

Aus dem Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

Untersuchungen zur Expression von Aquaporin-4
Isoformen mit Modifikation am C-Terminus im
Ductus cochlearis der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sigg, Florian

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Rüttiger

Tag der Disputation: 02.05.2019

Meinen Eltern in

Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Anatomische Grundlagen des auditiven Systems	3
1.2.1 Makroskopische Anatomie der Cochlea.....	3
1.2.2 Mikroskopische Anatomie des <i>Ductus cochlearis</i>	4
1.3 Physiologische Grundlagen des auditiven Systems	6
1.4 Aquaporine.....	8
1.4.1 Grundlagen der Aquaporine.....	8
1.4.2 Aquaporin 4.....	10
1.4.3 Aquaporin 4 im <i>Ductus cochlearis</i> der Ratte	12
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Tiere und Gewebeproben.....	16
2.2 Molekularbiologische Untersuchungen.....	17
2.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben für molekularbiologische Untersuchungen inklusive Isolierung von RNA	17
2.2.2 3'RACE-PCR zum Screening nach putativen AQP4 mRNA- Transkripten mit Modifikation am 3'-Ende in Cochlea, Cerebellum und Retina	18
2.2.3 RT-PCR zur Validierung der in der 3'RACE-PCR identifizierten AQP4-Isoformen mit Modifikation am 3'Terminus mit neu- generierten Primern	21
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	22
	IV

2.2.5	Isolierung und Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarosegelen.....	23
2.2.6	TOPO-TA Klonierung der extrahierten PCR-Produkte	23
2.2.7	Glycerin-Dauerkulturen	24
2.2.8	Sequenzierung und Analyse der klonierten PCR-Produkte	24
2.2.9	Theoretisierung der neuen AQP4-Isoformen	25
2.3	Immunmarkierungen des <i>Ductus cochlearis</i>	25
2.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben.....	25
2.3.2	Antikörper.....	26
2.3.3	Färbeprotokoll und Mikroskopische Analyse.....	27
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....	29
3.1.1	3'RACE-PCR zum Screening nach putativen AQP4 mRNA-Transkripten mit Modifikation am 3' Ende	29
3.1.2	Sequenzanalyse der TOPO-TA klonierten 3'RACE-Produkte von 450 und 600 Basenpaaren	31
3.1.3	RT-PCR zur Validierung der über 3'RACE-PCR identifizierten, AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Ende.....	36
3.1.4	Sequenzanalyse der TOPO-TA klonierten RT-PCR-Produkte	37
3.1.5	Theoretisierung der Full-Length AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus	39
3.1.6	Theoretisierung der aus den 3' modifizierten AQP4 mRNA-Transkripten resultierenden Proteinen	43
3.2	Ergebnisse der Immunmarkierungen des <i>Ductus cochlearis</i> der adulten Ratte (p32)	47
3.2.1	Immunmarkierung des DC mit einem Anti-AQP4-Antikörper, der eine Spezifität für ein Epitop am N-Terminus der AQP4 M1-Isoform aufweist (Anti-AQP4-NT).....	47

3.2.2	Immunmarkierung des <i>DC</i> mit zwei Anti-AQP4-Antikörpern, von denen einer eine Spezifität für ein Epitop am C-Loop von AQP4 (Anti-AQP4-C-Loop), der andere eine Spezifität für ein Epitop am C-Terminus von AQP4 (Anti-AQP4-CT) aufweist.....	48
3.2.3	Immunmarkierungen mit Anti-AQP4-CT, Anti-AQP4-C-Loop sowie Anti-AQP4-NT in Kontrollgewebe der Retina der adulten Ratte (p32)	49
4	DISKUSSION	50
4.1	Die Expression von neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus in den Stützzellen der sensorischen Domäne des <i>Ductus cochlearis</i> der Ratte	50
4.2	Struktur, Funktion und Regulation der neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus.....	58
4.3	Die klinische Relevanz der neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus.....	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	65
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	74
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	77
9	ANHANG	78
10	DANKSAGUNG	92

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines midmodiolaren Schnittes durch den *Ductus cochlearis*. Abbildung modifiziert nach (Hirt et al., 2011) 5

Abbildung 2: Schematische Auflistung aller bekannten AQP4-Isoformen in DNA-, mRNA- und Protein-Form. Abbildung in Anlehnung und modifiziert nach (Moe et al., 2008)..... 11

Abbildung 3: Vergleich der Bindungsmöglichkeiten von Anti-AQP4-CT- und Anti-AQP4-NT-Antikörpern an einer potenziell neuen AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus sowie der bekannten M1-Isoform..... 14

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schritte einer 3'RACE-PCR 19

Abbildung 5: Bindungsstellen der neu generierten Primerpaare zur Validierung der modifizierten AQP4 mRNA-Transkripte.. 22

Abbildung 6: Bindungsstellen der verwendeten Anti-AQP4-Antikörper 27

Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophoresen von Amplifikaten nach 3'RACE-PCR mit AQP4-spezifischen Vorwärtsprimern „GSP1“ bzw. „GSP2“ zum Screening nach neuen mRNA-Transkripte mit Modifikation am 3'Ende 30

Abbildung 8: Ausschnitt des Sequenzalignments der klassischen M1-Isoform (NM_012825.4) mit den kurzen RACE-Produkten von 450 Basenpaaren..... 31

Abbildung 9: Ausschnitt des Sequenzalignments der klassischen M1-Isoform (NM_012825.4) mit den langen RACE-Produkten von 600 Basenpaaren..... 32

Abbildung 10: Charakteristika der über 3' RACE-PCR identifizierten AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3' Terminus	33
Abbildung 11: Übereinstimmung der Sequenzen des kurzen mRNA-Transkriptes (458 bp) mit einer „Predicted_AQP4_Isoform_X2“	35
Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese (3%) von Amplifikaten nach RT-PCR mit neu generierten Primerpaaren zur Validierung der AQP4 mRNA-Transkripte.....	36
Abbildung 13: Charakteristika der über RT-PCR bestätigten AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus	38
Abbildung 14: Full-Length Modell des kurzen AQP4 mRNA-Transkriptes mit modifiziertem 3'Terminus	40
Abbildung 15: Full-Length Modell des langen AQP4 mRNA-Transkriptes mit modifiziertem 3'Terminus	42
Abbildung 16: Theoretisierung der neuen AQP4-C2X-Isoform der Ratte	44
Abbildung 17: Theoretisierung der neuen AQP4-C1X-Isoform der Ratte	46
Abbildung 18: Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-NT (rot) der adulten Ratte (p32).....	47
Abbildung 19: Immunmarkierung des DC der adulten Ratte mit Anti-AQP4-C-Loop (rot) und Anti-AQP4-CT (grün).....	48
Abbildung 20: Immunmarkierungen mit Anti-AQP4-CT, Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-NT in Kontrollgewebe der Retina der adulten Ratte	49

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Primer für 3'RACE-PCR. 20

Tabelle 2: PCR-Protokoll der 3'RACE-PCR 20

Tabelle 3: Eigenschaften der neu generierten Primerpaare zur Validierung
der modifizierten AQP4-Transkripte über eine RT-PCR 22

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für Immunmarkierungen des
DC..... 28

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius (Temperatureinheit)
%	Symbol für Prozent
3'RACE	Verfahren zur schnellen Amplifikation von 3'Enden
3'UTR	3' untranslatierter Bereich der mRNA (untranslated region)
5'RACE	Verfahren zur schnellen Amplifikation von 5'Enden
5'UTR	5' untranslatierter Bereich der mRNA (untranslated region)
α-helikale	rechtshändige Spirale (Protein-Sekundärstruktur)
AP	Adapterprimer
AS	Aminosäure
AQP	Aquaporin (Wasserkanal)
ÄHZ	Äußere Haarzelle
ÄPZ	Äußere Pfeilerzelle
ÄSZ	Äußere Sulkuszelle
AUAP	Abridged Universal Amplification Primer
bp	Basenpaare
BW	Baden-Württemberg
cDNA	komplementäre DNA
CDS	codierender Sequenzabschnitt (coding sequence)
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
CO ₂	Summenformel für Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy (COOH-) terminale Region
CZ	Claudiuszelle
DC	<i>Ductus cochlearis</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	steriles destilliertes Wasser
DNase	Desoxyribonuklease
Dr.	Doktor
dT	deoxy-Thymin
DZ	Deiters-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E. Coli.....	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
FKGV	Phenylalanin-Lysin-Glycin-Valin (Aminosäuren)
GI	Gastrointestinal (Magen-Darm)
GSP.....	Genspezifischer Primer
H ₂ O.....	Summenformel von Wasser
HCl	Summenformel für Salzsäure
HZ	Hensen-Zelle
IDZ	Interdentalzellen
IHZ	Innere Haarzelle
IPhZ.....	Innere Phalangenzelle
IPZ.....	Innere Pfeilerzelle
ISZ med.....	mediale Innere Sulkuszelle
ISZ lat.....	laterale Innere Sulkuszelle
K ⁺	Kalium-Ion
KCNQ.....	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
KCl	Summenformel für Kaliumchlorid
kDa.....	Kilodalton (Atomare Masseneinheit)
K _{ir}	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (inward rectifier)
l	Liter
LB.....	Nährmedium (lysogeny broth)
LI	Leucin-Isoleucin (Aminosäuren)
MALDI	Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung
MALDI-TOF	Methode der Massenanalyse chemischer Verbindungen
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ml	Milliliter
mRNA.....	messenger-RNA (Boten-RNA)
mV	Millivolt (Spannung)
NaCl	Summenformel für Natriumchlorid
NCBI.....	Nationales Center für Biotechnologie Information

NDS.....	Pufferlösung aus EDTA, TRIS und Sarkosyl
NPA.....	Asparagin-Prolin-Alanin (Aminosäuren)
N-Terminus.....	Amino (NH ₂ -) terminale Region
OPK.....	orthogonale Partikelkomplexe
p32.....	postnataler Tag 32
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH.....	Maß für sauren oder basischen Charakter
PKA.....	Proteinkinase-A
PKC.....	Proteinkinase-C
pmol.....	Picomol
RACE.....	rapid amplification of cDNA-ends
RM.....	Reissner-Membran
RNA.....	Ribonukleinsäure
RNase.....	Ribonuklease
RP.....	Regierungspräsidium
RT.....	Reverse-Transkriptase
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
SNP.....	Einzelnukleotid-Polymorphismus
S.O.C.....	Nährmedium
SV.....	<i>Stria vascularis</i>
TAE.....	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq.....	<i>Thermus aquaticus</i>
TierSchG.....	Tierschutzgesetz
TOF.....	Flugzeitanalyse (time of flight)
TRIS.....	Trishydroxymethylaminomethan
TRT.....	translational readthrough (Überlesen des Stoppcodon)
UV.....	Ultraviolett
µg.....	Mikrogramm
µl.....	Mikroliter
µm.....	Mikrometer
ZNS.....	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Das menschliche Gehör ist eines unserer komplexesten Sinnesorgane und ermöglicht zusammen mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) die Wahrnehmung von Schall in Form von Tönen, Sprache oder Musik. Grundlage hierfür ist die Umwandlung von mechanischen Wellen in neuroelektrische Signale. Dieser Mechanismus ist unter dem Begriff der mechano-sensorischen Transduktion bekannt und findet innerhalb der Cochlea am Corti-Organ statt (Hudspeth, 1989, Corey and Hudspeth, 1979). Während diesem Prozess kommt es zu einer Anhäufung von Kalium (K^+) in der direkten Umgebung der Haarsinneszellen (Johnstone and Sellick, 1972). Zur Regulation der Ionenkonzentration folgt unter anderem über den Kanal $K_{ir} 4.1$ eine Aufnahme des Kaliums in die Stützzellen des *Ductus cochlearis* (DC). Im Rahmen dieser Ionenströme entsteht ein osmotischer Stress, der durch neutralisierende Wasserflüsse reduziert werden muss (Eckhard et al., 2012b, Li and Verkman, 2001).

Wie in den Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und der Netzhaut (Retina) erfolgt die Regulation dieser Kalium- und Volumenhomöostase im DC über das kolokalisierte Kanalsystem $K_{ir} 4.1$ und AQP4 (Gleiser et al., 2016, Eckhard et al., 2012b, Haj-Yasein et al., 2015, Hibino et al., 1997, Nagelhus et al., 1999, Nagelhus et al., 2004, Eckhard, 2012). Pathophysiologische Symptome sowohl bei AQP4-Knockout Mäusen als auch bei Menschen mit Einzelnukleotid-Polymorphismen im AQP4-Gen verdeutlichen die zentrale Bedeutung des Wasserkanals im Hörprozess. In beiden Fällen lassen sich eine deutliche Hörbeeinträchtigung, teils sogar völlige Taubheit feststellen (Li and Verkman, 2001, Nicchia et al., 2011). Interessanterweise konnte speziell für die Stützzellen der sensorischen Domäne bisher keine Expression von AQP4 gezeigt werden (Eckhard et al., 2012b, Takumi et al., 1998, Hirt et al., 2011, Mhatre et al., 2002, Huang et al., 2002). Diese Zellen befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den Haarzellen und werden so im Rahmen der mechano-sensorischen Transduktion

mit hohen K^+ -Konzentrationen konfrontiert, was einen besonders starken osmotischen Stress zur Folge hat. Analog den Gliazellen des ZNS (Astrozyten) sowie der Retina (Müller-Zellen), welche unmittelbar neben exzitatorischen Zellen lokalisiert sind und zur Regulation der gekoppelten Kalium- und Volumenhomöostase das Kanalsystem aus $K_{ir} 4.1$ und AQP4 exprimieren, würde man gerade hier am Ort der Transduktion das Vorkommen des Wasserkanals vermuten (Gleiser et al., 2016, Eckhard, 2012, Gleiser, 2012). Das fehlende Signal von AQP4 in den Stützzellen der sensorischen Domäne (Eckhard et al., 2012b) steht damit im Gegensatz zu den Regulationsmechanismen des „ K^+ - Spatial Buffering“ im ZNS (Nagelhus et al., 2004, Orkand et al., 1966) bzw. dem „ K^+ -Siphoning“ (Nagelhus et al., 1999, Newman et al., 1984) der Retina (Gleiser et al., 2016, Gleiser, 2012).

Ein besonderes Charakteristikum von AQP4 ist das Vorkommen zahlreicher Isoformen (Moe et al., 2008, De Bellis et al., 2014, De Bellis et al., 2017). Innerhalb der Familie der Aquaporine handelt es sich um eine sehr heterogene Untergruppe. Neben den vorwiegend bekannten AQP4-Isoformen mit modifiziertem N-Terminus bei gleichem COOH-Ende, konnte kürzlich auch eine Isoform mit verändertem C-Terminus identifiziert werden (De Bellis et al., 2017). Alle bisher publizierten Immunmarkierungen im *DC* sind mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper durchgeführt worden, der gegen eine spezifische Region am C-Terminus von AQP4 gerichtet ist. Im Rahmen zweier Dissertationsarbeiten konnte bei Immunmarkierungen des *DC* mit Hilfe eines neu generierten Antikörpers gegen den N-Terminus der AQP4 M1-Isoform erstmals ein Signal von AQP4 in den Stützzellen des Corti-Organs nachgewiesen werden (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012). Auf Grund der Tatsache, dass diese Signale mit den kommerziellen Antikörpern nicht detektiert werden konnten, liegt die Vermutung nach einer weiteren AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus nahe.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Immunmarkierungen in den Stützzellen der sensorischen Domäne des Corti-Organs der Ratte das Korrelat einer echten, neuen AQP4-Isoform mit

modifiziertem C-Terminus sein können oder ob es sich lediglich um posttranslationale Modifikationen der bekannten AQP4-Untergruppe handelt.

In den folgenden Kapiteln sollen zunächst die anatomischen (Kapitel 1.2) und physiologischen Grundlagen (Kapitel 1.3) der Cochlea dargestellt werden. Nach einer Einführung in das Thema Aquaporine, insbesondere den Subtyp AQP4 und dessen Funktion und Vorkommen im *DC* (Kapitel 1.4) soll zum Schluss die genaue Zielsetzung und der Aufbau der vorliegenden Arbeit geschildert werden (Kapitel 1.5).

1.2 Anatomische Grundlagen des auditiven Systems

1.2.1 Makroskopische Anatomie der Cochlea

Die Cochlea (Gehörschnecke) verfügt über die strukturelle Ausstattung zur Umwandlung von Schallwellen in neuronale Signale und wird deshalb im engeren Sinne als das eigentliche Hörorgan betrachtet (Welsch, 2010). Als Teil des Innenohres befindet sie sich im mittleren, vorderen Abschnitt eines mit Periost ausgekleideten Hohlraumsystems im Felsenbein (*Pars petrosa ossis temporalis*), dem sogenannten knöchernen Labyrinth (*Labyrinthus osseus*) (Drenckhahn, 2004). Die Cochlea selbst ist ein ca. 35 mm langes knöchernes Rohr (*Canalis spiralis cochlea*), welches sich in mehreren übereinanderliegenden Windungen spiralförmig um eine Längsachse (*Modiolus*) anordnet und so der Form eines Schneckenhauses gleicht (Lüllmann-Rauch, 2006). Grundsätzlich lässt sich der *Canalis spiralis cochlea* in drei unterschiedliche Räume gliedern - *Scala vestibuli*, *Scala media* bzw. *DC* und *Scala tympani* (Lüllmann-Rauch, 2006). Der *DC* ist der cochleäre Anteil des allseitig umschlossenen häutigen Gangsystems (*Labyrinthus membranaceus*) welches mit Endolymphe gefüllt und in das knöcherne Labyrinth eingebettet ist (Drenckhahn, 2004). *Scala tympani* und *Scala vestibuli* sind jeweils mit Perilymphe gefüllt und füllen den Raum zwischen *DC* und der knöchernen Schneckenkapsel. Die *Scala vestibuli* wird an der Schneckenbasis durch eine Membran (ovales Fenster) zum Mittelohr hin abgeschlossen und steht über den in diese Membran eingelassenen Steigbügel in Kontakt zum beweglichen Trommelfell (Drenckhahn, 2004). *Scala tympani* und

Scala vestibuli sind an der Spitze der Gehörschnecke über das *Helicotrema* verbunden (Lüllmann-Rauch, 2006). Die *Scala tympani* ist wiederum zum Mittelohr hin durch eine Membran (rundes Fenster) verschlossen (Drenckhahn, 2004).

1.2.2 Mikroskopische Anatomie des *Ductus cochlearis*

Der *Ductus cochlearis* (*DC*, *Scala media*) ist ein in sich abgeschlossener Raum, der mit kaliumreicher Endolymphe gefüllt ist und das auditive Sinnesepithel in Form des Corti-Organs beinhaltet. Im histologischen Querschnitt lassen sich, bedingt durch die Form, grundsätzlich drei Abschnitte differenzieren (Drenckhahn, 2004). Erstens der laterale Abschnitt mit der *Stria vascularis*, zweitens der vestibuläre Abschnitt mit der Reissner-Membran sowie drittens der tympanale Abschnitt mit dem Corti-Organ und der Basilarmembran.

Die laterale Wand der *Scala media* besteht aus dem bindegewebigen *Ligamentum spirale* und der bedeckenden *Stria vascularis*. Während das fibrozytenreiche Bindegewebe eine mechanische Verankerungsfunktion zwischen *DC* und dem Knochen der Cochlea darstellt (Drenckhahn, 2004), spielt die *Stria vascularis* eine zentrale Rolle bei der Bildung der Endolymphe und bei der Re-zirkulation des Kaliums aus dem Corti-Organ (Lüllmann-Rauch, 2006). Im vestibulären Wandabschnitt bildet die dünne Reissner-Membran das Dach des *DC* und trennt dadurch sowohl topografisch als auch funktionell *Scala vestibuli* und *Scala media* (Welsch, 2010). Im tympanalen Wandabschnitt bilden die mediale Knochenleiste (*Limbus spiralis*) und die von ihr entspringende, bewegliche Basilarmembran (*Membrana basilaris*), den Boden des *DC* (Lüllmann-Rauch, 2006). Am lateralen Ende erfolgt der Übergang in das *Ligamentum spirale* (Drenckhahn, 2004). Auf der Basilarmembran verankert, befindet sich das Corti-Organ, der eigentliche Ort der mechano-sensorischen Transduktion. Es stellt ein komplexes Konstrukt aus spezialisierten Sinneszellen (Haarzellen) und Stützzellen dar (siehe Abbildung 1).

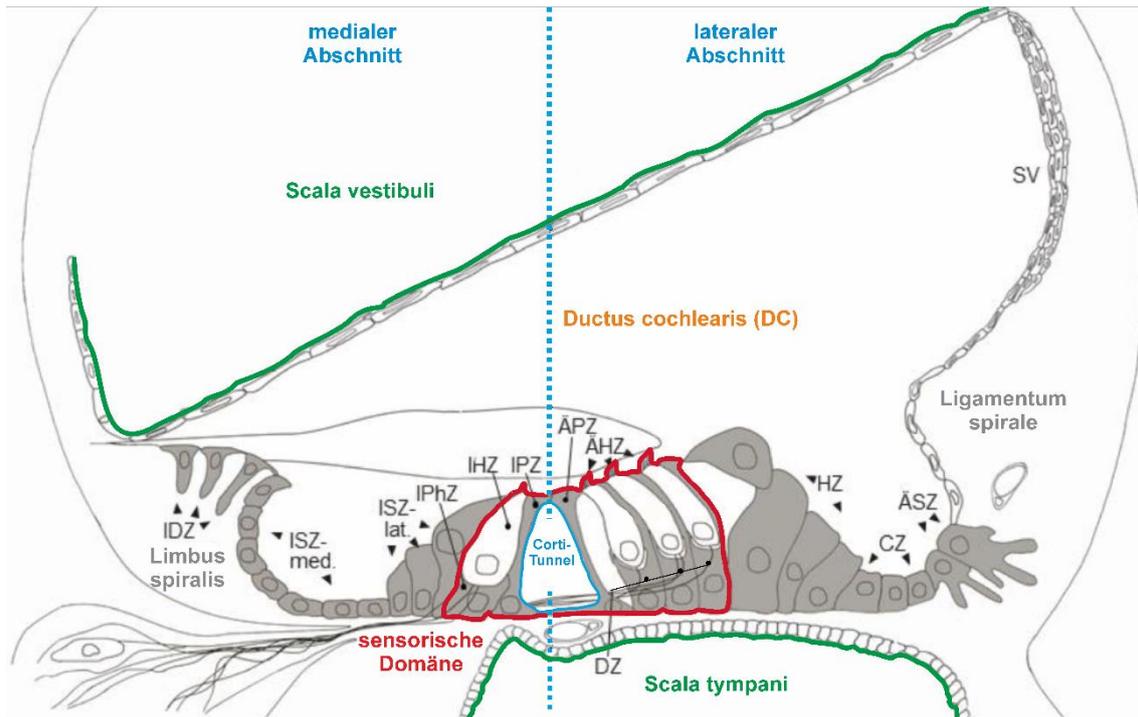


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines midmodiolaren Schnitts durch den *Ductus cochlearis*. Abbildung modifiziert nach (Hirt et al., 2011). Lateraler Wandabschnitt des DC bestehend aus *Ligamentum spirale* und *Stria vascularis* (SV). Vestibulärer Wandabschnitt mit Reissner-Membran (RM), welche das Dach des DC bildet und ihn zur *Scala vestibuli* abgrenzt. Der tympanale Wandabschnitt bildet mit der Basilarmembran, ausgehend vom *Limbus spiralis* mit den Interdentalzellen (IDZ), den Boden des DC und grenzt ihn zur *Scala tympani* ab. Aufsitzend auf der Basilarmembran die sensorische Domäne mit spezialisierten Haarzellen (IHZ: innere Haarzelle, ÄHZ: äußere Haarzellen) sowie den epithelialen Stützzellen (IPhZ: innere Phalangenzelle, IPZ: innere Pfeilerzelle, ÄPZ: äußere Pfeilerzelle, DZ: Deiters-Zellen). Medial flankierend die Epithelzellen des inneren Sulcus (ISZ), lateral die Hensenzellen (HZ), die Claudiuszellen (CZ) sowie die Zellen des Äußeren Sulcus (ÄSZ). Der Corti-Tunnel unterteilt das Corti-Organ in einen medialen und lateralen Teil.

Unter den Sinneszellen unterscheidet man innere und äußere Haarzellen. Bei den Stützzellen differenziert man zwischen Pfeilerzellen und Phalangenzellen. Die inneren und äußeren Pfeilerzellen haben vorwiegend mechanische Funktion und stützen das Corti-Organ (Drenckhahn, 2004). Insgesamt begrenzen sie einen Hohlraum, der als Corti-Tunnel bezeichnet wird und mit Corti-Lymphe (Perilymphe) gefüllt ist (Welsch, 2010). Ausgehend von diesem Tunnel werden Strukturen des Corti-Organ in mediale (innere) und laterale (äußere) Anteile unterteilt. Bei den Phalangenzellen differenziert man zwischen den einreihigen

inneren Phalangenzellen (IPhZ) und den drei- bis vierreihigen äußeren Phalangenzellen, die auch als Deiters-Zellen (DZ) bekannt sind (Drenckhahn, 2004). Diese Phalangenzellen erfüllen einerseits mechanische Stützfunktion für die jeweiligen Haarzellen, andererseits spielen sie eine Rolle beim Abtransport des Kaliums, welches während der mechanosensorischen Transduktion anfällt. Medial der inneren Haar- und Phalangenzellen schließt sich der innere Sulkus (*Sulcus spiralis internus*) an, welcher durch kubische Epithelzellen gebildet wird, die die Verbindung zu den Interdentalzellen des *Limbus spiralis* herstellen (Drenckhahn, 2004). Lateral der Deiters- und äußeren Haarzellen fungieren die Hensen-Zellen mit den nachfolgenden flachen, kubischen Claudius-Zellen als Kopplung zum äußeren ein- bis zweischichtigen Epithel des *Sulcus spiralis externus* welcher schließlich in die *Stria vascularis* übergeht (Drenckhahn, 2004). Neben dem bereits erwähnten Corti-Tunnel lassen sich noch zwei weitere mit Perilymphe (Corti-Lymphe) gefüllte Hohlräume im Aufbau des Corti-Organs erkennen. Zum einen ist dies der Nuel-Raum, der zwischen dem lateralen Anteil der äußeren Pfeilerzelle und der medialsten äußeren Haarzelle und deren Deiters-Zelle liegt, zum anderen der äußere Tunnel, der sich zwischen dem Kopffortsatz der lateralsten Deiters-Zelle und der medialsten Hensen-Zelle bildet (Drenckhahn, 2004). Funktionell wichtig ist die Tatsache, dass alle epithelialen Sinnes- und Stützzellen des *DC* durch spezielle Zell-Zell-Kontakte, *Tight Junctions*, untereinander verbunden sind und so einen in sich abgeschlossenen Flüssigkeitsraum bilden. Insbesondere entsteht auf diese Weise die für die Corti-Funktion wichtige Diffusionsbarriere zwischen Endolymphe im *DC* und Perilymphe im Nuel-Raum (Jahnke, 1975). Sie ermöglicht den physiologisch wichtigen Konzentrationsunterschied zwischen Endo- und Perilymphe, welcher zu einer Potenzialdifferenz von ca. 80mV zwischen *Scala media* und *Scala tympani* bzw. *Scala vestibuli* (Dallos, 1985, Oliver et al., 2003) führt, dem sogenannten endocochleären Potenzial.

1.3 Physiologische Grundlagen des auditiven Systems

Ein über die Ohrmuschel aufgenommenes Schallsignal wird über das Trommelfell, die Gehörknöchelchenkette und das ovale Fenster als mechanische

Welle an die mit Perilymphe gefüllte *Scala vestibuli* übertragen. Als Folge der Druckwelle wird die Basilarmembran einschließlich des aufsitzenden Corti-Organ in Schwingungen versetzt (Stenfelt, 2015). Dort erfolgt an den Haarzellen der sensorischen Domäne die eigentliche Transformation der mechanischen Druckwelle in ein neuronales Signal (Denk et al., 1995, Corey and Hudspeth, 1979). Dieser Umwandlungsprozess ist allgemein als mechano-sensorische Transduktion bekannt. Im engeren Sinne läuft der Mechanismus vorwiegend an den apikalen Oberflächendifferenzierungen der Haarzellen (Stereozilien) ab, die in direktem Kontakt mit der K⁺-reichen Endolymphe stehen (Bosher and Warren, 1968, Kimura, 1966). Da sich Tektorialmembran und Corti-Organ im Verlauf der Schwingungen gegeneinander bewegen, erfolgt eine Deflektion der Stereozilien. Der dabei über „Tip-Links“ übertragene Zug führt zu einer mechanischen Öffnung von assoziierten Kationenkanälen (Osborne et al., 1984, Pickles, 1985). In der Folge erfolgt anhand der Triebkraft des endocochleären Potenzials ein Fluss von K⁺-Ionen aus der Endolymphe in die Haarzellen (Kros, 1996). Diese Ionenverschiebung löst eine Depolarisation der Haarzelle aus, welche einerseits zur Erzeugung eines Generatorpotentials führt (Russell and Sellick, 1977), andererseits öffnen sich basolateral lokalisierte spannungsaktivierte K⁺-Kanäle des Typs KCNQ4 (Lang et al., 2007, Kubisch et al., 1999). Über diese strömen die eingeflossenen K⁺-Ionen aus den Haarzellen in die sie umgebende Corti- bzw. Perilymphe wieder ab und häufen sich dort an (Johnstone and Sellick, 1972). Es ist nachvollziehbar, dass sich durch diesen Prozess die sonst stark unterschiedlichen Ionenkonzentrationen von Endo- und Perilymphe auf Dauer ausgleichen würden. Die Folge wäre ein Zusammenbruch des endocochleären Potenzials, einer dadurch verminderten Triebkraft für K⁺-Ionen in die Haarzellen im Rahmen der mechano-sensorischen Transduktion mit resultierender Hörminderung (Zenner et al., 1994, Jentsch, 2000). Zur Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrationen muss daher ein kontinuierlicher Ab- und Weitertransport von Kalium aus der Corti-Lymphe erfolgen. Hierfür sind verschiedene Rezirkulationskonzepte über bestimmte Routen im *DC* beschrieben. Die erste Theorie schildert einen extraepithelialen Weg, bei dem das Kalium über die permeable *Membrana basilaris* in die *Scala tympani* diffundiert (Hibino et al.,

1997, Zidanic and Brownell, 1990, Salt and Ohyama, 1993, Mountain and Cody, 1999, Jahnke, 1980) und über das *Ligamentum spirale* in die *Stria vascularis* weitergeleitet wird (Spicer and Schulte, 1996, Weber et al., 2001). Die zweite Theorie schildert einen intraepithelialen Weg, bei dem die in die Corti-Lymphe freigesetzten K^+ -Ionen von den jeweils umgebenden Stützzellen aufgenommen und anschließend entlang einer medialen oder lateralen Route wieder der Endolymphe zugeführt werden (Spicer and Schulte, 1996, Spicer and Schulte, 1998). Molekulare Grundlage stellen zum einen porenbildende Komplexe aus *Connexinen*, sog. *Gap-Junctions*, dar, die das Stützzellepithel des DC zu einem *Synzytium* koppeln (Kikuchi et al., 1995, Kikuchi et al., 2000a). Die zweite wesentliche molekulare Grundlage stellt der Kaliumkanal $K_{ir} 4.1$ dar. Eine intrazelluläre Aufnahme von Kalium über diesen Kanal führt zwingenderweise zu einem osmotischen Stress der betroffenen Zelle (Li and Verkman, 2001). Dieser muss in logischer Konsequenz durch Wasserflüsse neutralisiert werden, welche vorwiegend über Wasserkanäle, insbesondere AQP4 erfolgen.

1.4 Aquaporine

1.4.1 Grundlagen der Aquaporine

Eukaryontische Zellen sind unter physiologischen Bedingungen ständig variierenden intra- bzw. extrazellulären Ionenkonzentrationen ausgesetzt. Auf Grund der Osmolaritätsunterschiede und dem dadurch entstehenden osmotischen Druck treten einwärts- bzw. auswärtsgerichtete Wasserflüsse entlang der Zellmembran auf, die eine Ionenhomöostase und folglich eine normale Zellfunktion gewährleisten. Entgegen der Vorstellung, dass sich das Wasser dabei in allen Geweben mit nahezu gleicher Geschwindigkeit, nur frei nach dem Prinzip der passiven Diffusion über die Lipiddoppelschicht bewegt, offenbarten biophysikalische Studien gewebsspezifische, unterschiedliche Wasserpermeabilitäten (Paganelli and Solomon, 1957, Sidel and Solomon, 1957). Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde die Theorie eines speziellen Kanals aufgestellt, der den Wassertransport vermittelt (Solomon et al., 1983, Macey, 1984). Die Identifizierung des ersten Proteins, der als Aquaporine

bezeichneten Wasserkanalfamilie, gelang in Erythrozyten und gilt als Revolution in der Erforschung der intra- und extrazellulären Wasserhomöostase (Preston et al., 1992, Agre et al., 1993). Für die Entdeckung dieses Transmembranproteins, zunächst als Chip28, später als AQP1 bekannt, wurde Peter Agre 2003 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (Agre, 2004). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind in der Familie der Aquaporine 13 verschiedene Subtypen (AQP0 – AQP12) beschrieben, wobei sich eine ubiquitäre Expression bei nahezu allen Spezies einschließlich Bakterien, Viren und Pflanzen zeigt (Ishibashi et al., 2017). Innerhalb der Gruppe der Säugetiere findet sich eine quantitative Häufung in Geweben, die aus funktionellen Gründen eine hohe und schnelle Wasserpermeabilität benötigen. Typische Lokalisationen sind z.B. Niere, Zentralnervensystem, Auge, Cochlea, Speicheldrüsen und Haut (Verkman, 2011, Gleiser et al., 2016).

Die klassischen Aquaporine sind auf den beschleunigten Transport großer Wassermengen spezialisiert (Verkman et al., 2014), wobei dieser passiv, entlang eines osmotischen Konzentrationsgradienten, frei nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion erfolgt (Agre et al., 1993, Agre, 2004, Verkman et al., 2014). Im Vergleich zu anderen Transmembranproteinen, wie z.B. Ionenkanälen, ist der strukturelle Aufbau aller bisher bekannten Aquaporine relativ homogen. Die AQP-Monomere haben eine Masse von ca. 26-34 kDa und bestehen aus sechs α -helikalen Segmenten, welche die Lipiddoppelschicht durchspannen (Verkman and Mitra, 2000, Agre et al., 1993). Diese transmembranären Abschnitte sind durch extra- bzw. intrazellulär lokalisierte Schlaufen verbunden, die ausgehend vom N-Terminus mit den Buchstaben A-E bezeichnet werden. Die Amino (N) - und Carboxy (C) – terminalen Domänen des Proteins sind jeweils intrazellulär lokalisiert. Funktionell wichtig sind die extrazellulären B- sowie intrazellulären E-Schlaufen. Sie beinhalten jeweils ein sogenanntes NPA-Motiv. Dieses charakteristische Aminosäuren-Triplett besteht aus der Abfolge der Aminosäuren Asparagin–Prolin–Alanin und ist über alle bisher bekannten, funktionell wasserleitenden Aquaporine konserviert. Nach dem „Sanduhrenmodell“ von Jung interagieren die B- und E-Schlaufe über ihre NPA-

Motive miteinander und bilden so die selektive Wasserpore mit einem Durchmesser von 2,8 Angström, was der Größe eines H₂O-Moleküls entspricht (Agre et al., 1993, Jung et al., 1994b, Murata et al., 2000, Sui et al., 2001). Die AQP-Monomere lagern sich in der Zellmembran gewöhnlich zu stabilen tetrameren Komplexen zusammen, wobei jedes dieser vier Einzelmoleküle unabhängig voneinander Wasser leitet (Sui et al., 2001).

1.4.2 Aquaporin 4

Das Transmembranprotein Aquaporin 4 (AQP4) ist ein Subtyp aus der Familie der Wasserkanäle, welcher als erstes im ZNS entdeckt wurde und die dort dominierende Form darstellt (Jung et al., 1994a, Nielsen et al., 1997). Neben der typischen Expression in neurosensorischen Organen wie dem Stützzellepithel des *DC* oder dem olfaktorischen Epithel findet sich der Kanal auch in Epithelgewebe von Niere, Speicheldrüse, Prostata, GI-Trakt oder Skelettmuskulatur, wobei eine vorwiegend basolaterale Expression beobachtet wird (Mobasheri et al., 2007, Gleiser et al., 2016). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft zeigt AQP4 eine reine Selektivität für Wassermoleküle und gehört daher zur Subfamilie der klassischen Aquaporine (King et al., 2004, Ishibashi et al., 2017). Ein spezifisches Charakteristikum von AQP4 ist das Auftreten von multiplen Protein-Isoformen. Bislang sind innerhalb der Gruppe der Säugetiere insgesamt neun unterschiedliche AQP4-Isoformen bekannt (siehe Abbildung 2). Diese unterscheiden sich untereinander durch Modifikationen am Anfang (N-Terminus), am Ende (C-Terminus) aber auch innerhalb des Proteins (Moe et al., 2008, De Bellis et al., 2014, De Bellis et al., 2017). Die zwei etablierten und am besten untersuchten Isoformen sind AQP4-M1 (AQP4a) und AQP4-M23 (AQP4c). Sie entstehen auf Grund von unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten innerhalb des gleichen Gens (Jung et al., 1994a). Ein am 5' Ende zusätzlich vorkommendes Exon 0 codiert dabei den um 22 Aminosäuren verlängerten N-Terminus der M1-Isoform bei sonst identischem COOH-Ende. Die funktionelle Wassertransportkapazität dieser zwei Proteine ist trotz der strukturellen Variation jedoch nahezu identisch (Neely et al., 1999).

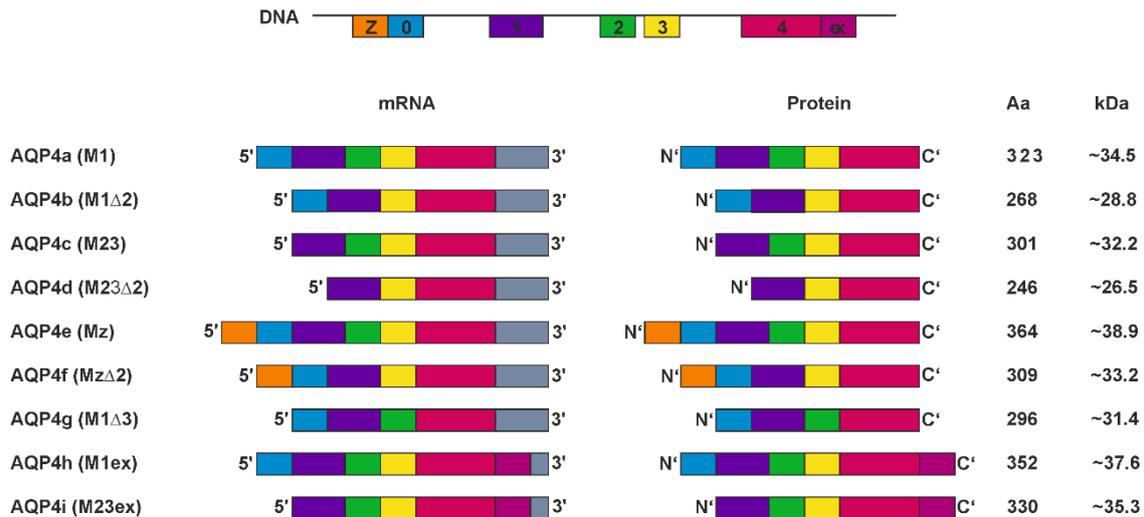


Abbildung 2: Schematische Auflistung aller bekannten AQP4-Isoformen in DNA-, mRNA- und Protein-Form. Abbildung in Anlehnung und modifiziert nach (Moe et al., 2008).

Darstellung aller neun AQP4-Isoformen mit Modifikationen an N / (5') - oder C / (3') -Terminus bzw. innerhalb des Proteins inklusive der Angaben über Anzahl der Aminosäuren (Aa) und des Molekulargewichtes in kDa. AQP4 a, c, e zeigen eine transmembranäre Lokalisation und funktionelle Wasserleitfähigkeit, AQP4 b, d, f mit fehlendem Exon-2 zeigen eine zytosolische Lokalisation und fehlende funktionelle Wasserleitfähigkeit.

Die Mz-Isoform (AQP4e) hat auf Grund eines zusätzlich vorhandenen Exon Z, einen um weitere 41 Aminosäuren verlängerten N-Terminus im Vergleich zur M1-Isoform bei identischem C-Terminus und stellt das aktuell längste AQP4-Protein dar (Moe et al., 2008). AQP4-Mz leitet experimentell Wasser (Fenton et al., 2010), wird jedoch nach bisherigem Stand der Forschung nur bei der Ratte, aber nicht beim Menschen exprimiert (Rossi et al., 2011). Darüber hinaus konnten ausgehend von all diesen drei Hauptformen, jeweils Isoformen mit fehlendem Exon 2 identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden und als AQP4b, AQP4d bzw. AQP4f bezeichnet werden (Moe et al., 2008). Funktionell interessant ist die Erkenntnis, dass die Isoformen AQP4a, AQP4c und AQP4e *in vitro* transmembranär lokalisiert sind und Wasser leiten, während die Isoformen AQP4b, AQP4d und AQP4f intrazellulär lokalisiert sind und keine Wasserleitfähigkeit zeigen (Moe et al., 2008). Analog hierzu konnten AQP4 Proteine mit fehlendem Exon 3 identifiziert werden (De Bellis et al., 2014). Diese zeigen eine ebenfalls intrazelluläre Lokalisation bei fehlender funktioneller

Wasserleitfähigkeit (De Bellis et al., 2014). Neben diesen beschriebenen AQP4-Isoformen mit modifiziertem N-Terminus bei gleichem COOH-Ende, wurden kürzlich auch Isoformen mit verändertem C-Terminus identifiziert die als AQP4-M1ex bzw. AQP4-M23ex bekannt sind (De Bellis et al., 2017). Hierbei handelt es sich jeweils um C-terminal verlängerte M1- bzw. M23-Proteine, die durch Überlesen des primären Stopcodons generiert werden (translational readthrough, TRT). Eine funktionelle Wasserleitfähigkeit konnte nachgewiesen werden (De Bellis et al., 2017). Ein weiteres Charakteristikum von AQP4-Molekülen ist die Fähigkeit, größere, supramolekulare Komplexe zu bilden, die als orthogonale Partikelkomplexe (OPKs) bekannt sind (Wolburg, 1995, Wolburg et al., 2011, Rash et al., 1998). Diese bestehen vorwiegend aus der M23-Isoform, weil der verlängerte N-Terminus der M1-Isoform die Bildung dieser Komplexe zu stören scheint (Furman et al., 2003, Fenton et al., 2010, Suzuki et al., 2008). Beschrieben sind sie im ZNS an den Endfüßen der Astrozyten (Dermietzel, 1974), sowie im Stützzellepithel des *DC* (Hirt et al., 2011). Hypothesen gehen davon aus, dass sie u.a. die Wasserpermeabilität steigern (Fenton et al., 2010, Crane et al., 2010), dennoch bleibt deren genaue Funktion bis heute teils ungeklärt (Verkman, 2013).

1.4.3 Aquaporin 4 im *Ductus cochlearis* der Ratte

Der Wasserkanal AQP4 spielt im *DC* eine entscheidende Rolle in der K⁺- und Volumenhomöostase (Eckhard, 2012). Beim Ab- und Weitertransport des bei der mechano-sensorischen Transduktion anfallenden Kalium über den Kanal K_{ir} 4.1 entsteht osmotischer Stress (Eckhard, 2012, Li and Verkman, 2001). Dabei trägt AQP4 mit neutralisierenden Wasserflüssen wesentlich zum Erhalt des osmotischen Gleichgewichts bei. Immunmarkierungen von AQP4 und K_{ir} 4.1 im *DC* offenbaren eine Expression und Kolo-kalisation dieser Proteine in nahezu allen epithelialen Stützzellen, die das Corti-Organ bilateral flankieren (Hibino et al., 1997, Jagger et al., 2010, Hirt et al., 2011, Hirt et al., 2010, Mhatre et al., 2002, Miyabe et al., 2002, Takumi et al., 1998, Eckhard et al., 2012b, Taylor et al., 2012). Auffällig ist jedoch die Tatsache, dass in allen bisher publizierten Studien, speziell für die Stützzellen des Corti-Organs (IPhZ, IPZ, ÄPZ und DZ)

keine Markierung von AQP4 gezeigt werden konnte sondern nur eine Expression von K_{ir} 4.1 (Huang et al., 2002, Mhatre et al., 2002, Takumi et al., 1998, Eckhard et al., 2012b).

Die Stützzellen werden auf Grund ihrer engen topografischen Beziehung zu den Haarsinneszellen mit besonders hohen Kalium-Konzentrationen konfrontiert. Dies bedeutet folglich einen besonders hohen osmotischen Stress. Analog den Gliazellen des ZNS (Astrozyten) sowie der Retina (Müller-Zellen), welche unmittelbar neben exzitatorischen Zellen lokalisiert sind und zur Regulation der gekoppelten Kalium- und Volumenhomöostase das Kanalsystem aus K_{ir} 4.1 und AQP4 exprimieren, würde man gerade hier am Ort der Transduktion das Vorkommen des Wasserkanals erwarten (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012). Die beobachtete Expressionslücke von AQP4 in der sensorischen Domäne (Eckhard et al., 2012b) korreliert daher nicht mit den bekannten Mechanismen des „Kalium-Siphoning“ (Nagelhus et al., 1999, Newman et al., 1984) in der Retina oder dem „Kalium-Spatial Buffering“ (Nagelhus et al., 2004, Orkand et al., 1966) im ZNS (Gleiser et al., 2016).

Alle bisher publizierten Immunmarkierungen im *DC* der Ratte sind mit kommerziell erhältlichen Antikörpern durchgeführt worden, die gegen ein Epitop am C-Terminus von AQP4 gerichtet sind (Anti-AQP4-CT). Interessant ist jedoch die Tatsache, dass im Zuge zweier Promotionen mit Hilfe eines neu generierten Antikörpers, der eine Spezifität für den N-Terminus der AQP4-M1-Isoform aufweist (Anti-AQP4-NT), erstmalig eine Markierung von AQP4 in den Stützzellen der sensorischen Domäne beobachtet wurde (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Während Immunmarkierungen des *DC* mit kommerziellen Anti-AQP4-CT-Antikörpern kein Signal in den Stützzellen der sensorischen Domäne erkennen lassen, zeigen Untersuchungen unter Verwendung eines Anti-AQP4-NT-

Antikörpers, Markierungen innerhalb dieser Zellpopulation (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012). Diese Beobachtung ließe sich durch die Tatsache erklären, dass es eine weitere AQP4-Isoform gibt, die am N-Terminus ein Epitop analog der M1-Isoform besitzt, jedoch einen komplett veränderten C-Terminus aufweist. Es liegt also die Vermutung nach einer neuen, weiteren AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus nahe (siehe Abbildung 3).

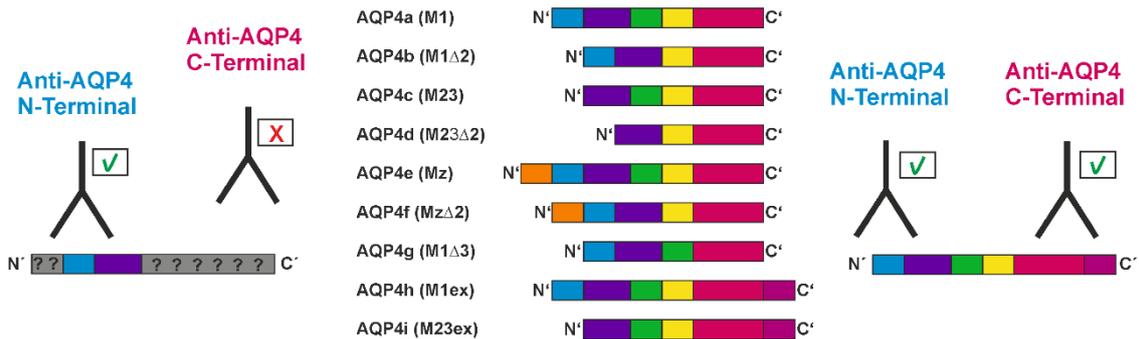


Abbildung 3: Vergleich der Bindungsmöglichkeiten von Anti-AQP4-CT- und Anti-AQP4-NT-Antikörpern an einer potenziell neuen AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus sowie der bekannten M1-Isoform. (Links) Potenzielle, neue AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus, welche zwar von einem Anti-AQP4-NT-Antikörper erfasst wird, nicht jedoch von einem Anti-AQP4-CT-Antikörper. **(Mitte)** Schema aller bisher bekannten AQP4-Isoformen. **(Rechts)** AQP4-M1-Isoform, welche sowohl von einem Anti-AQP4-NT-Antikörper als auch von einem Anti-AQP4-CT-Antikörper detektiert wird.

Die vorliegende Studie hatte somit als Ziel die Klärung der Frage, ob die Immunmarkierungen mit Anti-AQP4-NT in den Stützzellen der sensorischen Domäne das Korrelat einer echten, neuen AQP4-Isoform darstellen könnten oder ob es sich lediglich um posttranslationale Modifikationen der bekannten AQP4-Untergruppe handelt. Einer echten Isoform mit modifiziertem C-Terminus sollte ein entsprechendes mRNA-Transkript mit modifiziertem 3'Ende zu Grunde liegen. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit vorwiegend auf mRNA-Ebene durchgeführt. Der detaillierte Aufbau soll im Folgenden noch genauer erläutert werden.

Aufbau der vorliegenden Arbeit sowie konkrete Fragen und Ziele:

Teil A:

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob es AQP4 spezifische mRNA-Transkripte mit verändertem 3'Ende gibt. Die Existenz einer solchen Boten-RNA würde für das Vorkommen weiterer Isoformen mit modifiziertem C-Terminus sprechen. Methodisch erfolgte das Screening auf solche mRNA-Transkripte mit Hilfe der 3'RACE-PCR inklusive anschließender Klonierung und Sequenzanalyse der Produkte.

Teil B:

Auf Grund der methodisch bedingten, relativen Unspezifität einer 3'RACE-PCR sollte im zweiten Teil dieser Arbeit validiert werden, ob die identifizierten, AQP4-spezifischen mRNA-Transkripte mit verändertem 3'Ende tatsächlich existieren. Methodisch wurde diese Überprüfung unter Entwicklung neuer Primerpaare mit einer RT-PCR inklusive anschließender Klonierung und Sequenzanalyse der Produkte durchgeführt. Weiterhin erfolgte auf Grundlage aller gewonnenen Sequenzdaten eine Theoretisierung der im Rahmen der Translation resultierenden Proteine. Im engeren Sinne wurden aus den ermittelten mRNA-Transkripten Modelle der neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus abgeleitet.

Teil C:

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Immunmarkierungen mit Antikörpern durchgeführt, die zur Bestätigung der bereits immunhistochemisch erzielten Ergebnisse vorhergegangener Arbeiten dienen sollten. Im Rahmen der Validierung der AQP4-spezifischen Signale in den Stützzellen der sensorischen Domäne wurde auch ein neuer Antikörper gegen den C-Loop von AQP4 generiert. Im engeren Sinne sollte die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Signale überprüft werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere und Gewebeproben

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte an adulten Wistar Ratten, welche über die Firma „Charles River Wiga GmbH“ (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Versorgung und Pflege der Tiere erfolgte in der Tierhaltung des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen, wobei freier Zugang zu Futter und Trinkwasser bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bestand.

Der nach dem aktuellen TierSchG für die Tötung und Organentnahme erforderliche Antrag vom 05.06.2014 lautete: „Immunhistochemische, molekularbiologische, ultrastrukturelle und funktionelle Untersuchung von wassertransportierenden Kanälen an Innenohren aus der Ratte“. Die Genehmigung erfolgte am 04.07.2014 durch das Regierungspräsidium Tübingen, BW.

Für die Präparation und Gewebegewinnung wurden die hörreife Ratten im postnatalen Alter von 32 Tagen (p32) mit CO₂ narkotisiert. Es folgte die sagittale Spaltung des abgetrennten Rattenschädels und die Entfernung des Großhirns von der Schädelbasis. Zur Gewinnung von Cochlea-Gewebe wurde an jeder Schädelhälfte die knöchernen Labyrinthkapsel von der *Basis cranii* abgetrennt. Für molekularbiologische Untersuchungen folgte die Befreiung der Gehörschnecke von der knöchernen Bedeckung mit Hilfe einer Pinzette. Durch anschließende Lösung des häutigen Labyrinths vom *Modiolus* wurde das eigentliche Probenmaterial isoliert. Jeweils 6-8 Cochleas wurden zu einer Probe zusammengefasst. Für immunhistochemische Untersuchungen ist das Gewebe innerhalb der knöchernen Labyrinthkapsel über drei kleinflächige Öffnungen der Fixierlösung zugänglich gemacht worden. Hierfür wurde die Fußplatte des Steigbügels aus dem ovalen Fenster luxiert, die Membran des runden Fensters entfernt und die knöchernen Spitze der Gehörschnecke eröffnet.

Zur Gewinnung von Cerebellum-Gewebe sind nach Entfernung des Großhirns von der Schädelbasis und dem dadurch direkt exponierten Kleinhirn, würfelförmige, ca. 3x3x3 mm große Proben entnommen worden.

Zur Gewinnung von Retina-Gewebe sind von denselben Tieren zunächst die Augen *in toto*, im Sinne einer *Exenteratio bulbi*, entfernt worden. Nach spitzer Inzision der Bulbuswand kurz hinter dem Übergang zwischen *Cornea* und *Sklera* mit anschließender zirkulärer Abtrennung der vorderen Halbkugel unter Benutzung einer Präparationsschere, wurden der Glaskörper sowie der dioptrische Apparat entfernt. Mit Hilfe einer Pinzette erfolgte schließlich die Probengewinnung durch vorsichtiges Ablösen der Netzhaut im Sinne einer „Häutchenpräparation“. Alle Präparationsschritte wurden in kühlem 1x PBS (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) mit Hilfe einer Binokularlupe (M125, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Außerdem erfolgte die Gewinnung der Proben in einem möglichst RNase-freien Umfeld. Hierzu wurde die Oberflächen-RNase-Dekontaminationslösung RNaseZap[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt.

2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben für molekularbiologische Untersuchungen inklusive Isolierung von RNA

Die präparativ gewonnenen Gewebeproben von Cochlea, Cerebellum und Retina wurden jeweils sofort in die mit 100 µl RNA Lysis Buffer T-P befüllten Aufbewahrungs- bzw. Lysegefäße des Precellys Ceramic Kit 1.4 / 2.8 mm (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland) überführt, mehrmals geschwenkt und *ad hoc* in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren.

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus den biologischen Proben erfolgte zuerst der Aufschluss des Gewebes mit Hilfe des MINILYS Arbeitsplatz-Homogenisators (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die eigentliche RNA-Isolierung wurde unter Anwendung des Precellys Tissue RNA Kit (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt, wobei bei den Arbeitsschritten

entsprechend dem Protokoll des Herstellers verfahren wurde. Der optionale DNase I Verdau ist für alle Experimente durchgeführt worden. Hierdurch sollten alle potentiell verbliebenen DNA-Reste (genomische DNA) entfernt werden. Die isolierte RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser (DEPC) in ein steriles Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eluiert. Die Messung der jeweiligen RNA Konzentration erfolgte mit Hilfe des Qubit RNA Assay Kit in einem Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Die isolierte RNA wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.2.2 3'RACE-PCR zum Screening nach putativen AQP4 mRNA-Transkripten mit Modifikation am 3'-Ende in Cochlea, Cerebellum und Retina

Die Durchführung einer 3'RACE-PCR ermöglicht die Detektion von mRNA-Transkripten mit verändertem 3'Terminus. Das Grundprinzip besteht dabei in der Vervielfältigung einer Basensequenz zwischen einer definierten, genspezifischen Region innerhalb einer zytosolischen mRNA und deren Poly-A-Schwanzes (3'-Ende) (Scotto-Lavino et al., 2006). Auf diese Weise wird neben dem codierenden Bereich auch die untranslatierte Region am 3'-Ende (3'UTR) amplifiziert. Für die vorliegenden Experimente wurde das „3'RACE System Kit for Rapid Amplification of cDNA Ends“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Erststrangsynthese von cDNA erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers, wobei jeweils 5 µg der isolierten RNA eingesetzt wurden. Das Priming des Poly-A-Schwanzes der mRNA erfolgte durch die Anlagerung eines „Oligo-dT Adapter Primers (AP)“ mit spezieller Ankersequenz. Die cDNA-Synthese ist mit der SuperScript II RT (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) als Reverse Transkriptase durchgeführt worden. Die RNA-Überreste wurden mit RNase H (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) degradiert. Anschließend erfolgte die eigentliche PCR. Eine zusammenfassende, schematische Darstellung aller Schritte dieser speziellen PCR zeigt Abbildung 4.

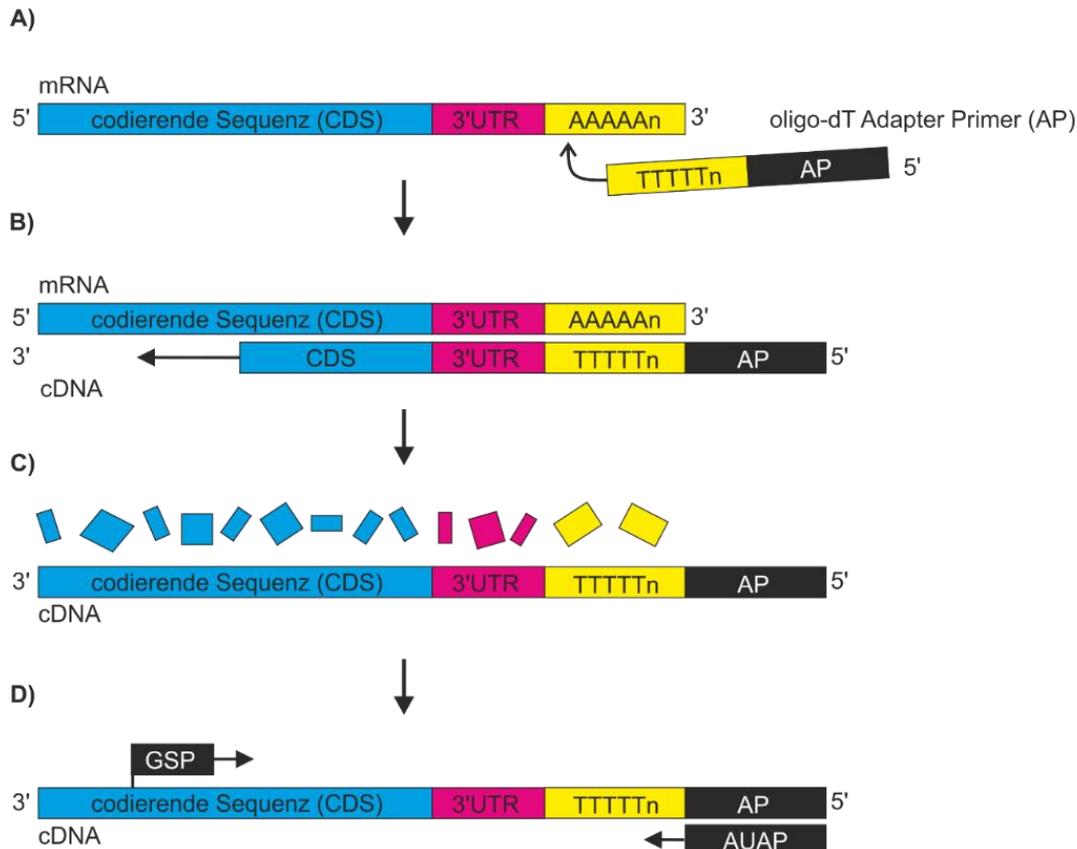


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schritte einer 3'RACE-PCR. (A) Priming des Poly-A-Schwanzes (3' Ende) mit oligo-dT Adapter Primer (AP). **(B)** Erststrangsynthese von cDNA aus Gesamt-RNA mit Reverser Transkriptase. **(C)** RNA-Verdau mit RNase H. **(D)** Amplifikation von cDNA zwischen einer definierten genspezifischen Region und dem Poly-A-Schwanz mit Hilfe von GSP- und AUAP-Primern.

Als Vorwärtsprimer für die eigentliche PCR kamen dabei zwei genspezifische Primer (GSP) zum Einsatz, die an jeweils unterschiedlichen Regionen im bekannten codierenden Bereich binden. Der GSP1 bindet im Exon 2 von AQP4 und stellte den verwendeten Hauptprimer dar. Der GSP2 lagert sich etwa 100 Basenpaare weiter stromaufwärts im Exon 1 von AQP4 an und diente vorwiegend der internen Kontrolle der 3'RACE-PCR Ergebnisse. Als Rückwärtsprimer wurde der AUAP-Primer verwendet, der sich an die entsprechende „AP-Ankersequenz“ anlagert. Tabelle 1 zeigt die Nukleotidsequenzen sowie die Lokalisation der in der 3' RACE verwendeten Primer. Als essenzielle Abwandlung des Herstellerprotokolls erfolgte für die PCR der Einsatz einer „High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt,

Deutschland), die einerseits eine große Ausbeute, andererseits durch die integrierte Korrekturlesefunktion einer 3'-5'Exonukleaseaktivität eine sehr hohe Genauigkeit ermöglicht. Tabelle 2 zeigt das verwendete Protokoll der durchgeführten 3'RACE-PCR. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Visualisierung in einem Agarose-Gel, Gel-Extraktion, TOPO-TA-Klonierung und anschließender Sequenzierung.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Primer für 3'RACE-PCR.

Name des Primers	Sequenz des Oligonukleotids (5' - 3')	Bindung	Annealing-Temperatur
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT (TTT) ₅ T	Poly-A (mRNA)	70°C
GSP1 (Vorwärts)	ATCTTTGCCAGCTGTGATTC	Exon 2 (AQP4)	56°C
GSP2 (Vorwärts)	TGGGAGGATTGGGAGTCACC	Exon 1 (AQP4)	56°C
AUAP (Rückwärts)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	AP-Anker (cDNA)	56°C

Tabelle 2: PCR-Protokoll der 3'RACE-PCR

PCR-Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	Anzahl der Zyklen
1. Prä-Denaturierung	95	120	1
2. Amplifikation			35
2.1 Denaturierung	95	30	
2.2 Annealing	56	30	
2.3 Elongation	72	120	
3. Endelongation	72	600	1

2.2.3 RT-PCR zur Validierung der in der 3'RACE-PCR identifizierten AQP4-Isoformen mit Modifikation am 3'Terminus mit neu-generierten Primern

Die Datenanalyse der 3'RACE-PCR Produkte deutet die Existenz von zwei weiteren AQP4-mRNA-Transkripten an, die sich am 3'Ende von den bekannten Isoformen unterscheiden. Zur Validierung und exakteren Charakterisierung dieser Transkripte wurde im weiteren Verlauf eine RT-PCR durchgeführt.

Die Gewinnung von Erststrang-cDNA erfolgte mit Hilfe des cDNA-Synthesis Kit H Plus (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Synthese erfolgte durch Einsatz von jeweils 5 µg der isolierten RNA sowie Anwendung des „random hexamer primers“ und der „peqGOLD M-MuLV H Plus“ (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland) als Reverse Transkriptase.

Für die anschließende PCR wurden neue Primerpaare generiert. Hierfür erfolgte der Einsatz des Primer-Select-Programmes der Software „DNASTAR Lasergene – Version 8“ (<https://www.dnastar.com>). Insgesamt wurden zwei unterschiedliche Vorwärtsprimer erstellt, die an unterschiedlichen Regionen im bekannten codierenden Bereich binden. Der Primer M1_56 bindet dabei im Exon 0 von AQP4, der Primer M1_491 im Exon 1 (siehe Tabelle 3). Der Grund für das Design von zwei Primern ist durch die Tatsache bedingt, dass Exon 1 bei allen bekannten AQP4-Isoformen vorkommt, das vorangestellte Exon 0 jedoch nur bei M1- und Mz-Isoformen. Durch die Primer-Staffelung sollte eine annähernde Charakterisierung des 5'Endes der neuen Transkripte ermöglicht werden. Darüber hinaus stellt die Verwendung eines zweiten Primerpaares eine doppelte Kontrolle dar und sichert die erhaltenen Ergebnisse. Die Generierung des Rückwärtsprimer CX_AQP4 erfolgte anhand der über die 3'RACE-PCR gewonnen Sequenzdaten. Die Bindungsstelle wurde so gewählt, dass er innerhalb des modifizierten 3'Endes (Sequenz C) möglichst weit strangabwärts, jedoch vor dem Poly-A-Signal liegt und darüber hinaus mit beiden Vorwärtsprimern verwendet werden kann (siehe Abbildung 5 sowie Tabelle 3). Unter Einsatz von 2 µl der RT-Reaktion, d.h. ca. 10 µg DNA, erfolgte die Durchführung der PCR mit Hilfe einer Taq DNA-Polymerase (peqGOLD Taq-

DNA-Polymerase all inclusive; VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers unter Anwendung von Reaction Buffer Y und Enhancer Solution P. Es wurden 35 Zyklen gefahren (Denaturierung: 95°C für 30 Sekunden, Annealing: 56°C für 30 Sekunden, Elongation: 72°C für 120 Sekunden). Die Analyse der Produkte erfolgte wiederum durch Visualisierung in einem Agarose-Gel, Gel-Extraktion, TOPO-TA-Klonierung und anschließender Sequenzierung.



Abbildung 5: Bindungsstellen der neu generierten Primerpaare zur Validierung der modifizierten AQP4 mRNA-Transkripte. Der Vorwärtsprimer M1_56 liegt am Beginn des bekannten Exon 0, der Vorwärtsprimer M1_491 im bekannten Exon 1 von AQP4. Der Rückwärtsprimer CX_AQP4 liegt im Endbereich der Sequenz C, welche das modifizierte 3' Ende der neuen AQP4 mRNA-Transkripte definiert.

Tabelle 3: Eigenschaften der neu generierten Primerpaare zur Validierung der modifizierten AQP4-Transkripte über eine RT-PCR

Name des Primers	Sequenz des Oligonukleotids (5` - 3`)	Annealing- Temperatur
M1_56 (Vorwärts)	CCAGGGAAGGCATGAGTGACG	56°C
M1_491 (Vorwärts)	TGGGAGGATTGGGAGTCACC	56°C
CX_AQP4 (Rückwärts)	AACCCATAAATATTCGGCTGTA	56°C

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die größenmäßige Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte über Standard-Agarosegele (Universal-Agarose peqGOLD, VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland) variabler Konzentrationen (2,0–3,0%) bei einer Spannung von 90 Volt. Die In-Gel Färbung des PCR-Produktes wurde mit Midori Green Advance (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) als DNA-

Farbstoff durchgeführt. Für die Gelextraktion von PCR-Produkten wurde bei sonst gleichen Bedingungen eine Low-Melting-Agarose (LM Plaque Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) eingesetzt. Die fotografischen Aufnahmen der DNA-Agarosegele erfolgten unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem (E-Box VX2, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland).

2.2.5 Isolierung und Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarosegelen

Die Extraktion der gefärbten Banden aus den Low-Melting Agarosegelen erfolgte auf einem UV-Lichttisch bei möglichst kurzer Belichtungszeit und wurde zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen mit Einmalstanzen (X-Tracta Disposable Gel Extraction Tool, Starlab, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zur Erhöhung der quantitativen Ausbeute ist dabei pro Gewebe jeweils ein Pool aus zwei identischen Banden erstellt worden. Die eigentliche Isolation und Aufreinigung der cDNA aus den herausgestanzten Gelstücken erfolgte mittels des peqGOLD Gel Extraction Kit (VWR Peqlab, Erlangen, Deutschland), wobei die Arbeitsschritte inklusive aller optionalen Maßnahmen nach Herstellerangaben ausgeführt wurden. Die extrahierte cDNA ist anschließend mit jeweils mit 40 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0) in ein steriles Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt worden.

2.2.6 TOPO-TA Klonierung der extrahierten PCR-Produkte

Die isolierten PCR-Produkte wurden vor der vollständigen Sequenzierung über die molekularbiologische Methode des Klonierens amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit ist hierfür das „TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet worden. Nach Ligation des aufgereinigten PCR-Produktes in den „pCR4-TOPO-Vektor“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) erfolgte eine chemische Transformation des pCR4-TOPO-Konstruktes in chemisch kompetente „One Shot TOP 10“ *E.coli*-

Bakterien (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Hierfür wurden die Bakterien in einem Wasserbad mit 42°C für 30 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und nach Hinzufügen von 250 µl S.O.C. Medium eine Stunde bei 37°C und 200 RPM kontinuierlich horizontal geschüttelt. 150 µl dieser Zellsuspension wurden mit einem abgeglühten Drigalski-Spatel gleichmäßig auf ampicillinhaltigen (50 µg/ml) LB-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 Stunden bei 37°C wurden die Platten auf das Wachstum von *E.coli*-Kolonien inspiziert. Die Identifikation einer Kolonie mit der entsprechenden klonierten cDNA erfolgte über eine Mini-PCR (Kolonie-PCR) mit M13-Primern und einer „Dream Taq-Polymerase“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), gefolgt von einer konventionellen 1,5% Agarose-Gelelektrophorese. Durch Re-suspension der positiven Bakterienkolonien in 5 ml ampicillinhaltigem (50 µg/ml) LB-Medium wurden Übernachtskulturen angelegt. Die Isolation der Plasmid-DNA aus diesen Kulturen erfolgte mittels des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die extrahierte und aufgereinigte DNA wurde schließlich mit 50 µl Elution Buffer in ein steriles Eppendorf Tube eluiert und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.2.7 Glycerin-Dauerkulturen

Um die erfolgreich cDNA-transfizierten *E.coli*-Klone längerfristig aufzubewahren, wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Hierfür wurden Übernachtskulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin angezogen und am folgenden Tag 1:1 mit Glycerin (autoklaviert) gemischt. Diese Bakterien-Glycerin-Mischung wurde bei -80°C gelagert.

2.2.8 Sequenzierung und Analyse der klonierten PCR-Produkte

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente erfolgte im Sinne einer automatisierten Sanger-Sequenzierung mit dem System LIGHTRUN TUBE durch die Firma GATC BIOTECH (Konstanz, Deutschland). Nach Herstellerangaben sind vollständige Sequenzierungen von DNA-Fragmenten bis

zu einer Länge von 1.100 Nukleotiden in Phred20 – Qualität, also einer Genauigkeit von 99% möglich. Es wurden fünf Mikroliter der aufgereinigten Plasmid-DNA (Konzentration: 100 ng/μl) mit fünf Mikroliter M13 Primer (Konzentration: 5 pmol/μl) in einem 1,5 ml Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemischt, das Tube mit einem Barcode versehen und anschließend der zuständigen Firma zugesandt. Die Lieferung der Rohdaten erfolgte online über ein myGATC-Konto. Die anschließende Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem kostenlosen Programm „4Peaks“ von Nucleobytes (<http://nucleobytes.com/4peaks/>), den online zugänglichen Datenbanken des Nationalen Zentrums für Biotechnologieinformation (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie der Onlineversion des Programms „Clustal Omega“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.2.9 Theoretisierung der neuen AQP4-Isoformen

Für die Theoretisierung der neuen AQP4-Isoformen erfolgte mit Hilfe des Online-Programmes ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) eine Übersetzung der neuen Nukleotidsequenzen in eine Aminosäuresequenz. Die voraussichtliche Masse der Proteine wurde mit dem Onlineprogramm „Protein Molecular Weight Calculator“ (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) berechnet. Weiterhin erfolgte ein rechnergestütztes Modelling der Transmembrandomänen sowie eine Vorhersage der intra- bzw. extrazellulären Lokalisation von N- und C-Terminus. Dieses Modelling wurde mit dem Onlineprogramm „OCTOPUS“ (<http://octopus.cbr.su.se/index.php?about=OCTOPUS>) durchgeführt.

2.3 Immunmarkierungen des *Ductus cochlearis*

2.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Fixation des Innenohrgewebes erfolgte durch vorsichtige Perfusion der Labyrinthkapsel über die präparativ geschaffenen Öffnungen mit einer 4%-igen phosphatgepufferten (pH7) Formaldehydlösung (Roti Histofix 4%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach zwei Stunden wurde mehrmals mit 1xPBS

(phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,4; PBS-Tabletten für 500 ml dH₂O, 2,7 mM KCl; 140 mM NaCl; 10mM Phosphat; PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Um die Anfertigung von Kryoschnitten der Cochlea zu ermöglichen wurde die cochleäre knöcherne Labyrinthkapsel bei 4°C in EDTA-PBS-Lösung (150 mmol/l EDTA; PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, pH 8, in 1xPBS gelöst) für ca. 2 Tage entkalkt. Nach dreimaliger Spülung mit PBS (1x) wurde das Präparat zur Gefrierprotektion in 30% Saccharose in PBS (pH 7,4) bei 4°C über Nacht inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Einbettung der fixierten Gewebe in „Tissue-Tec“ Kryo-Gel (Sakura Finetek, Staufen im Breisgau, Deutschland) und die Anfertigung von ca. 14 µm dicken Kryoschnitten mit einem Kryostat-Mikrotom (CM3050S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Schnitte der Cochlea wurden mittig im *Modiolus* durchgeführt und auf einem entsprechenden Objektträger (SuperFrost, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Die *retinalen* und *cerebellären* Gewebeproben wurden jeweils für 2 Stunden in 4%-iger phosphatgepufferten (pH7) Formaldehydlösung (Roti Histofix 4%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen 1X PBS folgte eine eintägige Lagerung in 30%-iger Saccharose-Lösung bei 4°C. Die Anfertigung von Schnitten sowie deren Einbettung erfolgte analog den Gewebeproben aus der Cochlea.

2.3.2 Antikörper

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunmarkierungen des *DC* wurden drei Anti-AQP4-Antikörper verwendet, die sich jeweils durch ihre spezifischen Bindungsstellen unterscheiden. Neben einem konventionell erhältlichen Antikörper mit einer Epitospezifität für den C-Terminus von AQP4 (Exon 4, Anti-AQP4-CT) wurde ein Antikörper mit einer Spezifität für den N-Terminus (Exon 0 der M1-Isoform, Anti-AQP4-NT) verwendet. Dieser wurde bereits im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Andreas Eckhard (Eckhard, 2012) in Zusammenarbeit mit Dr. Hubert Kalbacher (Interfakultäres Institut für Biochemie der Universität Tübingen) synthetisiert. Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, zusammen mit der Firma Abmart (China), ein Antikörper

mit einer Spezifität gegen den C-Loop von AQP4 generiert (Anti-AQP4-C-Loop). Die veränderten Bindungsstellen von Anti-AQP4-NT sowie Anti-AQP4-C-Loop im Vergleich zu den konventionell erhältlichen Anti-AQP4-CT-Antikörpern ermöglicht u.a. die Detektion von Isoformen mit modifiziertem C-Terminus. Ein Schema der verschiedenen Bindungsstellen der beschriebenen Antikörper zeigt Abbildung 6.

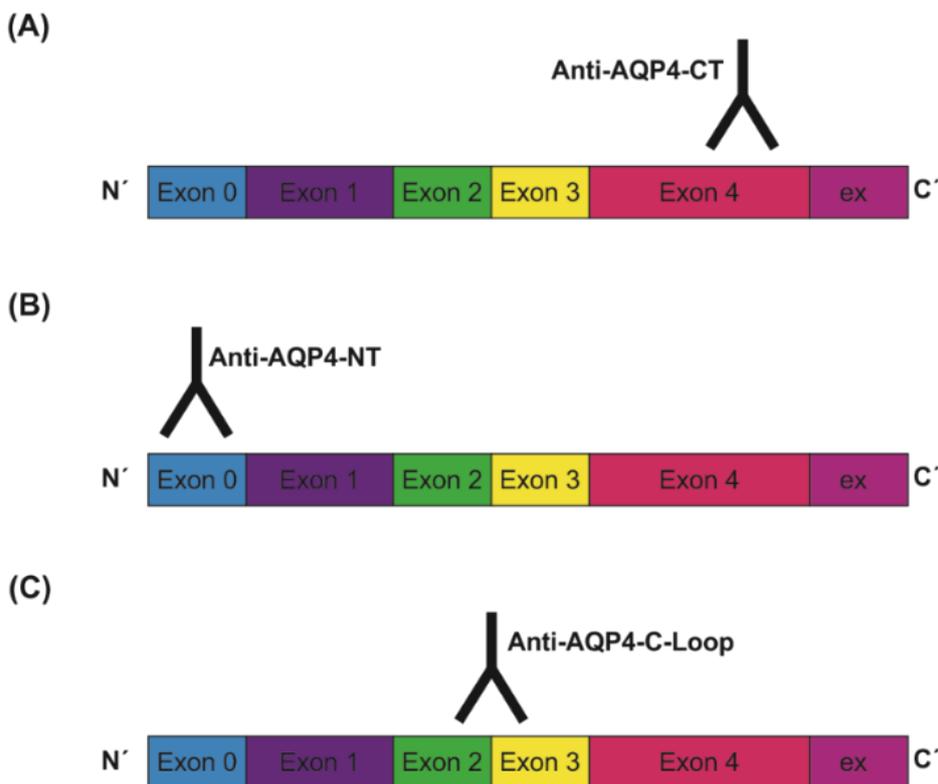


Abbildung 6: Bindungsstellen der verwendeten Anti-AQP4-Antikörper. (A) Käuflich erhältlicher Anti-AQP4-CT Antikörper mit Epitopspezifität gegen den C-Terminus. (B) Antikörper mit Spezifität gegen den N-Terminus der AQP4 M1-Isoform, generiert von Dr. Hubert Kalbacher. (C) Neuer, Anti-AQP4-C-Loop Antikörper mit Spezifität gegen den extrazellulären C-Loop. Entwicklung und Synthese in Kooperation mit der Firma Abmart (China).

2.3.3 Färbeprotokoll und Mikroskopische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunmarkierungen des DC erfolgten unter Anwendung eines Färbeprotokolls mit SDS-Antigen-Retrieval. Nach initialem Auftauen der Gewebeschnitte wurden sie zunächst in 1x PBS für

fünf Minuten renaturiert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch 10-minütige Inkubation in Denaturierungspuffer (0,1% SDS in 1x PBS), gefolgt von dreimaligem, jeweils 5-minütigem Waschen der Proben in 1x PBS. Nach einer 15-minütigen Lagerung in einem Blockierungspuffer (1% NDS in 1x PBS) erfolgte eine nächtliche Inkubation der Gewebeproben bei 4°C mit den Primärantikörpern (1:50 bzw. 1:100 gelöst in Reaktionspuffer (0,5 % NDS in 1x PBS)). Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst wieder dreimal, für jeweils fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die abgedunkelte Inkubation der Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern (1:400 in Reaktionspuffer (0,5 % NDS in 1x PBS)). Eine Auflistung der jeweils verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zeigt Tabelle 4. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS (3-mal) erfolgte die Zellkern-Gegenfärbung mit Syto60 (1:5.000) im Reaktionspuffer für 10 Minuten. Nach abschließendem, dreimaligem Spülen in 1x PBS für fünf Minuten, wurden die Proben mit Flour Save Eindeckmedium (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) unter einem Deckglas (Dicke: 0,13 - 0,16 mm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) eingebettet. Die Analyse erfolgte anschließend mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen, Deutschland).

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für Immunmarkierungen des DC

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Anti-AQP4-NT (Rabbit, polyklonal, 1:50, Dr. Hubert Kalbacher, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen)	Donkey anti-Rabbit, Alexa 546 1:400, Invitrogen
Anti-AQP4-CT (C-19, Goat, polyklonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology)	Donkey anti-Goat, Alexa 488 1:400, Invitrogen
Anti-AQP4-C-Loop (polyklonal, 1:100, Abmart, China)	Donkey anti-Rabbit, Alexa 546 1:400, Life-Technologies

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

3.1.1 3'RACE-PCR zum Screening nach putativen AQP4 mRNA-Transkripten mit Modifikation am 3' Ende

Mit Hilfe einer 3'RACE-PCR wurde ein Screening nach putativen mRNA-Transkripten mit modifiziertem 3'Terminus durchgeführt. Neben Cochlea-Gewebe erfolgte der Einsatz von Proben aus Retina und Cerebellum als Positivkontrolle. Es wurden zwei unterschiedliche Vorwärtsprimer verwendet: Zum einen der AQP4-spezifische Primer „GSP1“ und zum anderen, zur internen Kontrolle der RACE-Ergebnisse, der ca. 100 Basenpaare weiter upstream bindende, AQP4-spezifische Vorwärtsprimer „GSP2“ (siehe Abbildung 7 - A). Die Primer wurden jeweils separat und nicht im Sinne einer nested-PCR verwendet.

Bei Verwendung des „GSP1“ zeigte sich eine schwache Bande von ungefähr 6.000 Basenpaaren (#), welche der bekannten AQP4 M1-Isoform entspricht (siehe Abbildung 7 – B). Diese Bande war jedoch auf Grund ihrer Länge nur schwer zu amplifizieren und deshalb nicht immer detektierbar. Unterhalb dieses Produktes lassen sich zusätzliche, multiple Banden erkennen, die die Existenz weiterer AQP4 mRNA-Transkripte vermuten lassen. Deutliche Banden finden sich bei 450 (*) und 600 (+) Basenpaaren, die sich reproduzierbar in allen Versuchsdurchführungen und getesteten Geweben amplifizieren ließen. Während in Cochlea und Cerebellum die 450 bp Produkte deutlich prominenter als die 600 bp Produkte exprimiert sind, ist dieses Verhältnis in der Retina umgekehrt. Neben diesen reproduzierbaren Banden zeigen sich unterschiedlich starke Banden in den Bereichen von 500, 700 und 1.000 Basenpaaren. Unabhängig von der Art des untersuchten Gewebes war jedoch das Auftreten dieser Produkte über alle Versuche hinweg inkonsistent und sehr heterogen (siehe Abbildung 7 – B und C).

Bei der separaten Kontrollverwendung des „GSP2“ zeigten sich in allen Geweben zwei schwache Banden bei 550 (*') und 700 (+') Basenpaaren. Diese entsprechen jeweils den um 100 bp verlängerten Produkten von 450 (*) und 600 (+) Basenpaaren unter Verwendung von „GSP1“ und bestätigen damit das Ergebnis. Zusätzlich zeigt sich jeweils noch eine Bande bei 350 Basenpaaren (Abbildung 7 – C).

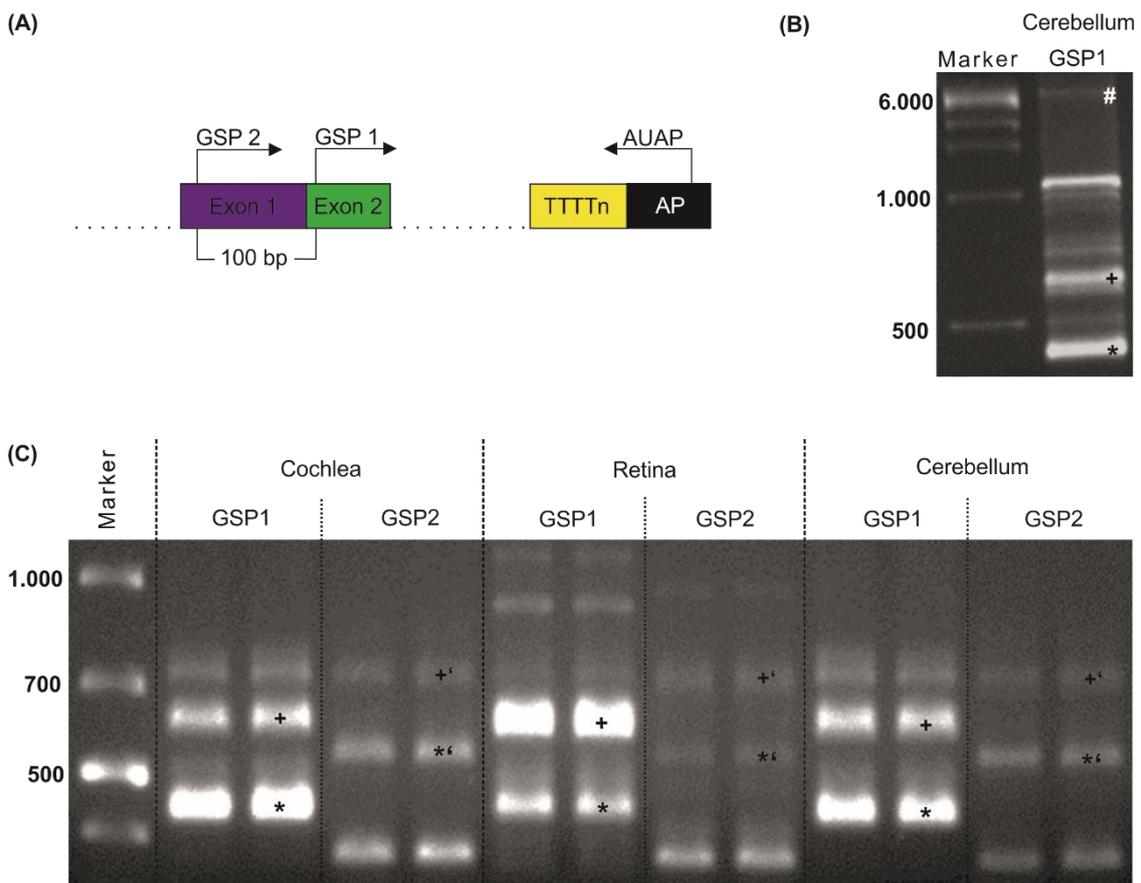


Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophoresen von Amplifikaten nach 3'RACE-PCR mit AQP4-spezifischen Vorwärtsprimern „GSP1“ bzw. „GSP2“ zum Screening nach neuen mRNA-Transkripten mit Modifikation am 3'Ende. (A) Bindungsstellen der AQP4-spezifischen Forwärtprimere GSP1 und GSP2. GSP2 liegt ca. 100 bp upstream von GSP1. **(B)** Produkte aus Cerebellum-Gewebe mit GSP1. Die schwache Bande von 6.000 bp (#) entspricht der bekannten AQP4 M1-Isoform. Darunter weitere Banden bei 450, 500, 600, 700 und 1.000 bp, wobei sich nur die Produkte von 450 bp (*) und 600 bp (+) konsistent amplifizieren ließen. **(C)** Übersicht aller Produkte aus Cochlea, Retina und Cerebellum. Mit GSP1 deutliche Banden in allen Geweben bei 450 (*) und 600 bp (+) sowie schwache Banden bei 500, 700 und 1.000 bp. Mit GSP2 Banden bei 550 (*') und 700 bp (+') sowie einer zusätzlichen Bande bei 350 bp.

3.1.2 Sequenzanalyse der TOPO-TA klonierten 3'RACE-Produkte von 450 und 600 Basenpaaren

Für die Charakterisierung der Produkte von 450 und 600 Basenpaaren wurden diese kloniert und sequenziert. Anschließend erfolgte ein Alignment mit den bekannten Sequenzen der AQP4-Isoformen. Bei beiden Produkten zeigt sich eine Übereinstimmung über Teilabschnitte der Exone 2 und 3 bis zur Base 759 der klassischen M1-Isoform (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

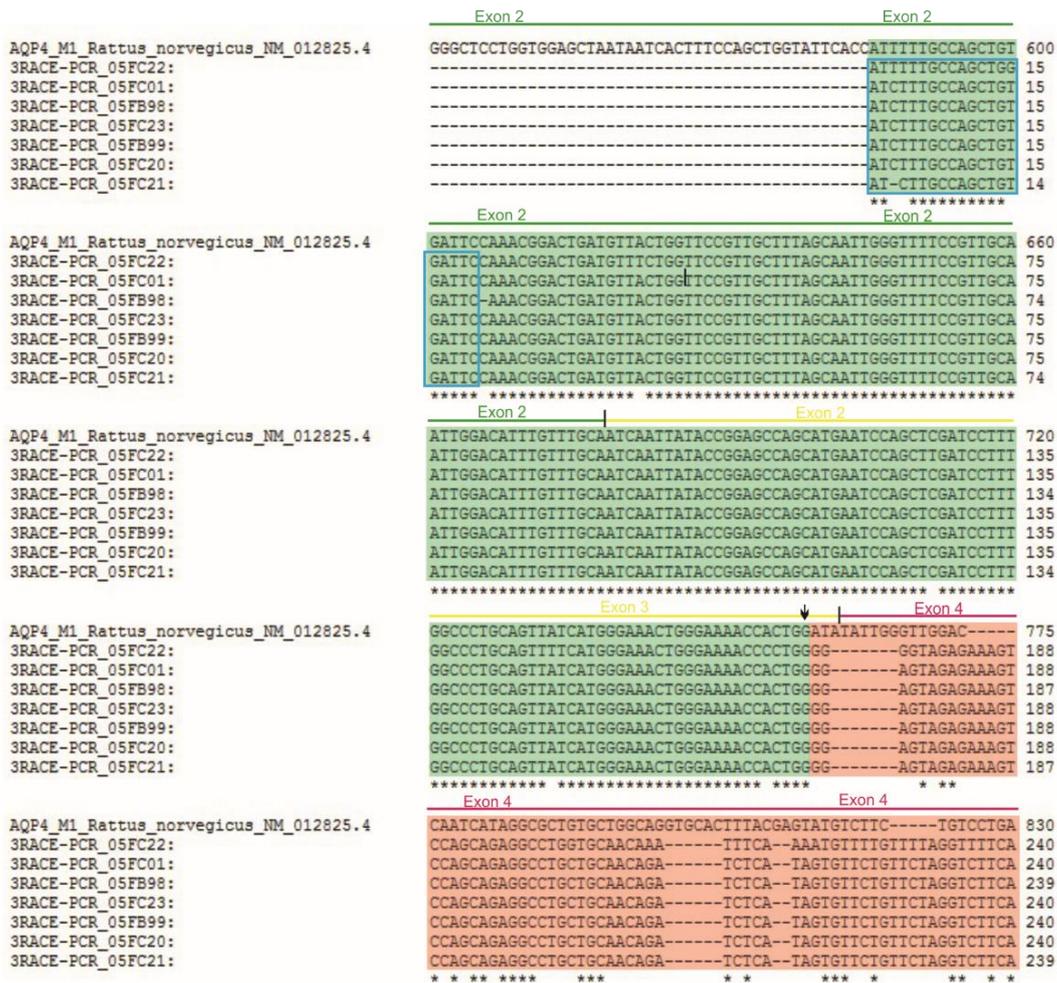


Abbildung 8: Ausschnitt des Sequenzalignments der klassischen M1-Isoform (NM_012825.4) mit den kurzen RACE-Produkten von 450 Basenpaaren. Farbliche Markierung der bekannten Exone der M1-Isoform. Schwarzer Pfeil zeigt Base 759 der M1-Isoform. Blaue Box: GSP1, Markierung grün: Übereinstimmung mit klassischer AQP4 M1-Isoform, Markierung orange: Beginn der abweichenden Nukleotidsequenz zur M1-Isoform (Nukleotidsequenz A).

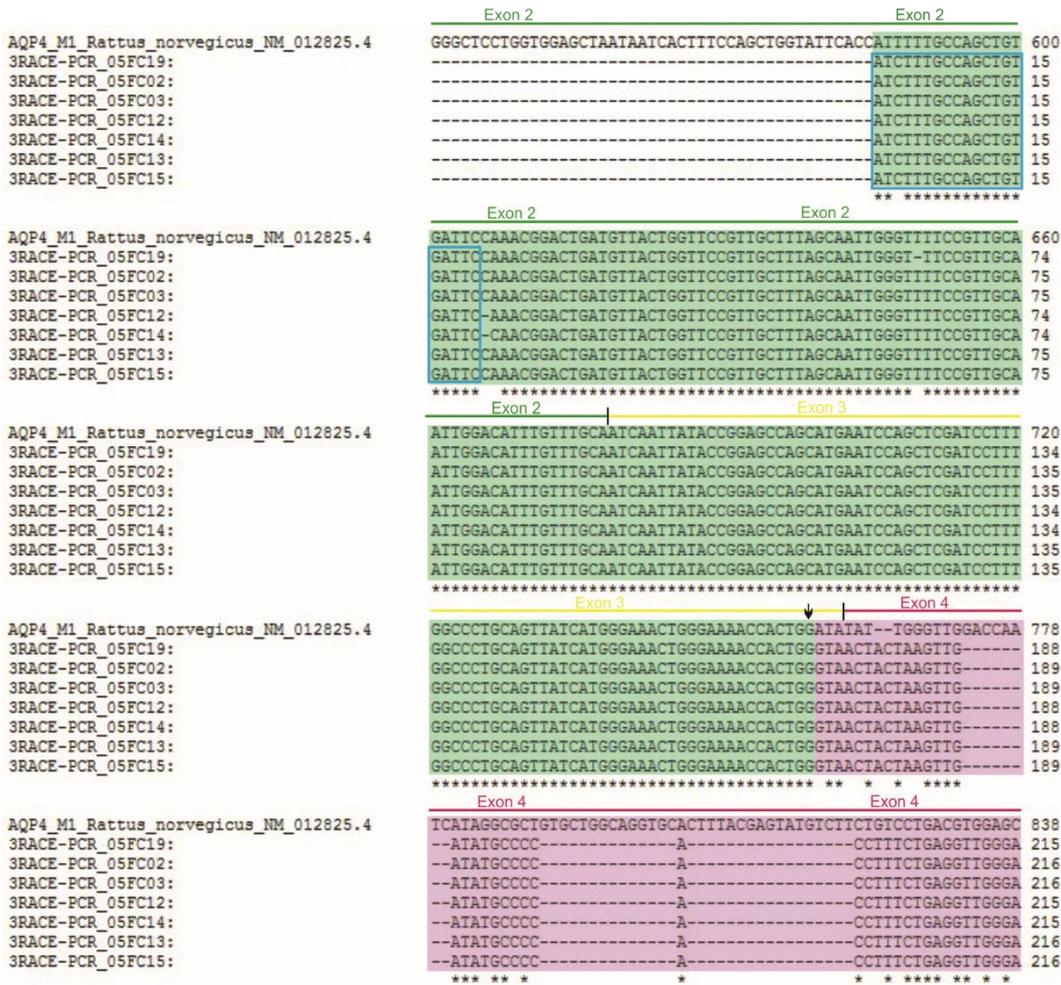


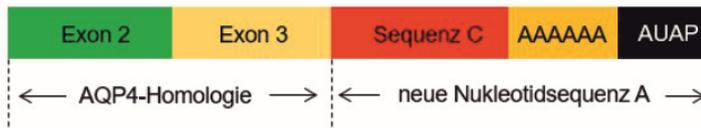
Abbildung 9: Ausschnitt des Sequenzalignments der klassischen M1-Isoform (NM_012825.4) mit den langen RACE-Produkten von 600 Basenpaaren. Farbliche Markierung der bekannten Exone der M1-Isoform. Schwarzer Pfeil zeigt Base 759 der M1-Isoform. Blaue Box: GSP1, Markierung grün: Übereinstimmung mit klassischer AQP4 M1-Isoform, Markierung violett: Beginn der abweichenden Nukleotidsequenz zur M1-Isoform (Nukleotidsequenz B).

Die Abweichung des dritten Nukleotids der RACE-Produkte von der M1-Sequenz (C anstatt T) ist bedingt durch die Konstruktion des GSP1, da dieser nicht nur Ratten-AQP4 sondern auch Human-AQP4 spezifisch ist. Die Position der Base 759 liegt exakt drei Nukleotide vor dem Ende des Exon 3 der M1-Isoform. Anschließend folgt jeweils eine abweichende Basenabfolge. Im Folgenden wird diese beim kurzen Produkt (450bp) als Nukleotidsequenz A, beim langen Produkt (600 bp) als Nukleotidsequenz B bezeichnet. In einem weiteren Sequenzalignment wurden die Produkte von 450 und 600 Basenpaaren direkt miteinander verglichen. Dabei konnten diese als neue AQP4 mRNA-Transkripte

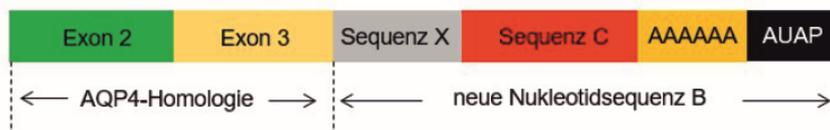
mit modifiziertem 3'Terminus identifiziert werden. Das kürzere PCR-Produkt besteht aus 458, das längere aus 634 Nukleotiden, wobei sich bei beiden Transkripten zwei charakteristische Abschnitte identifizieren lassen (siehe Abbildung 10).

A)

kurzes mRNA-Transkript (458 bp)



langes mRNA-Transkript (634 bp)



B)

kurzes mRNA-Transkript (458 bp)

ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGTTCCGTTGCTTTAGCAATTGGGTTTTCC
GTTGCAATTGGACATTTTGGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAATCCAGCTCGATCCTTTGG
CCCTGCAGTTATCATGCGAACTGGGAAAACCCTGGGGAGTAGAGAAAGTCCAGCAGAGGCCTGCT
GCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGT
CTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGTATGCTG
AATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAGAAAAATAAAGTGATTCTTAA
GGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCC

langes mRNA-Transkript (634 bp)

ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGTTCCGTTGCTTTAGCAATTGGGTTTTCCGTTGCAAT
TGGACATTTGTTTGGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAATCCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGG
GAAACTGGGAAAACCCTGGGTAACACTAAGTTGATATGCCCCACCTTTCTGAGGTTGGGAACAATATCCAAAAG
CCTTTTTTTTATTAACATAACTTAGCTCACTAGTTTCTTTGCTTTCCACCCAACTCGGACTCTCAACTGTATTTTC
ATTTACAGGGAGTAGAGAAAGTCCAGCAGAGGCCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTAC
TAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGTCTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATA
AATTTAAATCATAAATGTATGCTGAATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAGAAAAATAA
AGTGATTCTTAAAGGAGAAAGTACTA
GTCGACGCGTGGCC

Abbildung 10: Charakteristika der über 3' RACE-PCR identifizierten AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3' Terminus. (A) Schematische Darstellung der mRNA-Transkripte mit 458 und 634 Nukleotiden. Darstellung der Exone bzw. Sequenzabschnitte als farbliche Boxen. **(B)** Nukleotidsequenzen der identifizierten mRNA-Transkripte. Farbliche Markierung entsprechend der Boxen in (A). Unterstreichung grün: GSP1, Unterstreichung rot: Poly-A-Signal, Unterstreichung schwarz: AUAP-Primer

Der erste Abschnitt stellt die mit der bekannten AQP4 M1-Isoform übereinstimmende Basenabfolge über die Exone 2 und 3 bis zur Base 759 dar und wird daher als „AQP4-homologer“ Anteil bezeichnet. Dieser Teil ist bei beiden Transkripten identisch. Als zweiten charakteristischen Abschnitt lassen sich jeweils die von den bekannten AQP4-Isoformen abweichenden Basenabfolgen definieren, bezeichnet als neue Nukleotidsequenz A (kurzes Transkript) bzw. Nukleotidsequenz B (langes Transkript).

Eine detailliertere Analyse der „Nukleotidsequenz A“ lässt drei Unterabschnitte erkennen (siehe Abbildung 10). Den in der 3'RACE verwendeten und an den Poly-A-Schwanz bindenden AUAP-Primer (schwarz), den Poly-A-Schwanz selbst (gelb) sowie eine neue Basenpaarfolge, die im Folgenden als „Sequenz C“ (rot) bezeichnet werden soll. Diese Sequenz C ist das eigentliche, modifizierte 3'Ende des kurzen Transkriptes und repräsentiert damit sowohl dessen codierenden Anteil (CDS) als auch die 3'UTR-Region mit dem Poly-A-Signal (AAUAAA).

Im Vergleich hierzu lassen sich bei einer Analyse der „Nukleotidsequenz B“ vier Unterabschnitte differenzieren. Neben der identischen Sequenz C, dem Poly-A-Schwanz sowie dem AUAP-Primer lässt sich eine zusätzliche, 145 lange Basenpaarfolge erkennen, die als „Sequenz X“ (grau) bezeichnet werden soll. Die Nukleotidsequenz B unterscheidet sich von der Nukleotidsequenz A also nur durch das zusätzliche Vorkommen der Sequenz X. Folglich bildet die Gesamtheit der Sequenzen X und C das modifizierte 3'Ende des langen Transkriptes und repräsentiert dessen CDS sowie 3'UTR-Region. Das mRNA-Transkript mit 458 Basenpaaren entspricht also exakt dem langen Produkt mit 634 Basenpaaren ohne die Sequenz X.

Insgesamt liefert die Sequenzanalyse der RACE-Produkte also zwei neue, AQP4-spezifische mRNA-Transkripte von 458 und 634 Basenpaaren mit modifiziertem 3'Terminus.

Es ist weiterhin festzustellen, dass der Sequenzabgleich des kurzen mRNA-Transkriptes aus 458 Basenpaaren eine Übereinstimmung von 99% mit einer gemodelten mRNA-Sequenz zeigt, die mit Hilfe der genomischen AQP4-Sequenz bioinformatisch vorhergesagt wurde (Genbank National Center for Biotechnology, Accession ID: XM_006254430.1) (siehe Abbildung 11).

A)

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA	708	708	96%	0.0	99%	XM_006254430.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X3, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	XM_006254431.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X1, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	XM_006254429.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 2, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	NM_001142366.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 1, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	NM_012825.3
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 4, mRNA	147	147	19%	4e-34	100%	NM_001270559.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 3, mRNA	147	147	19%	4e-34	100%	NM_001270558.1

B)

PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA

Sequence ID: [ref|XM_006254430.1](#) Length: 1180 Number of Matches: 1

Range 1: 782 to 1180 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
708 bits(784)	0.0	397/399(99%)	1/399(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCTTTGCCAGCTGTGATTC-AAACGGACTGATGTTACTGGTTCGGTTGCTTTAGCAATT			59
Sbjct 782	ATTTTGGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGGTTCGGTTGCTTTAGCAATT			841
Query 60	GGGTTTTCCGTTGCAATTTGGACATTTGTTTGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAAT			119
Sbjct 842	GGGTTTTCCGTTGCAATTTGGACATTTGTTTGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAAT			901
Query 120	CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGGAGTA			179
Sbjct 902	CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGGAGTA			961
Query 180	GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTCA			239
Sbjct 962	GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTCA			1021
Query 240	CTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGCTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATG			299
Sbjct 1022	CTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGCTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATG			1081
Query 300	GGTTCCCATGTAGAATAAAATTTAAATCATAAATGTATGCTGAATATTACTGCTTAAATC			359
Sbjct 1082	GGTTCCCATGTAGAATAAAATTTAAATCATAAATGTATGCTGAATATTACTGCTTAAATC			1141
Query 360	ATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAGAAAATAAAG 398			
Sbjct 1142	ATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAGAAAATAAAG 1180			

Abbildung 11: Übereinstimmung der Sequenzen des kurzen mRNA-Transkriptes (458 bp) mit einer „Predicted_AQP4_Isoform_X2“. (A und B) Ein Sequenzabgleich des kurzen 3'RACE-PCR Produktes (458 Basenpaare) über die Nukleotiddatenbank des NCBI liefert eine Übereinstimmung von 99% mit einer gemodelten „Predicted_AQP4_Isoform_X2“ (XM_006254430.1) [Online-Zugriff: 29.04.2014].

3.1.3 RT-PCR zur Validierung der über 3'RACE-PCR identifizierten, AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Ende

Die Ergebnisse der 3'RACE-PCR deuten die Existenz von zwei AQP4 mRNA-Transkripten an, die sich am 3'Terminus von den bekannten Isoformen unterscheiden. Zur Validierung und Charakterisierung dieser Transkripte wurde im weiteren Verlauf eine RT-PCR mit neu generierten Primerpaaren durchgeführt (siehe Abbildung 12).

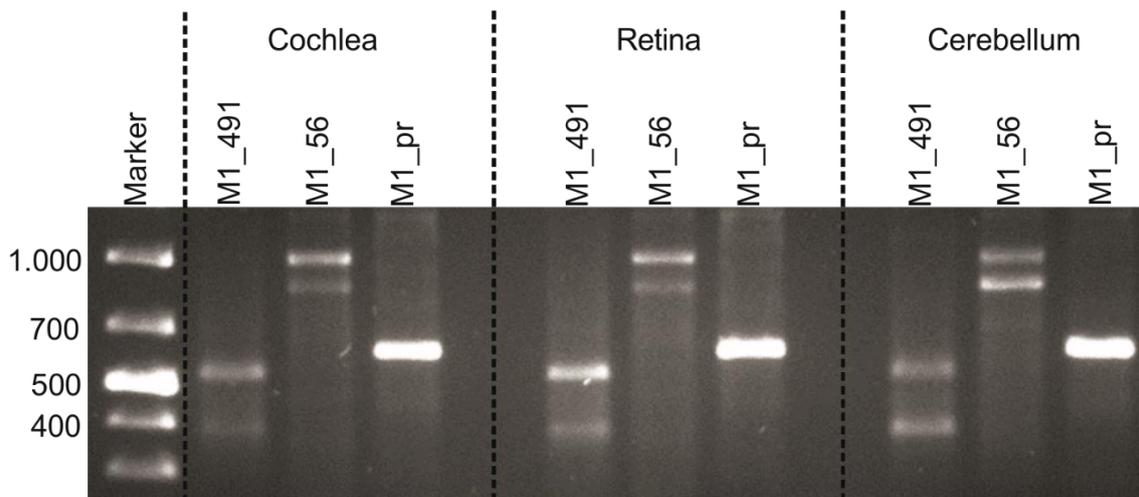


Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese (3%) von Amplifikaten nach RT-PCR mit neu generierten Primerpaaren zur Validierung der AQP4 mRNA-Transkripte. Mit M1_491 / CX_AQP4 zwei deutliche Banden bei 400 und 550 bp in allen Geweben. Mit M1_56 / CX_AQP4 ebenfalls zwei Banden bei 850 und 1.000 bp. Die Positivkontrolle (M1_pr / +530) zeigt jeweils nur eine Bande bei 600 bp, die klassische M1-Isoform.

Bei der Verwendung des im Exon 1 bindenden Vorwärtsprimers M1_491 sowie des am modifizierten 3'Ende (Sequenz C) bindenden Rückwärtsprimers CX_AQP4 ließen sich in allen untersuchten Geweben zwei Banden identifizieren. Die kürzere liegt bei 400, die längere bei 550 Basenpaaren. Der Größenunterschied zwischen den Amplifikaten (150 bp) entspricht der Basenpaardifferenz der zwei AQP4-mRNA-Transkripte, die in der vorangegangenen RACE-PCR identifiziert wurden.

Bei der Verwendung des ca. 450 Basenpaare weiter upstream im Exon 0 bindenden Vorwärtsprimers M1_56 sowie des am modifizierten 3' Ende

(Sequenz C) bindenden Rückwärtsprimers CX_AQP4 ließen sich in allen untersuchten Geweben ebenfalls zwei Banden identifizieren. Die kürzere liegt bei 850, die längere bei 1.000 Basenpaaren. Die Basenpaardifferenz von 150 zwischen den Amplifikaten entspricht dem Größenunterschied der zwei AQP4-mRNA-Transkripte, die in der vorangegangenen RACE-PCR identifiziert wurden.

Bei der Positivkontrolle (M1_pr / +530) ließ sich in allen Geweben jeweils nur eine Bande bei ca. 600 Basenpaaren amplifizieren. Diese entspricht der bekannten AQP4-M1-Isoform ohne modifiziertes 3'Ende.

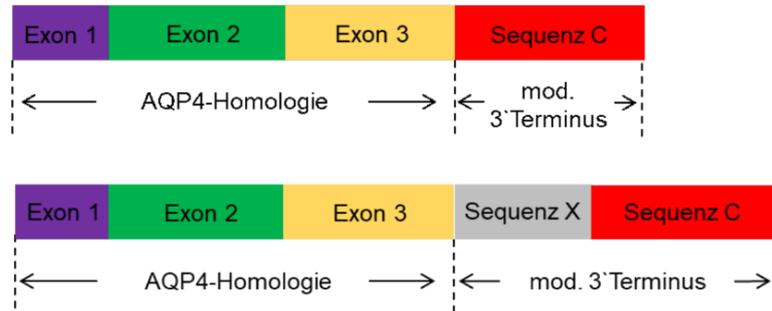
Insgesamt bestätigt die RT-PCR die Expression zweier neuer AQP4-mRNA-Transkripte mit verändertem 3'Terminus in Cochlea, Retina und Cerebellum.

3.1.4 Sequenzanalyse der TOPO-TA klonierten RT-PCR-Produkte

Die klonierten Produkte aus der RT-PCR wurden zur weiteren Charakterisierung sequenziert. In den gewonnenen Daten, inklusive Vektoranteilen, wurden zunächst die in der PCR verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer aufgesucht und auf die Bereiche zwischen diesen Primerpaaren reduziert. Aus den Analysen lassen sich grundsätzlich zwei Ergebnisse schlussfolgern:

Der Datenabgleich bestätigt das Vorkommen von zwei unterschiedlich langen AQP4-Transkripten mit modifiziertem 3'Terminus (siehe Abbildung 13). Analog den Ergebnissen der 3'RACE-PCR lässt sich über die Exone 0-3 bis zur Base 759 der bekannten AQP4 M1-Isoform ein AQP4-homologer Anteil identifizieren. Es folgt die Sequenz der veränderten 3'Enden (Nukleotidsequenz A bzw. B). Die Differenz von ca. 150 Nukleotiden zwischen den Produkten ist bedingt durch die im längeren Transkript zusätzlich vorkommende „Sequenz X“. Weiterhin lässt sich der 5'Terminus der Transkripte etwas genauer charakterisieren. Dabei zeigt sich, dass die Produkte sowohl ein Exon 1, entsprechend der AQP4 M23-Isoform, als auch ein Exon 0, entsprechend der AQP4 M1-Isoform umfassen.

(A)



(B)

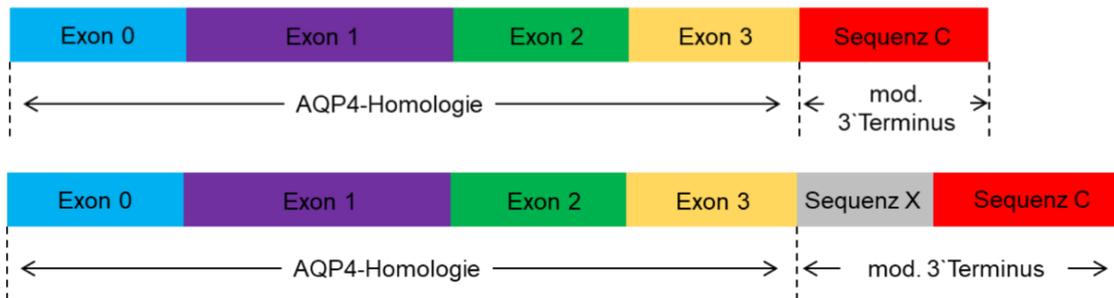


Abbildung 13: Charakteristika der über RT-PCR bestätigten AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus. (A) Schematische Darstellung der analysierten RT-PCR-Produkte von 400 und 550 bp unter Verwendung der Primer M1_491 und CX_AQP4. **(B)** Schematische Darstellung der analysierten RT-PCR-Produkte von 850 und 1.000 bp unter Verwendung der Primer M1_56 und CX_AQP4. Es bestätigen sich zwei unterschiedlich lange AQP4-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus, die am 5'Ende sowohl ein Exon 1 als auch ein Exon 0 aufweisen. Darstellung der Exone bzw. Sequenzabschnitte als farbliche Boxen.

3.1.5 Theoretisierung der Full-Length AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus

Durch Zusammenfügen der ermittelten Sequenzdaten aus der 3'RACE-PCR sowie der RT-PCR wurde jeweils ein Full-Length Modell des kurzen und langen AQP4 mRNA-Transkriptes mit modifiziertem 3'Terminus generiert, wobei von einem M1-analogen N-Terminus mit Exon 0 ausgegangen wird. Da die 5'UTR-Region des mRNA-Transkriptes nicht vollständig experimentell ermittelt werden konnte, wird auf Grund der hohen Analogie zur M1-Isoform deren 5'UTR aus den offiziellen Datenbanken des NCBI übernommen. Das Modell des so ermittelten kurzen mRNA-Transkriptes lässt sich grundsätzlich in zwei charakteristische Abschnitte unterteilen (siehe Abbildung 14).

Der erste Abschnitt entspricht einer AQP4-Homologie über die Exone 0, 1, 2 und 3 der M1-Isoform. Ab der Base 760, also exakt drei Nukleotide vor Ende des konventionellen Exons 3 erfolgt der Übergang in den zweiten Teil des Transkriptes, die Nukleotidsequenz A, den modifizierten 3'Terminus.

Dieser zweite Abschnitt stellt das neue charakteristische 3'Ende dar, welches wiederum aus der Sequenz C und nachfolgendem Poly-A-Schwanz besteht. Die zentrale Sequenz C wiederum beinhaltet im engeren Sinne einen codierenden Nukleotidanteil (CDS), das Stopcodon (UAA) sowie die 3'UTR-Region mit dem spezifischen Poly-A-Signal. Zur Differenzierung dieser Regionen ist es nötig, das erste Stopcodon innerhalb der gesamten Nukleotidsequenz zu bestimmen. Ausgehend von dem Startcodon „AUG“ im Exon 0, liegt das erste Stopcodon „UAA“ im Bereich der Nukleotide 874 – 876. Diese entsprechen den Basen 181 - 183 innerhalb der Sequenz C. Alles davor stellt die CDS dar, entsprechend einem neuen putativen Exon, welches das modifizierte 3'Ende codiert. Dieses wird im Folgenden als Exon C2 bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz hinter dem Stopcodon stellt die 3'UTR-Region des gesamten mRNA-Transkriptes dar und beinhaltet das spezifische Polyadenylierungssignal (AAUAAA).

(A)

AATCTGATTCCCGAGCACTGGAGCCTGGGGGCAGGCAATGAGAGCTGCACTCCGGCCAG
 GGAAGGCATGAGTGACGGAGCTGCAGCGAGGCGGTGGGGTAAGTGTGGACCTCCCTGCA
 GCAGAGAGAGCATCATGGTGGCTTTCAAAGGCGTCTGGACTCAAGCCTTCTGGAAGGCGG
 TCACAGCAGAGTTCCTGGCCATGCTCATCTTTGTTCTGCTCAGCGTGGGATCCACCATTAA
 CTGGGGTGGCTCAGAGAACCCCCTACCTGTGGACATGGTCTCATCTCCCTCTGCTTTGG
 ACTCAGCATTGCCACCATGGTTCAGTGCTTCGGCCACATCAGCGGTGGCCACATCAACCC
 AGCGGTGACAGTGGCCATGGTGTGCACACGAAAGATCAGCATCGCCAAGTCCGTCTTCTA
 CATCACTGCGCAGTGCCTGGGGCCATCATCGGAGCTGGGATCCTCTACCTGGTCACACC
 CCCAGCGTGGTGGGAGATTGGGAGTACCACCGTTTCATGGAAACCTCACTGCTGGCC
 ATGGGCTCCTGGTGGAGCTAATAACTTTCCAGCTGGTATTACCATTTTTGCCAGCTG
 TGATTCAAACGGACTGATGTTACTGGTTCGTTGCTTTAGCAATTGGGTTTTCCGTTGCAA
 TTGGACATTTGTTTGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAATCCAGCTCGATCCTTTGG
 CCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGGAGTAGAGAAAGTCCAGCAGAG
 GCCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGA
 AACGTCAGATATGTCTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAAT
 TTAATCATAAATGTATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAA
 CAATAGAAATAAAGTGATTTCCTTAAAGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(B)

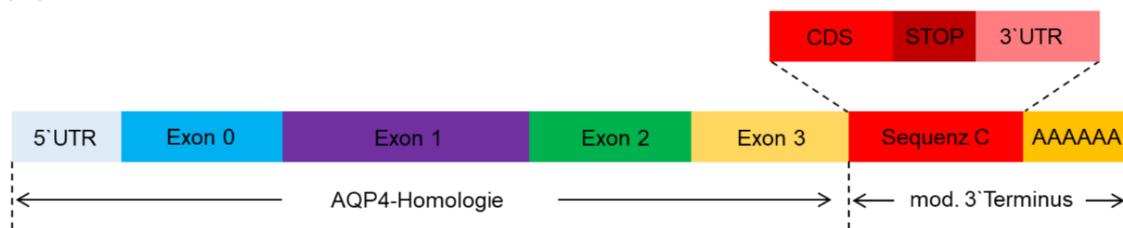


Abbildung 14: Full-Length Modell des kurzen AQP4 mRNA-Transkriptes mit modifiziertem 3'Terminus. (A) Zusammengefügte Nukleotidsequenz aller Klone aus 3'RACE-PCR, RT-PCR sowie der Datenbank des NCBI. Farbliche Markierung der Exone sowie spezifischer Abschnitte. Unterstreichung mit grauer Unterlegung: Primer M1_56, M1_491 bzw. CX_AQP4, rote Unterlegung: Stopcodon TAA, gelbe Unterlegung: Poly-A-Signal AATAAA sowie Poly-A-Schwanz AAAAn. (B) Schematische Darstellung des kurzen Full-Length AQP4 mRNA-Transkriptes mit seinen charakteristischen Anteilen. Darstellung der Exone bzw. Sequenzabschnitte als farbliche Boxen, coloriert analog Teilabbildung (A). 5'/ 3'UTR: 5' bzw. 3' untranslatierter Bereich, CDS: codierender Bereich, Stop: Stopcodon, AAAAAA: Poly-A-Schwanz.

Das Modell des langen mRNA-Transkriptes lässt sich ebenfalls in zwei charakteristische Abschnitte unterteilen (siehe Abbildung 15). Der erste Abschnitt mit dem 5'Terminus ist analog dem des kurzen Transkriptes und zeigt die bekannte AQP4-Homologie über die Exone 0-3 bis zur Base 759 der M1-Isoform.

Es folgt wiederum der Übergang in den zweiten Teil des Transkriptes, die Nukleotidsequenz B, das charakteristisch modifizierte 3'Ende. Im Vergleich zum kurzen Transkript lässt sich hier eine zusätzliche, 145 Basenpaare lange „Sequenz X“ identifizieren. Anschließend folgen wiederum die bereits bekannte „Sequenz C“ und der Poly-A-Schwanz. Im engeren Sinne bildet in diesem Fall die Gesamtheit der Sequenzen X und C das modifizierte 3'Ende, bestehend aus dem codierenden Basenanteil (CDS), dem Stopcodon sowie der 3'UTR-Region mit dem spezifischen Poly-A-Signal. Zur Differenzierung der einzelnen Regionen wurde wiederum das erste Stopcodon innerhalb der gesamten Nukleotidsequenz bestimmt. Ausgehend von dem Startcodon „AUG“ im Exon 0, liegt das erste Stopcodon „UAA“ im Bereich der Nukleotide 769 – 771. Diese entsprechen den Basen 76 – 78 innerhalb der Sequenz X. Alles davor repräsentiert wiederum den codierenden Abschnitt (CDS), entsprechend einem weiteren putativen Exon, welches das modifizierte 3'Ende codiert. Dieses wird im Folgenden als Exon C1 bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz hinter dem Stopcodon stellt die 3'UTR-Region des gesamten mRNA-Transkriptes dar und beinhaltet das spezifische Polyadenylierungssignal (AAUAAA). Bedingt durch die Tatsache, dass sich in der Sequenz X bereits ein Stopcodon befindet, wird in diesem längeren Transkript die Sequenz C zu einem Teil der 3'UTR-Region. Es muss erwähnt werden, dass der Beginn und das Ende der Sequenz X einem GT-AG-Intron ähneln, was später noch diskutiert wird.

(A)

AATCTGATTCCCGAGCACTGGAGCCTGGGGGCAGGCAATGAGAGCTGCACTCCGGCCAG
 GGAAGGCATGAGTGACGGAGCTGCAGCGAGGCGGTGGGGTAAGTGTGGACCTCCCTGCA
 GCAGAGAGAGCATCATGGTGGCTTTCAAAGGCGTCTGGACTCAAGCCTTCTGGAAGGCGG
 TCACAGCAGAGTTCCTGGCCATGCTCATCTTTGTTCTGCTCAGCGTGGGATCCACCATTAA
 CTGGGGTGGCTCAGAGAACCCCTACCTGTGGACATGGTCCTCATCTCCCTCTGCTTTGG
 ACTCAGCATTGCCACCATGGTTCAGTGTTCGGCCACATCAGCGGTGGCCACATCAACC
 AGCGGTGACAGTGGCCATGGTGTGCACACGAAAGATCAGCATCGCCAAGTCCGTCTTCTA
 CATCACTGCGCAGTGCCTGGGGGCCATCATCGGAGCTGGGATCCTCTACCTGGTCACACC
 CCCAGCGTGGTGGGAGATTGGGAGTCACACAGGTTTCATGGAAACCTCACTGCTGGCC
 ATGGGCTCCTGGTGGAGCTAATAATCACTTTCCAGCTGGTATTACCATTTTTGCCAGCTG
 TGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGGTTCGTTGCTTTAGCAATTGGGTTTTCCGTTGCAA
 TTGGACATTTGTTTGCAATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAATCCAGCTCGATCCTTTGG
 CCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGTAACTACTAAGTTGATATGCCCC
 ACCTTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTTTTATTAACAATACTTAGCTCA
 CTAGTTTCTTTTGGCTTTCCACCAACTCGGACTCTCAACTTGTATTTCATTTACAGGGAG
 TAGAGAAAGTCCAGCAGAGGCCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTTCTAGGTCTTC
 ACTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTGAGATATGTCTGACAGAGTACAGCCGAATATTTATGG
 GTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGTATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTG
 AAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAGAAAATAAAGTGATTCCCTAAAGGAGAAAAAAAAA
 AA

(B)

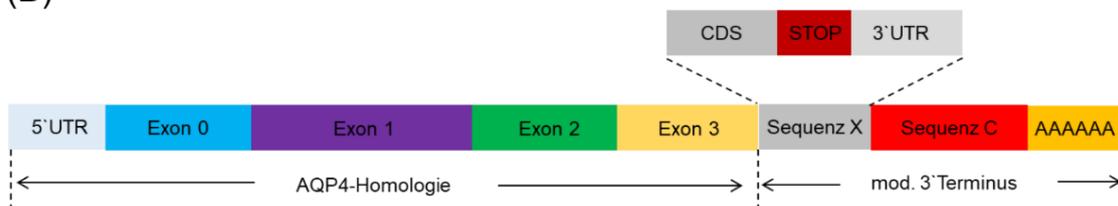


Abbildung 15: Full-Length Modell des langen AQP4 mRNA-Transkriptes mit modifiziertem 3'Terminus. (A) Zusammengefügte Nukleotidsequenz aller Klone aus 3'RACE-PCR, RT-PCR sowie der Datenbank des NCBI. Farbliche Markierung der Exone sowie spezifischer Abschnitte. Unterstreichung mit grauer Unterlegung: Primer M1_56, M1_491 bzw. CX_AQP4, rote Unterlegung: Stopcodon TAA, gelbe Unterlegung: Poly-A-Signal AATAAA sowie Poly-A-Schwanz AAAAn. (B) Schematische Darstellung des langen Full-Length AQP4 mRNA-Transkriptes mit seinen charakteristischen Anteilen. Darstellung der Exone bzw. Sequenzabschnitte als farbliche Boxen, coloriert analog Teilabbildung (A). 5'/ 3'UTR: 5' bzw. 3' untranslatierter Bereich, CDS: codierender Bereich, Stop: Stopcodon, AAAAAA: Poly-A-Schwanz.

3.1.6 Theoretisierung der aus den 3' modifizierten AQP4 mRNA-Transkripten resultierenden Proteinen

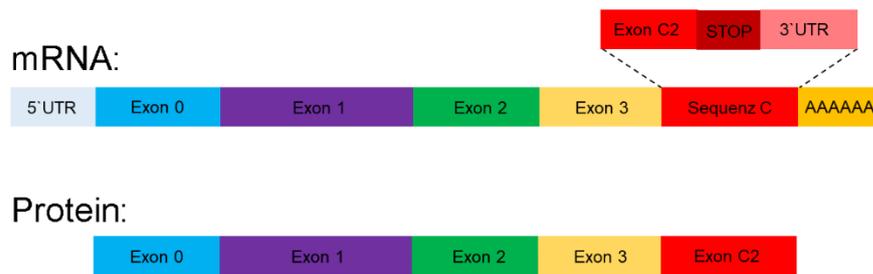
Unter der Annahme, dass die kurzen und langen AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Terminus im Rahmen der Translation tatsächlich in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden, so sollen im Folgenden die daraus resultierenden Proteine theoretisiert werden.

Das kürzere der beiden mRNA-Transkripte codiert ein Protein, das aus insgesamt 291 Aminosäuren besteht und sich in fünf Exone unterteilt (siehe Abbildung 16 - A). Die Exone 0, 1 und 2 entsprechen dabei vollständig dem Aufbau der AQP4 M1-Isoform. Dem Exon 3 fehlt die letzte Aminosäure, bedingt durch das fehlende letzte Basentriplett. Anschließend erfolgt der Übergang in das neue Exon C2. Auf Grund dieses Exons C2, welches den modifizierten C-Terminus charakterisiert, wird das resultierende Protein im Folgenden als AQP4-C2X-Isoform benannt. Das X in der Bezeichnung soll verdeutlichen, dass zum aktuellen Zeitpunkt noch kein endgültiger experimenteller Nachweis für die tatsächliche Expression dieses Proteins vorliegt. Eine computergestützte Berechnung veranschlagt für die C2X-Isoform eine Masse von ~ 31,20 kDa.

Bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenz kann man in der AQP4-C2X-Isoform Proteinmotive erkennen (siehe Abbildung 16 - B). So lässt sich in den Exonen 1 und 3 jeweils ein NPA-Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin) nachweisen.

Die Bestimmung von Transmembranstruktur und -topologie als weitere Charakteristika des Proteins erfolgte mit Hilfe eines rechnergenerierten Modells. Dabei zeigen sich für die AQP4-C2X-Isoform der Ratte insgesamt fünf α -helikale Transmembrandomänen, die durch vier Schleifen miteinander verbunden sind. Betrachtet man die vorhergesagte Membrantopologie, so lässt sich für den N-Terminus eine intrazelluläre, für den C-Terminus jedoch eine extrazelluläre Lokalisation feststellen (siehe Abbildung 16 – C).

(A)



(B)

```

atgagtgcaggagctgcagcggggcgggtggggaagtgtggacctcctgcagc
M S D G A A A R R W G K C G P P C S
agagagagcatcatggtggccttcaaaggcgtctggactcaagccttctggaaggcggtc
R E S I M V A F K G V W T Q A F W K A V
acagcagagttcctggccatgctcatcttggctctgctcagcgtgggatccaccattaac
T A E F L A M L I F V L L S V G S T I N
tggggtggctcagagaacccctacctgtggacatggtcctcatctccctctgcttggga
W G G S E N P L P V D M V L I S L C F G
ctcagcattgccaccatggttcagtgttcggccacatcagcgggtggccacatcaacccl
L S I A T M V Q C F G H I S G G H I N P
gcggtgacagtgcccatggtgtgacacgaaagatcagcatcgccaagtccgtcttctac
A V T V A M V C T R K I S I A K S V F Y
atcactgcgcagtgctggggccatcatcggagctgggatcctctacctggtcacacc
I T A Q C L G A I I G A G I L Y L V T P
cccagcgtgggtgggagattgggagtcaccacggttcattggaacctcactgctggccat
P S V V G G L G V T T V H G N L T A G H
gggctcctgggtggagctaaataactcttccagctggtattcaccattttgccagctgt
G L L V E L I I T F Q L V F T I F A S C
gattccaaacggactgatgttactggttccgttcttagcaattgggttttccgttgca
D S K R T D V T G S V A L A I G F S V A
attggacatttgggtgcaatcaattataccggagccagcatgaaatccagctcgatccttt
I G H L F A I N Y T G A S M N P A R S F
ggccctgcagttatcatgggaaactgggaaaaccactggggagtagagaagtccagcag
G P A V I M G N W E N H W G V E K V Q Q
aggcctgctgcaacagatctcatagtggtctgtctcaggtcttcaactaacagttgagttt
R P A A T D L I V F C S R S S L T V E F
tcgaaacgtcagatattgtcagacagatcagccgaatattatgggttcccatgtaga
S K R Q I C L T E Y S R I F M G F P C R
ataaatttaaatcataatgtatgctgaatattactgcttaa
I N L N H K C M L N I T A *

```

(C)

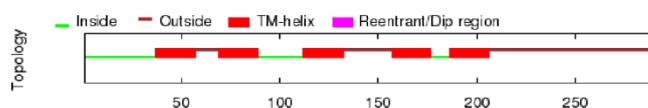


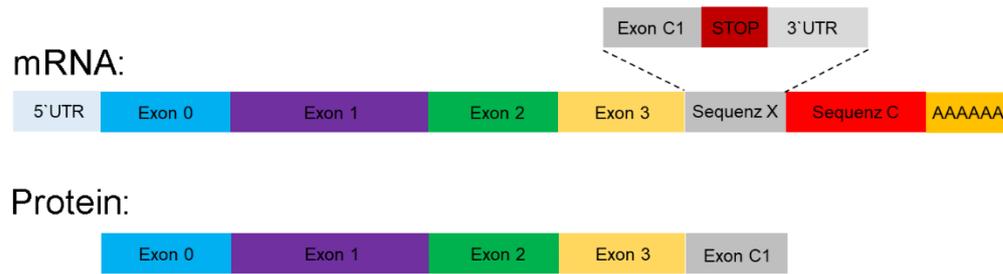
Abbildung 16: Theoretisierung der neuen AQP4-C2X-Isoform der Ratte. (A) Schematische Darstellung des kurzen mRNA-Transkriptes und das daraus resultierende Protein AQP4-C2X mit 3' modifiziertem Exon C2. (B) Codierende Nukleotid- und Aminosäuresequenz mit farbiger Markierung der Exone sowie der NPA-Proteinmotive. (C) Rechnergestütztes Modell der Transmembrantopologie zeigt fünf α -helikale Transmembrandomänen, bei intrazellulärer Lokalisation des N-Terminus aber extrazellulärer Lokalisation des C-Terminus (<http://octopus.cbr.su.se/>).

Das längere der beiden mRNA-Transkripte hingen codiert ein Protein, das aus insgesamt 256 Aminosäuren besteht und sich in die Exone 1-5 unterteilen lässt (siehe Abbildung 17 - A). Aus dem längeren mRNA-Transkript resultiert also ein kürzeres Protein als aus dem kürzeren mRNA-Transkript. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass die zusätzliche Sequenz X des langen Transkriptes bereits ein Stopcodon enthält, was zu einem frühzeitigen Translationsstopp führt. Die Exone 0, 1 und 2 entsprechen dem Aufbau der AQP4 M1-Isoform und dem Exon 3 fehlt wiederum die letzte Aminosäure. Anschließend erfolgt der Übergang in das neue Exon C1, welches durch die Sequenz X codiert wird. Auf Grund dieses Exons C1, welches den modifizierten C-Terminus charakterisiert, wird das resultierende Protein im Folgenden als AQP4-C1X-Isoform benannt. Das X in der Bezeichnung soll wiederum verdeutlichen, dass zum aktuellen Zeitpunkt noch kein endgültiger experimenteller Nachweis für die tatsächliche Expression dieses Proteins vorliegt. Die computergestützte Berechnung veranschlagt für diese Isoform eine Masse von ~ 27,13 kDa.

Auch in der AQP4 C1X-Isoform kann man Proteinmotive erkennen (siehe Abbildung 17 – B). So lassen sich in den Exonen 1 und 3 wieder jeweils ein NPA-Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin) nachweisen.

Als weiteres Charakteristikum des Proteins wurde ebenfalls mit Hilfe eines rechnergenerierten Modells die Transmembranstruktur und -topologie bestimmt. Dabei zeigen sich für die AQP4-C1X-Isoform der Ratte insgesamt sechs α -helikale Transmembrandomänen, die durch fünf Schleifen miteinander verbunden sind. Betrachtet man die vorhergesagte Membrantopologie, so lässt sich sowohl für den N-Terminus als auch für den C-Terminus eine intrazelluläre Lokalisation feststellen (siehe Abbildung 17 – C).

(A)



(B)

```

atgagtgacggagctgcagcggggcgggtgggtaagtgtggacctccctgcagc
  M S D G A A A R R W G K C G P P C S
agagagagcatcatggtggccttcaaaggcgtctggactcaagccttctggaaggcggtc
  R E S I M V A F K G V W T Q A F W K A V
acagcagagttcctggccatgctcatctttgttctgctcagcgtgggatccaccattaac
  T A E F L A M L I F V L L S V G S T I N
tggggtggctcagagaacccccctacctgtggacatggctcctcatcctcctctgctttgga
  W G G S E N P L P V D M V L I S L C F G
ctcagcattgccaccatggttcagtgcttcggccacatcagcgggtggccacatcaacca
  L S I A T M V Q C F G H I S G G H I N P
gcggtgacagtgccatgggtgtgcacacgaaagatcagcatcgccaagtccgtcttctac
  A V T V A M V C T R K I S I A K S V F Y
atcactgcgcagtgccctggggccatcatcgagctgggatcctctacctggtcacacc
  I T A Q C L G A I I G A G I L Y L V T P
ccagcgtgggtgggaggttgggagtcaccacggttcatggaaacctcactgctggccat
  P S V V G G L G V T T V H G N L T A G H
gggctcctggtggagctaaataactttccagctggtattcaccatTTTTGCCAGCTGT
  G L L V E L I I T F Q L V F T I F A S C
gattccaaacggaggttactggttccggtttagcaattgggttttccggttgca
  D S K R T D V T G S V A L A I G F S V A
attggacatttgttgcattcaattataccggagccagcatgaatccagctcgatccttt
  I G H L F A I N Y T G A S M N P A R S F
ggccctgcagttatcatgggaaactgggaaaaccactgggtaactactaagttgatatgc
  G P A V I M G N W E N H W V T T K L I C
cccaccttctgaggtgggaaacaattatccaaaagcctcttttttattataacataa
  P T F L R L G T I I Q K P L F L L T *

```

(C)

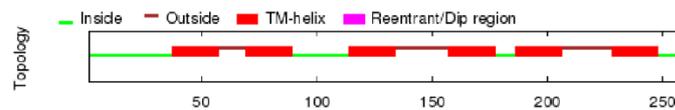


Abbildung 17: Theoretisierung der neuen AQP4-C1X-Isoform der Ratte. (A) Schematische Darstellung des langen mRNA-Transkriptes und das daraus resultierenden Protein AQP4-C1X mit 3' modifiziertem Exon C1. **(B)** Codierende Nukleotid- und Aminosäuresequenz mit farbiger Markierung der Exone sowie der NPA-Proteinmotive. **(C)** Rechnergestütztes Modell der Transmembrantopologie zeigt sechs α -helikale Transmembrandomänen, bei jeweils intrazellulärer Lokalisation von N- und C-Terminus (<http://octopus.cbr.su.se/>).

3.2 Ergebnisse der Immunmarkierungen des *Ductus cochlearis* der adulten Ratte (p32)

3.2.1 Immunmarkierung des DC mit einem Anti-AQP4-Antikörper, der eine Spezifität für ein Epitop am N-Terminus der AQP4 M1-Isoform aufweist (Anti-AQP4-NT)

Die Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-NT zeigt Signale von AQP4 vorwiegend in den epithelialen Stützzellen des äußeren Sulkus und im Stützzellepithel der sensorischen Domäne (siehe Abbildung 18 - A). Eine diskrete Markierung findet sich auch in den Stützzellen des inneren Sulkus. Auf zellulärer Ebene lassen sich die Signale innerhalb des Corti-Organs vorwiegend in den inneren Phalangenzellen (IPhC) sowie den Deiterszellen (DZ), teils aber auch in den inneren Pfeilerzellen (IPZ) identifizieren. Dabei kann man auf subzellulärer Ebene eine vorwiegend zytoplasmatische, supra- bzw. perinukleäre Markierung erkennen (siehe Abbildung 18 – B). Die äußeren Pfeilerzellen sind nicht ausreichend zu beurteilen. Weiterhin zeigt sich ein Signal in der Basilarmembran.

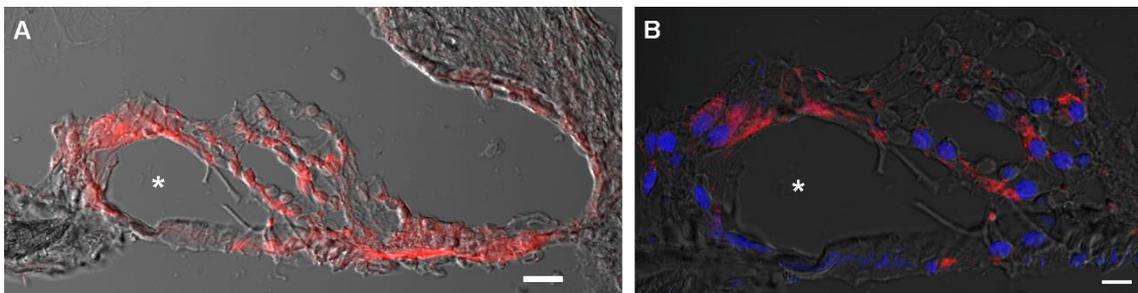


Abbildung 18: Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-NT (rot) der adulten Ratte (p32). (A) Es zeigt sich eine vorwiegende Markierung von AQP4 in den Stützzellen des lateralen Sulkus sowie im Stützzellepithel der sensorischen Domäne. Weiterhin zeigt sich ein diskretes Signal in den Stützzellen des inneren Sulkus sowie den inneren Pfeilerzellen. (Maßstab: 20 µm) (B) Subzelluläre Lokalisation von Anti-AQP4-NT in der sensorischen Domäne (Asterisk markiert den Corti-Tunnel). In den inneren Phalangenzellen (IPhZ) sowie den Deiterszellen (DZ) lässt sich eine vorwiegend zytoplasmatische, supra-bzw. perinukleäre Markierung erkennen. Die inneren Pfeilerzellen (IPZ) lassen ebenfalls ein positives Signal erahnen. (Maßstab: 10 µm)

3.2.2 Immunmarkierung des DC mit zwei Anti-AQP4-Antikörpern, von denen einer eine Spezifität für ein Epitop am C-Loop von AQP4 (Anti-AQP4-C-Loop), der andere eine Spezifität für ein Epitop am C-Terminus von AQP4 (Anti-AQP4-CT) aufweist

Die Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-CT lässt in den an die sensorische Domäne angrenzenden Stützzellen des inneren und äußeren Sulkus eine übereinstimmende Lokalisation beider Antikörpersignale erkennen (siehe Abbildung 19). Im Stützzellepithel der sensorischen Domäne hingegen lässt sich diese nicht identifizieren. Dort zeigt sich ausschließlich ein Signal für Anti-AQP4-C-Loop. Die exklusive Markierung findet sich in den inneren Phalangenzellen (IPhC), den inneren Pfeilerzellen (IPZ) sowie den Deiterszellen (DZ), wobei eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Signals von Anti-AQP4-C-Loop offensichtlich erscheint.

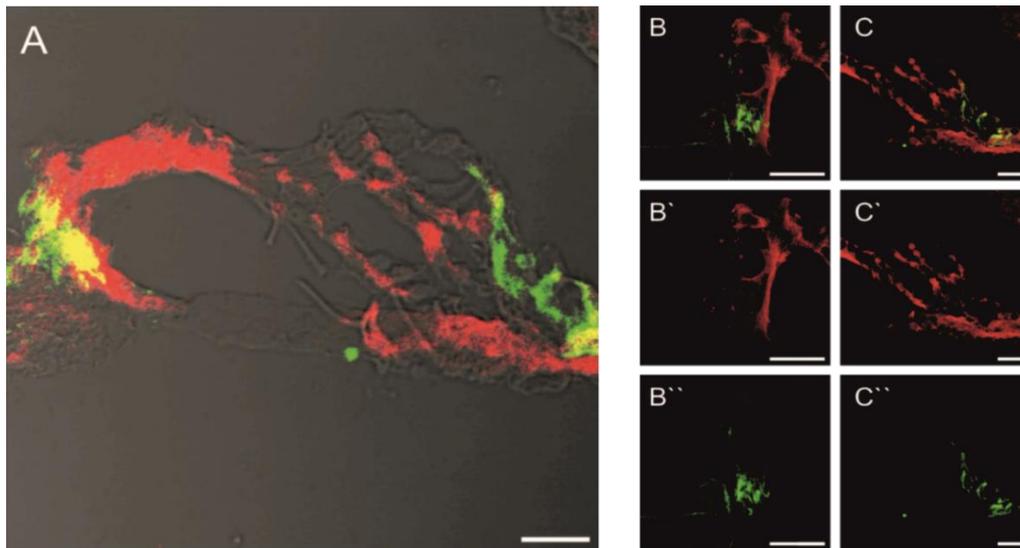


Abbildung 19: Immunmarkierung des DC der adulten Ratte mit Anti-AQP4-C-Loop (rot) und Anti-AQP4-CT (grün). (A) Übersichtsaufnahme des Corti-Organs, Kolokalisation von Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-CT in den Zellen des inneren und äußeren Sulkus (gelb) sowie exklusiver Markierung von Anti-AQP4-C-Loop in den Stützzellen der sensorischen Domäne (rot). (B-B'') Exklusive Markierung von Anti-AQP4-C-Loop (rot) in den Stützzellen der sensorischen Domäne (rot) mit deutlichem Signal in den inneren Pfeilerzellen (IPZ). Auffällig ist die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. (C-C'') Kolokalisation von Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-CT in den an die sensorische Domäne lateral grenzenden äußeren Sulkuszellen (Hensenzellen). Exklusive Markierung von Anti-AQP4-C-Loop (rot) in den Deiterszellen (rot) mit vorwiegend zytoplasmatischer Lokalisation. (Maßstab: 20µm).

3.2.3 Immunmarkierungen mit Anti-AQP4-CT, Anti-AQP4-C-Loop sowie Anti-AQP4-NT in Kontrollgewebe der Retina der adulten Ratte (p32)

Für alle verwendeten Anti-AQP4-Antikörper fungierte Retina-Gewebe aus der adulten Ratte jeweils als Kontrollgewebe (siehe Abbildung 20). Es lassen sich bei allen drei Antikörpern jeweils Signale im Bereich der inneren Grenzsicht, angrenzend an die Ganglienzellschicht (GCL), der äußeren plexiformen Schicht sowie der inneren Körnerschicht (INL) nachweisen. Die Signale von Anti-AQP4-CT, Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-NT sind jedoch sichtbar schwächer als die von Anti-AQP4-CT, insbesondere im Bereich der inneren Körnerschicht. Die Beobachtungen entsprechen der bekannten perivaskulären Lokalisation von AQP4 in der Ratten-Retina (Nagelhus et al., 1998, Nagelhus et al., 2004).

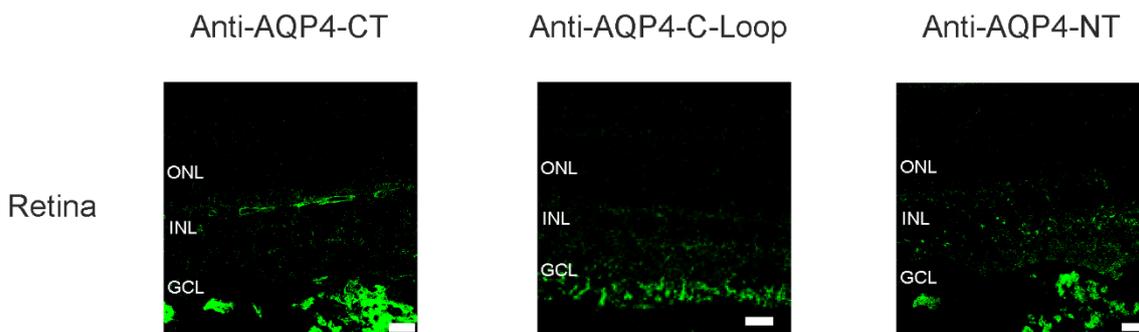


Abbildung 20: Immunmarkierungen mit Anti-AQP4-CT, Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-NT in Kontrollgewebe der Retina der adulten Ratte. Perivaskuläre Expression von AQP4 im Bereich der inneren Grenzsicht, der äußeren plexiformen Schicht sowie der inneren Körnerschicht (INL). ONL: äußere Körnerschicht, INL: innere Körnerschicht, GCL: Ganglienzellschicht. (Maßstab: 20µm)

4 DISKUSSION

4.1 Die Expression von neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus in den Stützzellen der sensorischen Domäne des *Ductus cochlearis* der Ratte

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine grundsätzliche Expression bzw. die Existenz von putativen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus im *DC* der Ratte, insbesondere in den Stützzellen der sensorischen Domäne zu untersuchen.

Eine charakteristische Eigenschaft des Wasserkanals AQP4 ist das Vorkommen von multiplen Isoformen. Der Großteil dieser Proteine unterscheiden sich durch ihre Modifikation am N-Terminus (AQP4 a-f) bei identischem C-Terminus (Moe et al., 2008). Erst kürzlich wurden in humanem Gewebe zwei weitere AQP4-Isoformen (AQP4-M1ex, AQP4-M23ex) mit erstmals modifiziertem C-Terminus entdeckt, welche durch den Mechanismus des „translational readthrough (TRT)“ generiert werden (De Bellis et al., 2017).

Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen, bestehend aus 3'RACE-PCR, RT-PCR, TOPO-TA-Klonierung sowie anschließender Sequenzierung ließen sich in der vorliegenden Studie zwei unterschiedlich lange, AQP4-spezifische mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Ende im *DC* der Ratte identifizieren. Theoretischen Analysen zufolge resultieren im Prozess der Translation daraus ebenfalls zwei weitere AQP4-Proteine mit verändertem C-Terminus, welche als AQP4-C1X bzw. AQP4-C2X bezeichnet werden sollen. Weiterhin ließen sich diese Transkripte auch in *retinalem* und *cerebellärem* Gewebe aus der Ratte nachweisen. Beide modifizierten mRNA-Transkripte sind vorwiegend charakterisiert durch den Verlust des Exon 4, welches den konventionellen C-Terminus der AQP4-Isoformen codiert.

Das kürzere mRNA-Transkript besitzt anstelle des Exon 4 eine „Sequenz C“ welche das modifizierende Exon C2 beinhaltet und das Protein AQP4-C2X mit 291 Aminosäuren codiert. Das längere mRNA-Transkript beinhaltet zusätzlich zur „Sequenz C“ noch eine vorangestellte „Sequenz X“. Insgesamt resultiert dieses mRNA-Transkript in dem Protein AQP4-C1X mit 256 Aminosäuren.

Die neu identifizierten mRNA-Transkripte unterscheiden sich voneinander also nur durch das zusätzliche Vorkommen der „Sequenz X“. Diese beinhaltet bereits ein Stopcodon und führt auf diese Weise zu einem kürzeren Protein. Eine auffällige Eigenschaft dieser „Sequenz X“ ist der Beginn mit der Basenabfolge „GT“ sowie das Ende mit der Basenabfolge „AG“, weshalb diese Sequenz X auch als GT-AG-Intron charakterisiert werden kann. Das Belassen bzw. Herausschneiden dieser „Sequenz X“ kann eventuell als Regulationsmechanismus verstanden werden, wodurch zwei unterschiedliche Proteine auf mRNA-Ebene codiert werden. Eine solche mRNA-Intron-Retention wurde lange Zeit als unsinnig betrachtet, scheint aber nach neueren Untersuchungen als weitere Form des alternativen Spleißens eine essenzielle Rolle in der normalen Zellphysiologie bzw. Regulation der Proteinviefalt zu spielen (Wong et al., 2016). Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Intron-Retention auch Folge eines fehlerhaften Spleiß-Mechanismus sein kann und dass das mRNA-Transkript ohne funktionellen Gebrauchswert ist, abgebaut und somit nie in ein Protein überführt wird (Roy and Irimia, 2008, Jaillon et al., 2008). Weiterhin wurde in den theoretischen Analysen der vorliegenden Studie das zusätzlich vorhandene Stopcodon innerhalb der „Sequenz X“ streng als solches beachtet, wodurch ein vorzeitiger Abbruch der Translation erfolgt, mit der logischen Folge eines kürzeren Proteins. Im Sinne eines „translational readthrough“ (TRT) wie er erst kürzlich bei einer AQP4-Isoform mit ebenfalls verändertem C-Terminus beobachtet wurde (De Bellis et al., 2017), könnte jedoch auch dieses Stopcodon nicht beachtet werden. Das Signal für den Translationsstopp würde dann wieder in der „Sequenz C“ liegen und somit ein weiteres, potenzielles Protein generieren. Das Vorkommen eines solchen TRT-Mechanismus bei der AQP4 C1X-Isoform sollte weiter untersucht werden.

In die Diskussion der modifizierten AQP4 mRNA-Transkripte muss weiterhin auch das 5'Ende bzw. der potenzielle N-Terminus miteinbezogen werden. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieser zumindest eine vollständige Übereinstimmung entsprechend der M1-Isoform aufweist. Da auf Grund der primären Fragestellung nach Isoformen mit modifizierten 3'Enden jedoch keine zusätzliche 5'RACE durchgeführt wurde, ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Analyse der 5'Regionen der neuen Isoformen noch nicht endgültig abgeschlossen bzw. inkomplett ist. Die Aufklärung der tatsächlichen „Full-Length-Sequenzen“ ist noch Gegenstand der Forschung und wird aktuell im Rahmen der Masterarbeit von Frau Lydia Garcia-Pradas am Department für Anatomie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt. Nach aktuellem Forschungsstand (September 2017) ist neben dem in dieser Arbeit gezeigten M1-analogen N-Terminus zusätzlich auch die Existenz eines Mz-analogen N-Terminus annehmbar.

Die Aufklärung der vollständigen Sequenzen ist dringende Voraussetzung für weitere Untersuchungen. Anschließend muss geklärt werden, ob die identifizierten neuen AQP4-mRNA-Transkripte auch tatsächlich in Proteine translatiert werden und ob diese eine funktionelle Wasserleitfähigkeit besitzen.

Betrachtet man die bereits bekannte hohe Variabilität des N-Terminus von AQP4-Isoformen, wie sie z.B. über Variation des Translationsstarts bzw. Leaky-Scanning-Mechanismen (Pisani et al., 2011) erzeugt werden, so spiegelt sich die hohe Variationsbreite durch die in dieser Arbeit identifizierten Isoformen und deren potenziellen Regulationsmechanismen des „TRT“ bzw. der Intron-Retention auch für den C-Terminus wieder. Entsprechend dieser „Spiegeltheorie“ ist es durch Variation von sowohl N- als auch C-Terminus möglich, eine sehr hohe Variabilität an AQP4-Isoformen zu generieren. Die AQP4-Vielfalt ist dadurch womöglich noch weitaus höher, als bisher angenommen und muss in allen künftigen Studien beachtet werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe von Immunmarkierungen die Expression von putativen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus im

DC der Ratte untersucht. Vergangene Arbeiten zum Verteilungsmuster von AQP4 zeigten dessen Expression in den epithelialen Stützzellen entlang dem inneren und äußeren Sulkus, nicht jedoch in den Stützzellen der sensorischen Domäne des *Ductus cochlearis* (Eckhard et al., 2012b, Hirt et al., 2011, Takumi et al., 1998). Diese Untersuchungen wurden weitestgehend mit einem Anti-AQP4-Antikörper durchgeführt, der eine Epitopspezifität für den konventionellen C-Terminus von AQP4 besitzt. Im Gegensatz zu diesen Studien konnten im Rahmen zweier Doktorarbeiten mit Hilfe eines Antikörpers mit einer Epitopspezifität gegen den Aminoterminus der AQP4 M1-Isoform erstmals Signale in den epithelialen Stützzellen der sensorischen Domäne des Corti-Organs der Ratte detektiert werden (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012) . Diese Beobachtungen sollten im Rahmen dieser Arbeit weiter überprüft werden. Hierfür wurden die Immunmarkierungen des DC nochmals durchgeführt und sollten mit einem neuen Anti-AQP4-C-Loop-Antikörper validiert werden.

Die Immunmarkierung mit Anti-AQP4-NT bestätigen eine Expression von AQP4 sowohl in den Stützzellen des inneren und äußeren Sulkus als auch in den Stützzellen des Corti-Organs, insbesondere den inneren Phalangenzellen, sowie den Deiterszellen. Ein Signal in den äußeren Pfeilerzellen fehlt weiterhin. Diese Ergebnisse sind folgendermaßen zu werten: Die Signale im inneren und äußeren Sulkus entsprechen den AQP4 M1- bzw. AQP4-Mz-Isoformen. Die positiven Signale in den Stützzellen der sensorischen Domäne sprechen hingegen für eine neuartige AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus. Analog den molekularbiologisch identifizierten mRNA-Transkripten mit verändertem 3'Ende jedoch M1-analogen 5'Ende, detektieren die Anti-AQP4-NT-Antikörper entsprechende Isoformen. Da die bisherigen Anti-AQP4-CT-Antikörper gegen das Exon 4 gerichtet waren, dieses jedoch bei den modifizierten Isoformen fehlt, erklärt logisch, weshalb diese bisher nicht erfolgreich detektiert wurden.

Eine ebenfalls durchgeführte Doppelmarkierung mit einem Anti-AQP4-C-Loop-Antikörper sowie einem konventionellen Anti-AQP4-CT-Antikörper zeigt für den inneren und äußeren Sulkus ein Kollokalisationsignal, für die Stützzellen der

sensorischen Domäne jedoch nur ein Signal für den Anti-AQP4-C-Loop-Antikörper. Diese Ergebnisse sind folgendermaßen zu bewerten:

Der Anti-AQP4-CT-Antikörper detektiert nur die altbekannten AQP4-Isoformen mit konventionellem C-Terminus. Die Signale in den Stützzellen des inneren und äußeren Sulkus stimmen mit früheren Untersuchungen überein (Eckhard et al., 2012b, Hirt et al., 2011, Mhatre et al., 2002, Miyabe et al., 2002, Takumi et al., 1998). Der neue Anti-AQP4-C-Loop-Antikörper detektiert hingegen sowohl die konventionellen als auch die neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus. Daher erklären sich die Kolokalisationssignale in den epithelialen Stützzellen des inneren und äußeren Sulkus. Die positiven Signale in den inneren Phalangenzellen, der inneren Pfeilerzellen sowie den Deiterszellen hingegen, zeigen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus. Die Immunmarkierungen mit dem Anti-AQP4-C-Loop-Antikörper validieren damit die Ergebnisse, die mit dem Anti-AQP4-NT-Antikörper erzielt wurden und festigen die Beweise für die Expression einer speziellen AQP4-Isoform in den Stützzellen des Corti-Organs.

Auffällig ist im Zusammenhang mit allen durchgeführten Immunmarkierungen die teils membranäre, vorwiegend jedoch intrazelluläre Lokalisation der AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus. Dies spricht dafür, dass sich der größte Anteil der neuen Isoformen vorwiegend zytoplasmatisch und nur ein kleiner Anteil transmembranär befindet. Es lässt sich vermuten, dass diese Lokalisation je nach extrazellulärem Milieu bzw. physiologischen Begebenheiten in bzw. aus der Zellmembran transloziert werden kann. In weiterführenden, bisher unveröffentlichten Untersuchungen (nicht Teil dieser Promotion) zur Kolokalisation von Anti-AQP4-C-Loop sowie K_{ir} 4.1 im *Ductus cochlearis* der adulten Ratte, wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf eine gekoppelte Expression der Kanäle AQP4 und K_{ir} 4.1 in den Stützzellen der sensorischen Domäne gefunden.

Die in dieser Arbeit erstmalig molekularbiologisch identifizierten AQP4-Transkripte mit modifiziertem 3'Ende, die Immunmarkierung von AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus in den Stützzellen der sensorischen Domäne der Ratte, sowie das komplementäre Expressionsmuster von AQP4 und Kir 4.1 im Stützzellepithel des Corti-Organs könnten *in toto* eine große Bedeutung bei der weiteren Aufklärung der Funktion von AQP4 im Hörprozess spielen und daher neue Einblicke in das physiologische und pathophysiologische Verständnis der Cochlea ermöglichen.

Wie bereits postuliert (Gleiser, 2012, Eckhard, 2012), spricht die gemeinsame Expression von AQP4 und Kir 4.1 in nächster Nachbarschaft zum Ort der Transduktion für eine AQP4 vermittelte osmotische Volumenhomöostase der Stützzellen, während der über Kir 4.1 ablaufenden K⁺-Ströme. Auf Basis der aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnissen, verdichten sich die Hinweise dass die Mechanismen in den Stützzellen des Corti-Organs daher tatsächlich als komplementär den Mechanismen des zentralen „K⁺-Spatial buffering“ bzw. des retinalen „K⁺-Siphoning“ (Newman et al., 1984, Orkand et al., 1966, Nagelhus et al., 1999, Nagelhus et al., 2004) betrachtet werden können. In weiterem Sinne können nach dieser funktionellen Theorie die epithelialen Stützzellen als „Gliazellen“ des DC betrachtet werden, analog den Gliazellen des ZNS (Astrozyten) sowie der Retina (Müllerzellen).

Ein Problem dieser theoretisch über AQP4 vermittelten, äquilibrierenden Wasserflüsse ist jedoch, dass sie zu einer Volumenänderung der Stützzelle führen. Hierdurch kann es zu einer Störung des zellulären Aufbaus des Corti-Organs kommen. In der Folge wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Störung bzw. einem Ausfall des Transduktionsmechanismus zu rechnen (Vollrath et al., 2007). Auf Grund dieser theoretischen Überlegung scheint es keine Vorteile zu haben, wenn die AQP4-Isoformen ständig in der Zellmembran lokalisiert sind. Womöglich ist die beobachtete, vorwiegend intrazelluläre Lokalisation in den Stützzellen der sensorischen Domäne Hintergrund dieser Problematik. Wie bereits postuliert (Eckhard, 2012) lässt sich vermuten, dass die Wasserkanäle primär zytosolisch in Vesikeln lokalisiert sind und bei Bedarf in die

Zellmembran transloziert werden. Auf Basis der aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Fakten, könnte der bereits diskutierte Intron-Retentionsmechanismus der „Sequenz X“ und das dadurch veränderte Stopcodon hierbei maßgeblich beteiligt sein.

Es ist zu vermuten, dass das Kaliumrecycling vorwiegend über das Gap-Junctions System abläuft (Kikuchi et al., 2000a, Kikuchi et al., 2000b, Suzuki et al., 2004) und das AQP4/K_{ir}4.1-System in besonderen Situationen, ähnlich einem Notfallmechanismus, eine zusätzliche Rolle spielt. Beispielhaft sei eine vorübergehende sehr hohe extrazelluläre K⁺-Konzentration erwähnt. Zur Kompensation des über die Kaliumströme auftretenden starken osmotischen Stresses werden die Wasserkanäle in die Membran transloziert. Es liegt auf der Hand, dass dieser Translokation neben der Intron-Retention noch weitere Regulationsmechanismen zu Grunde liegen können, die im weiteren Verlauf noch diskutiert werden

Im Rahmen dieser Diskussion soll im Weiteren noch die Korrelation zwischen den in der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch identifizierten AQP4-mRNA-Transkripten mit modifiziertem 3'Ende, sowie den immunhistochemisch über Anti-AQP4-NT bzw. Anti-AQP4-C-Loop detektieren Signalen in den Stützzellen der sensorischen Domäne besprochen werden. Beide Teilergebnisse sprechen aus bereits erwähnten Gründen eindeutig für die Existenz von AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus. Es ist jedoch zu bedenken, dass es bisher noch keinen eindeutigen experimentellen Nachweis für die direkte Korrelation dieser Teilergebnisse gibt, also, dass die detektierten Signale in den Stützzellen exakt den Proteinen entsprechen, die aus den modifizierten mRNA-Transkripten entstehen. Neben den in dieser Arbeit detektierten Transkripten sind bisher weiterhin nur AQP4-M1ex, sowie AQP4-M23ex als AQP4-Proteine mit verändertem C-Terminus bekannt (De Bellis et al., 2017). Diese Isoformen wären theoretisch jedoch trotz Modifikation am C-Terminus durch die bisher konventionell verwendeten Anti-AQP4-CT-Antikörper detektiert worden. Aus diesem Grund lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen den

Teilergebnissen zwar vermuten, dieser muss jedoch noch wissenschaftlich bewiesen werden.

Für den eindeutigen Nachweis dieser Korrelation empfiehlt sich die Synthese eines Anti-AQP4-Antikörpers mit einer Epitopspezifität gegen den modifizierten C-Terminus der neuen identifizierten Isoformen (Sequenz C von AQP4-C1X/-C2X). Mit diesem sollte das Protein über eine Western-Blot ggf. mit vorausgehender Immunopräzipitation identifiziert werden. Weiterführend kann die Aminosäuresequenz massenspektrometrisch über MALDI-TOF bzw. Tandem-Massenspektrometrie bestimmt werden. Damit wäre gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten AQP4 mRNA-Transkripte tatsächlich in Proteine translatiert werden. Weiterführend sollte der Nachweis erfolgen, dass die in den Stützzellen der sensorischen Domäne detektierten Signale mit den Anti-AQP4-NT bzw. Anti-AQP4-C-Loop Antikörpern tatsächlich den C-Terminus modifizierten Isoformen (AQP4-C1X / -C2X) entsprechen. Hierfür sollte mit dem Anti-AQP4-Antikörper mit einer Epitopspezifität gegen die „Sequenz C“ wiederum eine Immunmarkierung des *Ductus cochlearis* der Ratte durchgeführt werden. Mit einem weiteren Anti-AQP4-Antikörper, der eine Spezifität gegen die „Sequenz X“ der modifizierten Isoformen besitzt, könnte darüber hinaus zwischen den AQP4-Isoformen C1X und C2X differenziert werden. So ließe sich eindeutig deren subzelluläre Lokalisation (intrazellulär / transmembranär) nachweisen.

Im Rahmen der Western-Blot Analyse ließe sich eventuell weiterhin eine bisher ungeklärte Frage klären. Bei der Durchführung von Immunoblots aus Hirngewebe wurde in früheren Untersuchungen interessanterweise mit einem Anti-AQP4-NT-Antikörper eine Proteinbande von 38 kDa detektiert, die jedoch mit einem Anti-AQP4-CT-Antikörper nicht identifiziert werden konnte (Neely et al., 1999). Bereits damals stellte sich die Frage nach weiteren AQP4-Isoformen mit potenzieller Modifikation am C-Terminus. Zwar entsprechen die in dieser Arbeit identifizierten AQP4-C1X bzw. AQP4-C2X-Isoformen mit ca. 27 bzw. 32 kDa rein rechnerisch nicht dieser Bande. Durch die bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärten „Full-Length-Sequenzen“ bzw. zusätzliche TRT-Mechanismen ist eine

Übereinstimmung mit dem Protein von 38 kDa aber rein theoretisch möglich. Weiterhin könnten sich hinter der Proteinbande noch weitere, bisher nicht identifizierte AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus verbergen.

4.2 Struktur, Funktion und Regulation der neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit identifizierten AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer potenziellen funktionellen Wasserleitfähigkeit sowie die möglicherweise zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen diskutiert werden.

Nahezu alle bisher bekannten Aquaporine zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Sie bestehen aus sechs Transmembrandomänen, wobei Amino- (N) und Carboxy- (C) Terminus jeweils intrazellulär lokalisiert sind (Agre et al., 1993, Verkman and Mitra, 2000). Ein rechnergestütztes Modell sagt für die AQP4 C1X-Isoform sechs α -helikale Transmembrandomänen, bei jeweils intrazellulärer Lokalisation von N- bzw. C-Terminus, voraus. Rein strukturell reiht sich diese Isoform somit problemlos in die Familie der Aquaporine ein. Abweichend hiervon zeigen sich für das Modell der AQP4 C2X-Isoform fünf α -helikale Transmembrandomänen, die durch vier Schleifen miteinander verbunden sind. Dabei lassen sich eine intrazelluläre Lokalisation des N-Terminus, jedoch eine extrazelluläre Lokalisation des C-Terminus feststellen. Die Transmembranstruktur sowie -topologie weichen also von der generellen Aquaporin-Struktur ab. Diese Anomalie kann rein theoretisch durch das rechnergestützte Modell an sich bedingt sein und in Wirklichkeit gar nicht vorliegen. Andererseits wurde in früheren Studien bereits über mehrere Aquaporine mit veränderter Transmembranstruktur berichtet, die jedoch teilweise funktionelle Beeinträchtigungen aufwiesen (Moe et al., 2008, De Bellis et al., 2014).

In diesem Zusammenhang stellt sich selbstverständlich die grundlegende Frage nach einer funktionellen Wasserleitfähigkeit der C-terminal modifizierten AQP4-

Isoformen, die im Folgenden diskutiert werden soll. Eine zentrale Bedeutung für die Wasserleitfähigkeit spielt das Vorkommen der NPA-Motive (Asparagin-Prolin-Alanin), welche die selektive Wasserpore bilden (Agre et al., 1993, Jung et al., 1994b, Murata et al., 2000, Sui et al., 2001). Entsprechend den bekannten AQP4-Kanälen zeigen die theoretisierten Aminosäuresequenzen der neuen Isoformen ebenfalls NPA-Motive. Hierdurch besitzen sie zunächst die grundlegende Voraussetzung zur Bildung einer funktionellen, wasserselektiven Pore. Initiale Untersuchungen zur Wasserleitfähigkeit der Stützzellen der sensorischen Domäne des *Ductus cochlearis* der Ratte stützen weiterhin die Theorie einer vorhandenen Konduktivität für Wasser (Gleiser, 2012).

Es muss jedoch erwähnt werden, dass für alle bisher identifizierten AQP4-Proteine mit intrazellulärer Lokalisation (AQP4b, AQP4d, AQP4f sowie AQP4- Δ 4) keine funktionelle Wasserleitfähigkeit nachweisbar war (Moe et al., 2008, De Bellis et al., 2014). Diese resultierten aus einer veränderten Transmembranstruktur bei vorhanden NPA-Motiven. Während die AQP4 C1X-Isoform mit sechs Transmembrandomänen und NPA-Motiv alle strukturellen Voraussetzungen erfüllt, so lässt sich auf Basis bisheriger Studien (Murata et al., 2000) für die AQP4 C2X-Isoform mit fünf Transmembrandomänen eine zumindest verminderte, wenn nicht sogar fehlende Wasserleitfähigkeit erahnen. Analog einem kürzlich gezeigten dominant-negativem Effekt der intrazellulär lokalisierten AQP4- Δ 4-Isoform auf die konventionellen AQP4-Isoformen (De Bellis et al., 2014), könnte die AQP4-C2X-Isoform die Wasserleitfähigkeit der C1X-Isoform modifizierend beeinflussen.

Abschließend kann die Frage nach der Wasserleitfähigkeit der AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus jedoch nicht rein theoretisch, sondern nur durch weiterführende experimentelle Untersuchungen geklärt werden. Hierfür bietet sich die *in-vitro* Transkription und Translation der neuen Isoformen in Oozyten oder in immortalisierten Zelllinien an. Anschließend können diverse transmembranäre Wasserpermeabilitätsmessungen durchgeführt werden (Kuppers et al., 2008, Zelenina and Brismar, 2000). Im Rahmen dieser

Experimente lassen sich durch Veränderung der Versuchsbedingungen auch mögliche Regulationsmechanismen studieren.

Wie bereits beschrieben, zeigen die Immunmarkierungen der neuen AQP4-Isoformen eine teils transmembranäre, vorwiegend jedoch zytoplasmatische Lokalisation in den epithelialen Stützzellen der sensorischen Domäne des DC. Weiterhin lässt sich auf Grund der erwähnten Zytoarchitekturstörung in Zusammenhang mit kontinuierlichen, osmotisch äquilibrierenden Wasserflüssen vermuten, dass die neuen AQP4-Isoformen nur bei Bedarf in die Zellmembran transloziert werden und dieser Lokalisationswechsel speziellen Regulationsmechanismen unterliegt. Diese können dynamisch-schnell oder langfristig reguliert sein (Zelenina, 2010). Grundsätzlich sind bereits für mehrere Aquaporine (AQP2, AQP4, AQP5) solche Translokationsmechanismen nachgewiesen worden (Nielsen et al., 1995, Ishikawa et al., 2002, Conner et al., 2012, Taylor, 2012).

Mehrere Fakten sprechen für eine schnelle, osmotisch regulierte Translokation der modifizierten AQP4-Isoformen. So konnte in früheren Untersuchungen für AQP4 grundlegend gezeigt werden, dass ein hypoosmolares Milieu über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zu einer reversiblen, zeitlich leicht verzögerten Translokation des Wasserkanals in die Zellmembran und damit veränderten Wasserpermeabilität führt (Taylor, 2012). Weiterhin konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe für die Teile der epithelialen Stützzellen des DC, in denen vorwiegend die neue AQP4-Isoform mit modifiziertem C-Terminus identifiziert wurde, eine zeitlich nahezu identische, leicht verzögerte Schwellreaktion auf hypoosmolare Stimulation gezeigt werden (Gleiser, 2012).

In Analogie zu AQP2 in der Niere könnte die Translokation weiterhin über eine Vasopressin induzierte, PKC-vermittelte Signalkaskade reguliert sein (Nielsen et al., 1995), auch wenn eine solche bisher noch nicht exakt für AQP4 nachgewiesen wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine lange PKC-Aktivierung *in-vitro* zu einer Internalisierung von AQP4 führt (Moeller et al., 2009).

In Zusammenhang mit diesen Signalkaskaden soll noch die Phosphorylierbarkeit des C-Terminus diskutiert werden. Während manche Untersuchungen eine zentrale Rolle der COOH-terminalen Serin- bzw. Threoninreste für die Translozierbarkeit propagierten (Zelenina et al., 2002, Han et al., 1998, Gunnarson et al., 2008) zeigen andere Studien, dass diese Phosphorylierungsstellen hingegen einen wesentlichen Einfluss auf das Schicksal der AQP4-Wasserkanäle im zytosolischen Kompartiment haben (Assentoft et al., 2014, Madrid et al., 2001, Kadohira et al., 2008). Dabei führt die Phosphorylierung zu einem lysosomalen Abbau (Kadohira et al., 2008). Bei den zwei modifizierten AQP4-Proteinen lassen sich unterschiedliche Phosphorylierungsstellen am C-Terminus eruieren. Die AQP4 C1X-Isoform zeigt dabei im Vergleich zur C2X-Isoform ein stark vermindertes Vorkommen von Serin- bzw. Threoninresten. Bei einer vorübergehenden, Clathrin-vermittelten Internalisierung der C1X-Isoform wäre dieses Protein dabei vor dem schnellen lysosomalen Abbau geschützt und könnte bei Bedarf schnell wieder in die Membran transloziert werden um die Wasserleitfähigkeit der Stützzellen des *Ductus cochlearis* zu beeinflussen.

Neben dieser schnellen, dynamischen Regulation sind auch langsame, längerfristige Mechanismen denkbar (Zelenina, 2010). Unter der Annahme, dass eine der C-terminal modifizierten AQP4-Isoformen innerhalb der Zellmembran und die andere zytosolisch lokalisiert ist, ist auch eine Regulation auf mRNA-Ebene durch „Alternatives Splicing“ denkbar. Wie bereits beschrieben hat die „Sequenz X“ den Charakter eines „GT-AG-Intron“. Als Folge der Entfernung bzw. Retention dieser „Sequenz X“ entstehen zwei unterschiedliche AQP4-Isoformen mit jeweils fünf- bzw. sechs Transmembrandomänen und annehmbarer unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation. Theoretisch könnte so die Regulation der transmembranären Wasserpermeabilität in den Stützzellen des *Ductus cochlearis* auch durch „Alternatives Splicing“ bzw. „Intron-Retention“ erfolgen, im Endeffekt also auf der vorwiegenden Expression einer der Isoformen beruhen. Zur Sicherung dieser Theorie müsste jedoch zunächst untersucht werden, ob die in dieser Arbeit identifizierten AQP4 Protein-Isoformen tatsächlich

in ihrer zellulären Lokalisation differieren. Weiterhin ist eine gegenseitige Beeinflussung der modifizierten Isoformen C1X und C2X möglich, was in einer veränderten Wasserleitfähigkeit der Zellen resultiert. Für AQP4-Proteine mit veränderter Transmembranstruktur und intrazellulärer Lokalisation konnte ein dominant-negativer Effekt auf andere AQP4-Isoformen gezeigt werden (De Bellis et al., 2014). Dabei könnte die AQP4-CX2-Isoform sowohl indirekt über Hemmung der C1X-Synthese als auch über direkte Interaktion mit der C1X-Isoform deren Wasserleitfähigkeit bidirektional modulieren. Insgesamt wird deutlich, dass sowohl die Aufklärung des grundlegenden Translokationsmechanismus von AQP4 als auch die Regulation der spezifischen Isoformen in der sensorischen Domäne des *Ductus cochlearis* weitere intensive Forschung. Die Aufklärung dieser Mechanismen ist unter anderem Voraussetzung für eine potenzielle therapeutische Intervention von AQP4-Pathologien mit veränderten Wasserpermeabilität.

4.3 Die klinische Relevanz der neuen AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus

Die Tatsache, dass die modifizierten AQP4-Isoformen teils transmembranär, teils zytosolisch lokalisiert sind, lassen wie bereits beschrieben einen Regulationsmechanismus zur Translokation bzw. Beeinflussung der Wasserleitfähigkeit der Stützzellen vermuten. Vor diesem Hintergrund sind viele potenzielle therapeutische Interventionen denkbar.

Ein Großteil der Bevölkerung ist mit zunehmendem Alter von der Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) betroffen. In einem Mausmodell konnte bei Betroffenen eine verminderte AQP4-Expression festgestellt werden (Christensen et al., 2009). Unter der Annahme, dass auch die C-terminal modifizierten AQP4-Isoformen hierbei eine Rolle spielen, könnte durch eine pharmakologische verstärkte Translokation der AQP4-Isoformen aus dem Zytosol in die Zellmembran bzw. Induktion der Transkription dieser Expressionsveränderung

entgegengewirkt werden. Auf diese Weise könnte in Zukunft auf externe Hörgeräte verzichtet und die eigentliche Ursache therapiert werden. Weitere pharmakologische Interventionen sind auch bei grundlegenden Störungen der Volumen- und Ionenhomöostase des Innenohres mit Beteiligung von AQP4 denkbar, so z.B. bei der Morbus Menière-Erkrankung.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten AQP4 mRNA-Transkripte mit modifiziertem 3'Ende ließen sich weiterhin auch in Gewebe aus Cerebellum und Retina nachweisen. Unter der Annahme, dass die resultierenden Proteine in den entsprechenden Geweben ebenfalls exprimiert werden, so ist in Pathomechanismen dieser Gewebe die Rolle der neuen AQP4-Proteine ebenfalls zu bedenken. So scheint AQP4 im zentralen Nervensystem unter anderem eine große Bedeutung bei der Entstehung von Hirnödemen in Folge eines Schlaganfalls zu spielen. Untersuchungen deuten als pathophysiologische Ursache auf eine verstärkte Expression von AQP4 hin (Tang and Yang, 2016, Rao et al., 2011). Im Falle einer wie oben erwähnten PKC-abhängigen Regulation der Translokation könnte im Sinne einer pharmakologischen, antiödematösen Therapie eine Hemmung dieser Kaskade (z.B. Vasopressin-Inhibitor) mit Internalisierung der AQP4-Isoformen erfolgen und in Folge die Wasserleitfähigkeit vermindert werden. Weiterhin ist auch an eine Antikörpervermittelte Blockade der Aquaporine zu denken. Hierbei sind die neu identifizierten ebenfalls AQP4-Isoformen zu bedenken. Möglicherweise könnte durch Herstellung eines blockierenden Antikörpers, der alle Isoformen detektiert ein besseres klinisches Resultat erreicht werden. Eine solche Bindestelle könnte im C-Loop in direkter Nachbarschaft zur Wasserpore liegen.

Zusammenfassend stellen die in dieser Arbeit generierten Daten Grundlage bzw. Ausgangspunkt für weiterführende funktionelle Analysen der AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus im *Ductus cochlearis* der Ratte dar, die eine hohe klinische Relevanz vermuten lassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Wasserkanal Aquaporin-4 spielt eine zentrale Rolle im Hörprozess. Essenziell ist die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts in den epithelialen Stützzellen des *Ductus cochlearis* (DC) durch ausgleichende Wasserflüsse im Rahmen der Kaliumhomöostase (Li and Verkman, 2001, Eckhard et al., 2012a). Anschaulich wird die Bedeutsamkeit des Wasserkanals bei AQP4-Knockout-Mäusen und Menschen mit Mutationen im AQP4-Gen, die eine verminderte Hörfähigkeit aufweisen (Li and Verkman, 2001, Nicchia et al., 2011). Eine spezifische Eigenschaft von AQP4 ist die Existenz multipler Isoformen (Moe et al., 2008, De Bellis et al., 2014, De Bellis et al., 2017). Immunmarkierungen des DC mit Antikörpern die eine Spezifität für den C-Terminus von AQP4 aufweisen, konnten keine Expression des Kanals in den Stützzellen des Corti-Organs zeigen (Eckhard et al., 2012b, Hirt et al., 2011, Takumi et al., 1998). Bei Verwendung eines Antikörpers mit einer Spezifität für den N-Terminus der M1-Isoform wurde jedoch auch in diesen Zellen ein Signal detektiert (Eckhard, 2012, Gleiser, 2012). Aus dieser Beobachtung resultiert der Verdacht nach einer C-terminal modifizierten AQP4-Isoform. In der vorliegenden Studie konnten über 3'RACE-PCR, RT-PCR, TOPO-TA-Klonierung und Sequenzanalysen zwei neue, AQP4-spezifische mRNA-Transkripte mit veränderten 3'Enden identifiziert werden. Während der Translation resultiert daraus theoretisch jeweils ein Protein, AQP4-C1X bzw. AQP4-C2X. Damit liefert diese Arbeit ein molekularbiologisches Korrelat für die Existenz von AQP4-Isoformen mit modifiziertem C-Terminus im DC der Ratte. Immunmarkierungen des DC mit neu generierten Antikörpern, die eine Spezifität gegen den C-Loop von AQP4 aufweisen, lassen spezifische Signale in den epithelialen Stützzellen des Corti-Organs erkennen. Damit festigen sich die Hinweise vorheriger Untersuchungen (Gleiser, 2012, Eckhard, 2012), dass in diesen Zellen eine spezifische, C-terminal modifizierte AQP4-Isoform exprimiert ist. Weitere Untersuchungen müssen folgen, eine pharmakologische Beeinflussung der neuen AQP4-Isoformen ist jedoch denkbar und könnte die Therapie AQP4-bedingter Schwerhörigkeit ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AGRE, P. 2004. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 43, 4278-90.
- AGRE, P., PRESTON, G. M., SMITH, B. L., JUNG, J. S., RAINA, S., MOON, C., GUGGINO, W. B. & NIELSEN, S. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol*, 265, F463-76.
- ASSENTOFT, M., LARSEN, B. R., OLESEN, E. T., FENTON, R. A. & MACAULAY, N. 2014. AQP4 plasma membrane trafficking or channel gating is not significantly modulated by phosphorylation at COOH-terminal serine residues. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C957-65.
- BOSHER, S. K. & WARREN, R. L. 1968. Observations on the electrochemistry of the cochlear endolymph of the rat: a quantitative study of its electrical potential and ionic composition as determined by means of flame spectrophotometry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 171, 227-47.
- CHRISTENSEN, N., D'SOUZA, M., ZHU, X. & FRISINA, R. D. 2009. Age-related hearing loss: aquaporin 4 gene expression changes in the mouse cochlea and auditory midbrain. *Brain Res*, 1253, 27-34.
- CONNER, M. T., CONNER, A. C., BLAND, C. E., TAYLOR, L. H., BROWN, J. E., PARRI, H. R. & BILL, R. M. 2012. Rapid aquaporin translocation regulates cellular water flow: mechanism of hypotonicity-induced subcellular localization of aquaporin 1 water channel. *J Biol Chem*, 287, 11516-25.
- COREY, D. P. & HUDSPETH, A. J. 1979. Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature*, 281, 675-7.
- CRANE, J. M., TAJIMA, M. & VERKMAN, A. S. 2010. Live-cell imaging of aquaporin-4 diffusion and interactions in orthogonal arrays of particles. *Neuroscience*, 168, 892-902.
- DALLOS, P. 1985. Response characteristics of mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci*, 5, 1591-608.
- DE BELLIS, M., PISANI, F., MOLA, M. G., BASCO, D., CATALANO, F., NICCHIA, G. P., SVELTO, M. & FRIGERI, A. 2014. A novel human aquaporin-4 splice variant exhibits a dominant-negative activity: a new mechanism to regulate water permeability. *Mol Biol Cell*, 25, 470-80.
- DE BELLIS, M., PISANI, F., MOLA, M. G., ROSITO, S., SIMONE, L., BUCCOLIERO, C., TROJANO, M., NICCHIA, G. P., SVELTO, M. & FRIGERI, A. 2017. Translational readthrough generates new astrocyte AQP4 isoforms that modulate supramolecular clustering, glial endfeet localization, and water transport. *Glia*, 65, 790-803.

- DENK, W., HOLT, J. R., SHEPHERD, G. M. & COREY, D. P. 1995. Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links. *Neuron*, 15, 1311-21.
- DERMIETZEL, R. 1974. Junctions in the central nervous system of the cat. 3. Gap junctions and membrane-associated orthogonal particle complexes (MOPC) in astrocytic membranes. *Cell Tissue Res*, 149, 121-35.
- DRENCKHAHN, B. 2004. Benninghoff Anatomie Band 2, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Elsevier - Urban & Fischer, München. 876, 706-745
- ECKHARD, A. 2012. Theoretisierung und immunhistochemische Untersuchung einer durch Aquaporine vermittelten Wasserhomöostase in der Cochlea, In: Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Universität Tübingen.
- ECKHARD, A., GLEISER, C., ARNOLD, H., RASK-ANDERSEN, H., KUMAGAMI, H., MULLER, M., HIRT, B. & LOWENHEIM, H. 2012a. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Mol Aspects Med*, 33, 612-37.
- ECKHARD, A., GLEISER, C., RASK-ANDERSEN, H., ARNOLD, H., LIU, W., MACK, A., MULLER, M., LOWENHEIM, H. & HIRT, B. 2012b. 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.
- FENTON, R. A., MOELLER, H. B., ZELENINA, M., SNAEBJORNSSON, M. T., HOLEN, T. & MACAULAY, N. 2010. Differential water permeability and regulation of three aquaporin 4 isoforms. *Cell Mol Life Sci*, 67, 829-40.
- FURMAN, C. S., GORELICK-FELDMAN, D. A., DAVIDSON, K. G., YASUMURA, T., NEELY, J. D., AGRE, P. & RASH, J. E. 2003. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13609-14.
- GLEISER, C. 2012. Aquaporin-vermittelte Mechanismen der Volumenregulation im Innenohr, Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.), Universität Tübingen. 95.
- GLEISER, C., WAGNER, A., FALLIER-BECKER, P., WOLBURG, H., HIRT, B. & MACK, A. F. 2016. Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. *Int J Mol Sci*, 17.
- GUNNARSON, E., ZELENINA, M., AXEHULT, G., SONG, Y., BONDAR, A., KRIEGER, P., BRISMAR, H., ZELENIN, S. & APERIA, A. 2008.

- Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia*, 56, 587-96.
- HAIJ-YASEIN, N. N., BUGGE, C. E., JENSEN, V., OSTBY, I., OTTERSEN, O. P., HVALBY, O. & NAGELHUS, E. A. 2015. Deletion of aquaporin-4 increases extracellular K(+) concentration during synaptic stimulation in mouse hippocampus. *Brain Struct Funct*, 220, 2469-74.
- HAN, Z., WAX, M. B. & PATIL, R. V. 1998. Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 273, 6001-4.
- HIBINO, H., HORIO, Y., INANOBE, A., DOI, K., ITO, M., YAMADA, M., GOTOW, T., UCHIYAMA, Y., KAWAMURA, M., KUBO, T. & 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, 4711-21.
- HIRT, B., GLEISER, C., ECKHARD, A., MACK, A. F., MULLER, M., WOLBURG, H. & 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.
- HIRT, B., PENKOVA, Z. H., ECKHARD, A., LIU, W., RASK-ANDERSEN, H., MULLER, M. & LOWENHEIM, H. 2010. The subcellular distribution of aquaporin 5 in the cochlea reveals a water shunt at the perilymph-endolymph barrier. *Neuroscience*, 168, 957-70.
- HUANG, D., CHEN, P., CHEN, S., NAGURA, M., LIM, D. J. & LIN, X. 2002. Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res*, 165, 85-95.
- HUDSPETH, A. J. 1989. How the ear's works work. *Nature*, 341, 397-404.
- ISHIBASHI, K., MORISHITA, Y. & TANAKA, Y. 2017. The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. In: YANG, B. (ed.) *Aquaporins*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- ISHIKAWA, Y., IIDA, H. & ISHIDA, H. 2002. The muscarinic acetylcholine receptor-stimulated increase in aquaporin-5 levels in the apical plasma membrane in rat parotid acinar cells is coupled with activation of nitric oxide/cGMP signal transduction. *Mol Pharmacol*, 61, 1423-34.
- JAGGER, D. J., NEVILL, G. & FORGE, A. 2010. The Membrane Properties of Cochlear Root Cells are Consistent with Roles in Potassium Recirculation and Spatial Buffering. *J Assoc Res Otolaryngol*, 11, 435-48.
- JAHNKE, K. 1975. The fine structure of freeze-fractured intercellular junctions in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl*, 336, 1-40.

- JAHNKE, K. 1980. The fine structure of the cochlear plexus. *Arch Otorhinolaryngol*, 228, 155-61.
- JAILLON, O., BOUHOUCHE, K., GOUT, J. F., AURY, J. M., NOEL, B., SAUDEMONT, B., NOWACKI, M., SERRANO, V., PORCEL, B. M., SEGURENS, B., LE MOUEL, A., LEPERE, G., SCHACHTER, V., BETERMIER, M., COHEN, J., WINCKER, P., SPERLING, L., DURET, L. & MEYER, E. 2008. Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature*, 451, 359-62.
- JENTSCH, T. J. 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, 1, 21-30.
- JOHNSTONE, B. M. & SELICK, P. M. 1972. Dynamic changes in cochlear potentials and endolymph concentrations. *J Otolaryngol Soc Aust*, 3, 317-9.
- JUNG, J. S., BHAT, R. V., PRESTON, G. M., GUGGINO, W. B., BARABAN, J. M. & AGRE, P. 1994a. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 13052-6.
- JUNG, J. S., PRESTON, G. M., SMITH, B. L., GUGGINO, W. B. & AGRE, P. 1994b. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem*, 269, 14648-54.
- KADOHIRA, I., ABE, Y., NURIYA, M., SANO, K., TSUJI, S., ARIMITSU, T., YOSHIMURA, Y. & YASUI, M. 2008. Phosphorylation in the C-terminal domain of Aquaporin-4 is required for Golgi transition in primary cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 463-468.
- KIKUCHI, T., ADAMS, J. C., MIYABE, Y., SO, E. & KOBAYASHI, T. 2000a. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc*, 33, 51-6.
- KIKUCHI, T., KIMURA, R. S., PAUL, D. L. & ADAMS, J. C. 1995. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)*, 191, 101-18.
- KIKUCHI, T., KIMURA, R. S., PAUL, D. L., TAKASAKA, T. & ADAMS, J. C. 2000b. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev*, 32, 163-6.
- KIMURA, R. S. 1966. Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane. *Acta Otolaryngol*, 61, 55-72.
- KING, L. S., KOZONO, D. & AGRE, P. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 687-98.

- KROS, C. J. 1996. Physiology of Mammalian Cochlear Hair Cells. In: DALLOS, P., POPPER, A. N. & FAY, R. R. (eds.) *The Cochlea*. New York, NY: Springer New York.
- KUBISCH, C., SCHROEDER, B. C., FRIEDRICH, T., LUTJOHANN, B., EL-AMRAOUI, A., MARLIN, S., PETIT, C. & JENTSCH, T. J. 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96, 437-46.
- KUPPERS, E., GLEISER, C., BRITO, V., WACHTER, B., PAULY, T., HIRT, B. & GRISSMER, S. 2008. AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine--implications for proliferation of astrocytes. *Eur J Neurosci*, 28, 2173-82.
- LANG, F., VALLON, V., KNIPPER, M. & WANGEMANN, P. 2007. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, C1187-208.
- LI, J. & VERKMAN, A. S. 2001. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem*, 276, 31233-7.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2006. *Taschenlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 644, 559-569.
- MACEY, R. I. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am J Physiol*, 246, C195-203.
- MADRID, R., LE MAOUT, S., BARRAULT, M. B., JANVIER, K., BENICHOUS, S. & MEROT, J. 2001. Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *EMBO J*, 20, 7008-21.
- MHATRE, A. N., STERN, R. E., LI, J. & LALWANI, A. K. 2002. Aquaporin 4 expression in the mammalian inner ear and its role in hearing. *Biochem Biophys Res Commun*, 297, 987-96.
- MIYABE, Y., KIKUCHI, T. & 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, 247-57.
- MOBASHERI, A., MARPLES, D., YOUNG, I. S., FLOYD, R. V., MOSKALUK, C. A. & FRIGERI, A. 2007. Distribution of the AQP4 water channel in normal human tissues: protein and tissue microarrays reveal expression in several new anatomical locations, including the prostate gland and seminal vesicles. *Channels (Austin)*, 1, 29-38.
- MOE, S. E., SORBO, J. G., SOGAARD, R., ZEUTHEN, T., PETTER OTTERSEN, O. & HOLEN, T. 2008. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics*, 91, 367-77.

- MOELLER, H. B., FENTON, R. A., ZEUTHEN, T. & MACAULAY, N. 2009. Vasopressin-dependent short-term regulation of aquaporin 4 expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience*, 164, 1674-84.
- MOUNTAIN, D. C. & CODY, A. R. 1999. Multiple modes of inner hair cell stimulation. *Hear Res*, 132, 1-14.
- MURATA, K., MITSUOKA, K., HIRAI, T., WALZ, T., AGRE, P., HEYMANN, J. B., ENGEL, A. & FUJIYOSHI, Y. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407, 599-605.
- NAGELHUS, E. A., HORIO, Y., INANOBE, A., FUJITA, A., HAUG, F. M., NIELSEN, S., KURACHI, Y. & OTTERSEN, O. P. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26, 47-54.
- NAGELHUS, E. A., MATHIISEN, T. M. & OTTERSEN, O. P. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129, 905-13.
- NAGELHUS, E. A., VERUKI, M. L., TORP, R., HAUG, F. M., LAAKE, J. H., NIELSEN, S., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*, 18, 2506-19.
- NEELY, J. D., CHRISTENSEN, B. M., NIELSEN, S. & AGRE, P. 1999. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 38, 11156-63.
- NEWMAN, E. A., FRAMBACH, D. A. & ODETTE, L. L. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science*, 225, 1174-5.
- NICCHIA, G. P., FICARELLA, R., ROSSI, A., GIANGRECO, I., NICLOTTI, O., CAROTTI, A., PISANI, F., ESTIVILL, X., GASPARINI, P., SVELTO, M. & FRIGERI, A. 2011. D184E mutation in aquaporin-4 gene impairs water permeability and links to deafness. *Neuroscience*, 197, 80-8.
- NIELSEN, S., CHOU, C. L., MARPLES, D., CHRISTENSEN, E. I., KISHORE, B. K. & KNEPPER, M. A. 1995. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1013-7.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17, 171-80.
- OLIVER, D., KNIPPER, M., DERST, C. & FAKLER, B. 2003. Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated

- mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J Neurosci*, 23, 2141-9.
- ORKAND, R. K., NICHOLLS, J. G. & KUFFLER, S. W. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*, 29, 788-806.
- OSBORNE, M. P., COMIS, S. D. & PICKLES, J. O. 1984. Morphology and cross-linkage of stereocilia in the guinea-pig labyrinth examined without the use of osmium as a fixative. *Cell Tissue Res*, 237, 43-8.
- PAGANELLI, C. V. & SOLOMON, A. K. 1957. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J Gen Physiol*, 41, 259-77.
- PICKLES, J. O. 1985. Recent advances in cochlear physiology. *Prog Neurobiol*, 24, 1-42.
- PISANI, F., ROSSI, A., NICCHIA, G. P., SVELTO, M. & FRIGERI, A. 2011. Translational regulation mechanisms of aquaporin-4 supramolecular organization in astrocytes. *Glia*, 59, 1923-32.
- PRESTON, G. M., CARROLL, T. P., GUGGINO, W. B. & AGRE, P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256, 385-7.
- RAO, K. V., REDDY, P. V., CURTIS, K. M. & NORENBURG, M. D. 2011. Aquaporin-4 expression in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *J Neurotrauma*, 28, 371-81.
- RASH, J. E., YASUMURA, T., HUDSON, C. S., AGRE, P. & NIELSEN, S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11981-6.
- ROSSI, A., CRANE, J. M. & VERKMAN, A. S. 2011. Aquaporin-4 Mz isoform: brain expression, supramolecular assembly and neuromyelitis optica antibody binding. *Glia*, 59, 1056-63.
- ROY, S. W. & IRIMIA, M. 2008. Intron mis-splicing: no alternative? *Genome Biol*, 9, 208.
- RUSSELL, I. J. & SELICK, P. M. 1977. Tuning properties of cochlear hair cells. *Nature*, 267, 858-60.
- SALT, A. N. & OHYAMA, K. 1993. Accumulation of potassium in scala vestibuli perilymph of the mammalian cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 102, 64-70.
- SCOTTO-LAVINO, E., DU, G. & FROHMAN, M. A. 2006. 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc*, 1, 2742-5.

- SIDEL, V. W. & SOLOMON, A. K. 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J Gen Physiol*, 41, 243-57.
- SOLOMON, A. K., CHASAN, B., DIX, J. A., LUKACOVIC, M. F., TOON, M. R. & VERKMAN, A. S. 1983. The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes, and water. *Ann N Y Acad Sci*, 414, 97-124.
- SPICER, S. S. & SCHULTE, B. A. 1996. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res*, 100, 80-100.
- SPICER, S. S. & SCHULTE, B. A. 1998. Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cells. *Hear Res*, 118, 1-12.
- STENFELT, S. 2015. Inner ear contribution to bone conduction hearing in the human. *Hear Res*, 329, 41-51.
- SUI, H., HAN, B. G., LEE, J. K., WALIAN, P. & JAP, B. K. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414, 872-8.
- SUZUKI, H., NISHIKAWA, K., HIROAKI, Y. & FUJIYOSHI, Y. 2008. Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1181-9.
- SUZUKI, M., KIKUCHI, T. & IKEDA, K. 2004. Endocochlear potential and endolymphatic K⁺ changes induced by gap junction blockers. *Acta Otolaryngol*, 124, 902-6.
- TAKUMI, Y., NAGELHUS, E. A., EIDET, J., MATSUBARA, A., USAMI, S., SHINKAWA, H., NIELSEN, S. & OTTERSEN, O. P. 1998. Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein. *Eur J Neurosci*, 10, 3584-95.
- TANG, G. & YANG, G. Y. 2016. Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema. *Int J Mol Sci*, 17.
- TAYLOR, L. C., M. T.; BILL, R. M. UND CONNER, A. C. 2012. Short-Term Regulation of Aquaporin 4 and it Potential Role as a Drug Target for Brain Oedema. 4th Focused Meeting on Cell Signalling, University of Leicster.
- TAYLOR, R. R., JAGGER, D. J. & FORGE, A. 2012. Defining the cellular environment in the organ of Corti following extensive hair cell loss: a basis for future sensory cell replacement in the Cochlea. *PLoS One*, 7, e30577.
- VERKMAN, A. S. 2011. Aquaporins at a glance. *J Cell Sci*, 124, 2107-12.
- VERKMAN, A. S. 2013. Aquaporins. *Curr Biol*, 23, R52-5.
- VERKMAN, A. S., ANDERSON, M. O. & PAPADOPOULOS, M. C. 2014. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 259-77.

- VERKMAN, A. S. & MITRA, A. K. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278, F13-28.
- VOLLRATH, M. A., KWAN, K. Y. & COREY, D. P. 2007. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci*, 30, 339-65.
- WEBER, P. C., CUNNINGHAM, C. D., 3RD & SCHULTE, B. A. 2001. Potassium recycling pathways in the human cochlea. *Laryngoscope*, 111, 1156-65.
- WELSCH, U., DELLER, T. 2010. *Welsch - Lehrbuch Histologie*, Elsevier - Urban & Fischer, München. 596, 485-497.
- WOLBURG, H. 1995. Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch*, 36, 239-58.
- WOLBURG, H., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., FALLIER-BECKER, P., NOELL, S. & MACK, A. F. 2011. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol*, 287, 1-41.
- WONG, J. J., AU, A. Y., RITCHIE, W. & RASKO, J. E. 2016. Intron retention in mRNA: No longer nonsense: Known and putative roles of intron retention in normal and disease biology. *Bioessays*, 38, 41-9.
- ZELENINA, M. 2010. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int*, 57, 468-88.
- ZELENINA, M. & BRISMAR, H. 2000. Osmotic water permeability measurements using confocal laser scanning microscopy. *Eur Biophys J*, 29, 165-71.
- ZELENINA, M., ZELENIN, S., BONDAR, A. A., BRISMAR, H. & APERIA, A. 2002. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283, F309-18.
- ZENNER, H. P., REUTER, G., ZIMMERMANN, U., GITTER, A. H., FERMIN, C. & LEPAGE, E. L. 1994. Transitory endolymph leakage induced hearing loss and tinnitus: depolarization, biphasic shortening and loss of electromotility of outer hair cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 251, 143-53.
- ZIDANIC, M. & BROWNELL, W. E. 1990. Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current. *Biophys J*, 57, 1253-68.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

1. Durchführung und Konzeption der vorliegenden Studie zu AQP4-Isoformen:

Die Arbeit wurde am Department für Anatomie Tübingen, Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik, unter Betreuung von Prof. Dr. Bernhard Hirt durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Corinna Gleiser und Florian Sigg.

2. Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche:

Bei allen eigenständig durchgeführten Versuchen erfolgte jeweils eine Einarbeitung durch Dr. Corinna Gleiser.

a) 3'RACE-PCR zum Screening nach modifizierten AQP4-Isoformen:

- Planung und Etablierung der 3'RACE-PCR
→ Dr. Corinna Gleiser und Florian Sigg
- Präparation Felsenbein inklusive Cochlea:
→ Prof. Dr. Bernhard Hirt und Dr. Gleiser
- Präparation Cerebellum und Retina:
→ Florian Sigg
- RNA-Isolierung und cDNA-Synthese:
→ Florian Sigg
- PCR und Gel-Elektrophorese:
→ Florian Sigg
- Gelextraktion und Aufreinigung für Klonierung:
→ Florian Sigg
- Auswertung:
→ Florian Sigg und Dr. Corinna Gleiser

b) TOPO-TA-Klonierung und Sequenzierung im Rahmen der 3'RACE- und RT-PCR:

- Planung und Etablierung:
→ Florian Sigg und Ulrike Kohler
- Durchführung der Klonierungen, Anlage Dauerkulturen:
→ Ulrike Kohler

- Auswertung der Sequenzen:
 - ➔ Florian Sigg
- c) RT-PCR zur Bestätigung der modifizierten AQP4-Isoformen:
 - Planung und Etablierung der RT-PCR
 - ➔ Florian Sigg und Dr. Corinna Gleiser
 - Präparation Felsenbein inklusive Cochlea:
 - ➔ Prof. Dr. Bernhard Hirt und Dr. Corinna Gleiser
 - Präparation Cerebellum und Retina:
 - ➔ Florian Sigg
 - Primer-Design:
 - ➔ Florian Sigg
 - RNA-Isolierung und cDNA-Synthese:
 - ➔ Florian Sigg und Lydia Garcia Pradas
 - PCR und Gel-Elektrophorese:
 - ➔ Florian Sigg
 - Gelextraktion und Aufreinigung für Klonierung:
 - ➔ Florian Sigg
 - Auswertung:
 - ➔ Florian Sigg
- d) Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-NT-Antikörper:
 - Planung und Etablierung
 - ➔ Dr. Corinna Gleiser und Dr. Andreas Eckhard
 - Präparation Felsenbein inklusive Cochlea:
 - ➔ Prof. Dr. Bernhard Hirt und Dr. Corinna Gleiser
 - Präparation Cerebellum und Retina:
 - ➔ Florian Sigg
 - Anfertigung der Kryo-Schnitte
 - ➔ Dr. Corinna Gleiser
 - Immunmarkierungen / Färbungen:
 - ➔ Florian Sigg und Dr. Andreas Wagner
 - cLSM-Aufnahmen:
 - ➔ Florian Sigg und Dr. Andreas Wagner

- Auswertung der Aufnahmen:
 - ➔ Florian Sigg und Dr. Corinna Gleiser
- e) Immunmarkierung des DC mit Anti-AQP4-C-Loop und Anti-AQP4-CT Antikörper:
 - Planung und Etablierung der neuen Antikörper
 - ➔ Dr. Corinna Gleiser und Florian Sigg
 - Präparation Felsenbein inklusive Cochlea:
 - ➔ Prof. Dr. Bernhard Hirt und Dr. Corinna Gleiser
 - Präparation Cerebellum und Retina:
 - ➔ Florian Sigg
 - Anfertigung der Kryo-Schnitte:
 - ➔ Dr. Corinna Gleiser
 - Immunmarkierungen / Färbungen:
 - ➔ Lydia Garcia Pradas, Dr. Andreas Wagner
 - cLSM-Aufnahmen:
 - ➔ Dr. Andreas Wagner, Dr. Corinna Gleiser und Florian Sigg
 - Auswertung der Aufnahmen:
 - ➔ Florian Sigg und Dr. Corinna Gleiser
- 3. Durchführung von Daten-Recherchen:
 - Florian Sigg und Dr. Corinna Gleiser
- 4. Verfassen der Dissertationsschrift:
 - Florian Sigg

Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Dr. Corinna Gleiser verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir in dieser Arbeit angegebenen Quellen verwendet zu haben. Prof. Dr. Bernhard Hirt und Dr. Corinna Gleiser betreuten die Arbeit. Dr. Corinna Gleiser korrigierte das Manuskript der vorliegenden Dissertationsschrift.

Leinfelden-Echterdingen, den 05.09.2018

Florian Sigg

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikation:

Die wissenschaftliche Publikation zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnissen, befand sich zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertationsschrift noch in Arbeit.

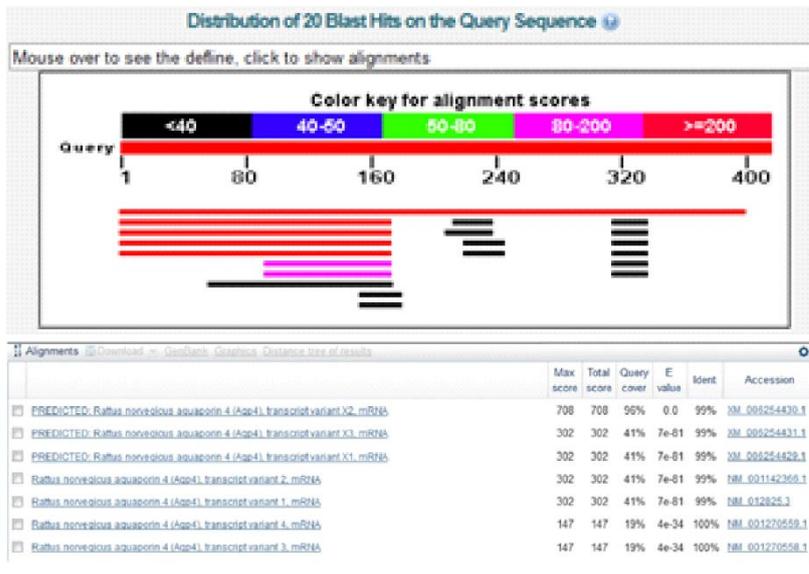
9 ANHANG

Anhang 1: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Primer	79
Anhang 2: Übereinstimmung der Sequenzen des kurzen mRNA-Transkriptes mit einer gemodelten „Predicted_AQP4_Isoform_X2 (XM_006254430.1)	80
Anhang 3: Sequenzvergleich der 3´RACE-Produkte mit 450 Basenpaaren (kurzes mRNA-Transkript)	81
Anhang 4: Sequenzvergleich der 3´RACE-Produkte mit 600 Basenpaaren (langes mRNA-Transkript)	82
Anhang 5: Direkter Sequenzvergleich aller 3´RACE-Produkte mit 450 und 600 Basenpaaren – Teil 1	83
Anhang 6: Direkter Sequenzvergleich aller 3´RACE-Produkte mit 450 und 600 Basenpaaren – Teil 2	84
Anhang 7: Sequenzvergleich aller kurzen RT-PCT Produkte aus Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 1	85
Anhang 8: Sequenzvergleich aller kurzen RT-PCR Produkte aus Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 2	86
Anhang 9: Sequenzvergleich aller langen RT-PCR Produkte aus Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 1	87
Anhang 10: Sequenzvergleich aller langen RT-PCR Produkte aus Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 2	88
Anhang 11: Sequenzvergleich der 3´Enden aller kurzen Transkripte aus 3´RACE-PCR und RT-PCR in Cochlea, Retina und Cerebellum	89
Anhang 12: Sequenzvergleich der 3´Enden aller langen Transkripte aus 3´RACE-PCR und RT-PCR in Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 1	90
Anhang 13: Sequenzvergleich der 3´Enden aller langen Transkripte aus 3´RACE-PCR und RT-PCR in Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 2	91

Anhang 1: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer	Sequenz [5' - 3']	Funktion	Organismus	Annealing	Publikation
P3 (for.)	ATCTTTGCCAGCTGTGATTC	3' RACE-PCR	Human und Ratte	56°C	(De Bellis et al., 2014)
zAQP4 (for.)	AACCGCCCTGTGTCTATAGT	RT-PCR	Ratte	56°C	(Moe et al., 2008)
M1_56 (for.)	CCAGGGAAGGCATGAGTGACG	RT-PCR	Ratte	56°C	Eigendesign
M1_491 (for.)	TGGGAGGATTGGGAGTCACC	RT-PCR / 3' RACE-PCR	Ratte	56°C	Eigendesign
CX_AQP4 (rev.)	AACCCATAAATATTCGGCTGTA	RT-PCR	Ratte	56°C	Eigendesign
M1_pr (for.)	AGGGAAGGCATGAGTGACGG	RT-PCR	Ratte	56°C	(Moe et al., 2008)
+530 (rev.)	CCAATTGCTAAAGCAACGGA	RT-PCR	Ratte	56°C	(Moe et al., 2008)
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT (TTT) ₅ T	3' RACE-PCR	---	70°C	Manual „3'RACE-Kit“
AUAP (rev.)	GGCCACGCGTCGACTAGT	3' RACE-PCR	---	55-60°C	Manual „3'RACE-Kit“
M13F (for.)	GTAAAACGACGGCCAG	Kolonie-PCR / Sequenzierung	---	55-60°C	Manual „TOPO-TA-Cloning Kit“
M13R (rev.)	CAGGAAACAGCTATGAC	Kolonie-PCR / Sequenzierung	---	55-60°C	Manual „TOPO-TA-Cloning Kit“

Anhang 2: Übereinstimmung der Sequenzen des kurzen mRNA-Transkriptes mit einer gemodelten „Predicted_AQP4_Isoform_X2 (XM_006254430.1)“



Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA	708	708	96%	0.0	99%	XM_006254430.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X3, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	XM_006254431.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X1, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	XM_006254432.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 2, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	NM_001142368.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 1, mRNA	302	302	41%	7e-81	99%	NM_032825.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 4, mRNA	147	147	19%	4e-34	100%	NM_001270559.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant 3, mRNA	147	147	19%	4e-34	100%	NM_001270558.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA
 Sequence ID: [ref|XM_006254430.1](#) Length: 1180 Number of Matches: 1

Range 1: 782 to 1180 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
708 bits(784)	0.0	397/399(99%)	1/399(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCITTTGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGGTTCGGTTGCTTTAGCAATT	59		
Sbjct 782	ATTTTGGCCAGCTGTGATTCCAAACGGACTGATGTTACTGGTTCGGTTGCTTTAGCAATT	841		
Query 60	GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAAT	119		
Sbjct 842	GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACCGGAGCCAGCATGAAT	901		
Query 120	CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGGAGTA	179		
Sbjct 902	CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAAACTGGGAAAACCACTGGGGAGTA	961		
Query 180	GAGAAAGTCCAGCAGAGGCGCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTCTAGGCTTTCA	239		
Sbjct 962	GAGAAAGTCCAGCAGAGGCGCTGCTGCAACAGATCTCATAGTGTCTGTCTAGGCTTTCA	1021		
Query 240	CTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGCTGACAGAGTACAGCCGAATATTATG	299		
Sbjct 1022	CTAACAGTTGAGTTTTCGAAACGTCAGATATGCTGACAGAGTACAGCCGAATATTATG	1081		
Query 300	GGTTTCCCATGTAGAATAAATTAATCATAAATGATGCTGAATATTACTGCTTAAATC	359		
Sbjct 1082	GGTTTCCCATGTAGAATAAATTAATCATAAATGATGCTGAATATTACTGCTTAAATC	1141		
Query 360	ATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCACAAATAGAAAATAAAG	398		
Sbjct 1142	ATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCACAAATAGAAAATAAAG	1180		

PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA

NCBI Reference Sequence: [XM_006254430.1](#)

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#) [C](#)

LOCUS XM_006254430 1180 bp mRNA linear ROD 09-DEC-2019
 DEFINITION PREDICTED: Rattus norvegicus aquaporin 4 (Aqp4), transcript variant X2, mRNA.
 ACCESSION XM_006254430
 VERSION XM_006254430.1 GI:564392483
 DBLINK BioProject: [PRJNA12455](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Rattus norvegicus (Norway rat)
 ORGANISM Rattus norvegicus
 Eukaryote; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.
 COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NW_003812576.1) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by EST evidence.
 Also see: [Documentation of NCBI's Annotation Process](#)

Anhang 3: Sequenzvergleich der 3'RACE-Produkte mit 450 Basenpaaren (kurzes mRNA-Transkript)

```

3RACE-PCR_05FC22:  ATTTTTGCCAGCTGGGATCCAAAACGGACTGATGTTTCTGGTCCGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC01:  ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FB98:  ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC23:  ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FB99:  ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC20:  ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC21:  AT-CTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTG6TTC6GTTGCTTTAGCAATT
** *****

3RACE-PCR_05FC22:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC01:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FB98:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC23:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FB99:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC20:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC21:  GGGTTTTCCGTTGCAATTGGACATTTGTTTGAATCAATTATACCCGGAGCCAGCATGAAT
*****

3RACE-PCR_05FC22:  CCAGCTTGATCCTTTGGCCCTGCAGTTTTCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGGTA
3RACE-PCR_05FC01:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
3RACE-PCR_05FB98:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
3RACE-PCR_05FC23:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
3RACE-PCR_05FB99:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
3RACE-PCR_05FC20:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
3RACE-PCR_05FC21:  CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCCCTGGGGAGTA
*****

3RACE-PCR_05FC22:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FC01:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FB98:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FC23:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FB99:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FC20:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
3RACE-PCR_05FC21:  GAGAAAGTCCAGCAGAGGCTGCTGCAACCAATTTCAAATGTTTTGTTTATAGTTTCA
*****

3RACE-PCR_05FC22:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FC01:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FB98:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FC23:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FB99:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FC20:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
3RACE-PCR_05FC21:  CTAAACAATTGGGTTTTGAAAAGTTAGATAATTTTGACAGAGTACAGCCGAATTTTATG
*****

3RACE-PCR_05FC22:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCAAAAAGTATGCTGAAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FC01:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FB98:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FC23:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FB99:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FC20:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
3RACE-PCR_05FC21:  GGTTTCCCCTGTAGAATAAATTTAAATCATAAATGATGCTGAAATTAAGTCTTAAATC
*****

3RACE-PCR_05FC22:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FC01:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FB98:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FC23:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FB99:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FC20:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
3RACE-PCR_05FC21:  ATTGAAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAATAAAGGATTCCTTAAAGGGAGAAAAG
*****

3RACE-PCR_05FC22:  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC01:  AAAA-----AAAAAAAAAAGAAC
3RACE-PCR_05FB98:  AAA-----AAA-----AAAAAG
3RACE-PCR_05FC23:  AAAA-----AAA-----AAAAAG
3RACE-PCR_05FB99:  AAA-----AAA-----AAAAAG
3RACE-PCR_05FC20:  AAA-----AAA-----AAAAAG
3RACE-PCR_05FC21:  AAA-----AAA-----AAAAAG
***

3RACE-PCR_05FC22:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
3RACE-PCR_05FC01:  TACTAGACGACGGT----
3RACE-PCR_05FB98:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
3RACE-PCR_05FC23:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
3RACE-PCR_05FB99:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
3RACE-PCR_05FC20:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
3RACE-PCR_05FC21:  TACTAGTCGACGCGTG6CC
*****

```

Anhang 4: Sequenzvergleich der 3'RACE-Produkte mit 600 Basenpaaren (langes mRNA-Transkript)

```

3RACE-PCR_05FC19: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC02: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC03: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC12: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC14: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC13: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
3RACE-PCR_05FC15: ATCTTTGCCAGCTGTGATTCCAAAACGGACTGATGTTACTGGTTCCGGTTGCTTTAGCAATT
*****

3RACE-PCR_05FC19: GGGT-TTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC02: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC03: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC12: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC14: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC13: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
3RACE-PCR_05FC15: GGGTTTTCCGGTTGCAATTGGACATTTGTTTGCATCAATTATACGGGAGCCAGCATGAAT
*****

3RACE-PCR_05FC19: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC02: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC03: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC12: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC14: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC13: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
3RACE-PCR_05FC15: CCAGCTCGATCCTTTGGCCCTGCAGTTATCATGGGAACTGGGAAAACCACTGGGTAAC
*****

3RACE-PCR_05FC19: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC02: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC03: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC12: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC14: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC13: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
3RACE-PCR_05FC15: ACTAAGTTGATATGCCCCACCTTCTGAGGTTGGGAACAATTATCCAAAAGCCTCTTTTT
*****

3RACE-PCR_05FC19: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC02: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC03: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC12: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC14: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC13: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
3RACE-PCR_05FC15: TTATTAACATAAAGTCTCACTAGTTTCTTTTGCCTTCCACCCAACTCGGACTCTCAAC
*****

3RACE-PCR_05FC19: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC02: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC03: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC12: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC14: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC13: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
3RACE-PCR_05FC15: TTGTTATTTTCATTTCCACAGGAGTAGAGAAAAGTCCAGCCAGAGGCCCTGCTGCCACAGATCT
*****

3RACE-PCR_05FC19: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC02: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC03: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC12: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC14: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC13: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
3RACE-PCR_05FC15: CATAGTGTCTGTCTAGGCTTCACTAACAGTTGAGTTTTCGAAAAGTCCAGATATGCTCT
*****

3RACE-PCR_05FC19: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC02: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC03: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC12: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC14: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC13: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
3RACE-PCR_05FC15: GACAGAGTACAGCCGAATATTTATGGGTTTCCCATGTAGAATAAATTTAAATCATAAATG
*****

3RACE-PCR_05FC19: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC02: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC03: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC12: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC14: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC13: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
3RACE-PCR_05FC15: TATGCTGAATATTACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCCTTCGTAGCCAAATAGAAAAT
*****

3RACE-PCR_05FC19: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC02: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC03: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC12: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC14: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC13: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
3RACE-PCR_05FC15: AAAGTGATTCCCTTAAAGCGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
*****

3RACE-PCR_05FC19: AAAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC02: ---AAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC03: ---AAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC12: AAAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC14: AAAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC13: AAAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
3RACE-PCR_05FC15: AAAAAAAAAAAGTACTAGTCAAGCCGTGGCC
*****

```


Anhang 6: Direkter Sequenzvergleich aller 3'RACE-Produkte mit 450 und 600 Basenpaaren – Teil 2

	401				450
3RACE-PCR_05FC19	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC02	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC03	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC12	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC14	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC13	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC15	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC01	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FB98	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC23	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FB99	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC20	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC21	TCGAAACGTC	AGATATGTCT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT
3RACE-PCR_05FC22	TTGAAAAGTT	AGATATTTTT	GACAGAGTAC	AGCCGAATAT	TTATGGGTTT

	451				500
3RACE-PCR_05FC19	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC02	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC03	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC12	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC14	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC13	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC15	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC01	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FB98	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC23	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FB99	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC20	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC21	CCCATGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCATAAAATG	TATGCTGAAT	ATTACTGCTT
3RACE-PCR_05FC22	CCCTGTAGA	ATAAAATTTAA	ATCAAAAAG	TATGCTGAAA	ATTACTGCTT

	501				550
3RACE-PCR_05FC19	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC02	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC03	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC12	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC14	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC13	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC15	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC01	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FB98	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC23	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FB99	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC20	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC21	AAATCATTGA	AAGAAAGCCT	TCGTAGCAAC	AATAGAAAAT	AAAGTGATTTC
3RACE-PCR_05FC22	AAATCATTGA	AAAAAAGCCT	TTGTAGCAAC	AAAAAATAAA	AAAGGGATTTC

	551				600
3RACE-PCR_05FC19	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAA.....AAAAAA
3RACE-PCR_05FC02	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC03	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC12	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC14	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC13	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC15	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC01	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FB98	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC23	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FB99	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC20	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC21	CTTAAAGGAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
3RACE-PCR_05FC22	CTTAAAGGGG	AAAAAGAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA

	601				644
3RACE-PCR_05FC19	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC02	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC03	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC12	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC14	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC13	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC15	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC01	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FB98	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC23	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FB99	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC20	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC21	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC
3RACE-PCR_05FC22	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAGTACTA	GTCAACGCGT	GGCC

Anhang 13: Sequenzvergleich der 3'Enden aller langen Transkripte aus 3'RACE-PCR und RT-PCR in Cochlea, Retina und Cerebellum – Teil 2

RT-PCR_ID67EE15_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE16_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE20_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE11_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE12_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE01_Retina_lang:	-----	277
RT-PCR_ID67EE27_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE29_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67ED97_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE31_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE33_Cerebellum_lang:	-----	275
3RACE-PCR_05FC02_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC03_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC12_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC13_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC14_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC15_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
3RACE-PCR_05FC19_Cerebellum_lang:	CATAAAATGATGCTGGAATATCACTGCTTAAATCATTGAAAGAAAGCCTTCGTAGCAACAA	358
RT-PCR_ID67EE15_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE16_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE20_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE11_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE12_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE01_Retina_lang:	-----	277
RT-PCR_ID67EE27_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE29_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67ED97_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE31_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE33_Cerebellum_lang:	-----	275
3RACE-PCR_05FC02_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	407
3RACE-PCR_05FC03_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	407
3RACE-PCR_05FC12_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	417
3RACE-PCR_05FC13_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	417
3RACE-PCR_05FC14_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	417
3RACE-PCR_05FC15_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	417
3RACE-PCR_05FC19_Cerebellum_lang:	TAGAAAATAAAGTGATTCCCTTAAAGGAGAAAAA	418
RT-PCR_ID67EE15_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE16_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE20_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE11_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE12_Cochlea_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE01_Retina_lang:	-----	277
RT-PCR_ID67EE27_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67EE29_Retina_lang:	-----	275
RT-PCR_ID67ED97_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE31_Cerebellum_lang:	-----	276
RT-PCR_ID67EE33_Cerebellum_lang:	-----	275
3RACE-PCR_05FC02_Cerebellum_lang:	-----GTA	427
3RACE-PCR_05FC03_Cerebellum_lang:	-----GTA	427
3RACE-PCR_05FC12_Cerebellum_lang:	-----AAGTACTAGTCGACGGGTGGCC	439
3RACE-PCR_05FC13_Cerebellum_lang:	-----AAGTACTAGTCGACGGGTGGCC	439
3RACE-PCR_05FC14_Cerebellum_lang:	-----AAGTACTAGTCGACGGGTGGCC	439
3RACE-PCR_05FC15_Cerebellum_lang:	-----AAGTACTAGTCGACGGGTGGCC	439
3RACE-PCR_05FC19_Cerebellum_lang:	AAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCACGCGTGGCC	460

10 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. B. Hirt für die freundliche Überlassung des Themas und die stetige, verständnisvolle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. C. Gleiser für die jahrelange, einwandfreie Betreuung. Vom Einarbeiten bis zum Abschluss der Promotion war Sie mir stets mit fachlichen Hinweisen, Tipps und Tricks, emotionalem Beistand aber auch dem manchmal notwendigen Antrieb eine unvergessliche Hilfe. Ihr Engagement für Doktoranden ist beispiellos und vermutlich einmalig – Danke für alles!

Weiterhin danken möchte ich insbesondere Ulrike Kohler, Lidia Garcia-Pradas, Andreas Mack, Andreas Wagner und Andrea Wizenmann für den unbezahlbar wertvollen Support im Labor.

Danke auch an das IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen für die Bewilligung des Stipendiums. Die damit verbundene wissenschaftliche Ausbildung sowie die finanzielle Förderung des Projekts waren eine große Hilfe.

Mein tief empfundener Dank gilt meinen geliebten Eltern und Großeltern, die mich nicht nur stets emotional und moralisch, sondern auch finanziell unterstützt und mir immer den Rücken freigehalten haben. Ohne Sie wäre das abgeschlossene Studium und diese Arbeit nie möglich gewesen – Danke!

Einen großen Dank auch an meinen Chef, Mentor und guten Freund Dr. Dr. M. Wolf, der mir die Fertigstellung dieser Arbeit neben dem Beruf ermöglicht hat und mit den passenden aufmunternden und motivierenden Worten stets zur Seite stand. Danke für die unfassbar lehrreiche Zeit!