Retina* findet sich auch ein perivaskuläres Expressionsmuster von α -Dystroglykan und β -Dys-

troglykan [80]. Im *DC* konnte α -Dystroglykan sowohl in seinen epithelialen Stützzellen (Hensen-, innere Grenz-, Claudius-, innere Sulkus-, äußere Sulkus-, und Interdentalzellen) als auch in den Stützzellen des Corti-Organs (Deiterszellen, innere Phalangenzelle, äußere Pfeilerzelle und innere Pfeilerzelle) und perivaskulär in der *Stria vascularis* identifiziert werden [39-41]. Eine β -Dystroglykan-Expression wurde im *DC* bis jetzt nur perivaskulär in der *Stria vascularis* und dem *Nervus cochlearis* gezeigt [40].

1.3.3.4 Laminin

Die Familie der Laminine stellt eine große Gruppe der Basalmembranproteine. Sie haben generell einen T-förmigen Aufbau, der sich weiter in eine α -, β -, und γ -Kette mit jeweils eigenen Isoformen und genetischem Ursprung erstreckt. Entsprechend ihrer Kettenzusammensetzung können die Laminine systematisch, neben ihrem Eigennamen, bezeichnet werden. In Vertebraten sind bislang fünf α -Ketten, drei β -Ketten und drei γ -Ketten bekannt. Aus den daraus entstehenden Kombinationsmöglichkeiten konnten bisher 16 Laminine identifiziert werden [81]. Die verschiedenen Ketten erfüllen unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Interaktion mit anderen extrazellulären Matrixmolekülen, wie Kollagen IV oder Agrin, der Quervernetzung mit anderen Lamininen oder als Liganden zum Beispiel der Integrinfamilie oder der Dystroglykane. Mit Fokus auf den DAPK konnte eine hohe Affinität der α_1 - und α_2 -Ketten für eine Bindung mit α -Dystroglykan gezeigt werden [82]. Im ZNS konnten Lamininisoformen perivaskulär und somit in unmittelbarer Nähe der Astrozytenendfüße, nachgewiesen werden [83]. In der *Retina* konnten Laminine ebenfalls perivaskulär und in der inneren Grenzmembran detektiert werden [80]. Im *DC* der Ratte wurden Lamininisoformen unspezifisch in den Basalmembrankontakten des Corti-Organs und der epithelialen Stützzellen *DCs* nachgewiesen. Konkret entlang der äußeren und inneren Pfeilerzellen, Deiters- und inneren Phalangenzellen, Hensen- und innere Grenz-zellen, Claudius- und inneren Sulkuszellen, äußeren Sulkus- und Interdentalzellen [84]. Genauer wurden weiter die γ_1 -Kette im Meerschweinchen und die β_2 -Kette im Menschen entlang der Stützzellen des *DCs* und des Corti-Organs identifiziert [39, 42].

1.3.3.5 Agrin

Neben ihrer elementaren Rolle bei der Aggregation der Neuromuskulären Endplatte wurden die Mitglieder der Agrinfamilie, Heparansulfat-Glykoproteine, unter anderem im ZNS beschrieben, wo sie bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke einen wichtigen Teil einnehmen [85-88]. Aus dem hochkonservierten Agrin-Gen, AGRN, gehen mehrere gewebespezifisch exprimierte Isoformen durch alternatives mRNA Spleißing an mindestens drei Abschnitten hervor [89]. Zwei Spleißing-Abschnitte, A im Huhn- oder γ im Nageragrin und B im Huhn- oder α im Nageragrin, liegen in LG-domänen, die eine Bindung zu Lamininen und α -Dystroglykan vermitteln und modulieren [89-91]. Im ZNS konnte Agrin im Extrazellulärraum der Endothelzellen und somit auch der Astrozytenendfüße detektiert werden [92]. In der Retina wurde in der Maus eine Agrin-Expression perivaskulär in der inneren nukleären und äußeren plexiformen Schicht identifiziert [93]. Die Expression von Agrin-Isoformen wurde im *DC* bisher weder auf zellulärer noch auf subzellulärer Ebene analysiert.

1.3.3.6 Dystrobrevin

Die intrazelluläre Proteinfamilie der Dystrobrevine zählt mit einer den Dystrophinen sehr ähnlichen Proteinsequenz nahe des C-Terminus zu den „Dystrophin-verwandten“ Mitgliedern des DAPKs. Sie können einerseits Mitglieder der Syntrophinfamilie und andererseits an Dystrophine binden, vermutlich aufgrund des Dystrophin-ähnlichen Proteinsequenzabschnitts [94, 95]. Aus zwei Genen, α - und β -Dystrobrevin, mit jeweils mehreren Isoformen entstammen die Mitglieder der Dystrobrevine [96, 97]. Beide konnten bisher in den perivaskulären Endfußmembranen im ZNS und der Retina identifiziert werden [61, 97, 98]. Im Innenohr wurden Mitglieder der Dystrobrevinfamilie, genauer α -Dystrobrevin-1, während der Embryonalentwicklung unter anderem basolateral in Epithelzellen des Ohrbläschens der Maus, ungefähr am embryonalen Tag 10,5 beobachtet [99].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.4.1 Die Verankerung von AQP4 in den epithelialen Stützzellen des DCs – in Analogie zur *Retina* und den Gliazellen des ZNS.

Die AQP4-Expression und das gleichzeitige Fehlen der OPKs in den Zellmembranen der Claudiuszellen weisen auf einen zusätzlichen Regelmechanismus hin, der die polare AQP4- und OPK-Expression in den Stützzellen des DCs und des Corti-Organs neben speziellen Zellkontakten, TJs, steuert. In den Stützzellen des ZNS und der *Retina* wird die polare AQP4-Expression und OPK-Formation entscheidend über die Verankerung mit einem Makromolekülkomplex, dem DAPK, hervorgerufen. Die Kernfragestellung dieser Studie ist es, ob sich das Prinzip der AQP4-Verankerung aus den Stützzellen des ZNS und der *Retina*, zur Generierung einer Zellmembranpolarität, auf die epithelialen Stützzellen des DCs übertragen lässt. Daraus wurden die folgenden Fragen abgeleitet.

1. Ist die Verankerung von AQP4 im DC analog zu der in den Gliazellen?
2. Sind die Verankerungsmoleküle essenziell für die OPK-Formation im DC?

1.4.2 Konkrete methodische Fragestellungen

Im Rahmen dieser Studie sollte der DC des Menschen und der Ratte auf die Expression der DAPK-Komponenten auf mRNA-, zellulärer und subzellulärer Ebene untersucht werden. Im Folgenden wird auf die konkrete methodische Fragestellung dieser Arbeit näher eingegangen.

Zum Nachweis der DAPK-Komponenten auf mRNA-Ebene im DC wurde in dieser Studie die RT-PCR/qPCR verwendet, um folgenden Fragestellungen nachzugehen.

1. Sind die DAPK-Komponenten auf mRNA-Ebene in den Zellen des DCs der Ratte exprimiert?
2. Sind die Komponenten des DAPKs auf mRNA-Ebene im humanen DC exprimiert?

Zum Nachweis der DAPK-Komponenten auf Proteinebene und weiter auf zellulärer sowie subzellulärer Ebene im *DC* wurden Immunfluoreszenzanalysen mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (cLSM) ausgewertet. Daraus wurden folgende Fragestellungen abgeleitet.

1. Ist Syntrophin als Anker von AQP4 mit diesem im *DC* kolokalisiert?
2. Sind die DAPK-Mitglieder subzellulär in denselben Membrandomänen, wie aus dem ZNS und der *Retina*, im *DC* der Ratte lokalisiert und könnten AQP4 dort verankern?
3. Ist Syntrophin als Anker von AQP4 mit diesem im humanen *DC* kolokalisiert?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zur Organentnahme verwendete Tiere

Alle Experimente wurden an *Cochlea*-Gewebe durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Gewebe der *Retina*. Die Organentnahme wurde an hörreifen, funktionell maturen Wistar Ratten (Charls River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) des postnatalen Tags 31 (p31) durchgeführt. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß den Vorgaben der Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden in der Fassung vom 18. Juni 2007 herausgegeben von der Kommission der europäischen Gemeinschaften – Aktenzeichen K(2007) 2525. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 8 Absatz 13 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178) geändert wurde. Die hierfür erforderliche Mitteilung mit dem Titel „Immunhistochemische, molekularbiologische, ultrastrukturelle und funktionelle Untersuchung von wassertransportierenden Kanälen an Innenohren aus der Ratte“ vom 05.06.2014 wurden am 04.07.2014 durch die Tierschutzbeauftragte der Universität Tübingen vom Regierungspräsidium Tübingen des Landes Baden-Württemberg genehmigt.

2.1.2 Gewebe von Körperspendern

Die Experimente wurden an Gewebe des humanen *Ductus cochlearis* durchgeführt und als Positivkontrolle diente Gewebe der humanen *Retina*. Nach dem Tod der Körperspender und vorheriger Erfüllung von § 42 Abs. 1-4 des Bestattungsgesetzes des Landes Baden-Württemberg, BestattG, BW, vom 21. Juli 1970, das zuletzt durch das Gesetz vom 01. April 2014 (GVBL. S. 93ff) geändert wurde, wurden die Körperspender schnellstmöglich in das Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen überführt und die Gewebeentnahme durchgeführt. Im Vorfeld bestimmten die Körperspender in ihrer letztwilligen Verfügung über die anatomische Körperspende, dass ihre

Körperspende für die medizinische und medizintechnische Wissenschaft, die die Entnahme, Prozessierung und Lagerung von supravivalem Gewebe einschließt, verwendet werden darf. Während der wissenschaftlichen Untersuchungen und darüber hinaus wurde die Anonymität der Körperspender stets unter der Verwendung von Pseudonymen gewahrt. Einen expliziten positiven Entscheid über dieses Vorgehen traf die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen in der Sitzung vom 18.10.2010 unter der Projektnummer 237/2007BO1 und dem Vorsitz von Professor Dr. med. Dieter Luft.

2.1.3 Chemikalien

Die Standardchemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von der Firma Applichem, Darmstadt, Deutschland bezogen.

2.1.4 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

PBS – Phosphat-gepufferte Salzlösung: 1 PBS-Puffertablette, A9201, (Appli-Chem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in 1l entmineralisiertem Wasser gelöst ergibt 1x konzentrierte wässrige Lösung mit pH 7,4; Kaliumchlorid 2,7 mmol/l, Natriumchlorid 140 mmol/l und Phosphat 10 mmol/l.

EDTA – Ethylendiamintetraacetat-Lösung: 150 mmol/l EDTA, pH 8, in 1x PBS.

30% Saccharose-Lösung: 30g Saccharose gelöst in 100 ml 1xPBS.

Fixierlösung auf Paraformaldehyd-Basis (PFA): Roti®-Histo Fix 4%, (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Permeabilisierungspuffer: 0,25% Triton™ X-100, (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 1x PBS (v/v).

Blockierungspuffer: 0,1% Triton™ X-100 und 1% Normal Donkey Serum (NDS) S30-100ML, (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Detuschland) in 1x PBS (v/v)

und/oder 1% NGS (Normal Goat Serum) (G9023 SIGMA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in 1x PBS (v/v).

Reaktionspuffer: 0,5% NDS und/oder NGS in 1xPBS (v/v).

2.1.5 Einbettmedium, Fettstift, Eindeckelmedium und Immersionsöl

Eindeckelmedium: Tissue-Tec® O.C.T. compound (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande)

Fettstift: Dako Pen, (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)

Einbettmedium: FluorSave™ Reagent der Firma Merck KGaA

Immersionsöl: Immersol™ 518 F (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

2.1.6 Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 1 – Antikörper für die Immunhistochemie

Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper
AQP4 (C-19) (sc-9888), anti-goat, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Donkey anti-goat Alexa 488 (A-11055), 1:400, Invitrogen™
β-Dystroglycan (ab49515), anti-mouse, 1:100, Abcam	Donkey anti-mouse Alexa 488 (A21202), 1:400, Life Technologies
Dystrophin (ab15277), anti-rabbit, 1:100, Abcam	Donkey anti-rabbit Alexa 488 (A21206), 1:400, Life Technologies
Laminin (ab11575), anti-rabbit, 1:100, Abcam	Donkey anti-rabbit Alexa 488 (A21206), 1:400, Life Technologies
Syntrophin (MA1-745), anti-mouse, 1:100, Thermo Scientific	Donkey anti-mouse Alexa 488 (A21202), 1:400, Life Technologies
AQP4 (C-19) (sc-9888), anti-goat, 1:100, Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti-goat Alexa 546 (A11056), 1:400, Life Technologies

Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Dallas, Vereinigte Staaten von Amerika)

Invitrogen™ von Thermo Fisher Scientific Inc., (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)

Life Technologies von Thermo Fisher Scientific Inc.,

Abcam plc, (Cambridge, Vereinigtes Königreich)

2.1.7 Puffer für die Molekularbiologie

TBE – Tris-Borat-EDTA-Puffer: TBE-Puffer (10x) – Pulver BC, (A4348,1000), AppliChem GmbH in 1 l entmineralisiertem Wasser gelöst ergibt 10x konzentrierte wässrige Lösung (170,28 g/l); Borsäure 55,03 g/l (0,89 mol/l), EDTA 7,44 g/l (0,02 mol/l) und Tris 107,81 g/l (0,89 mol/l). TBE-Puffer (1x) – 100 ml TBE-Puffer (10x) werden mit 900 ml entmineralisiertem Wasser gemischt, Verhältnis 1:10.

DEPC-Wasser: 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) werden in 1 l doppeltdestilliertem Wasser gelöst (0,1 % DEPC v/v), bei RT über Nacht rührend inkubiert und im Anschluss bei 20 psi für 20 min autoklaviert.

2.1.8 RNase freie Glaswaren und Präparationsbesteck

Wurden entweder bei 180°C für 3h gebacken oder mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) benetzt und anschließend mit DEPC-behandeltem Wasser abgespült.

2.1.9 Kits für die Molekularbiologie

Precellys® Tissue RNA KIT (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

Precellys®Ceramic Kit 1.4/2.8 mm (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

peqGOLD DNase I Digest Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Qubit® RNA HS Assay Kit, 250 pg/μL and 100 ng/μL (Life technologies)

Qubit® RNA BR Assay Kit, 1 ng/μL to 1 μg/μL (Life technologies)

peqGOLD cDNA Kit Synthesis Kit H Plus (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

peqGOLD Taq-DNA-Polymerase-Kit 'all inclusive', (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

TaqMan® Gene Expression Master Mix, (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

O'range 50 bp DNA Ladder, Orange G Ladepuffer (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

2.1.10 Agarose-Gel

Das 1,5 %ige (3 %ige) Agarose-Gel für die RT-PCT- (qPCR-) Reaktion wurde erstellt, in dem 1,5g (3g) Agarose, peqGOLD Universal Agarose der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, und 100 ml 1x TBE-Puffer in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vermischt und in einer Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt wurden. Unter sanftem Rühren wurden dem noch flüssigen Gemisch 2 µl Midori Green Advanced DNA Stain der Firma Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland hinzugefügt. Die Polymerisation erfolgte in einer Gelkammer, 40-0911 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH.

2.1.11 Primer für die RT-PCR

Alle Primer-Paare wurden von der Firma Eurofins Genomics, (Ebersberg, Deutschland), bezogen und sind gegen cDNA-Abschnitte der Ratte gerichtet.

Tabelle 2 – Primersequenzen der RT-PCR

Gen	Forward	Reverse	Länge	Quelle
Agrin (AGRN)	CGTATGCGGTTCTGATG-GACACA	ACTGGGCTTCTAGG-GACTCTGG	455 bp	Lasergene 8
Aquaporin 4 (AQP4)	CCTGCAGCAGAGAGAGCATC	CCAATT-GCTAAAGCAACGGA	534 bp	Moe et al [16]
Dp71 (in DMD)	ATGAGGGAACAGCTCA-AAGG	TGCAGCTGACAGGCTCA-AGA	183 bp	Claudepierre et al [100]
Laminin, β1 (LAMB1)	CCCGTTCCGGTTGTAAAT	TGGTCCGGCAGCTGTGGTTCATAG	515 bp	Lasergene 8
Laminin, β2 (LAMB2)	AGGGGAAGCTGGGAAT-GGTG	GACGCCGGGTATCTGCT-GAGTTGC	366 bp	Lasergene 8
Laminin, α3 (LAMA3)	GCAAGAAAAGGCGCAGGT-CAA	ATCCCGAATATTCTT-TAGCAGT	362 bp	Lasergene 8
Laminin, γ1 (LAMC1)	TCTGGCAGCACCGACGAA	AGGGGCGACAAAAG-TATCTG	338 bp	Lasergene 8
α-Dystrobrevin (DTNA)	CCGGAGGGCCATGG-TAAAATCT	ATCGGAATCCCATCATGCTCTCAC	406 bp	Lasergene 8
α-Dystroglykan (in DAG1)	GAGCCCACAGCCGTTAT-TAC	TGAACCCACGATTCT-CACC	425 bp	Claudepierre et al [100] (for) / Collins et al [101] (rev)
α₁-Syntrophin (STNA1)	CCTCTTCAGCGTCAGCCTT-CTTCC	TGTTCCGT-GAGCCAGCCAATCT	328 bp	Lasergene 8

β-Dystrobrevin (DTNB)	CGGAAGACCATGGCG-GAGAAGAG	CGTAGGCGGGCGATCA-TAAAGTTG	334 bp	Lasergene 8
β-Dystroglycan (in DAG1)	GAGGACCAGGCCACCTT-TATTAAG	CAGGCGCTT-GTGGGTAAAG	346 bp	Claudepierre et al [100](for)/Collins et al [101] (rev)

2.1.11 TaqMan® Sonden

Alle Sonden stammten aus dem TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems von Thermo Fisher) und sind gegen humane cDNA-Abschnitte gerichtet.

Tabelle 3 – Gene und Assay-Nummern der TaqMan® Sonden.

Name	Gen-Alias	Assay-Nummer
Aquaporin 4 (AQP4)	AQP4	Hs00242342_m1
Syntrophin, α₁ (STNA1)	SNTA1	Hs00162045_m1
Dystrophin (DMD)	DMD	Hs00758098_m1
Dystrobrevin, α (DTNA)	DNTA1	Hs00169927_m1
Dystroglykan 1 (DAG1)	DAG1	Hs00189308_m1
Laminin, α3 (LAMA3)	LAMA3	Hs00165042_m1
Laminin, β1 (LAMB1)	LAMB1	Hs01055969_m1
Laminin, γ1 (LAMC1)	LAMC1	Hs00267056_m1
Agrin (AGRN)	AGRN	Hs00394748_m1
TATA-Box bindendes Protein (TBP)	TBP	Hs00427620_m1
Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT)	HPRT 1	Hs02800695_m1
Ubiquitin C (UBC)	UBC	Hs00824723_m1

2.1.12 Verbrauchsmaterial

Spitzen: TipOne, (STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland)

Pipetten: ErgOne, (STARLAB GmbH,)

Petri-Schale: (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Deutschland)

Insulinspritze: Nadelgröße: 26G Nadel: BD Microlance 3, (Becton, Ort, Deutschland)

Objektträger: SuperFrost® Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Deckgläser: Deckgläser Glasdicke: 0,13-0,16, (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland)

Skalpelle: Bruno Baya GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Reaktionsgefäße:

Semi-Skirted 96 Well PCR Plate, (PEQLAB) für die qPCR-Reaktion

Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml – 2 ml, für übrige Reaktionen, (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.1.13 Geräte

Binokularlupe: M125 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Kryotom: CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)

Zentrifuge: Centrifuge 5414D, (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Fluorometer: Qubit® 2.0 Fluorometer, (Life Technologies)

Thermoblock: Peqlab-Biosan, (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Thermocycler: peqSTAR 96X Universal Gradient (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Real-Time PCR System: Applied Biosystems Step One™ (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Spannungsquelle: peqPOWER E203 (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Gelkammer: Perfect Blue Mini Gelsystem L (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Geldokumentationssystem: EBOX VX2 20MX, (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Chirurgischer Bohrer: Zusammengesetzt aus einem Hochleistungs-EC-Motor (20711032) (KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und einem Handstück (1600399-001) (KARL STORZ GmbH & Co. KG). Als Bohrkopf wurde

entweder ein Rosenbohrkopf (Rosenbohrer) oder ein Diamantbohrkopf (Diamant-Bohrer) eingesetzt. Die Bohrköpfe 280030 wurden von der Firma KARL STORZ GmbH & Co. KG bezogen.

Konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM): LSM 510, Axioplan2i (Carl Zeiss AG)

2.1.14 Software

Primerentwurf: Zum Primerentwurf wurde das Softwarepaket DNASTAR Laser-gene 8 der Firma DNASTAR, Inc., (Madison, USA) verwendet.

Die Aufnahme am cLSM erfolgte durch die Software Zen 2009 in der Version 5,5,0,443 (Carl Zeiss AG) und die Auswertung durch Software ZEN 2012 (blue edition) in der Version 1.1.2.0 (Carl Zeiss AG).

Der Abbildungsentwurf erfolgte unter der Verwendung der Software Corel-DRAW®X6 in der Version 16.4.1.1281 der Firma Corel GmbH, München, Deutschland.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebegewinnung

2.2.1.1 Organentnahme aus der adulten Ratte (P31)

Die Tiere wurden zur Gewebegewinnung mit CO₂ bis zur Regungslosigkeit und Apnoe narkotisiert. Anschließend wurde der Kadaver dekapitiert, der Schädel skalpiert und median-sagittal, beginnend am *Foramen magnum*, mit einer Schere durchtrennt. An diesem Punkt wurde der *Bulbus oculi* als Ganzes direkt aus der *Orbita* entnommen.

Zur Gewinnung von Cochlea-Gewebe der Wistar-Ratte wurde nach der Entfernung des restlichen zentralnervösen Gewebes ein Schädelweichteilpaket, inklusive des *Os temporale*, rostral des Beginns der mittleren Schädelgrube abgetrennt und in eine mit 1x PBS befüllte Petri-Schale überführt. Die weitere Feinpräparation erfolgte unter einer Binokularlupe. Zur Darstellung des *Promontorium cochleae* wurde das Schädelweichteilpaket mit Hilfe von zwei Pinzetten, 11252-23 und 11051-10 (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) entlang des äußeren Gehörgangs und der Paukenhöhle gespalten. Abhängig von der späteren Verwendung des Gewebes, zur molekularbiologischen oder immunhistochemischen Untersuchung, wurden nachfolgend verschiedene Präparationsalgorithmen angewandt.

Zur **immunhistochemischen** Aufarbeitung des *Cochlea*-Gewebes aus der Wistar-Ratte wurde die knöchernen Hülle am Apex des *Promontorium cochlae* minimal entfernt, anschließend wurde der Stapes entfernt, das ovale und runde Fenster mittels einer Insulinspritze durchstoßen und deren jeweiliger Perilymphraum mit Roti®-Histofix 4% vorsichtig, mit wenig Druck, perfundiert. Das gesamte Präparat wurde zur Immersionsfixierung für eine Stunde in Roti®-Histofix 4% inkubiert, 3-mal mit 1x PBS gespült anschließend in 150 mmol/l EDTA-Lösung für 48 Stunden bei 4 °C zur Entkalkung gelagert. Nach erneutem 3-maligem Spülen mit 1x PBS wurde das Präparat in einer 30% Saccharose-Lösung bei 4°C für weitere 24 Stunden überführt. Danach wurde das Gewebe in ein Einbettungsmedium, Tissue-Tec® O.C.T, überführt und bei -80 °C gelagert. Der Gewebeblock wurde mit einem Kryotom 14µm dünn geschnitten. Unter

durchlichtmikroskopischer Kontrolle wurden nur Anschnitte parallel zur *Modiolus*-Achse, midmodiolar, auf SuperFrost® Adhäsions-Objekträger, aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Feinpräparation des Retinagewebes erfolgte unter einer Binokularlupe in 1xPBS auf Eis. Hierbei wurde die *Cornea* mit einer Schere, 91500-09 (Fine Science Tools GmbH), durchstoßen, kreisförmig entlang der Iriswurzel abgetrennt und so der Glaskörper entfernt. Der Augenbecher wurde für zwei Stunden auf Eis in Roti®-Histofix 4% inkubiert, 3-mal mit 1x PBS für je 20 Minuten gespült und danach für 24 Stunden bei 4 °C in einer 30% Saccharose-Lösung überführt. Die Einbettung in Tissue-Tek® und die Aufarbeitung am Kryotom erfolgte analog zur *Cochlea*.

Nachfolgend wird die Gewebegewinnung zur **molekularbiologischen Verwendung** beschrieben. Alle Präparationsschritte erfolgten in RNase freien Lösungen und mit RNase freiem Präparierbesteck. Zur Gewinnung von tierischem Cochlea-Gewebe wurde nach der Spaltung des Schädelweichteilpakets entlang des äußeren Gehörgangs das häutige Labyrinth aus seiner knöchernen Schale vorsichtig herauspräpariert und vom *Modiolus* getrennt. Anschließend wurde das Gewebe in ein mit 100 µl RNA-Lysis Buffer T-P, aus dem Precellys® Tissue RNA KIT (PEQLAB Biotechnologie GmbH), befülltes Gefäß des Precellys®Ceramic Kit 1.4/2.8 mm (PEQLAB Biotechnologie GmbH) überführt und 2-mal für 10 Sekunden bei 5000 rpm mit einem Minilysis-System homogenisiert. Das Homogenisat wurde nach vorigem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurden je 10 *Cochleae* aus drei unabhängigen Präparationen aufgearbeitet.

Das Retinagewebe wurde nach der Entfernung des Glaskörpers direkt von der *Choroidea* mit einer feinen Pinzette abgelöst und in ein, mit 100 µl RNA-Lysis Buffer T-P (PEQLAB Biotechnologie GmbH) befülltes, Gefäß aus dem Precellys®Ceramic Kit 1.4/2.8 mm (PEQLAB Biotechnologie GmbH) überführt, 2-mal für 10 Sekunden bei 5000 rpm mit einem Minilysis-System homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Organentnahme aus Körperspendern

Das humane Gewebe wurde 6 bis 18 Stunden *post mortem* entnommen. Alle chirurgischen Instrumente wurden soweit nicht anders angegeben von der Firma KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland bezogen. Das Präparationsverfahren ist stark an die Tympanoskopie über den endauralen Zugangsweg angelehnt. Zu Beginn des Eingriffs wurde der Körper abgedeckt und der Kopf zur kontralateralen Seite des äußeren Gehörgangs gelagert. Mit einem Skalpell der Größe 10 wurde ein ca. zwei bis vier Zentimeter langer Schnitt mit Beginn am äußeren Gehörgang gesetzt. Das Gewebe wurde bis auf den Schädelknochen zwischen *Tragus* und *Helix* der Ohrmuschel in Richtung der ipsilateralen *Orbita* durchtrennt. Mit einem scharfen Raspatorium nach Plester, 8mm, 213008, wurde vom Schnitt ausgehend das Weichteilgewebe halbkreisförmig mit Öffnung nach rostral unterhalb des *Periosts* mobilisiert und ein Teil des *Os temporale* dargestellt. Die feine Haut des äußeren Gehörgangs wurde an dessen Beginn mit einem Plestermesser, 223100, halbkreisförmig mit Öffnung nach rostral, umschnitten und sanft bis hinter den *Sulcus tympanicus* abgelöst. Im weiteren Verlauf wurde die mobilisierte Gehörgangshaut, inklusive Trommelfell, nach rostral geschlagen, der *Sulcus tympanicus* mit einem House-Löffel, 224001, großzügig abgetragen und *Malleus* sowie *Incus* durch Exartikulation des Incudostapedial-Gelenks gelöst. Hammer und Amboss wurden zusammenhängend mit dem Trommelfell aus der Paukenhöhle entfernt und diese entlang des äußeren Gehörgangs mit einem Rosenbohrer mit 5,0 mm Durchmesser unter kontinuierlichem Spülen mit 1x PBS erweitert. Die knöchernen Schale des *Pro-montorium cochlae* wurde mit einem Diamant-Bohrer mit 3,1 mm Durchmesser unter kontinuierlicher Spülung mit 1x PBS ausgedünnt. Nach der Entfernung des *Stapes* wurde der Beginn der basalen Windung des *Ductus cochlearis* durch Abtragen des Knochens zwischen ovalem und rundem Fenster dargestellt und weiterverfolgt. Nach erstmaligem Auffinden des *Ductus cochlearis* mit einem Diamant-Bohrer, 3,1 mm Durchmesser, unter kontinuierlichem Spülen mit 1x PBS wurde der ausgedünnte Knochen oberhalb der basalen Windung weiter mit einem House-Löffel abgetragen. Die basale Windung wurde kurz vor ihrer Rota-

tion um den *Modiolus* mit einem Tellermesser durchtrennt und als Teilstück geborgen. Weiter wurde oberhalb zuerst ein Teilstück der apikalen Windung mit einem Diamant-Bohrer, 3,1 mm Durchmesser, freigelegt und anschließend mit einem House-Löffel vollständig dargestellt. Mit einem Sichelmesser, 660500, wurde die apikale Windung des *Ductus cochlearis* von dem verbliebenen Teilstück der basalen Windung getrennt und geborgen. Danach wurde der *Modiolus* mit einem Diamantbohrer, 3,1 mm Durchmesser, unter kontinuierlicher Spülung mit 1x PBS durchdrungen, der verbliebene Teil der basalen Windung dargestellt und extrahiert. Das Gewebe wurde analog zur tierischen Präparation, entsprechend der jeweiligen Verwendung, aufgearbeitet. Die humane Präparation für die molekularbiologische Verwendung erfolgte analog zur tierischen mit RNase-freiem Operationsbesteck. Insgesamt wurden 6 *Cochleae* aus drei Körperspendern aufgearbeitet.

Für die Gewinnung von humanem Retinagewebe wurde der gesamte *Bulbus oculi* herausgelöst. Dafür wurden von nasal die *Sklera*, der Nervus opticus und die Bulbusmuskulatur mit einer gebogenen Schere, 513612, durchtrennt. Nach der Überführung des Bulbus in eine Petrischale befüllt mit 1x PBS wurde unter einer Binokularlupe die Sklera ca. 2 mm distal der Iris-Sklera-Grenze eröffnet, der Bulbus *posterior* des Ziliarkörpers kreisförmig umschnitten und der Glaskörper sanft durch den Sog von aufgelegtem Zellstoff herausgelöst. An zwei gegenüberliegenden Stellen wurde mit einer Schere, 213314, die Sklera durch einen äquatorialen Schnitt von der Eröffnungsstelle des Bulbus zur *Papilla nervi optici* von *Choroidea und Retina* abgelöst. Das verbliebene *Choroidea/Retina*-Gewebe wurde zur Entlastung an vier gegenüberliegenden Stellen in Richtung der *Papilla nervi optici* äquatorial eingeschnitten, aufgeklappt und Stücke der Größe von ca. 5 mm x 5mm parafoveolär entnommen. Das Gewebe wurde analog zur tierischen Präparation, entsprechend der jeweiligen Verwendung, aufgearbeitet.

2.2.1.3 RNA-Isolation

Nach der Gewebegewinnung für molekularbiologische Untersuchungen wurde die Isolierung der RNA mit dem Precellys® Tissue RNA-Kit nach den Angaben

des Herstellers durchgeführt. Der DNase I-Verdau erfolgte direkt auf der PerfectBind RNA Column durch die Zugabe von 75 µl DNase I Reaktionsmix auf die PerfectBind RNA Column und Inkubation bei RT für 15 Minuten. Dieser wurde zu Beginn der RNA-Isolation aus 73.5 µl DNase I Digestion Buffer und 1.5 µl RNase-freier DNase I (20 units/µl) angemischt. Zum Trocknen wurde die Säule im Anschluss für zwei Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert und in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 30 µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Säulenmatrix gegeben, für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und die eluierte RNA entweder direkt im Anschluss in cDNA umgeschrieben oder bei -80 °C gelagert. Bei allen Zwischenschritten der RNA-Extraktion wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Qubit® 2.0 Fluorometer bestimmt. Zur Messung der Konzentration der Cochlea-RNA wurde der Qubit® RNA HS Assay Kit für die Bestimmung von Konzentrationen zwischen 250 pg/µl und 100 ng/µl benutzt. Die Messung der Kontrollgewebe-RNA Konzentration erfolgte mit dem Qubit® RNA BR Assay Kit für die Bestimmung von Konzentrationen zwischen 1 ng/µL to 1 µg/µL. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit 1 µl der isolierten RNA.

2.2.1.4 RT-Reaktion

Für die RT-Reaktion wurde das peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Zuerst wurden das entsprechende Volumen von 1 µg Template-RNA und 8,33 µmol/l Random Hexamer Primer in DEPC-Wasser in ein RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert und fünf Minuten bei 65 °C in einem Thermoblock inkubiert. Nach abschließendem Abkühlen auf Eis wurden 1x ReactionBuffer (50 mmol/l Tris-HCl bei pH 8.3, 50 mmol/l KCl, 20 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l DTT), 20u peqGOLD RNase Inhibitor (20 u/µl), 2,5 mmol/l dNTP Mix, 100u/µl peqGOLD M-MuLV H Plus Reverse Transcriptase (200 u/µl) in dieser Reihenfolge dem Reaktionsgefäß hinzugefügt, sanft vermischt und für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Synthese erfolgte bei anschließender Inkubation bei 45 °C für 60 Minuten und wurde danach bei 70 °C für fünf Minuten terminiert. Die so gewonnene cDNA wurde entweder direkt im Anschluss verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.1.5 RT-PCR – Polymerase Kettenreaktion

Zum gezielten qualitativen Nachweis der mRNA-Sequenzabschnitte einzelner Gene wurde die RT-PCR gewählt. Für die Amplifikation der zu untersuchenden Gene wurden Oligonukleotidprimer mit einer Länge von 17 bis 24 Basenpaaren generiert oder aus anderen Studien verwendet (Tabelle 2). Zur Durchführung der Polymerase Kettenreaktion wurde das peqGOLD Taq-DNA-Polymerase-Kit 'all inclusive' nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Mastermix wurde aus 1x Reactionbuffer Y (20 mmol/l Tris-HCl bei pH 8,55, 16 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20 und 2mmol/l MgCl_2), 1x Enhancer Solution P, 0,2 mmol/l dNTP-Mix, 0,2 pmol/ μl Forward-Primer, 0,2 pmol/ μl Reverse-Primer, 1,25 u/ μl Taq-DNA-Polymerase (5 u/ μl) und DEPC-H₂O in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurde je 1 μg cDNA für die PCR eingesetzt. Diese wurde anschließend in einem Thermocycler, durchgeführt. Zu Beginn wurde der Ansatz einmalig drei Minuten lang bei 94 °C denaturiert. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden bei 94 °C, einer Hybridisierungsphase mit einer Dauer von 30 Sekunden bei 55 °C, und einer Elongationsphase mit der Dauer von 60 Sekunden bei 72 °C. Danach wurde eine finale Elongationsphase von fünf Minuten bei 72 °C durchgeführt. 10 μl des jeweiligen Amplifikates wurden mit 1x Orange G-Ladepuffer in einem frischen Reaktionsgefäß beladen und in eine Tasche eines 1,5 % Agarose-Gels pipettiert. Zur Visualisierung der DNA diente Midori Green Advanced. Die Größenidentifizierung der spezifischen Banden erfolgte mit einem Orange 50 bp DNA Ladder, von dem 10 μl in eine Tasche des Gels pipettiert wurden. Die Banden wurden bei 120 Volt für 45 Minuten aufgetrennt. Danach wurde das Ergebnis der Gel-Elektrophorese im Geldokumentationssystem visualisiert.

2.2.1.6 qPCR – Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Der Nachweis von mRNA-Sequenzabschnitten mittels qPCR erfolgte in einem Real-Time PCR System. In ein Reaktionsgefäß einer PCR Plate wurden in ein Volumen von 20 μl 2 ng/ μl cDNA, 1x TaqMan® Gene Expression Master-Mix und

das jeweilige 1x TaqMan® Gene Expression Assay pipettiert. Die qPCR umfasste 40 Zyklen, die mit einer Annealing-/Elongations-Temperatur von 60°C und einer Denaturierungs-Temperatur von 95°C durchgeführt wurden. Die Größenidentifizierung der spezifischen Banden erfolgte mit einem O'range 50 bp DNA Ladder, von dem 10 µl in eine Tasche eines 3% Agarose Gels pipettiert wurden. Die 10 µl der Amplifikate wurden mit 1x Orange G Ladepuffer beladen und in die restlichen Taschen pipettiert. Die Banden wurden bei 120 V für 2 Stunden aufgetrennt. Danach wurde das Ergebnis der Gel-Elektrophorese im Geldokumentationssystem visualisiert.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

2.2.2.1 Immunfluoreszenzmarkierung

Die Gewebeschnitte auf den jeweiligen Objektträgern wurden zuerst bei Raumtemperatur aufgetaut, mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet und fünf Minuten mit 1x PBS renaturiert. Nach anschließender Lagerung im Permeabilisierungspuffer für 5 Minuten wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten lang in 1x PBS gespült. Die Blockierung erfolgte 30 Minuten im Blockierungspuffer. Die Zugabe von NDS oder NGS zum Blockierungspuffer wurde dem jeweiligen Ursprungsorganismus des Sekundärantikörpers angepasst. Bei Mehrfachmarkierungen wurden beide Seren im Blockierungspuffer verwendet. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit dem Reaktionspuffer mit 1:100 Primär-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die tabellarische Auflistung der Antikörper findet sich in Tabelle 1. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten in 1x PBS die Inkubation mit 1:400 Sekundär-Antikörper in Reaktionspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Schnitte wurden erneut dreimal für jeweils 5 Minuten gespült und die Gewebeschnitte unter Verwendung von FluorSave™ Reagent eingedeckelt.

2.2.2.2 Konfokale cLSM-Aufnahme der Immunfluoreszenzmarkierung

Die Proben wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop, LSM 510, Axioplan2i (Carl Zeiss AG) mit der jeweiligen Anregungswellenlänge, 488nm – Argon-Laser LGK 7812 ML4 (Carl Zeiss AG) und 543nm - HeliumNeon-Laser LGK 7786 P (Carl Zeiss AG), des Fluorophors des gewählten Sekundärantikörpers evaluiert. Die Aufnahmen erfolgten dabei entweder durch die Objektive: Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil DIC (Carl Zeiss AG) oder Plan-APOCHROMAT 20./0,8 (Carl Zeiss AG).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Kolokalisation von AQP4 und seinem membranären DAPK-Ankerprotein, Syntrophin

3.1.1 Die zelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin im *Ductus cochlearis* der funktionell adulten Ratte (p31)

Die Kolokalisation von Aquaporin-4 und Syntrophin konnte in der immunhistochemischen Analyse des DCs der adulten Ratte (p31) in dessen Stützzellen außerhalb des Corti-Organ durchgehend nachgewiesen werden (Abbildung 4).

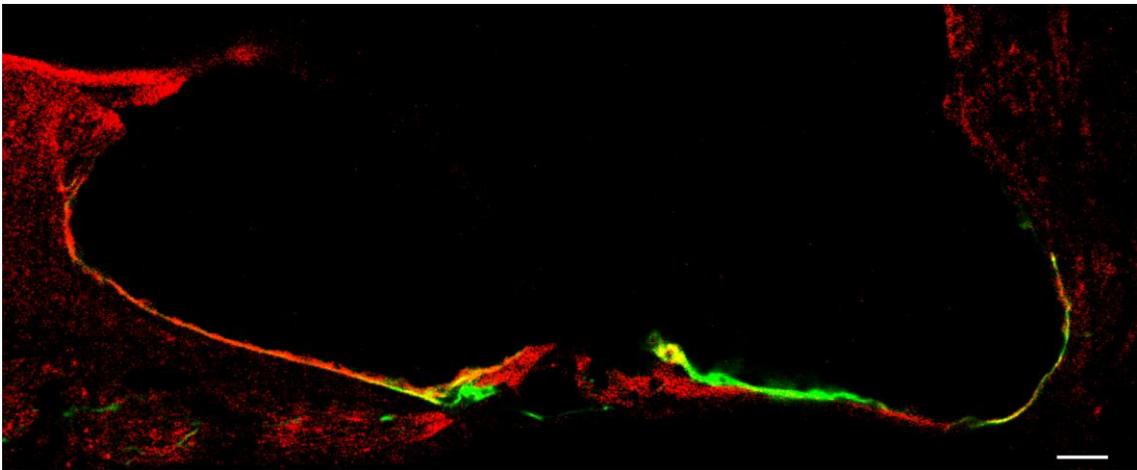


Abbildung 4 – Zelluläre Expression von AQP4 (grün) und Syntrophin (rot) in den epithelialen Stützzellen des *Ductus cochlearis*. Aquaporin-4 und Syntrophin sind in den epithelialen Stützzellen des DCs kolokalisiert. In dieser Aufnahme liegt das vorhandene AQP4-Signal in den epithelialen Stützzellen des inneren Sulkus außerhalb der Fokusebene. Das Corti-Organ zeigte nur eine Syntrophin-Expression und somit keine Kolokalisation mit AQP4. (Maßstab 20 µm)

Auf zellulärer Ebene zeigte sich eine Kolokalisation der beiden Epitope in den epithelialen Stützzellen des DCs, konkret im inneren Sulkus in den Interdental- (IDZs), den inneren Sulkus- (ISZs-med.) und den inneren Grenzzellen (ISZs-lat.). Im äußeren Sulkus konnte eine Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin in den Hensenzellen (HZs), den Claudiuszellen (CZs) und den äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) nachgewiesen werden. In den epithelialen Stützzellen des Corti-Organ konnte nur eine Syntrophin-Expression nachgewiesen werden. Eine AQP4-Expression konnte in den epithelialen Stützzellen des Corti-Organ nicht nachgewiesen werden. Somit sind AQP4 und Syntrophin im Corti-Organ nicht kolokalisiert.

3.1.2 Zelluläre Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin im Kontrollgewebe, *Retina*, der adulten Ratte (p31)

Die Netzhaut der adulten Ratte (p31) diente als Kontrollgewebe (Abbildung 5). AQP4 und Syntrophin waren überwiegend perivaskulär im Bereich der äußeren plexiformen und inneren nukleären Schicht kolokalisiert. Die innere Grenzschicht zeigte ebenfalls ein positives Koimmunfluoreszenzsignal von AQP4 und Syntrophin. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits bekannten Studien über die AQP4- und Syntrophin-Expression in der Retina der Ratte überein [54].

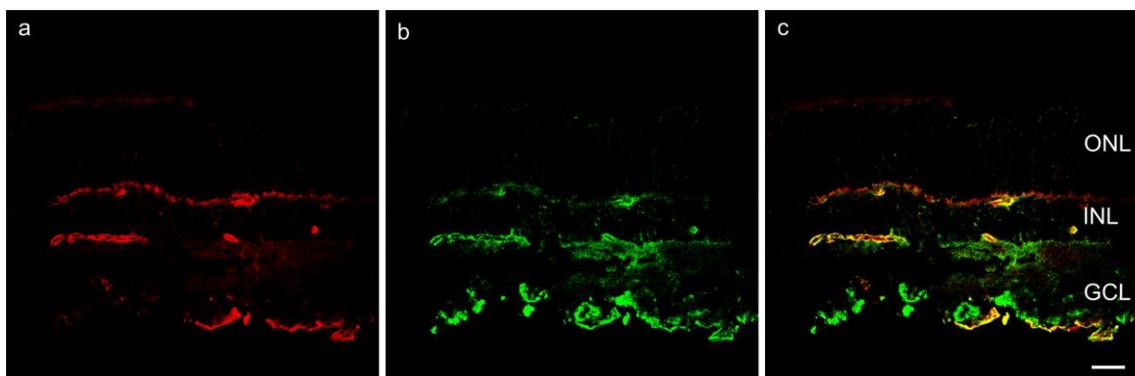


Abbildung 5 – Immunhistochemische Analyse der AQP4- (grün) und Syntrophin-Expression (rot) und deren Kolokalisation in der *Retina* der Ratte (p31). Das Pigmentepithel ist nach oben orientiert. (a) Syntrophin-Expression in der inneren Grenzschicht und perivaskulär in der äußeren plexiformen und inneren nukleären Schicht (INL). (b) AQP4-Expression sowohl in der inneren Grenzschicht als auch in der äußeren plexiformen und inneren nukleären Schicht (INL). (c) Fusionsbild aus (a) und (b) mit Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin perivaskulär in der inneren plexiformen und inneren Grenzschicht. (ONL, äußere nukleäre Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; GCL, Ganglienzellschicht). (Maßstab 20 µm)

3.2 mRNA-Analyse der Komponenten des DAPK's

3.2.1 Qualitative RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten

3.2.1.1 – des *Ductus cochlearis* der funktionell adulten Ratte (p31)

Die RNA der intrazellulären Komponenten des DAPKs (Aquaporin-4, α_1 -Syntrophin, Dystrophin und α - und β -Dystrobrevin) konnte in den Zellen des DCs der Ratte nachgewiesen werden (Abbildung 6). Weiter führte die RT-PCR Analyse der transmembranären (α - und β -Dystroglykan) und der extrazellulären Komponenten des DAPKs (Agrin und der α_3 -, β_1 -, β_2 - und γ_1 - Laminin-Ketten) ebenfalls zu einer deutlichen PCR-Bande. Die obengenannten Laminin-Ketten wurden zum Nachweis ausgesucht um die mögliche Expression aller bekannten Laminin-Isoformen abzudecken. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass im Gewebe des DCs die RNA aller untersuchten DAPK-Komponenten exprimiert wird.

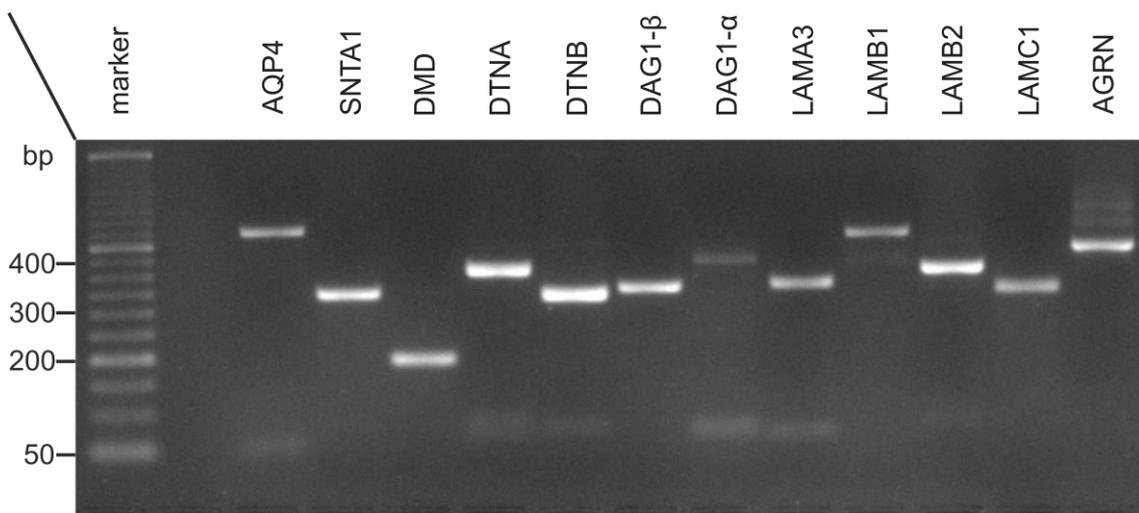


Abbildung 6 – RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten des *Ductus cochlearis* der funktionell adulten Ratte (p31). Die mRNA-Sequenzabschnitte aller untersuchten DAPK-Komponenten konnten im DC nachgewiesen werden. Intrazellulär: SNTA1, Syntrophin, alpha 1; DMD, Dystrophin; DTNA, Dystrobrevin, alpha; DTNB, Dystrobrevin, beta, transmembranär: AQP4, Aquaporin-4; DAG1- β , Dystroglykan, beta, extrazellulär: DAG1- α Dystroglykan, alpha; LAMA3, Laminin, alpha 3; LAMB1, Laminin, beta 1; LAMB2, Laminin, beta 2, LAMC1, Laminin, gamma 1; AGRN, Agrin).

3.2.1.2 – des Kontrollgewebes, der Retina der funktionell adulten Ratte (p31)

Im Kontrollgewebe, der *Retina* der Ratte, konnte eine RNA-Expression in allen untersuchten Komponenten des DAPKs in Analogie zur immunhistochemischen Analyse in Kapitel 3.1.2 nachgewiesen werden (Abbildung 7).

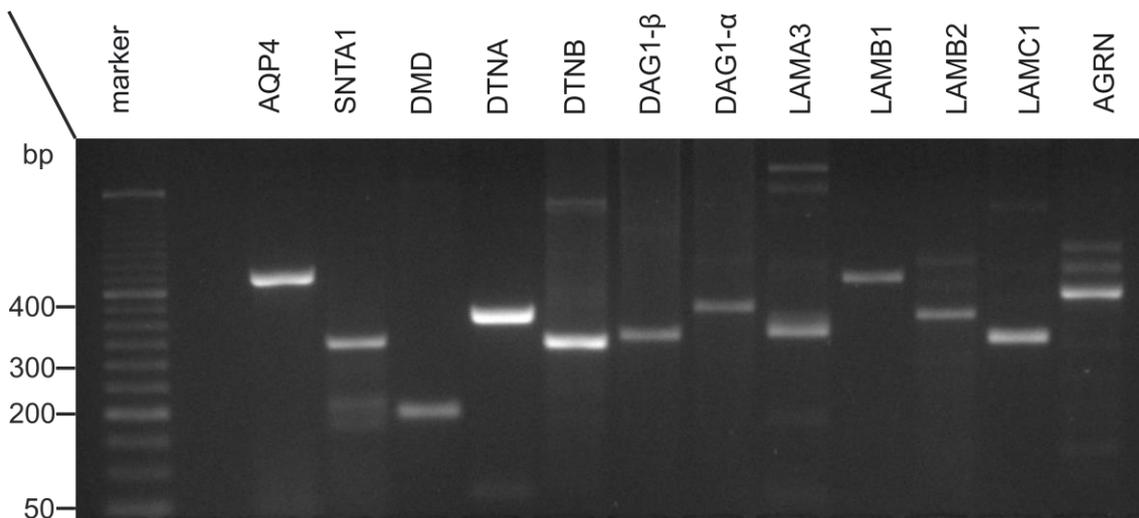


Abbildung 7 – RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten der *Retina* der Ratte (p31). In der *Retina* der Ratte konnten die mRNA-Sequenzabschnitte aller untersuchten DAPK-Komponenten nachgewiesen werden. *Intrazellulär*: SNTA1, Syntrophin, alpha 1; DMD, Dystrophin; DTNA, Dystrobrevin, alpha; DTNB, Dystrobrevin, beta, *transmembranär*: AQP4, Aquaporin-4; DAG1-β, Dystroglykan, beta, *extrazellulär*: DAG1-α Dystroglykan, alpha; LAMA3, Laminin, alpha 3; LAMB1, Laminin, beta 1; LAMB2, Laminin, beta 2, LAMC1, Laminin, gamma 1; AGRN, Agrin).

3.2.2 Qualitative Taq-Man® Real-Time PCR Analyse der DAPK-Komponenten

3.2.2.1 – des humanen *Ductus cochlearis*

Die Taq-Man® Real-Time PCR Analyse des humanen *DC*-Gewebes zeigte die qualitative mRNA Expression der intrazellulären (Dystrophin, α_1 -Syntrophin, α - und β -Dystrobrevin), transmembranären (Aquaporin-4, α - und β -Dystroglykan) und extrazellulären (Agrin und der α_3 -, β_1 -, γ_1 - Lamininketten) Komponenten des DAPKs (Abbildung 8). Wieder wurden diese Lamininketten ausgesucht um möglichst alle bekannten Laminin-Isoformen detektieren zu können.

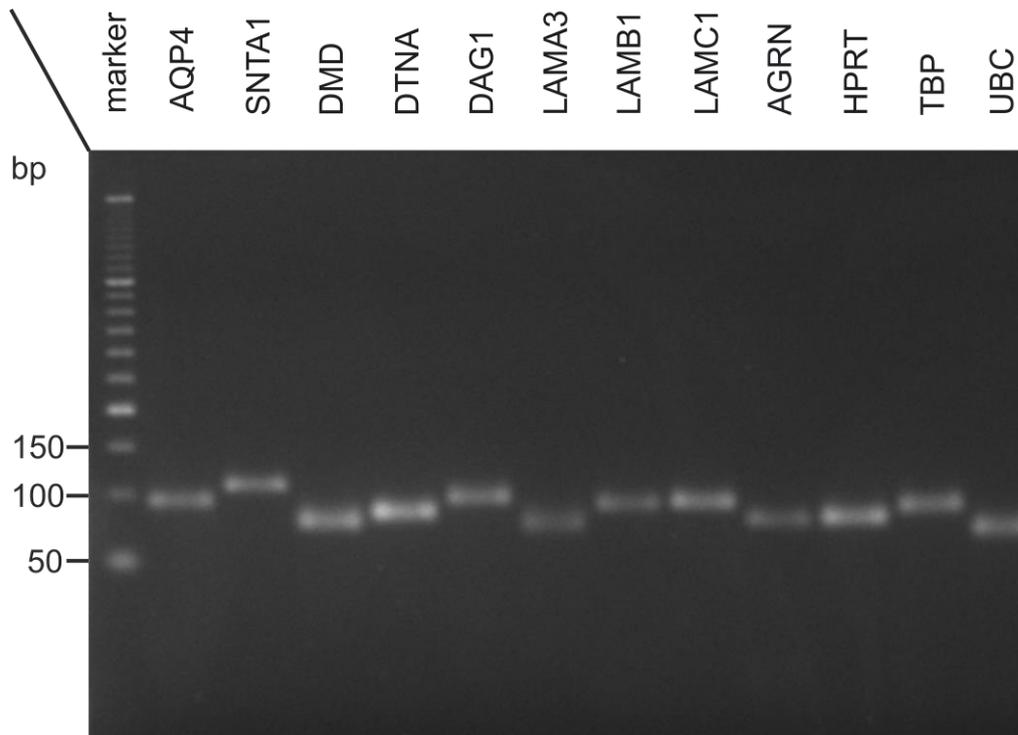


Abbildung 8 – Taq-Man® RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten des humanen DCs. Die mRNA-Sequenzen aller untersuchten Gene der DAPK-Komponenten konnten im humanen *Ductus cochlearis* nachgewiesen werden. Untersuchte DAPK-Komponenten von intra- nach extrazellulär: (AQP4, Aquaporin-4; SNTA1, Syntrophin, alpha 1; DMD; DTNA: α -Dystrobrevin; Dystrophin; DAG1, Dystroglykan, 1; LAMA3, Laminin, alpha 3; LAMB1, Laminin, beta 1; LAMC1, Laminin, gamma 1; AGRN, Agrin; HPRT, Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase; TBP, TATA Box Binding Protein; UBC, Ubiquitin C).

3.2.2.2 – des Kontrollgewebes, der humanen Retina

Gewebe der humanen *Retina* dienten bei dieser Studie als Kontrolle (Abbildung 9). Mit Hilfe der Taq-Man® RT-PCR Analyse konnte die qualitative mRNA-Expression aller untersuchten Komponenten des DAPK in den Zellen der humanen *Retina* festgestellt werden.

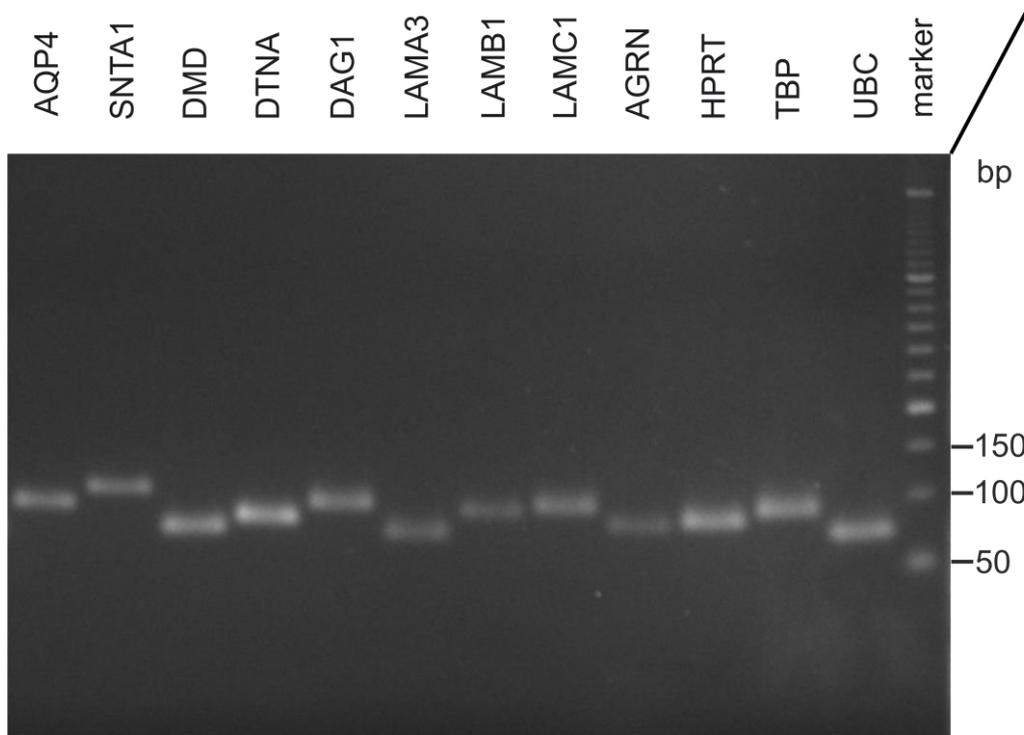


Abbildung 9 – Taq-Man® RT-PCR Analyse der DAPK-Komponenten der humanen *Retina*. In der humanen *Retina* konnte die mRNA-sequenzabschnitte aller untersuchten DAPK-Komponenten nachgewiesen werden. Untersuchte DAPK-Komponenten von intra- nach extrazellulär: (AQP4, Aquaporin-4; SNTA1, Syntrophin, alpha 1; DMD, Dystrophin; DAG1, Dystroglykan, 1; LAMA3, Laminin, alpha 3; LAMB1, Laminin, beta 1; LAMC1, Laminin, gamma 1; AGRN, Agrin; HPRT, Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase; TBP, TATA Box Binding Protein; UBC, Ubiquitin C).

3.3 Subzelluläre Lokalisation einzelner Komponenten des DAPK's

Zur Identifizierung des membranären Verankerungsmechanismus von AQP4 über die Komponenten des DAPKs im *DC* der Ratte wurden die subzelluläre Expression des direkten AQP4-Ankermoleküls Syntrophin, dessen intrazellulärer Bindungspartner Dystrophin, das transmembranäre β -Dystroglykan, sowie das extrazelluläre Laminin immunhistochemisch an Gefrierschnitten untersucht.

3.3.1 – in den epithelialen Stützzellen im *Ductus cochlearis* der funktionell adulten Ratte (p31)

Die Beschreibung der subzellulären Expression der einzelnen Komponenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes folgt dem gleichen Schema und be-

ginnt bei den Interdentalzellen, die am weitesten medial innerhalb des midmediolaren Schnitts durch den *DC* liegen, und endet bei den Wurzelfortsätzen der äußeren Sulkuszellen, die sich am weitesten lateral befinden. Zur einfacheren Orientierung (an Abbildung 2 und 18 sowie Tabelle 4) werden zu Beginn jedes der folgenden Unterkapitel die Abkürzungen der Zellen des *DCs* genannt. Am Ende dieser ist eine Zusammenfassung der subzellulären DAPK-Expression im *DC* der Ratte in Tabelle 4 aufgeführt.

3.3.1.2 Die subzelluläre Lokalisation des membranären AQP4-Anker-moleküls, Syntrophin, im Ductus cochlearis der Ratte

Im medialen Abschnitt des *DCs* zeigten die Zellmembranen der Interdentalzellen (IDZs) für Syntrophin ein basolaterales Immunfluoreszenzsignal (Abbildung 10).

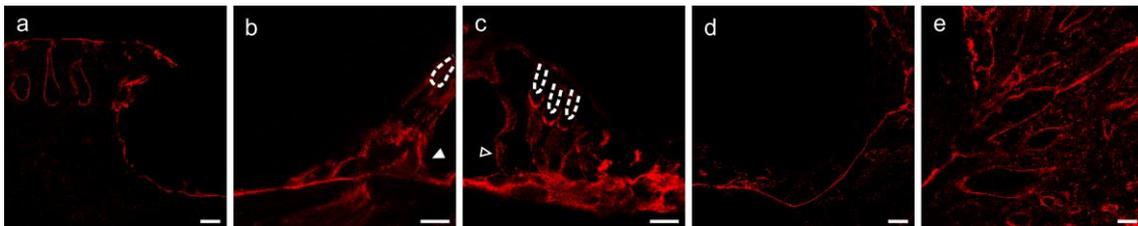


Abbildung 10 – Immunhistochemische Analyse mit konfokaler (cLSM) Aufnahme der subzellulären Expression von Syntrophin im *DC* der Ratte (p31). (a) Basolaterale Syntrophin-Expression in den IDZs und basale Syntrophin-Expression in den ISZs-med. (b) Zu erkennen ist eine basolaterale Expression von Syntrophin in den ISZs-lat., der IPhZ und der IPZ (gefüllter Pfeilkopf). Die IHZ wies kein Syntrophin-Signal auf. (c) zeigt das basolaterale Syntrophin-Immunfluoreszenzsignal in der ÄPZ (hohler Pfeilkopf), den DZs und den HZs. Die ÄHZs zeigten keine spezifische Syntrophin-Expression. In (d) ist die Syntrophin-Expression am basalen Zellpol der CZs zu erkennen. Die Wurzelfortsätze der ÄSZs zeigen in (e) eine basolaterale Syntrophin-Expression. (Maßstab 10 µm)

Weiter entlang des medialen Abschnitts des inneren Sulkus zeigten die inneren Sulkuszellen (ISZs-med.) hingegen eine basale Immunfluoreszenzmarkierung für Syntrophin. Es konnte sowohl bei den inneren Grenzzellen (ISZs-lat.) als auch bei der inneren Phalangenzelle (IPhZ) im Corti-Organ eine basolaterale Syntrophin-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wies die innere Haarsinneszelle (IHZ) keine Syntrophin-Expression auf. Die innere Pfeilerzelle (IPZ) und äußere Pfeilerzelle (ÄPZ) zeigten jeweils eine basolaterale Expression von Syntrophin. Im lateralen Abschnitt des Corti-Organs konnte bei allen drei Deiterszellen (DZs), eine basolaterale Immunfluoreszenzmarkierung für Syntrophin identifiziert werden. Besonders eindrücklich zeigte sich dies entlang des

Zellmembranabschnitts der Deiterszellen, der den basalen Pol der äußeren Haarsinneszellen (ÄHZs) umgibt. Im Gegensatz zu den Deiterszellen, konnte in den äußeren Haarsinneszellen kein positives Immunfluoreszenzsignal für Syntrophin detektiert werden. Die am lateralen Grenzbereich des Corti-Organs liegenden Hensenzellen (HZs) wiesen in ihren Zellmembranen eine basolaterale Syntrophin-Expression auf. Weiter im äußeren Sulkus konnte in den Zellmembranen der Claudiuszellen (CZs) ein basales und in den Zellmembranen der äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) entlang deren Wurzelfortsätze ein basolaterales Immunfluoreszenzsignal für Syntrophin detektiert werden.

3.3.1.3 Die subzelluläre Lokalisation der intrazellulären Dystrophine im Ductus cochlearis der Ratte

Bei der Immunhistochemische Analyse der Dystrophin-Expression konnte im medialen Bereich des DCs in den Interdentalzellen (IDZs), den inneren Sulkuszellen (ISZs-med.) und den inneren Grenzzellen (ISZs-lat.) ein zytoplasmatisches Immunfluoreszenzsignal erkannt werden (Abbildung 11). Es zeigte sich weiter eine zytoplasmatische Dystrophin-Expression in allen Zellen des Corti-Organs, konkret in der/den inneren Phalangenzelle (IPhZ), inneren Haarsinneszelle (IHZ), inneren Pfeilerzelle (IPZ), äußeren Pfeilerzelle (ÄPZ), äußeren Haarsinneszellen (ÄHZs) und Deiterszellen (DZs). Die zytoplasmatische Dystrophin-Expression setzte sich in den Zellen des äußeren Sulkus fort, konkret in den Hensenzellen (HZs), den Claudiuszellen (CZs) und den äußeren Sulkuszellen (ÄSZs).

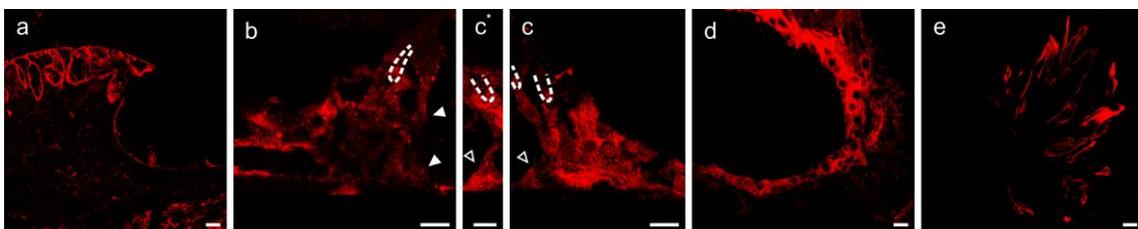


Abbildung 11 – Subzelluläre immunhistochemische Auswertung der Dystrophin-Expression im DC der Ratte (p31). (a) Dystrophin-Expression zytoplasmatisch in den IDZs und in den ISZs-med. (b) Zytoplasmatische Expression von Dystrophin in den ISZs-lat., der IPhZ, der IHZ und der IPZ (gefüllte Pfeilköpfe). (c) – (c*) Zytoplasmatische Markierung von Dystrophin im lateralen Abschnitt des Corti-Organs: ÄPZ (hohle Pfeilköpfe), den DZs, der ÄHZs und den HZs. (d) zeigt eine Dystrophin-Markierung am basalen Zellmembranabschnitt der CZs. (e) Zytoplasmatische Dystrophin-Expression der Wurzelfortsätze der ÄSZs. (Maßstab 10 µm)

3.3.1.4 Die subzelluläre Lokalisation des transmembranären β -Dystroglykans im Ductus cochlearis der Ratte

Beginnend im Bereich des inneren Sulkus zeigten die Interdentalzellen (IDZs) eine basolaterale und die inneren Sulkuszellen (ISZs-med.) eine basale Immunfluoreszenzmarkierung für β -Dystroglykan in ihren Zellmembranen (Abbildung 12). Am medialen Abschnitt des Corti-Organs zeigten die inneren Grenzzellen (ISZs-lat.), die innere Phalangenzelle (IPhZ) und die innere Pfeilerzelle (IPZ) eine basolaterale β -Dystroglykan-Expression. Die innere Haarsinneszelle (IHZ) hingegen zeigte kein spezifisches Signal für β -Dystroglykan. Weiter konnte im lateralen Abschnitt des Corti-Organs in den drei Deiterszellen (DZs), der äußeren Pfeilerzelle (ÄPZ) und den Hensenzellen (HZs) eine basolaterale β -Dystroglykan-Expression identifiziert werden. In den drei äußeren Haarsinneszellen (ÄHZs) konnte, analog zu den inneren Haarsinneszellen kein spezifisches Signal für β -Dystroglykan erkannt werden. Zusätzlich war am basalen Pol des inneren Tunnels ein Signal in der β -Dystroglykan-Immunfluoreszenzmarkierung zu erkennen, welches medial an der inneren Pfeilerzelle (IPZ) begann und an der äußeren Pfeilerzelle (ÄPZ) endete. Im äußeren Sulkus des DCs zeigten die Claudiuszellen (CZs) eine basale und die äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) eine basolaterale β -Dystroglykan-Expression, die sich ebenfalls in den basolateralen Zellmembranen ihrer Wurzelfortsätze fand.

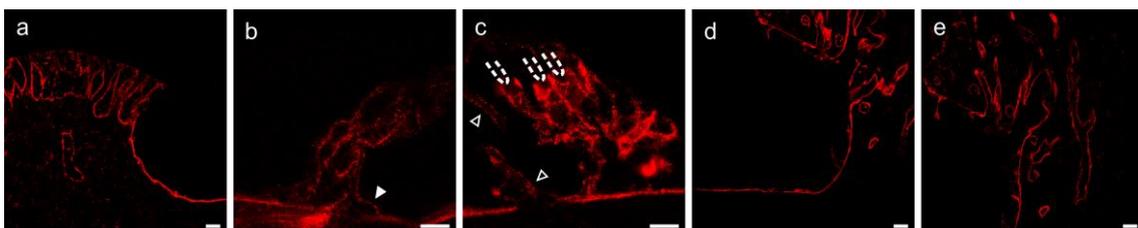


Abbildung 12 – β -Dystroglykan-Expression und dessen subzelluläre Lokalisation im DC der funktionell adulten Ratte (p31). (a) Basolaterales β -Dystroglykan-Signal in den IDZs und basales in den ISZs-med. (b) zeigt den medialen Abschnitt des Corti-Organs und einer basolateralen β -Dystroglykan-Expression der ISZs-lat., der IPhZ und der IPZ (gefüllter Pfeilkopf). In der IHZ konnte keine Expression von β -Dystroglykan detektiert werden. (c) Zu sehen ist der laterale Abschnitt des Corti-Organs mit basolateraler β -Dystroglykan-Expression der ÄPZ (hohle Pfeilköpfe), der DZs und der HZs. In (d) ist die basale β -Dystroglykan-Expression der CZs zu erkennen und in (e) das basolaterale β -Dystroglykan-Signal in den Wurzelfortsätzen der ÄSZs. (Maßstab 10 μ m)

3.3.1.5 Die subzelluläre Expression des extrazellulären Laminins im *Ductus cochlearis* der Ratte

Bei der immunhistochemischen Analyse von Laminin im *DC* der Ratte zeigte sich eine ubiquitäre Lokalisation der Mitglieder der extrazellulären Matrixmolekülfamilie in der Basallamina der epithelialen Stützzellen (Abbildung 13). Im medialen Abschnitt des *DCs* konnte bei den Interdentalzellen (IDZs) darüber hinaus eine Laminin-Expression um die basolateralen Membranen nachgewiesen werden. Diese immunhistochemische Markierung für Laminin zeigte sich ebenfalls um die basolateralen Membranen der Wurzelfortsätze der äußeren Sulkuszellen (ÄSZs).

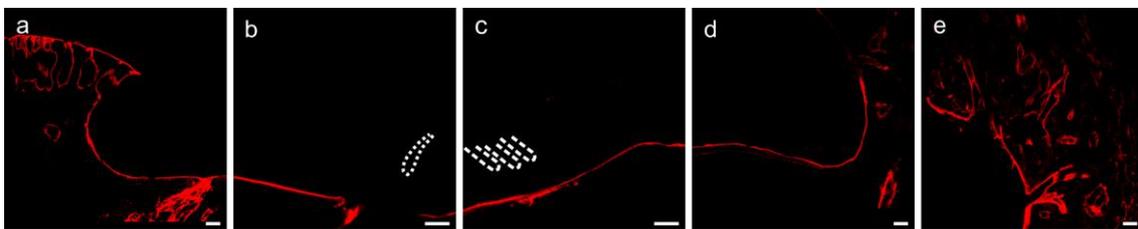


Abbildung 13 – Immunhistochemische Analyse und konfokale (cLSM) Aufnahme der Laminin-Expression im *DC* der funktionell adulten Ratte (p31). Ubiquitäre Laminin-Lokalisation in der Basallamina der epithelialen Stützzellen: Zu sehen in (a) den IDZs und den ISZs-med., in (b) den ISZs-lat., der IPHZ- und IPZ, in (c) der/den ÄPZ, DZs, und HZs und in (d) den CZs, ÄSZs und deren Wurzelfortsätzen (e). (Maßstab 10 µm)

3.3.1.6 Zusammenfassung der subzellulären Expression von AQP4 und der DAPK-Komponenten im *DC* der Ratte

Zusammenfassend findet sich die Expression aller Mitglieder des DAPKs in allen AQP4-exprimierenden Stützzellen des *Ductus cochlearis* (Tabelle 4). Die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Komponenten deckt sich mit der Beschreibung in den Gliazellen und den Müllerzellen: Syntrophin als unmittelbares AQP4-Ankerprotein von intrazellulär, weiter intrazellulär Dystrophin, membranüberspannend β -Dystroglykan und extrazellulär Laminin. Auch in den Stützzellen des Corti-Organs, in dem keine AQP4-Expression festgestellt werden konnte, konnte die durchgehende Expression aller Komponenten des DAPKs in ihrer subzellulären Verteilung nachgewiesen werden. Darüber hinaus exprimierten die inneren und äußeren Haarsinneszellen Dystrophin intrazellulär bei fehlender Lokalisation von AQP4.

Tabelle 4 – Zusammenfassung der subzellulären Expression von AQP4 und der DAPK-Komponenten im *Ductus cochlearis* der Ratte.

	Membran Domäne	IDZ	ISZ-med.	ISZ-lat.	IPhZ	IHZ	IPZ	ÄPZ	ÄHZ	DZ	HZ	CZ	ÄSZ
AQP4	basal	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	lateral	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Syn	basal	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	lateral	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
β-Dg	basal	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	lateral	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Dys	intra-zellulär	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lam	extra-zellulär	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

3.3.2 – im Kontrollgewebe, Retina der funktionell adulten Ratte (p31)
Retinagewebe aus der adulten Ratte (p31) wurde für diese Studie als Kontrollgewebe verwendet (Abbildung 14). In der inneren nukleären und äußeren plexiformen Schicht zeigte sich vor allem eine perivaskuläre Expression aller untersuchter Komponenten des DAPKs (Syntrophin, Dystrophin, β-Dystroglykan und Laminin). Weiter ist ein spezifisches Immunfluoreszenzsignal aller Komponenten des DAPKs in der inneren Grenzsicht zu erkennen. Zusätzlich konnte eine Dystrophin-Expression im Bereich der Fotorezeptoren nachgewiesen werden. Die hier gefundenen Ergebnisse stimmen mit früheren Studien über die Expression von Syntrophin, Dystrophin, β-Dystroglykan und Laminin in der Retina der Ratte überein.

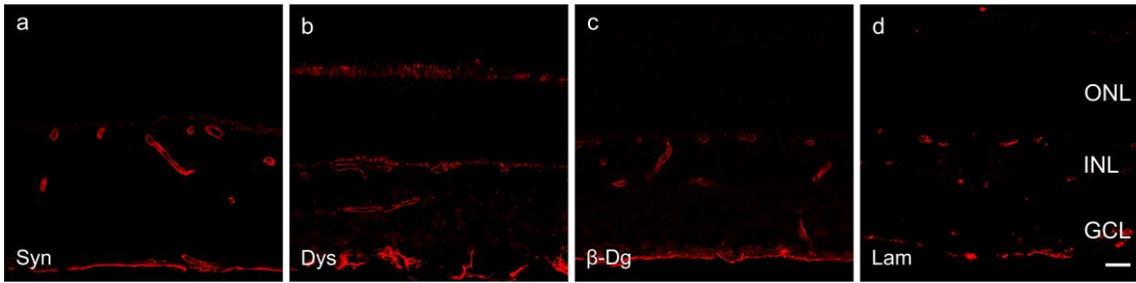


Abbildung 14 – Immunhistochemische Analyse und konfokale (cLSM) Aufnahme einzelner Komponenten des DAPKs in der Retina der Ratte (p31). Dargestellt sind die Immunfluoreszenzsignale der jeweiligen Komponenten des DAPKs (rot). (a – d) Im Bereich der inneren nukleären (INL) und äußeren plexiformen Schicht und in der inneren Grenzschrift, die hinter der Ganglienzellschicht (GCL) lokalisiert ist, zeigt sich vor allem perivaskulär eine deutliche Expression aller untersuchter DAPK-Komponenten: (a) Syntrophin, (b) Dystrophin, (c) β -Dystroglykan und (d) Laminin. In (b) ist die Dystrophin-Expression im Bereich der Fotorezeptoren zu erkennen. (d) Die immunhistochemische Analyse von Laminin zeigte ein positives perivaskulär lokalisiertes Signal zwischen der inneren nukleären (INL) und äußeren nukleären (ONL) Schicht, sowie in der inneren Grenzschrift. (Maßstab 20 μ m).

3.3.3 – im humanen *Ductus cochlearis*

3.3.3.1 Die zelluläre Lokalisation des membranären AQP4-Ankermoleküls, Syntrophin im humanen *Ductus cochlearis*

Im postmortal gewonnenen humanen DC konnte in den Interdentalzellen (IDZs) eine Syntrophin-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 15).

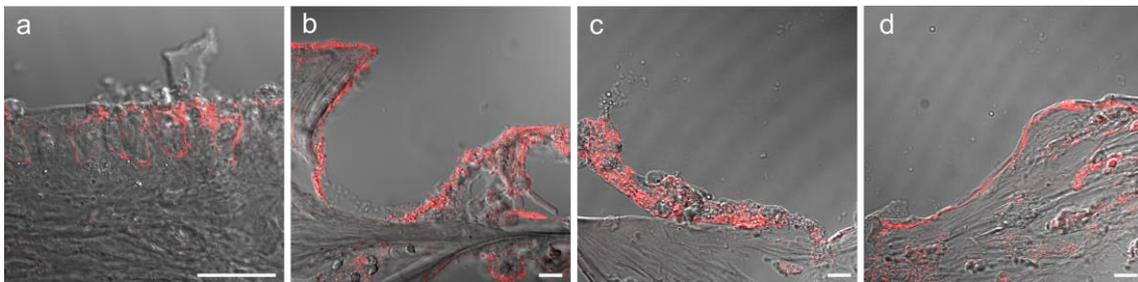


Abbildung 15 – Immunhistochemische Analyse der Syntrophin-Expression des humanen DCs. (a) Syntrophin-Expression in den IDZs. (b) Zu erkennen ist eine Expression von Syntrophin in den ISZs-med. bis zu den ISZs-lat. Corti-Organ mediale Hälfte: Positive Syntrophin-Expression in den IPhZ und IPZ. Keine Syntrophin-Expression in der IHZ (c) Corti-Organ laterale Hälfte und angrenzende Stützzellen: Positive Syntrophin-Expression in der ÄPZ, in den DZs, HZs und CZs. In den ÄHZs konnte keine Syntrophin-Expression identifiziert werden. (d) Dargestellt ist die positive Syntrophin-Expression der ÄSZs in ihren Wurzelfortsätzen. (Maßstab 10 μ m)

In den inneren Sulkuszellen (ISZs-med.) bis hin zu den inneren Grenzzellen (ISZs-lat.) konnte eine Syntrophin-Expression detektiert werden. Im Corti-Organ konnte in dessen medialen Stützzellen, innere Phalangen- (IPhZ) und innere

Pfeilerzelle (IPZ), ein positives Syntrophin-Immunfluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Analyse der Stützzellen der lateralen Hälfte des Corti-Organs, äußere Pfeilerzelle (ÄPZ) und den Deiterszellen (DZs), zeigte ein positives Syntrophin-Signal. Weiter ließ sich in der inneren Haarsinneszelle (IHZ) und den äußeren Haarsinneszellen (ÄHZs) keine Syntrophin-Expression nachweisen. An der lateralen Grenze des Corti-Organs konnte in den Hensenzellen (HZs) eine Syntrophin-Expression nachgewiesen werden. Entlang des äußeren Sulkus konnte in der immunhistochemischen cLSM-Aufnahme ein positives Signal für Syntrophin beobachtet werden.

3.3.3.2 Die zelluläre Lokalisation von AQP4 im humanen Ductus cochlearis

Die Interdentalzellen (IDZs) im postmortal gewonnenen humanen *DC* wiesen ein positives AQP4-Immunfluoreszenzsignal auf (Abbildung 16).

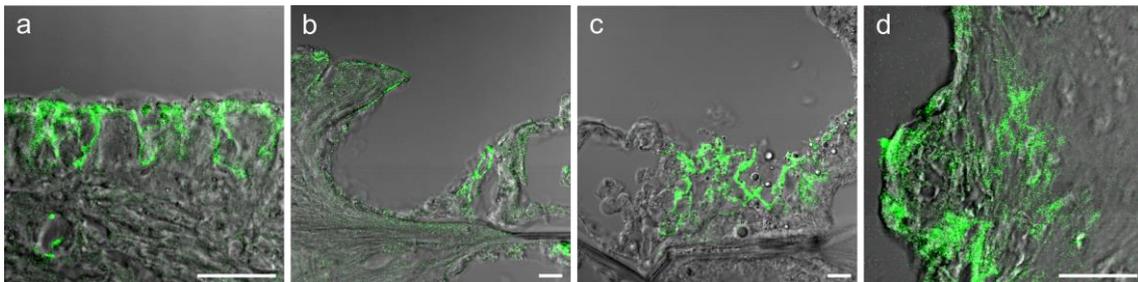


Abbildung 16 – AQP4-Expression entlang des humanen *DCs*. (a) AQP4-Expression in den IDZs. (b) zeigt ein AQP4-Signal in den ISZs-med. und den ISZs-lat. Die IHZ und die epithelialen Stützzellen des medialen Abschnitts des Corti-Organs, IPhZ und IPZ, zeigten kein spezifisches AQP4-Signal (c) Im lateralen Abschnitt des Corti-Organs zeigten dessen Stützzellen, ÄPZ und DZs, und die ÄHZs kein positives AQP4-Signal. Zu erkennen war eine AQP4-Expression in den HZs und CZs. (d) Dargestellt ist die AQP4-Expression in den Wurzelfortsätzen der ÄSZ. (Maßstab 10 µm)

Entlang der medialen Hälfte des *DCs* zeigten sich die inneren Sulkus- (ISZs-med.) und die inneren Grenzzellen (ISZs-lat.) ebenfalls positiv in der AQP4-Immunfluoreszenzmarkierung. An der Grenze zwischen Corti-Organ und dem lateralen Abschnitt des *DCs* konnte in den Hensenzellen (HZs) und den Claudiuszellen (CZs) eine AQP4-Expression beobachtet werden. In allen Stützzellen des Corti-Organs, sowie in den Haarsinneszellen konnte keine AQP4-Expression nachgewiesen werden. Weiter lateral im *DC* zeigten die Wurzelfortsätze der

äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) in ihren Zellmembranen ein positives AQP4-Immunfluoreszenzsignal.

3.3.3.3 Die zelluläre Kolokalisation von Syntrophin und Aquaporin-4 im humanen Ductus cochlearis

Bei der immunhistochemischen Doppelmarkierung von Syntrophin und Aquaporin-4 im humanen DC zeigte sich diese in den Interdentalzellen (IDZs), siehe Abbildung 17. Entlang des medialen Abschnitts des inneren Sulkus konnte in den inneren Sulkus- (ISZs-med.) und in den inneren Grenzzellen (ISZs-lat.) eine Kolokalisation von Syntrophin und AQP4 nachgewiesen werden. Die lateral an das Corti-Organ angrenzenden Hensenzellen (HZs) zeigten, sowie einige Claudiuszellen (CZs), ebenfalls in der Doppelmarkierung eine Kolokalisation. In den epithelialen Stützzellen des Corti-Organs konnte nur Syntrophin identifiziert werden, wobei AQP4 nicht nachgewiesen werden konnte. Beide Haarsinneszelltypen zeigten keine Syntrophin- oder AQP4-Expression. Im lateralen Abschnitt des DCs zeigte sich in der Doppelmarkierung in den äußeren Sulkuszellen (ÄSZs) eine Kolokalisation von Syntrophin und AQP4.

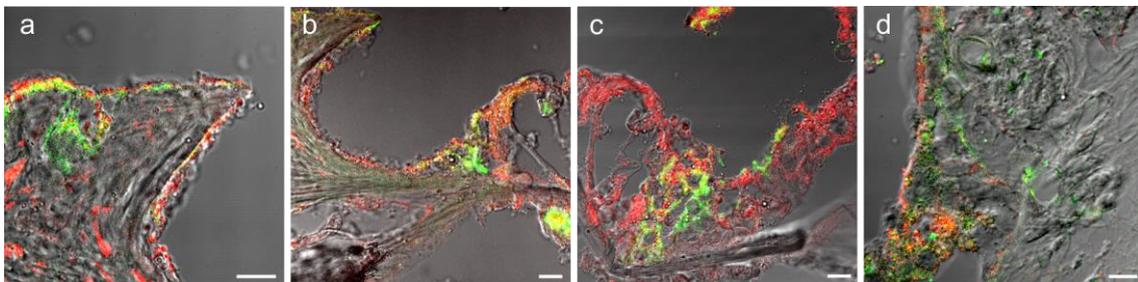


Abbildung 17– Kolokalisation von Syntrophin (rot) und Aquaporin-4 (grün) im humanen DC. (a) Zu erkennen ist eine Koimmunfluoreszenz in den IDZs. (b) zeigt die Kolokalisation von AQP4 und Syntrophin in den ISZs-med. und ISZs-lat. (c) In den lateral an das Corti-Organ grenzenden HZs und CZs konnte ein gemeinsames Immunfluoreszenzsignal von Syntrophin und AQP4 identifiziert werden. In den Zellen des Corti-Organs an sich konnte nur Syntrophin, nicht aber AQP4, nachgewiesen werden. (d) Dargestellt ist die Koimmunfluoreszenz von Syntrophin und AQP4 in vereinzelt Membranabschnitten der ÄSZs. (Maßstab 10 µm)

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es eine DAPK abhängige Verankerung von AQP4 in den Stützzellen des *Ductus cochlearis* in Analogie zu den Müllerzellen der *Retina* zu untersuchen, die ohne diesen Verankerungsmechanismus keine polare AQP4-Verteilung entlang ihrer Zellmembranen generieren können [54]. Die RT-PCR (Abbildung 6 und 7) beziehungsweise TaqMan® PCR Analyse (Abbildung 8 und 9) der mRNA des *Ductus cochlearis* der Ratte und des Menschen zeigten eine Expression aller DAPK-Komponenten im *Ductus cochlearis* und dem Kontrollgewebe *Retina*. In weiteren immunhistochemischen Analysen konnte die Kollokalisierung von AQP4 und Syntrophin, als direkter Verankerungspartner des DAPKs, im *DC* des Menschen und der Ratte gezeigt werden (Abbildung 4 und 17). Zusätzlich konnte eine distinkte Verteilung weiterer membranüberspannender DAPK-Proteine in den epithelialen Stützzellen des *Ductus cochlearis* der Ratte gezeigt werden, was die Hypothese einer Verankerung von AQP4 über den DAPK im *Ductus cochlearis* weiter bestärkt (Abbildung 10 bis 13).

4.1 Die subzelluläre Kollokalisierung von AQP4 und Syntrophin in den epithelialen Stützzellen des *DCs* der Ratte – Funktionelle Bedeutung für die Verankerung von AQP4

Die immunhistochemischen Ergebnisse zur subzellulären Kollokalisierung von AQP4 und Syntrophin im Stützzellepithel des *DCs* der vorliegenden Arbeit belegen, dass beide Proteine in der basalen (innere Sulkus- und Claudiuszellen), beziehungsweise der basolateralen Membrandomäne (Interdental-, innere Grenz-, Hensen-, und äußere Sulkuszellen) der epithelialen Stützzellen des *DCs* außerhalb des Corti-Organs kollokalisiert sind. Die Ergebnisse früherer Studien zur Expression von AQP4 in der Cochlea [5-8, 11, 12] konnten somit detailliert um die Erkenntnis einer subzellulären Kollokalisierung von AQP4 und Syntrophin sowie um die Expression von Syntrophin im Stützzellepithel des gesamten *Ductus cochlearis*, inklusive der Stützzellen des Corti-Organs, erweitert werden. Der verwendete Syntrophin-Antikörper detektiert Syntrophin-Isoformen aus der α - und β -Familie. Die mRNA-Analyse am *DC*-Gewebe der Ratte führte zu einem α_1 -

Syntrophin-Transkript, so dass eine Expression des α_1 -Syntrophin-Proteins in den epithelialen Stützzellen des *DCs* sehr wahrscheinlich ist.

Folgend sollen diese Ergebnisse der Hypothese einer möglichen membranären Verankerung von Aquaporin-4 mit dem DAPK über Syntrophin in den Stützzellen des *DCs* diskutiert werden: Im ZNS und der Retina erfolgt die Verankerung von AQP4 über Syntrophin polar in den Endfußmembranen der Astrozyten beziehungsweise den basolateralen Membrandomänen der Müllerzellen [52, 53]. Dies konnte auch durch transmissionselektronenmikroskopische Immungoldstudien im ZNS und in der Retina von α_1 -Syntrophin-knock-out-Mäusen gezeigt werden, wobei das Fehlen von α_1 -Syntrophin zu einem Verlust der polaren Expression von AQP4 in den Membranen dieser Zellen führte [31, 54]. Immunpräzipitationsstudien in ZNS-Gewebe der Maus zeigten dort weiter eine Verbindung der beiden Proteine AQP4 und Syntrophin. Dieser direkte Nachweis einer Assoziation von AQP4 und Syntrophin im *DC* der Ratte konnte methodisch nicht erbracht werden, da aufgrund der wenigen AQP4- und Syntrophin-exprimierenden Stützzellen im *DC* der Ratte viel Gewebe und eine unverhältnismäßig hohe Anzahl an Tieren benötigt werden würde.

Der Nachweis von α_1 -Syntrophin wirft die Frage nach seiner funktionellen Relevanz im *DC* als unmittelbarer Bindungspartner von AQP4 mit dem DAPK und dem Hörorgan als Gesamtsystem auf. Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an Syntrophin-knock-out-Mäusen könnten eine Antwort auf die Frage geben, ob die strikt basale AQP4-Expression in den inneren Sulkuszellen und den Claudiuszellen über den DAPK vermittelt wird, der als polarisations-generierender Mechanismus aus dem ZNS und der Retina bekannt ist [26, 30-32, 54, 102, 103]. α_1 -Syntrophin-depletierte Mäuse könnten im Rahmen von Hörmessungen eine erste Aussage über die funktionelle Relevanz von α_1 -Syntrophin im *DC* liefern.

4.2 Die Expression der einzelnen DAPK-Mitglieder in den epithelialen Stützzellen des DCs der Ratte – weitere Hinweise für eine Verankerung von AQP4 über den DAPK.

4.2.1 Die Dystrophin-Expression im DC der Ratte

In der immunhistochemischen Analyse zeigte sich für Dystrophin im DC der Ratte ein durchgehend zytoplasmatisches Signal in den Haarsinneszellen und den Stützzellen des Corti-Organs (äußere Pfeilerzelle, innere Pfeilerzelle, innere Phalangenzelle und Deiterszellen) sowie denen des DCs (Hensen-, innere Grenz-, Claudius-, innere Sulkus-, äußere Sulkus-, und Interdentalzellen), siehe Abbildung 11. In der mRNA-Analyse konnte die Expression der Dystrophinisoform Dp71 nachgewiesen werden. Kombiniert mit Expressionsdaten der Dystrophinfamilie aus früheren Studien am DC des Meerschweinchens, Dp427 und Dp116-Expression in der inneren Haarsinneszelle und den äußeren Haarsinneszellen, kann aus dem mRNA-Nachweis von Dp71 und der immunhistochemischen pan-Dystrophin-Analyse auf eine hohe Beteiligung der Dp71-Isoform in den Stützzellen des DCs und des Corti-Organs geschlossen werden [38]. Somit konnten bisherige Ergebnisse über die Expression der Dystrophine auf den DC der Ratte übertragen werden und um die Erkenntnis über die Expression in den Stützzellen des Corti-Organs und des DCs der Ratte erweitert werden. Dp71 steht im DC als Mitglied einer DAPK-Komposition, die nachweislich AQP4 im ZNS polar verankert [55, 104], zur Verfügung.

Interessanterweise konnte bei der Messung akustischer Hirnstammpotenziale (brainstem auditory evoked potentials - BAEPs) in einer Studie an Dp427 depletierten mdx-Mäusen nach mehrwöchiger Schalleexposition eine Erhöhung der Hörschwelle beobachtet werden, deren Ursache unter anderem in einem cochleären Schaden, genauer der Haarsinneszellen, vermutet wurde. Eine Begründung dieser erhöhten Vulnerabilität wurde bei den mdx-Mäusen in mechanischen Mikroläsionen der Haarsinneszellen vermutet, die zusätzlich zu einer erhöhten Kalziumaufnahme durch eine Permeabilitätsstörung der Zellmembran führen soll [35, 105, 106]. Eine Ermüdung der fortwährenden Glutamat-

ausschüttung durch die kalziumvermittelte Vesikelfusion könnte diese Vulnerabilität bedingen [45]. Mit der Erkenntnis der Dp71-Expression in den Stützzellen des DCs könnte diese erhöhte Vulnerabilität der mdx-Mäuse auch durch die insuffiziente osmotische Kompensationsfähigkeit des Stützzellapparates verursacht werden; Störung der AQP4-Verankerung, der AQP4-Polarisation und somit die Reduktion der membranären AQP4-Dichte. Um diese These zu erhärten müsste in zukünftigen Studien zuerst die subzelluläre AQP4- und Dp71-Lokalisation im DC der mdx-Maus untersucht werden. Anschließend könnte die genaue Ergründung und Gewichtung beider Thesen erfolgen.

In der Breite betrachtet vermitteln die Dystrophine als zentrales Glied des DAPKs sehr viel mehr Interaktionen, die bei Hörmessungen von Dystrophin-depletierten Tieren aller Art in das Messergebnis einfließen. Beispielhaft sind weitere Dystrophin-Interaktionen mit der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthetase, nNOS, mit dem Sarkoglykan- und Sarcospankomponenten und dem Aktinzytoskelett, die zelluläre Grundparameter beeinflussen [57, 95]. Die von Chen et al. beobachtete erhöhte Vulnerabilität sowohl auf cochleärer als auch auf retrocochleärer Ebene des Hörsystems weisen auf eine Interaktion von Dystrophin hin, die über die AQP4-Verankerung im DC hinaus geht [35]. Beispielsweise beeinflusst eine Depletion von Dp427 in mdx-Mäusen die zentralnervöse Expression von Proteinen der Utrophin-Familie, die den Dystrophinen äquivalente Domänen tragen und alternativ eine Verankerung von AQP4 über Syntrophin im DC bewerkstelligen könnten [107-109]. Da die bisherige Datenlage von Hörmessungsstudien an Dp427-depletierten (mdx) und aller Dystrophin-Isoformen depletierten (mdx^{3cv}) Knock-out-Mäusen widersprüchlich ist, könnten neue Hörmessungsstudien an Dp71-null-Mäusen erfolgen, deren Knock-out sich gezielt auf die Dystrophin-Isoform Dp71 in den Stützzellen des DCs richtet. Eine Hörmessungsstudie dieser Tiere könnte unter vorheriger immunhistochemischer Analyse der AQP4-Verteilung im DC eine Aussage über die funktionelle Relevanz der AQP4-Verankerung und einer dadurch eventuellen Beeinträchtigung der osmotischen Kompensationsfähigkeit im DC liefern. Im Rahmen dieser Überlegungen ist in einem ersten Schritt zuerst die genaue Kenntnis der Lokalisation der verschiedenen Dystrophin-Isoformen im DC für die Auswahl geeigneter

Knock-out-Tiere unabdingbar. Diese könnte direkt immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern, beginnend mit Dp71, im *DC* der Ratte erfolgen, um die Expressionsdaten dieser Grundlagenarbeit stärker auf das Dystrophin-Isoformen-Spektrum zu fokussieren.

Noch weiterführend könnte der Überlagerung der Hörmessungsergebnisse an einem Dp71-null Tier durch eine mögliche kompensatorische Utrophin-Expression mit der Analyse von doppelt-depletierten Mäusen, Utrophin/mdx-Mäuse, entgegen gewirkt werden [110-112]. Allerdings ist die eindeutige Zuordnung einer eventuellen Hörbeeinträchtigung durch die AQP4-Verankerung bei einer Depletion von zwei ubiquitär exprimierten Proteinfamilien ebenfalls schwierig. Die große Anzahl an Tieren mit den verschiedensten Dystrophin-knock-out-Konstellationen und deren zum Teil sehr überraschenden Phänotypen zeigt wie schwierig die Aussage eines spezifischen Zusammenhangs ist, beispielsweise zwischen dem Einfluss von Dystrophin auf die AQP4-Verankerung im *DC* und dessen Relevanz für das Hören [112].

4.2.2 Die Dystroglykan-Expression im *DC* der Ratte

Die β -Dystroglykan-Expression konnte in dieser Studie in den Stützzellen des Corti-Organs (basolateral: Innere Pfeilerzelle, äußere Pfeilerzelle, innere Phalangenzelle und Deiterszellen) und des *DCs* (basolateral: innere Grenz-, Hensen-, Interdental und äußere Sulkuszellen; basal: innere Sulkus- und Claudiuszellen) der Ratte immunhistochemisch auf subzellulärer Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 12). Die positive Amplifikation von DAG1-mRNA-Abschnitten, gemeinsames Vorläuferprotein von α - und β -Dystroglykan, in der α - und β -Dystroglykan-Region zeigen direkt die Grundlage für eine Expression der beiden Proteine im *DC* der Ratte [70, 101]. Im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen aus der Maus konnte in dieser Studie im *DC* der Ratte das transmembranäre β -Dystroglykan in dessen Stützzellen und in denen des Corti-Organs nachgewiesen werden [40]. Wie in den Stützzellen des Kontrollgewebes, den Müllerzellen in der Retina, konnte im *DC* der Ratte eine polare β -

Dystroglykan-Expression gezeigt werden [79, 80]. Somit steht auch das transmembranäre β -Dystroglykan für eine mögliche AQP4-Verankerung im *DC* der Ratte zur Verfügung. Die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Studie mit denen vorheriger scheint durch Speziesunterschiede allein, aufgrund der hohen Homologie zwischen Maus und Ratte von DAG1, als Begründung sehr unwahrscheinlich [113]. Eine Erklärung dafür könnte in der höheren Sensitivität der Immunfluoreszenz in der cLSM-Aufnahme oder in der damals verwendeten Paraffineinbettung liegen, die im Gegensatz zur Gefriereinbettung eine stärkere Maskierung der ohnehin niedrigen Epitopdichte im *DC* bedingen kann.

Weiterführend ist der noch ausstehende direkte Nachweis der α -Dystroglykan-Expression im *DC* der Ratte immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper zu erbringen. Der Nachweis einer α -Dystroglykan-Expression im *DC* der Ratte ist sehr wahrscheinlich, da frühere Studien im *DC* der Maus eine mit β -Dystroglykan in der Ratte (Abbildung 12) deckungsgleiche α -Dystroglykan-Expression zeigten [40]. Weiter erfolgte der Nachweis des α -Dystroglykan-mRNA-Abschnitts auf DAG1 im *DC* der Ratte bereits in dieser Studie.

Funktionelle Daten über die Dystroglykane im *DC* wurden bisher noch nicht erhoben. Jedoch stehen diese als vermittelnde Komponenten zwischen dem intra- und extrazellulären Teil des DAPKs an zentraler Stelle und könnten analog zu anderen DAPK-Mitgliedern im Rahmen der Hörmessung von DAG1-depletierten Tieren erhoben werden.

Einschränkend ist für das Konzept von Hörmessungen mit DAG1-depletierten Tieren zu nennen, dass die komplette Depletion von DAG1 bei Mäusen zu einem frühen Tod während der embryonalen Entwicklung führt und somit in dieser Form nicht möglich ist [114]. Eine Untersuchung an konditionierten Knock-out-Mäusen, die bestmöglich nur eine Depletion in den Zellen des *DCs* tragen, wäre denkbar, aber in der Aussagekraft über die AQP4-Verankerung eingeschränkt. Dies zeigt sich bei der großen Rolle der Dystroglykane in der Embryogenese, anschaulich im ZNS der Maus [115]. Nach derzeitigem Kenntnisstand existiert jedoch keine entsprechende Knock-out-Mauslinie [116].

4.2.3 Die Laminin-Expression im *DC* der Ratte

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Laminin-Familie extrazellulär als Bindungspartner für den DAPK, genauer α -Dystroglykan, entlang der Basalmembran aller epithelialen Stützzellen des *DCs* und des Corti-Organs der Ratte exprimiert sind.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus früheren Studien überein [84, 117, 118]. Somit stellen sie an der basalen Membrandomäne der Stützzellen des Corti-Organs und des *DCs* ein abschließendes Glied für eine mögliche AQP4-Verankerung über den DAPK dar. Einschränkend bestätigt die sehr breit gestreute Detektion in dieser Grundlagenarbeit auf mRNA-Ebene eine große Vielfalt von Mitgliedern der Lamininfamilie, lässt aber keine scharfe histoanatomische Lokalisation von Lamininen, beispielsweise α -Ketten tragenden, zu. Diese können direkt mit α -Dystroglykan interagieren. Weiter stellt die Laminin-Familie einen ubiquitären Bestandteil von extrazellulären Matrixmolekülen dar, die vor allem in der Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung sind, so versterben α_1 -Ketten depletierte Mäuse während der Embryonalentwicklung [119]. In der α_2 -Ketten depletierten Dy-Maus konnte bereits eine veränderte Morphologie des Innenohrs beobachtet werden, die sich in einer reduzierten vertikalen Höhe der Haarsinneszellen und der Stützzellen des Corti-Organs bis hin zu dessen kompletter Degeneration zeigte. Der Hörverlust wurde in der damaligen Studie in der strukturellen Veränderung des Halteapparats der Zellen im Corti-Organ und damit einer verstärkten Dämpfung der Wellenausbreitung in der *Cochlea* vermutet [120]. Deshalb stellt die scharfe Trennung solcher Effekte von denen der AQP4-Verankerung über den DAPK auch hier eine Herausforderung dar.

In zukünftigen Studien könnten immunhistochemische Färbungen im *DC* mit α -Ketten-spezifischen Laminin-Antikörpern weiteren Aufschluss über eine Interaktion mit α -Dystroglykan geben. Für eine stärkere Fokussierung in der Antikörperauswahl sollten die restlichen bekannten α -Ketten (α_1 , α_2 , α_4 und α_5) im Vorfeld auf eine mRNA-Expression untersucht werden [121]. Nachfolgend wäre die immunhistochemische Untersuchung von AQP4 und der DAPK-Komponenten im *DC* der Maus mit der Fragestellung einer Umverteilung oder

Reduktion der AQP4-Konzentration unter anderem in verschiedenen Knock-out-Linien möglich. Abschließend könnte der direkte Nachweis einer Proteininteraktion zwischen α -Dystroglykan und α -Ketten tragender Laminine im DC analog zu Syntrophin-Studien aus dem ZNS angestrebt werden [31].

Aus funktioneller Sicht liegen bereits Daten aus früheren Studien des DCs vor, in denen Mäuse mit inaktivierter Laminin α_2 -Kette, Dy-Maus, bei Hörmessungen einen deutlichen Hörverlust zeigten [120]. Über α -Ketten der Laminine, vor allem α_1 und α_2 , interagiert α -Dystroglykan mit den Lamininen und vermittelt so die Einbettung des DAPKs in die Extrazellulärmatrix [82, 122]. Eine gestörte AQP4-Verankerung und somit eine Umverteilung oder Reduktion der AQP4-Expression, analog zum ZNS, könnte in den Stützzellen des DCs und des Corti-Organs ein tragender Grund für die gemessene Hörminderung sein.

4.2.4 Die Agrin-Expression im DC der Ratte

Mitglieder der Agrin-Familie konnten auf mRNA-Ebene in den Zellen des DCs der Ratte erstmals nachgewiesen werden. Eine Interaktion von Proteinen der Agrin-Familie über deren LG-Domäne mit α -Dystroglykan und dem DAPK wäre somit möglich und stellt, neben den Lamininen, einen weiteren extrazellulären Teil eines AQP4-Verankerungsmechanismus im DC der Ratte dar. Ziel dieser Grundlagenstudie war es die Präsenz von Agrin als weiteren extrazellulären DAPK-Bindungspartner im DC der Ratte nachzuweisen. Die Daten lassen keine konkrete isoformenspezifische und histoanatomische Aussage über die Lokalisation und Interaktion der Agrine im DC der Ratte zu. Eine Schwierigkeit im Beweis der Hypothese einer kompensatorischen Stabilisierung der AQP4-Verankerung und -Expression durch Agrine liegt in der scharfen Abgrenzung der Effekte einer Veränderung von zwei ubiquitär exprimierten extrazellulären Matrixmolekülen, Laminin und Agrin.

In zukünftigen Studien können spezifische Primerpaare für Agrin-Isoformen in mRNA-Analysen im DC der Ratte Aufschluss über deren Expression im DC geben. Weiter kann die immunhistochemische Untersuchung der zellulären und subzellulären Expressionen von Agrinen im DC der Ratte angestrebt werden. Dies könnte ferner zum Aufschluss über die Relevanz der AQP4-Verankerung

für die OPK-Distribution, deren Interaktion mit dem DAPK aus dem ZNS bekannt ist, im *DC* der Ratte liefern [21, 25, 26]. Bei gelegten Grundlagen wäre eine funktionelle Hörmessung und Gefrierbruchanalyse des *DCs* an beispielsweise *dy^w/mag-tg*-Mäusen denkbar. Funktionell liegen noch keine Daten über Hörmessungen von Agrin depletierten Tieren vor. In Muskelgeweben transgener Laminin α_2 -Ketten depletierter *dy^w/mag-tg* Mauslinien konnte die verminderte α -Dystroglykan-Expression im Vergleich zu *dy^w*-Mäusen durch die Überexpression eines Mini-Agrins wieder auf das gleiche Maß wie im Wildtyp des Mausmodells angehoben werden [123, 124]. Die *dy^w/mag-tg* Mauslinien überexprimieren ein Mini-Agrin aus dem Huhn mit Bindungsfähigkeit an Laminine und α -Dystroglykan, wohingegen die *dy^w*-Mäusue eine alleinige α_2 -Ketten-Depletion tragen. Mitglieder der Agrin-Familie könnten im *DC* eine ähnliche Rolle übernehmen und als weiterer extrazellulärer Stützpfiler AQP4-Verankerung über den DAPK nehmen.

4.2.5 Die Lokalisation der DAPK-Komponenten im *DC* der Ratte im funktionellen Zusammenhang und zukünftigem Ausblick

In dieser Grundlagenarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die DAPK-Komponenten kohärent in den Membrandomänen der Stützzellen des *DCs* und des Corti-Organs der Ratte exprimiert sind und somit AQP4 in diesen verankern können. Diese Daten bereiten die Grundlage für weitere funktionelle Studien an Knock-Out-Tieren, die einen tieferen Einblick in den Verankerungsmechanismus von AQP4 geben können. Da einige Mitglieder des DAPKs gleichzeitig ubiquitär exprimierte Strukturproteine sind, stellt in Knock-Out-Studien die Beurteilung alleiniger Effekte bedingt durch die gestörte AQP4-Verankerung im *DC* eine Herausforderung dar. Im Vorfeld zur funktionellen Untersuchung des DAPKs sollte die Isoformen-spezifische DAPK-Komposition und Lokalisation im *DC* gezeigt werden. Die kohärente Expression der DAPK-Komponenten und AQP4 in den Stützzellen des *DCs* und das abrupte Fehlen von AQP4 bei weitergehender Expression der DAPK-Komponenten im Corti-Organ könnte durch eine fokussierte Isoformen-spezifische AQP4-Analyse der Stützzellen des Corti-Organs aufgeklärt werden. Abschließend sollte der direkte Nachweis einer Verankerung von AQP4 und Syntrophin im *DC*, wie im ZNS der Maus, angestrebt werden [31].

Aus funktioneller Sicht könnte die Untersuchung eines möglichen modulato-
rischen Einflusses des DAPKs auf die AQP4-Expression in den Stützzellen des
DCs angestrebt werden. Eine zielgerichtete Beeinflussung der DAPK-Kompo-
nenten, beispielsweise der Syntrophin-Expression, der Stützzellen des *DCs*
könnte im Alter eine Erhöhung der AQP4-Expression bedingen. So könnte das
Voranschreiten einer altersabhängigen Schwerhörigkeit, deren Pathogenese
zum einen auf einer Reduktion der AQP4-Expression zu basieren scheint, ge-
mildert oder gestoppt werden [10, 15].

4.3 Einfluss des DAPKs auf die OPK-Formierung im *DC* der Ratte

Im ZNS und der *Retina* steht der DAPK in der Diskussion verantwortlich für die
polare Expression von AQP4 zu sein [29, 31, 32, 55, 104, 125]. Zusätzlich hat
der DAPK im ZNS einen Einfluss, gezeigt über eine Komposition mit Agrin, auf
die ultrastrukturelle Organisation von AQP4 in OPKs [25-27]. In den Stützzellen
des *DCs* konnte dies nicht bestätigt werden, da in einer Stützzellpopulation des
DCs, den Claudiuszellen, zwar Komponenten des DAPKs und AQP4 exprimiert
sind, aber ultrastrukturell keine OPKs in diesen detektiert werden konnten [11].
Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Formierung von OPKs im *DC* un-
abhängig vom DAPK erfolgt. So könnten die Claudiuszellen einen hohen Anteil
der AQP4-Isoform M1 exprimieren, der in Transfektionsstudien zu sehr kleinen
bis nicht-detektierbaren OPKs führte [18, 19, 21]. Da in den Claudiuszellen AQP4
und alle untersuchten DAPK-Mitglieder in ihren vermuteten Membrandomänen
detektiert wurden (Abbildung 10 bis 13), wäre eine Verankerung von AQP4 über
den DAPK in diesen prinzipiell möglich. Die genannten Zusammenhänge lassen
allerdings vermuten, dass die OPK-Formierung im *DC* überwiegend vom expri-
mierten Anteil der AQP4-Isoform M1 zu M23, M1:M23, und weniger vom DAPK
abhängt. Hinweise darauf liefern zusätzlich Studien über „AQP4-Pools“ aus dem
ZNS der Ratte und der Maus, die unabhängig vom DAPK exprimiert werden.
Genauere 2D BN-SDS/PAGE- und Gefrierbruchelektronenmikroskopanalysen
zeigten, dass es sich hierbei um vergleichsweise kleine OPKs, < 500 kDa, mit

einer AQP4-Isoformenkonstellation von überwiegend AQP4-M1 handelte, die bei einer weiteren Schrumpfung unter die Detektionsgrenze fallen können [104, 126].

Die Daten dieser Studie stellen in der Ergründung der Assoziation des DAPKs mit der OPK-Formierung den ersten Schritt dar. Aus den erhobenen Daten kann histoanatomisch keine Isoformen-spezifische AQP4 Lokalisation von M1 und M23 im *DC* abgeleitet werden, da der verwendete AQP4-Antikörper den gemeinsamen C-Terminus beider AQP4-Isoformen detektiert.

Zukünftige Studien könnten im ersten Schritt in einer immunhistochemischen Analyse des *DCs* mit einem M1-spezifischen AQP4-Antikörper, beispielsweise Regionen nahe des N-Terminus, beginnen und eine M1-spezifische Expression in den Claudiuszellen untersuchen. Das M1:M23-Verhältnis könnte weiter in den Claudiuszellen, die zuvor aus einer „Whole-mount-Präparation“ des *DCs* extrahiert werden können, durch eine 2D BN-SDS/PAGE-Analyse analog zu Studien aus dem ZNS bestimmt werden [19, 126]. Die Analyse von Dp71-depletierten Mäusen in gleicher Form könnte im Anschluss einen tieferen Einblick in die Existenz und Lokalisation von DAPK-unabhängigen „AQP4-Pools“ im *DC* und dessen Claudiuszellen, analog zum ZNS, liefern [104, 126]. Somit könnten auch diese Effekte in die Beurteilung des DAPK-Einflusses auf die OPK-Formierung im *DC* einbezogen werden.

4.4 Die zelluläre Kollokalisierung von AQP4 und Syntrophin im humanen *DC*

In den Zellen des humanen *DCs* konnte die mRNA-Expression von AQP4 und aller untersuchter DAPK-Proteine (DAPK-Abschnitt intrazellulär: α_1 -Syntrophin, Dp71 und α -Dystrobrevin; transmembranär: DAG1 – α - und β -Dystroglykan-Vorläuferprotein; extrazellulär: Agrin und Laminin α_3 -, β_1 , und γ_1 -Kette) nachgewiesen werden (Abbildung 8). Zur Sicherstellung der RNA-Integrität wurden stets Proben mit einem RIS-Wert über 5,5 verwendet. In immunhistochemischen cLSM-Aufnahmen konnte in den humanen Stützzellen des Corti-Organs und des *DCs* die zelluläre Lokalisation von **AQP4** (*DC*: Interdental-, äußere Sulkus-, innere Sulkus-, Claudius-, innere Grenz- und Hensenzellen), **Syntrophin** (Corti-

Organ: innere Pfeilerzelle, äußere Pfeilerzelle, innere Phalangenzelle und Deiterszellen; DC: Interdental-, äußere Sulkus-, innere Sulkus, Claudius-, innere Grenz- und Hensenzellen) und deren **Doppelmarkierung** (DC: Interdental-, äußere Sulkus-, innere Sulkus-, Claudius-, innere Grenz- und Hensenzellen) gezeigt werden (Abbildung 15 bis 17). Damit konnten die Ergebnisse vorheriger Studien über die AQP4-Expression im humanen *DC* bestätigt werden und um die Expression von Syntrophin und dessen Kolo-kalisation mit AQP4 erweitert werden [8]. Die AQP4/Syntrophin-Doppelmarkierung im humanen *DC* liefert einen vielversprechenden Hinweis auf die Verankerung von AQP4 über den DAPK. Sie bereitet die Grundlage für eine analoge Übertragung der genannten Prinzipien der AQP4-Verankerung aus Nagetieren (Maus, Ratte und Meerschweinchen) auf den Menschen.

In humangenetischen Studien von Patienten mit punktmutiertem sowie funktionslosem AQP4-Gen und Mutation im DFN4-Lokus, der im Dystrophin-Gen (DMD) lag, konnte in beiden Fällen ein totaler Hörverlust festgestellt werden [13, 36, 37]. Pfister et al. vermuteten damals, dass der Hörverlust im DFN4-Lokus durch die Beeinträchtigung von Dystrophin-Isoformen hervorgerufen wird [36]. Zusammen mit den Daten dieser Studie könnte der beobachtete Hörverlust so erklärt werden, dass die Mutation im DFN4-Lokus eine Störung der DAPK-Zusammensetzung und somit der AQP4-Verankerung in den Stützzellen des humanen *DCs* bedingt. Die Störung der AQP4-Verankerung in den Stützzellen könnte zu dessen effektiver Funktionslosigkeit, durch Polarisationsverlust oder Konzentrationsreduktion, führen und so diesen Hörverlust bedingen. In den Müllerzellen der *Retina* von Mäusen konnte bereits beobachtet werden, dass eine Störung der DAPK-Komposition (α_1 -Syntrophin- und Dp71-knock-out) zu einer Aufhebung der AQP4-Polarität führte [54, 55, 127]. Folglich bewirkte dies eine massive Reduktion der AQP4-Expression an den perivaskulären Membranabschnitten. Eine solche modulatorische Komponente des DAPKs auf AQP4 im humanen *DC* wäre im größeren Zusammenhang als Baustein in der Ergründung der *Presbyakusis* interessant. Eine Reduktion der AQP4-Expression in den Stützzellen des *DCs* wird zurzeit in einem Mausmodell als ein möglicher Pathomechanismus der *Presbyakusis* diskutiert [10, 15].

Angesichts des stark variablen Zeitfensters bei Beginn der Gewebebegewinnung *post mortem*, der aufwendigen Extraktion und der anschließenden Gewebeprozessierung wurde der immunhistochemische Nachweis von DAPK-Komponenten in dieser Grundlagenstudie zunächst auf die unmittelbare AQP4-Verankerung mit dem DAPK, AQP4 und Syntrophin, fokussiert. Die positive mRNA-Analyse aller DAPK-Komponenten im humanen *DC* lässt eine zusammenhängende Lokalisation dieser im humanen *DC*, analog zum *DC* der Ratte in dieser Studie, vermuten.

Zukünftig könnte der immunhistochemische Nachweis von DAPK-Komponenten im humanen *DC* um die noch fehlenden Proteinisoformen, Dp71, α -Dystroglykan, β -Dystroglycan und Laminin- α -Ketten, ergänzt werden. So könnte die kohärente membranüberspannende und AQP4-verankernde DAPK-Komposition im humanen *DC* analog zu den Müllerzellen der *Retina* der Ratte gezeigt werden. In vorherigen Studien wurden im humanen *DC* bereits α -Dystroglykan und β -Ketten der Laminin-Familie auf zellulärer Ebene nachgewiesen [39]. Die positive mRNA-Analyse aller DAPK-Komponenten im humanen *DC* lässt eine zusammenhängende Lokalisation dieser im humanen *DC*, analog zum *DC* der Ratte in dieser Studie, vermuten.

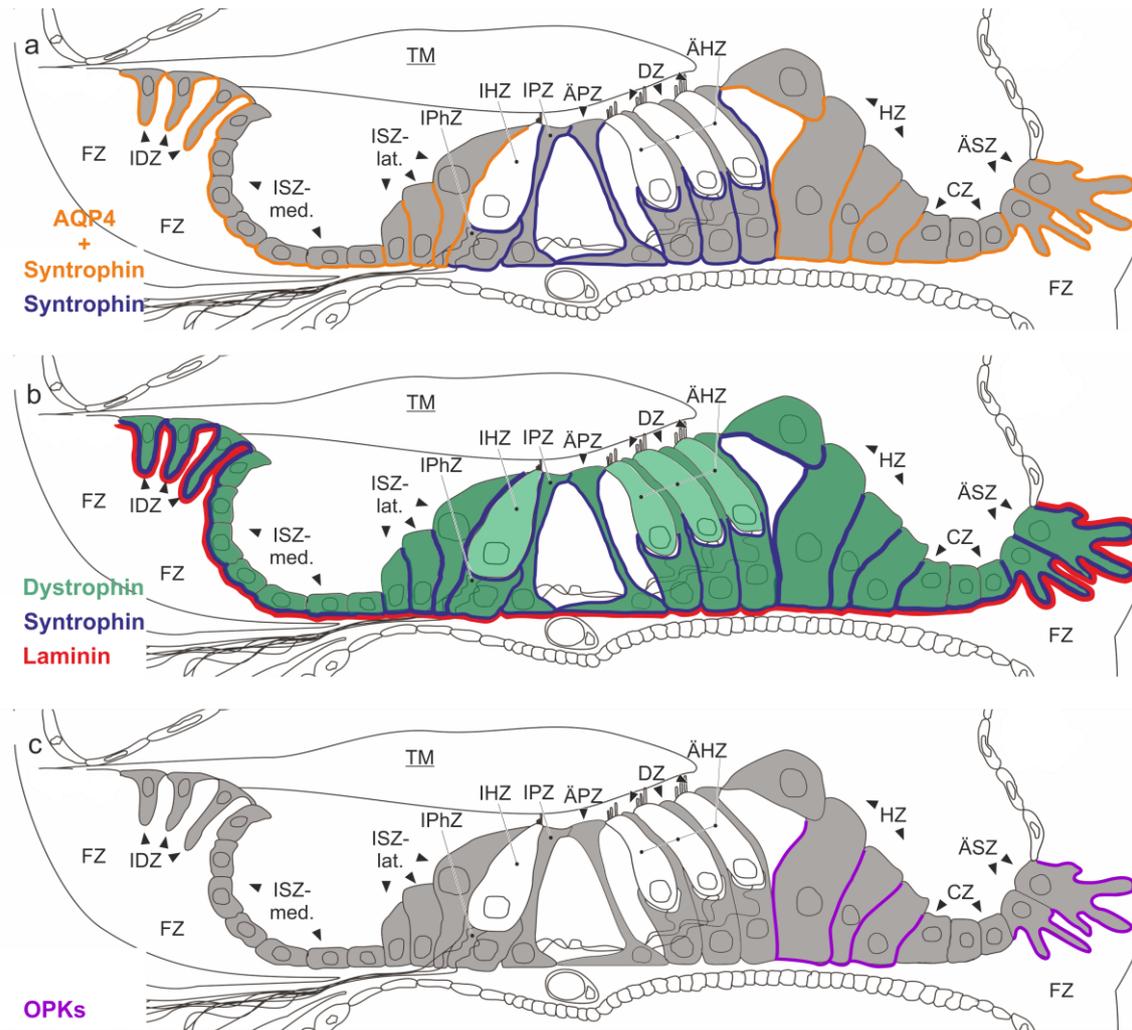


Abbildung 18– Expression von AQP4, OPKs und des DAPKs im DC im Vergleich (Modifiziert nach Hirt et al [11]). (a) Zusammenfassend sind AQP4 und Syntrophin in den Stützzellen des DCs kolokalisiert (orange). Syntrophin (blau) ist entlang der Stützzellen des Corti-Organs basolateral und des DCs in den ISZs-med. sowie den CZs basal und in allen übrigen basolateral exprimiert. (b) stellt die kohärente subzelluläre Expression der untersuchten DAPK-Mitglieder dar. Dystrophin (grün), Syntrophin (blau) und Laminin (rot). (c) Zu erkennen ist die bisher beschriebene Verteilung der OPKs (violett) – basolateral in den HZs und den ÄSZs.

5. Zusammenfassung

Im *Ductus cochlearis* (DC) des Innenohrs gilt der Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP4) und dessen subzelluläre Lokalisation als entscheidender Mechanismus für die osmotische Äquilibration des Stützzellsynzytiums beim Kaliumabtransport während der mechanoelektrischen Transduktion – Mutationen im AQP4-Gen bei Maus und Mensch führen zu einer nahezu vollständigen Ertaubung. AQP4-Isoformen M23 und M1 sind ultrastrukturell Teil von orthogonalen Partikelkomplexen (OPKs), die zuvor in Zellmembranen von Astrozyten des ZNS und Müllerzellen der *Retina* durch Gefrierbruchelektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnten. In den Stützzellen des DCs stimmt jedoch die subzelluläre Verteilung von AQP4 und der OPKs nicht vollständig überein. Die funktionelle Relevanz der Formierung von Aquaporin-4 zu orthogonalen Partikelkomplexen ist bis heute nicht abschließend geklärt – die integrierten AQP4-Isoformen M1 und M23 weisen eine unterschiedlich hohe Wasserpermeabilität auf. Jedoch gibt es Hinweise, dass der Zellmembran überbrückende Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex (DAPK) in den Astrozyten eine zentrale Rolle bei der Formierung von AQP4 zu OPKs sowie bei der gerichteten Verankerung von AQP4 in die Zellmembranen spielt. Im ZNS ist dies ein essenzieller Mechanismus der Zellmembranpolarisation.

In Analogie zum ZNS zielte diese Studie auf die Analyse der Grundvoraussetzungen einer möglichen AQP4-Verankerung über den DAPK im *Ductus cochlearis* des Menschen und der Ratte sowie auf den DAPK-Einfluss auf die ultrastrukturelle AQP4-Aggregation. In RT-PCR- und qPCR-Analysen wurde im DC zuerst die Expression eines breiten Isoformenspektrums der DAPK-Mitglieder auf mRNA-Ebene untersucht. Anschließend erfolgte die gezielte Analyse der subzellulären Lokalisation einzelner DAPK-Mitglieder im DC beider Spezies aus einzelnen Zellkompartimenten durch Immunfluoreszenzmarkierungen in einem konfokalen Laserscanningmikroskop.

In dieser Studie konnte im DC der Ratte und des Menschen die Kolokalisation von AQP4 und seinem DAPK-Verankerungspartner Syntrophin in allen Stützzellen außerhalb des Corti-Organ nachgewiesen werden. Somit wurde die

Grundvoraussetzung im *DC* für eine Interaktion von AQP4 mit dem DAPK in Analogie des ZNS und der *Retina* gezeigt. Weiter konnten in allen Stützzellen des *DCs* der Ratte histoanatomisch repräsentative DAPK-Mitglieder (Syntrophin, Dystrophin, β -Dystroglykan, Laminin) in verschiedenen Membrandomänen der Stützzellen nachgewiesen werden, die die Hypothese einer AQP4-Verankerung über den DAPK im *DC* weiter erhärten. Der Nachweis aller untersuchter DAPK-Komponenten sowohl in den Stützzellen des Corti-Organ als auch in denen des *DCs* der Ratte in Zusammenhang mit dem Fehlen der AQP4-Expression im Corti-Organ könnte auf eine weitere methodisch nicht-detektierte AQP4-Isoform hinweisen. Die Aktivität der Haarsinneszellen fordert von ihren angrenzenden Stützzellen eine hohe osmotische Kompensationsfähigkeit. Für die Einordnung der funktionellen Bedeutung der AQP4-Verankerung über den DAPK im *DC* bietet sich eine analoge Analyse von Knock-Out-Tieren zusammen mit deren Hörmessung an.

Frühere Studien über die subzelluläre OPK-Verteilung im *DC* der Ratte konnten in den Claudiuszellen (CZs), einem Stützzelltyp des *DCs*, keine OPKs nachweisen, jedoch eine AQP4-Expression. In dieser Studie konnten alle untersuchten DAPK-Mitglieder in den CZs nachgewiesen werden und somit kein Einfluss des DAPKs auf die ultrastrukturelle Formierung von AQP4 zu OPKs festgestellt werden. Somit könnte die OPK-Formierung im *DC* überwiegend durch das AQP4-Isoformenverhältnis M1:M23, eine weitere beschriebene Achse in der Modulation der OPK-Formierung in Größe und Dichte aus dem ZNS und der *Retina*, gesteuert werden.

Die Kolo-kalisation von AQP4 mit Syntrophin und der mRNA-Nachweis aller übrigen DAPK-Komponenten im humanen *DC* geben Anlass zur Vermutung, dass die Prinzipien der AQP4-Verankerung über den DAPK aus Nagetieren analog auf den Menschen übertragbar zu sein scheinen. Grundsätzlich wäre ein pharmakologischer Angriffspunkt auf die AQP4-Expression über die Modulation des DAPKs denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. v. Békésy G (1952) *DC Resting Potentials Inside the Cochlear Partition*. The Journal of the Acoustical Society of America 24: 72-76.
2. Konishi T, Hamrick PE, and Walsh PJ (1978) *Ion transport in guinea pig cochlea. I. Potassium and sodium transport*. Acta Otolaryngol 86: 22-34.
3. Johnstone BM, Patuzzi R, Syka J, and Sykova E (1989) *Stimulus-related potassium changes in the organ of Corti of guinea-pig*. J Physiol 408: 77-92.
4. Wangemann P (2006) *Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential*. J Physiol 576: 11-21.
5. Eckhard A, Gleiser C, Rask-Andersen H, Arnold H, Liu W, Mack A, Muller M, Lowenheim H, and Hirt B (2012) *Co-localisation of K(ir)4.1 and AQP4 in rat and human cochleae reveals a gap in water channel expression at the transduction sites of endocochlear K(+) recycling routes*. Cell Tissue Res 350: 27-43.
6. Takumi Y, Nagelhus EA, Eidet J, Matsubara A, Usami S, Shinkawa H, Nielsen S, and Ottersen OP (1998) *Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein*. Eur J Neurosci 10: 3584-3595.
7. Miyabe Y, Kikuchi T, and Kobayashi T (2002) *Comparative immunohistochemical localizations of aquaporin-1 and aquaporin-4 in the cochleae of three different species of rodents*. Tohoku J Exp Med 196: 247-257.
8. Lopez IA, Ishiyama G, Lee M, Baloh RW, and Ishiyama A (2007) *Immunohistochemical localization of aquaporins in the human inner ear*. Cell Tissue Res 328: 453-460.
9. Hirt B, Penkova ZH, Eckhard A, Liu W, Rask-Andersen H, Muller M, and Lowenheim H (2010) *The subcellular distribution of aquaporin 5 in the cochlea reveals a water shunt at the perilymph-endolymph barrier*. Neuroscience 168: 957-970.
10. Eckhard A, Gleiser C, Arnold H, Rask-Andersen H, Kumagami H, Muller M, Hirt B, and Lowenheim H (2012) *Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness*. Mol Aspects Med 33: 612-637.
11. Hirt B, Gleiser C, Eckhard A, Mack AF, Muller M, Wolburg H, and Lowenheim H (2011) *All functional aquaporin-4 isoforms are expressed in the rat cochlea and contribute to the formation of orthogonal arrays of particles*. Neuroscience 189: 79-92.
12. Li J and Verkman AS (2001) *Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels*. J Biol Chem 276: 31233-31237.
13. Nicchia GP, Ficarella R, Rossi A, Giangreco I, Nicolotti O, Carotti A, Pisani F, Estivill X, Gasparini P, Svelto M, and Frigeri A (2011) *D184E mutation in aquaporin-4 gene impairs water permeability and links to deafness*. Neuroscience 197: 80-88.
14. Mhatre AN, Stern RE, Li J, and Lalwani AK (2002) *Aquaporin 4 expression in the mammalian inner ear and its role in hearing*. Biochem Biophys Res Commun 297: 987-996.
15. Christensen N, D'Souza M, Zhu X, and Frisina RD (2009) *Age-related hearing loss: aquaporin 4 gene expression changes in the mouse cochlea and auditory midbrain*. Brain Res 1253: 27-34.
16. Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, Zeuthen T, Petter Ottersen O, and Holen T (2008) *New isoforms of rat Aquaporin-4*. Genomics 91: 367-377.
17. Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, Brown D, and Van Hoek AN (2004) *Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol 287: F501-511.

18. Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, Agre P, and Rash JE (2003) *Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 13609-13614.
19. Nicchia GP, Rossi A, Mola MG, Pisani F, Stigliano C, Basco D, Mastrototaro M, Svelto M, and Frigeri A (2010) *Higher order structure of aquaporin-4*. Neuroscience 168: 903-914.
20. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, and Nielsen S (1998) *Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 11981-11986.
21. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, and Mack AF (2011) *Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles*. Int Rev Cell Mol Biol 287: 1-41.
22. Yang B, Brown D, and Verkman AS (1996) *The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem 271: 4577-4580.
23. Reale E, Luciano L, and Spitznas M (1974) *Introduction to freeze-fracture method in retinal research*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 192: 73-87.
24. Jahnke K (1975) *The fine structure of freeze-fractured intercellular junctions in the guinea pig inner ear*. Acta Otolaryngol Suppl 336: 1-40.
25. Noell S, Fallier-Becker P, Beyer C, Kroger S, Mack AF, and Wolburg H (2007) *Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes*. Eur J Neurosci 26: 2109-2118.
26. Noell S, Fallier-Becker P, Deutsch U, Mack AF, and Wolburg H (2009) *Agtrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes*. Cell Tissue Res 337: 185-195.
27. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, Wolburg H, and Fallier-Becker P (2011) *Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet*. Eur J Neurosci 33: 2179-2186.
28. Waite A, Tinsley CL, Locke M, and Blake DJ (2009) *The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex*. Ann Med 41: 344-359.
29. Nagelhus EA and Ottersen OP (2013) *Physiological roles of aquaporin-4 in brain*. Physiol Rev 93: 1543-1562.
30. Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, and Svelto M (2001) *Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice*. Faseb j 15: 90-98.
31. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, and Adams ME (2001) *Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 14108-14113.
32. Hoddevik EH, Khan FH, Rahmani S, Ottersen OP, Boldt HB, and Amiry-Moghaddam M (2016) *Factors determining the density of AQP4 water channel molecules at the brain-blood interface*. Brain Struct Funct
33. Raynor EM and Mulroy MJ (1997) *Sensorineural hearing loss in the mdx mouse: a model of Duchenne muscular dystrophy*. Laryngoscope 107: 1053-1056.
34. Pillers DA, Duncan NM, Dwinnell SJ, Rash SM, Kempton JB, and Trune DR (1999) *Normal cochlear function in mdx and mdx(Cv3) Duchenne muscular dystrophy mouse models*. Laryngoscope 109: 1310-1312.
35. Chen TJ, Chen SS, Wang DC, and Hsieh YL (2002) *Increased vulnerability of auditory system to noise exposure in mdx mice*. Laryngoscope 112: 520-525.

36. Pfister MH, Apaydin F, Turan O, Bereketoglu M, Bilgen V, Braendle U, Kose S, Zenner HP, and Lalwani AK (1999) *Clinical evidence for dystrophin dysfunction as a cause of hearing loss in locus DFN4*. Laryngoscope 109: 730-735.
37. Pfister MH, Apaydin F, Turan O, Bereketoglu M, Bilgen V, Braendle U, Zenner HP, and Lalwani AK (1998) *A second family with nonsyndromic sensorineural hearing loss linked to Xp21.2: refinement of the DFN4 locus within DMD*. Genomics 53: 377-382.
38. Dodson HC, Piper TA, Clarke JD, Quinlivan RM, and Dickson G (1995) *Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea*. J Neurocytol 24: 625-632.
39. Ishiyama A, Mowry SE, Lopez IA, and Ishiyama G (2009) *Immunohistochemical distribution of basement membrane proteins in the human inner ear from older subjects*. Hear Res 254: 1-14.
40. Heaney DL and Schulte BA (2003) *Dystroglycan expression in the mouse cochlea*. Hear Res 177: 12-20.
41. Heaney DL, Schulte BA, and Niedzielski AS (2002) *Dystroglycan expression in the developing and senescent gerbil cochlea*. Hear Res 174: 9-18.
42. Weinberger DG, ten Cate WJ, Lautermann J, and Baethmann M (1999) *Localization of laminin isoforms in the guinea pig cochlea*. Laryngoscope 109: 2001-2004.
43. Drenckhahn D (2004) *Hör- und Gleichgewichtssystem 706-745 Drenckhahn D and Asan E Anatomie. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut Urban und Schwarzenberg München ; Wien ; Baltimore*.
44. Adams JC and Liberman CM (2010) *Anatomy 53-95 Merchant SN, Nadol JB, and Schuknecht HF Schuknecht's pathology of the ear McGraw-Hill Medical ; McGraw-Hill [distributor] New York; London*.
45. Fuchs PA, Glowatzki E, and Moser T (2003) *The afferent synapse of cochlear hair cells*. Curr Opin Neurobiol 13: 452-458.
46. Liberman CM, Rosowski JJ, and F. LR (2010) *Physiology and Pathophysiology 97-134 Merchant SN, Nadol JB, and Schuknecht HF Schuknecht's pathology of the ear McGraw-Hill Medical ; McGraw-Hill [distributor] New York; London*.
47. Zidanic M and Brownell WE (1990) *Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current*. Biophys J 57: 1253-1268.
48. Hibino H, Horio Y, Inanobe A, Doi K, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kawamura M, Kubo T, and Kurachi Y (1997) *An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4. 1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential*. J Neurosci 17: 4711-4721.
49. Niermann H, Amiry-Moghaddam M, Holthoff K, Witte OW, and Ottersen OP (2001) *A novel role of vasopressin in the brain: modulation of activity-dependent water flux in the neocortex*. J Neurosci 21: 3045-3051.
50. Amiry-Moghaddam M and Ottersen OP (2003) *The molecular basis of water transport in the brain*. Nat Rev Neurosci 4: 991-1001.
51. Verbavatz JM, Ma T, Gobin R, and Verkman AS (1997) *Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4*. J Cell Sci 110 (Pt 22): 2855-2860.
52. Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, and Ottersen OP (1998) *Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes*. J Neurosci 18: 2506-2519.
53. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, and Ottersen OP (1997) *Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-*

- resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain.* J Neurosci 17: 171-180.
54. Puwarawuttipanit W, Bragg AD, Frydenlund DS, Mylonakou MN, Nagelhus EA, Peters MF, Kotchabhakdi N, Adams ME, Froehner SC, Haug FM, Ottersen OP, and Amiry-Moghaddam M (2006) *Differential effect of α -syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice.* Neuroscience 137: 165-175.
 55. Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, Wertz K, Stodkilde-Jorgensen H, Sulyok E, Doczi T, Neely JD, Agre P, Frokiaer J, and Nielsen S (2002) *Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13131-13136.
 56. Wertz K and Fuchtbauer EM (1998) *Dmd(mdx-beta geo): a new allele for the mouse dystrophin gene.* Dev Dyn 212: 229-241.
 57. Waite A, Brown SC, and Blake DJ (2012) *The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease.* Trends Neurosci 35: 487-496.
 58. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, and Kunkel LM (1987) *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals.* Cell 50: 509-517.
 59. Blake DJ, Weir A, Newey SE, and Davies KE (2002) *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle.* Physiol Rev 82: 291-329.
 60. Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, and Barnard PJ (1992) *Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters.* Hum Mol Genet 1: 505-510.
 61. Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, and Beesley PW (1999) *Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia.* J Cell Biol 147: 645-658.
 62. Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH, and Davies KE (1992) *Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells.* Hum Mol Genet 1: 103-109.
 63. Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, and Froehner SC (1993) *Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution.* Neuron 11: 531-540.
 64. Ahn AH, Yoshida M, Anderson MS, Feener CA, Selig S, Hagiwara Y, Ozawa E, and Kunkel LM (1994) *Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24.* Proc Natl Acad Sci U S A 91: 4446-4450.
 65. Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, and Nigro V (2000) *Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells.* J Biol Chem 275: 15851-15860.
 66. Butler MH, Douville K, Murnane AA, Kramarcy NR, Cohen JB, Sealock R, and Froehner SC (1992) *Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein.* J Biol Chem 267: 6213-6218.
 67. Kachinsky AM, Froehner SC, and Milgram SL (1999) *A PDZ-containing Scaffold Related to the Dystrophin Complex at the Basolateral Membrane of Epithelial Cells.* The Journal of Cell Biology 145: 391-402.
 68. Albrecht DE and Froehner SC (2002) *Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses.* Neurosignals 11: 123-129.
 69. Connors NC, Adams ME, Froehner SC, and Kofuji P (2004) *The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia.* J Biol Chem 279: 28387-28392.

70. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, and Campbell KP (1992) *Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix*. *Nature* 355: 696-702.
71. Kanagawa M, Saito F, Kunz S, Yoshida-Moriguchi T, Barresi R, Kobayashi YM, Muschler J, Dumanski JP, Michele DE, Oldstone MB, and Campbell KP (2004) *Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan*. *Cell* 117: 953-964.
72. Bowe MA, Deyst KA, Leszyk JD, and Fallon JR (1994) *Identification and purification of an agrin receptor from torpedo postsynaptic membranes: A heteromeric complex related to the dystroglycans*. *Neuron* 12: 1173-1180.
73. Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, and Campbell KP (1994) *Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 13729-13732.
74. Ervasti J and Campbell K (1993) *A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin*. *The Journal of Cell Biology* 122: 809-823.
75. Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K, and Südhof TC (2001) *A stoichiometric complex of neuroligins and dystroglycan in brain*. *The Journal of Cell Biology* 154: 435-446.
76. Peng HB, Ali AA, Daggett DF, Rauvala H, Hassell JR, and Smalheiser NR (1998) *The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction*. *Cell Communication and Adhesion* 5: 475-489.
77. Di Stasio E, Sciandra F, Maras B, Di Tommaso F, Petrucci TC, Giardina B, and Brancaccio A (1999) *Structural and Functional Analysis of the N-Terminal Extracellular Region of β -Dystroglycan*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266: 274-278.
78. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, and Campbell KP (1995) *Identification and Characterization of the Dystrophin Anchoring Site on β -Dystroglycan*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27305-27310.
79. Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, and Jucker M (1996) *Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells*. *Eur J Neurosci* 8: 2739-2747.
80. Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, and Lindenbaum M (1995) *Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin*. *J Neurosci Res* 42: 528-538.
81. Macdonald PR, Lustig A, Steinmetz MO, and Kammerer RA (2010) *Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions*. *Journal of Structural Biology* 170: 398-405.
82. Suzuki N, Yokoyama F, and Nomizu M (2005) *Functional sites in the laminin alpha chains*. *Connect Tissue Res* 46: 142-152.
83. Eriksdotter-Nilsson M, Björklund H, and Olson L (1986) *Laminin immunohistochemistry: a simple method to visualize and quantitate vascular structures in the mammalian brain*. *Journal of Neuroscience Methods* 17: 275-286.
84. Satoh H, Kawasaki K, Kihara I, and Nakano Y (1998) *Importance of type IV collagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan in the regulation of labyrinthine fluid in the rat cochlear duct*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 285-288.

85. Nitkin RM, Smith MA, Magill C, Fallon JR, Yao YM, Wallace BG, and McMahan UJ (1987) *Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ*. J Cell Biol 105: 2471-2478.
86. McMahan UJ (1990) *The Agrin Hypothesis*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 55: 407-418.
87. Barber AJ and Lieth E (1997) *Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier*. Dev Dyn 208: 62-74.
88. Wolburg H, Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack A, and Fallier-Becker P (2009) *Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier*. Neuroscientist 15: 180-193.
89. Rupp F, Ozcelik T, Linial M, Peterson K, Francke U, and Scheller R (1992) *Structure and chromosomal localization of the mammalian agrin gene*. J Neurosci 12: 3535-3544.
90. Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, and Carbonetto S (1994) *Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor*. Cell 77: 675-686.
91. Bezakova G and Ruegg MA (2003) *New insights into the roles of agrin*. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 295-308.
92. Stone DM and Nikolics K (1995) *Tissue- and age-specific expression patterns of alternatively spliced agrin mRNA transcripts in embryonic rat suggest novel developmental roles*. J Neurosci 15: 6767-6778.
93. Fuerst PG, Rauch SM, and Burgess RW (2007) *Defects in eye development in transgenic mice overexpressing the heparan sulfate proteoglycan agrin*. Dev Biol 303: 165-180.
94. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, and Kunkel LM (1997) *Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 12413-12418.
95. Perronnet C and Vaillend C (2010) *Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies*. J Biomed Biotechnol 2010: 849426.
96. Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, and Kunkel LM (1996) *Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane*. Hum Mol Genet 5: 489-496.
97. Rees ML, Lien CF, and Gorecki DC (2007) *Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues*. Neuromuscul Disord 17: 123-134.
98. Lien CF, Hazai D, Yeung D, Tan J, Fuchtbauer EM, Jancsik V, and Gorecki DC (2007) *Expression of alpha-dystrobrevin in blood-tissue barriers: sub-cellular localisation and molecular characterisation in normal and dystrophic mice*. Cell Tissue Res 327: 67-82.
99. Lien CF, Vlachouli C, Blake DJ, Simons JP, and Górecki DC (2004) *Differential spatio-temporal expression of alpha-dystrobrevin-1 during mouse development*. Gene Expression Patterns 4: 583-593.
100. Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, and Rendon A (2000) *Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins*. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 294-304.
101. Collins BJ, Gorelick G, and Schneider AB (2001) *Dystroglycan is present in rat thyroid and rat thyroid cells and responds to thyrotropin*. Endocrinology 142: 3152-3162.
102. Rauch SM, Huen K, Miller MC, Chaudry H, Lau M, Sanes JR, Johanson CE, Stopa EG, and Burgess RW (2011) *Changes in brain beta-amyloid deposition*

- and aquaporin 4 levels in response to altered agrin expression in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 1124-1137.
103. Rurak J, Noel G, Lui L, Joshi B, and Moukhles H (2007) *Distribution of potassium ion and water permeable channels at perivascular glia in brain and retina of the Largemyd mouse*. *Journal of Neurochemistry* 103: 1940-1953.
 104. Nicchia GP, Rossi A, Nudel U, Svelto M, and Frigeri A (2008) *Dystrophin-dependent and -independent AQP4 pools are expressed in the mouse brain*. *Glia* 56: 869-876.
 105. Woodward Hopf F and Steinhardt RA (1992) *Regulation of intracellular free calcium in normal and dystrophic mouse cerebellar neurons*. *Brain Research* 578: 49-54.
 106. Mallouk N, Jacquemond V, and Allard B (2000) *Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4950-4955.
 107. Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, and Fritschy JM (2004) *The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCS) in the choroid plexus and microvasculature of the brain*. *Neuroscience* 129: 403-413.
 108. Baby SM, Bogdanovich S, Willmann G, Basu U, Lozynska O, and Khurana TS (2010) *Differential Expression of Utrophin-A and -B Promoters in the Central Nervous System (CNS) of Normal and Dystrophic mdx Mice*. *Brain Pathology* 20: 323-342.
 109. Perronnet C, Chagneau C, Le Blanc P, Samson-Desvignes N, Mornet D, Laroche S, De La Porte S, and Vaillend C (2012) *Upregulation of brain utrophin does not rescue behavioral alterations in dystrophin-deficient mice*. *Hum Mol Genet* 21: 2263-2276.
 110. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, and Davies KE (1997) *Utrophin-Dystrophin-Deficient Mice as a Model for Duchenne Muscular Dystrophy*. *Cell* 90: 717-727.
 111. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, and Sanes JR (1997) *Skeletal and Cardiac Myopathies in Mice Lacking Utrophin and Dystrophin: A Model for Duchenne Muscular Dystrophy*. *Cell* 90: 729-738.
 112. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, and Duan D (2015) *Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy*. *Disease Models and Mechanisms* 8: 195-213.
 113. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/3234> [Zugriff: 22.09.16]
 114. Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnya O, and Campbell KP (1997) *Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice*. *Hum Mol Genet* 6: 831-841.
 115. Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, and Campbell KP (2002) *Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy*. *Nature* 418: 422-425.
 116. Sciandra F, Bigotti MG, Giardina B, Bozzi M, and Brancaccio A (2015) *Genetic Engineering of Dystroglycan in Animal Models of Muscular Dystrophy*. *Biomed Res Int* 2015: 635792.
 117. Takahashi M and Hokunan K (1992) *Localization of type IV collagen and laminin in the guinea pig inner ear*. *The Annals of otology, rhinology & laryngology*. Supplement 157: 58-62.
 118. Rodgers KD, Barritt L, Miner JH, and Cosgrove D (2001) *The laminins in the murine inner ear: developmental transitions and expression in cochlear basement membranes*. *Hearing Research* 158: 39-50.

119. Alpy F, Jivkov I, Sorokin L, Klein A, Arnold C, Huss Y, Kedinger M, Simon-Assmann P, and Lefebvre O (2005) *Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene*. *Genesis* 43: 59-70.
120. Pillers D-AM, Kempton JB, Duncan NM, Pang J, Dwinnell SJ, and Trune DR (2002) *Hearing loss in the laminin-deficient dy mouse model of congenital muscular dystrophy*. *Molecular Genetics and Metabolism* 76: 217-224.
121. Aumailley M (2013) *The laminin family*. *Cell Adh Migr* 7: 48-55.
122. Hohenester E, Tisi D, Talts JF, and Timpl R (1999) *The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin*. *Mol Cell* 4: 783-792.
123. Kuang W, Xu H, Vachon PH, Liu L, Loechel F, Wewer UM, and Engvall E (1998) *Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models*. *Journal of Clinical Investigation* 102: 844-852.
124. Moll J, Barzaghi P, Lin S, Bezakova G, Lochmuller H, Engvall E, Muller U, and Ruegg MA (2001) *An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy*. *Nature* 413: 302-307.
125. Enger R, Gundersen GA, Haj-Yasein NN, Eilert-Olsen M, Thoren AE, Vindedal GF, Petersen PH, Skare O, Nedergaard M, Ottersen OP, and Nagelhus EA (2012) *Molecular scaffolds underpinning macroglial polarization: an analysis of retinal Muller cells and brain astrocytes in mouse*. *Glia* 60: 2018-2026.
126. Nicchia GP, Cogotzi L, Rossi A, Basco D, Brancaccio A, Svelto M, and Frigeri A (2008) *Expression of multiple AQP4 pools in the plasma membrane and their association with the dystrophin complex*. *J Neurochem* 105: 2156-2165.
127. Vajda Z, Pedersen M, Doczi T, Sulyok E, and Nielsen S (2004) *Studies of mdx mice*. *Neuroscience* 129: 991-996.

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Studie wurde von Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser konzipiert und durch diese am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen betreut.

a) Aufschlüsselung nach Abbildungen:

Die Versuche, die in den Abbildungen 1, 4-7 und 10-17 dargestellt sind, habe ich, Andreas Peter Wagner, nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser durchgeführt und war an der Konzeption dieser beteiligt. Weiter habe ich die dafür benötigte Daten-Recherche und den Primer-Entwurf (Tabelle 1-2) selbstständig durchgeführt.

Die Versuche der Abbildungen 8 und 9 wurden von Frau Lidia Garcia-Pradas durchgeführt und von mir im Vorfeld konzipiert - Recherche der TaqMan® Sonden (Tabelle 3).

b) Aufschlüsselung nach Art der Versuche:

Die Dekapitation und Feinpräparation der Felsenbeine der Ratte wurden von Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser durchgeführt. Die E nukleation und Feinpräparation des Bulbus oculi der Ratte wurde von mir durchgeführt. Die Extraktion der RNA des Gewebes aus der Ratte (*Ductus cochlearis (DC)* und *Retina*) und Umsetzung in cDNA wurden von mir und von Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser durchgeführt. Die Aufarbeitung der Felsenbeine und *Retina* der Ratte für die immunhistochemische Analyse geschah durch mich und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser.

Die Extraktion der humanen Gewebe (*DC* und *Retina*) wurden von Professor Dr. med. Bernhard Hirt und mir konzipiert und durchgeführt. Die Entnahme des humanen *Ductus cochlearis*, der in dieser Studie verwendet wurde, geschah dabei durch mich. Humanes *Retina*-Gewebe wurde von Professor Dr. med. Bernhard Hirt entnommen und weiter feinpräpariert. Die Extraktion der RNA aus humanem *DC* sowie humaner *Retina* und die Umsetzung in cDNA wurden mir und von Frau Dr. Corinna Gleiser durchgeführt. Die Aufarbeitung des humanen

Ductus cochlearis für die immunhistochemische Analyse wurden von mir und von Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser durchgeführt.

Die Primer der RT-PCR wurden von mir entworfen beziehungsweise recherchiert und diese von mir an cDNA der Ratte durchgeführt. Die TaqMan® Sonden der humanen qPCR-Versuche wurden mir recherchiert und der Versuch anschließend von Frau Lidia Garcia Pradas durchgeführt.

Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen von *Ductus cochlearis* des Menschen und die cLSM-Aufnahme dieser geschahen durch mich. Die weitere immunhistochemische Färbung und Aufnahme des *Ductus cochlearis* der Ratte sowie *Retina* der Ratte wurden ebenfalls von mir mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Zuvor wurden die aufgearbeiteten und eingebetteten Gewebe (*DC* und *Retina*) von mir geschnitten und auf Objektträger aufgezogen.

Ich versichere hiermit, dass ich das Manuskript selbstständig verfasst habe und keine zusätzlichen Quellen als die von mir in dieser Arbeit angegebenen verwendet habe. Professor Dr. med. Bernhard Hirt und Frau Dr. med. Corinna Gleiser haben diese Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Tübingen, den

Andreas Peter Wagner