

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen  
Abteilung allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie  
Leiter: Professor Dr. B. Bültmann**

**Die Umverteilung von Aquaporin-4 im humanen Glioblastom  
korreliert mit dem Verlust der Agrin-Immunreaktivität in der  
Basalmembran von Hirngefäßen**

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

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

**vorgelegt von  
Arne Warth, geb. am 23.11.1979  
aus  
Stuttgart**

**2006**

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Tatagiba

Was ist das Schwerste von allem?  
Was dir das Leichteste dünket,  
Mit den Augen zu sehen,  
Was vor den Augen dir liegt

Johann Wolfgang von Goethe

Anita und meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Glioblastom.....	1
1.2 Die Blut-Hirn-Schranke.....	3
1.3 Die Blut-Hirn-Schranke im Glioblastom.....	5
1.4 Die extrazelluläre Matrix.....	6
1.4.1 Veränderungen der extrazellulären Matrix im Glioblastom.....	9
1.5 Der Dystrophin-Dystroglykan-Komplex.....	10
1.6 Fragestellung.....	13
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Immunhistochemische Methoden.....	15
2.1.1 Gewebepräparation.....	15
2.1.2 Behandlung des Gewebes mit Antikörpern.....	16
2.2 Histologische Methoden.....	20
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
3.1 Untersuchungen der anti-Agrin-Immunreaktivität.....	23
3.2 Die physiologische und pathophysiologische Expression von AQP4.....	24
3.3 Auswirkungen der AQP4-Umverteilung im GBM auf die Komponenten des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes.....	27
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>34</b>
4.1 Die Korrelation zwischen der glialen Expression von Agrin und der Klusterung des Wasserkanalproteins AQP4 in den perivaskulären Astrozytenendfüßen.....	34

4.2 Auswirkungen des Verlustes von Agrin und der Umverteilung von AQP4 auf Komponenten des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes.....	41
4.3 Ausblick.....	48
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Das Glioblastom**

Das Glioblastom gehört zur relativ heterogenen Gruppe der Astrozytome und stellt den häufigsten Hirntumor im Erwachsenenalter mit zugleich höchster Malignität dar. Die Astrozytome werden gemäß der WHO-Klassifikation entsprechend ihrer Histologie in vier Grade eingeteilt (Kleihues et al., 2000):

**Tabelle 1:** *Die WHO-Klassifikation der Astrozytome*

Grad I WHO	pilozytisches Astrozytom
Grad II WHO	fibrilläres Astrozytom, protoplasmatisches Astrozytom, gemistozytäres Astrozytom
Grad III WHO	anaplastisches Astrozytom
Grad IV WHO	Glioblastom

Der Altersgipfel der Erstmanifestation eines GBM liegt im 4. – 5. Lebensjahrzehnt, wobei Männer im Verhältnis 3 zu 2 häufiger betroffen sind als Frauen. Die Hauptlokalisationen sind vor allem die Großhirnhemisphären, von welchen aus sich der Primärtumor häufig schmetterlingsförmig über den Balken auf die Gegenseite ausbreitet. Durch sehr schnelles, unkontrolliertes und infiltratives Wachstum in das umliegende, gesunde Hirngewebe, hat das GBM eine sehr schlechte Prognose. Gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlungen zeigt es sich relativ therapieresistent, so dass als Therapiemaßnahme auch die chirurgische Resektion eine wichtige Rolle einnimmt. Aufgrund des diffusen Wachstums gelangen allerdings überwiegend nur Teilresektionen, was in kürzester Zeit Rezidive zur Folge hat. Mit aktuellen Therapieoptionen liegt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose im Bereich von 13 bis 18 Monaten (Westphal et al., 2003; Weller et al., 2003). Ohne spezifische Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit nur wenige Wochen (Fazeny-Dörner et al., 2003). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in den letzten 30 Jahren in unterschiedlichen Untersuchungen ungefähr bei 5%, neuere

Ergebnisse deuten jedoch auf eine noch geringere Zahl hin (McLendon und Halperin, 2003).

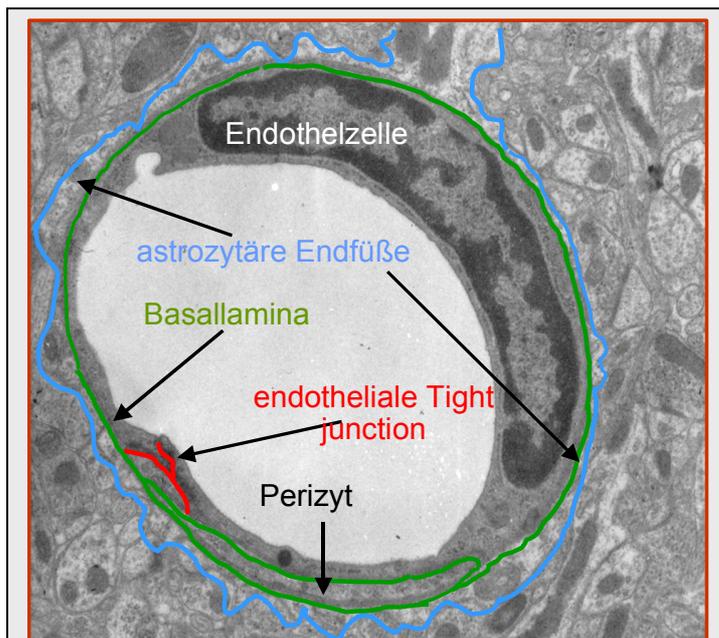
Morphologische Charakteristika des Glioblastoms sind Nekrosen, zystische Zerfallshöhlen, Hämorrhagien, ein enormer Zell- und Mitosereichtum sowie eine „bunte“ Schnittfläche. Histologisch besteht ein Glioblastom in den allermeisten Fällen aus entdifferenzierten Astrozyten. Ein diagnostisch relevantes Merkmal sind die ausgeprägten glomeruloiden, hyperplastischen Gefäßproliferationen, welche das morphologische Korrelat für das enorme angiogenetische Potential des Tumors darstellen. Funktionell hat das Vorkommen hyperplastischer glatter Muskelzellen, Perizyten und Endothelzellen zur Folge, dass sich häufig auch komplette Gefäßverschlüsse nachweisen lassen. Immunhistochemisch können derartige Verschlüsse durch die spezifische Markierung des hyperplastischen Endothels durch Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF) dargestellt werden ( McComb et al., 1982).

Ein entscheidender pathogenetischer Faktor während der Genese eines Glioblastoms ist nicht nur das schnelle und infiltrative Wachstum, sondern auch das Entstehen massiver, lebensbedrohlicher Ödeme (Papadopoulos et al., 2001; Davies, 2002). Diese sind sowohl durch die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) infolge der hohen Angiogeneseaktivität des umgebenden Hirngewebes bedingt, als auch durch Differenzierungsprozesse der Endothelzellen selbst (Plate und Risau, 1995; Plate, 1999). Hierbei kommt es durch bisher nur unzureichend verstandene Mechanismen unter anderem zu einem Verlust bzw. einer veränderten Expression von interendothelialen Tight junction-Proteinen (Liebner et al., 2000), was schließlich den Integritätsverlust der BHS zur Folge hat. Dieses Ereignis zieht einen Flüssigkeitseinstrom in das umliegenden Gewebe nach sich, welchen Astrozyten allerdings teilweise kompensieren können, indem sie Wasser in ihre Endfüße aufnehmen. Die so entstehenden ödematösen Schwellungen führen schließlich durch Kompression des gesunden Hirngewebes zu schwerwiegenden neurologischen Ausfällen, welche oft zur vitalen Bedrohung für den Patienten werden.

## 1.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Aufgabe der BHS besteht darin, die sensiblen Nervenzellen des Gehirns vor toxischen Substanzen aus dem Blut zu schützen und den Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Hirnmilieu aufrechtzuerhalten. Dies wird durch ihre selektiven Barriereigenschaften gewährleistet, so dass unabhängig von den ständig schwankenden Zusammensetzungen des Blutes eine stabile Ionen- und Nährstoffkonzentration um die Nervenzellen herum besteht. Beispielsweise wirkt Glutamat, einer der dominierenden Neurotransmitter im Nervensystem, in hohen Konzentrationen neurotoxisch. Die BHS verhindert jedoch den Übertritt von Glutamat in das Hirnmilieu, so dass im Blut bis zu 4000fach höhere Konzentrationen erreicht werden, ohne dass dies Auswirkungen auf die Funktion der Nervenzellen hat.

Morphologisch betrachtet besteht die BHS aus Tight junctions, welche die

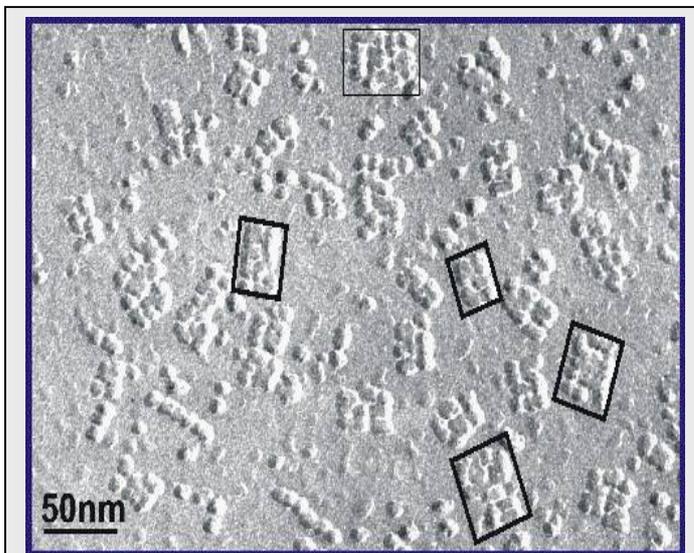


**Abb. 1:** elektronenmikroskopische Darstellung eines Hirngefäßes mit Endothelzellen, endothelialen Tight junctions, Perizyten, der Basalmembran und astrozytären Endfüßen. Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Wolburg, Pathologisches Institut der Universität Tübingen, modifiziert.

Endothelzellen der Hirngefäße miteinander verbinden. Das Endothel wird umgeben von Perizyten, die kontraktile Elemente enthalten (Bandopadhyay et al., 2001) und so vermutlich, in Analogie zu glatten Muskelzellen, den Durchmesser bzw. den Druck innerhalb des Gefäßlumens regulieren können. Die Rolle der Perizyten bei der Formation der BBB wurde von Balabanov und Dore-

Duffy zusammengefasst (1998), sie spielt jedoch im Gesamtkontext gesehen

eine eher untergeordnete Rolle. Endothelzellen und Perizyten sind jeweils durch eine Basalmembran verankert. An deren abluminaler Seite liegen die Endfüße der Astrozyten an, welche das neurale Parenchym vom mesenchymalen Kompartiment abtrennen (Abb. 1; Kacem et al., 1998). Die Basis der geringen Durchlässigkeit der BHS wird über die Verminderung der parazellulären Diffusion durch die endothelialen Tight junctions (Reese und Karnovsky, 1967; Brightman und Reese, 1969) und eine eingeschränkte Transzytose durch das Endothel gebildet (Peters et al., 1991). Um diese Barriereigenschaften der BHS in vivo aufrechtzuerhalten, scheint ein komplexes, größtenteils nur unzureichend verstandenes Zusammenspiel



**Abb. 2:** elektronenmikroskopische Darstellung der orthogonalen Partikelkomplexe an astrozytären Endfüßen. Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Wolburg, Pathologisches Institut der Universität Tübingen

zwischen Endothelzellen, Perizyten, Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) und den Astrozyten notwendig zu sein. Eine bemerkenswerte Korrelation besteht beispielsweise zwischen der Ausbildung der BHS und der Differenzierung von Astrozyten während der Entwicklung des Gehirns (Wolburg, 1995a; Nico et al., 2001). Astrozytäre Zellmembranen sind

charakterisiert durch das Auftreten von sogenannten orthogonalen Partikelkomplexen (OPKs; Abb. 2), die als bisher einzig bekannten Bestandteil den Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) enthalten (Nielsen et al., 1997; Rash et al., 1998). Die OPKs treten in sehr hoher Dichte ( $100-400/\mu\text{m}^2$ ) in Bereichen auf, in denen Astrozyten mit ihren Endfüßen die Basalmembran von Hirngefäßen umschließen bzw. das zentrale Nervensystem oberflächlich abschließen (*Glia limitans superficialis et perivascularis*; Neuhaus, 1990; Wolburg, 1995a). Im Gegensatz dazu werden innerhalb des Neuropils, welches

keinen Kontakt mehr zur Basalmembran hat, nur sehr wenig OPKs ausgebildet ( $10-20/\mu\text{m}^2$ ). Aufgrund dieser geringen Dichte kann in diesen Membranbereichen auch AQP4 immunhistochemisch nicht mehr nachgewiesen werden. Die Polarisierung von Astrozyten durch die Klusterung von OPKs in ihren perivaskulären Endfüßen lässt sich zeitgleich mit der Ausbildung der BHS beobachten und scheint bei deren Induktion eine wichtige Rolle zu spielen. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Astrozyten selbst bestimmte Substanzen bilden können, die an der Induktion der BHS beteiligt sind (Janzer und Raff, 1997; Kniesel und Wolburg, 2000).

Eine Polarisierung der Astrozyten durch die Expression von OPKs kann in Kultur nicht aufrechterhalten werden (Wolburg, 1995a; Nico et al., 2001), was deutlich macht, dass neben den Astrozyten offensichtlich noch weitere Komponenten für die Ausbildung der BHS notwendig sind. Diese Hypothese wird auch von Ergebnissen bestätigt, die andeuten, dass das gesamte, spezifische Milieu im Gehirn in die Ausbildung der BHS involviert ist (Wolburg et al., 1994; Hayashi et al., 1997), insbesondere rückt in diesem Zusammenhang die ECM immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses.

### **1.3 Die Blut-Hirn-Schranke im Glioblastom**

Im Laufe der Pathogenese eines Glioblastoms verlieren die Gefäße ihre selektiven Barriereigenschaften, wodurch es zum Integritätsverlust der BHS kommt (Long, 1970; Seitz und Wechsler, 1987; McMahan, 1990; Groothuis et al., 1991). Durch den folgenden Flüssigkeitseinstrom in das Hirngewebe und die daraus resultierenden Änderungen des Milieus, kommt es wie bei jeder anderen Verletzung des Hirngewebes auch, zu einem Anschwellen der astrozytären Endfüße (Norenberg, 1994). Im weiteren Verlauf nach einer Läsion des Hirngewebes reagieren auch andere Zelltypen auf die Veränderungen, z.B. migrieren etwa 40% der Perizyten weg von ihrer periendothelialen Lokalisation, was zunächst einen deutlichen Substanzverlust der abluminalen ECM zur Folge

hat (Dore-Duffy et al., 2000), andererseits aber auch Platz für die notwendigen angiogenetische und proliferierende Prozesse schafft.

Auf molekularer Ebene zeigt sich im Falle des Glioblastoms eine dramatische Reduktion der OPK-spezifischen Astrozytenpolarität, bis hin zu einem völligen Verlust der OPKs (Neuhaus, 1990). Interessanterweise lässt sich aber trotz dieser drastischen Reduktion der OPKs immunhistochemisch eine starke Expression von AQP4 mit einer Immunreaktivität über die gesamte astrozytäre Zellmembran nachweisen (Saadoun et al, 2002b). Welche molekularen Prozesse jedoch zu diesen Veränderungen in der Pathogenese eines Glioblastoms führen, ist bis heute ungeklärt.

#### **1.4 Die extrazelluläre Matrix**

Die ECM, insbesondere die subendotheliale Basalmembran von Gehirngefäßen, nimmt beim Verständnis der Induktionsvorgänge und der Aufrechterhaltung der BHS eine immer wichtiger werdende Rolle ein. Sie besteht aus einer Vielzahl von Kollagenen, Elastin, Laminin, Fibronectin, Entaktin, Thrombospondin, Agrin, sowie weiteren Proteoglykanen. Klassischerweise sah man ihre Funktion im Zusammenhalt von Gewebe und der Ausbildung eines Gerüsts, in welches Zellen migrieren und miteinander interagieren können. Erst in neuerer Zeit wurde man sich bewusst, dass die ECM nicht nur eine strukturvorgebende Matrix darstellt, sondern durch ihre komplexe Zusammensetzung auch in der Lage ist, multiple Funktionen und regulative Aspekte eines Gewebes zu übernehmen. So sind einige ECM-Moleküle beispielsweise in der Lage, Rezeptoren an Zelloberflächen zu konzentrieren. Diese Mechanismen der Molekülanordnung auf Membranen sind vermutlich auch verantwortlich für die Ausbildung der Astrozytenpolarität (Wolburg, 1995a; Nico et al., 2001), und sind damit für die Induktion der BHS von großer Wichtigkeit. Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss der ECM auf Induktionsvorgänge der BHS liefert die Tatsache, dass auf Grund der

morphologischen Situation (Abb. 1) jede Kommunikation zwischen Astrozyt und Endothelzelle über die ECM erfolgen muss.

Bei genauerer Betrachtung der Entwicklung der BHS und der spezifischen Zusammensetzung der ECM innerhalb dieses Prozesses fallen insbesondere die beiden Moleküle Agrin und Tenascin auf. Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und wurde zuerst aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* isoliert (Nitkin et al., 1987). Berühmt wurde es jedoch erst als entdeckt wurde, dass es in der Lage ist, auf der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte Acetylcholinrezeptoren zu klustern (McMahan, 1990). Überdies wurde Agrin in nahezu allen Basalmembranen von Gefäßen gefunden, die über spezielle Barriereigenschaften verfügen. Dies ist neben dem Gehirn (BHS) auch im Glomerulum der Niere, dem Thymus und im Hoden (Blut-Hoden-Schranke) der Fall (Barber und Lieth, 1997) und unterstreicht die mögliche Rolle von Agrin bei der Induktion von spezifischen Barriereigenschaften. Im Falle der BHS konnte gezeigt werden, dass Astrozyten selbst in der Lage sind, Splicevarianten von Agrin zu exprimieren. Ein größerer Anteil von Agrin in der ECM wird jedoch während der Entwicklung von den Endothelzellen gebildet (Stone und Nikolics, 1995), was als Resultat eine höhere Konzentration von Agrin auf der endothelialen Seite der ECM zur Folge hat. Untersuchungen am Skelettmuskel haben gezeigt, dass Agrin über den sogenannten Dystrophin-Dystroglykan-Komplex (DDC) mit dem Zytoskelett in Kontakt tritt. Da dieser Komplex neben anderen Geweben auch in den Endfüßen von Astrozyten lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier Agrin die Verbindung zwischen dem astrozytären Zytoskelett und der ECM bildet.

Zeitgleich mit der Entwicklung und Reifung der BHS lässt sich eine stetig steigende Konzentration von Agrin in der ECM nachweisen (Barber und Lieth, 1997). Diese Beobachtung korreliert gegenläufig mit der Expression von Tenascin, einem weiteren Glykoprotein der ECM. Dieses spielt insbesondere während der Entwicklung, aber auch bei Gewebeneubildung und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Jones und Jones, 2000). Im ausgereiften Gefäßsystem ist die Expression von Tenascin auf Bereiche

beschränkt, in welchen Gefäßneubildung oder Wundheilung stattfindet. Somit handelt es sich bei Agrin und Tenascin bezüglich ihres Einflusses auf die BHS um so etwas wie funktionelle Antagonisten, welche die Permeabilität von Hirngefäßen gegenläufig regulieren können. Dieses Expressionsschema zeigt sich auch deutlich im immunhistochemischen Nachweis der beiden Moleküle im Glioblastom (Rascher et al., 2002). In den meisten Gefäßen in welchen Tenascin in der ECM exprimiert wurde, konnte Agrin nicht nachgewiesen werden, Agrin-positive Gefäße waren umgekehrt zumeist Tenascin-negativ. Im Falle des gemeinsamen Nachweises beider Moleküle in einem Gefäß zeigte sich erstaunlicherweise keine Kolo-kalisation: Agrin wurde ausschließlich in der endothelialen und Tenascin ausschließlich in der glialen Seite der ECM vorgefunden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Expression von Agrin im Laufe der Tumorgenese herunterreguliert wird und durch eine Überexpression von Tenascin ersetzt wird. Die endotheliale Lokalisation von Agrin innerhalb der ECM deutet darauf hin, dass primär die Astrozyten ihre Fähigkeit Agrin zu bilden verlieren, während die Endothelzellen dazu zunächst noch in der Lage sind. Das gemeinsame Auftreten beider Moleküle in einem Gefäß weist darauf hin, dass es sich bei diesem Expressionsmuster der beiden Moleküle nicht um ein Entweder-Oder-Ereignis handelt, sondern vielmehr um einen dynamischen Prozess, welchen die ECM im Laufe der Genese eines Glioblastoms durchläuft. Von Herold-Mende et al. (2002) konnte ergänzend gezeigt werden, dass die Expression von Tenascin in einem Gliom positiv mit dessen Malignität korreliert, was die Funktion von Tenascin bei Proliferations- und Migrationsvorgängen von Tumorzellen abermals verdeutlicht.

Das Glykoprotein Laminin bzw. seine Splicevariante s-Laminin stellt eine weitere, wichtige ECM-Komponente dar. Interessant ist bei Laminin in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass es viele funktionelle Gemeinsamkeiten mit Agrin aufweist. Es wird ebenfalls in der Basalmembran von Gehirngefäßen exprimiert, ebenfalls zeitgleich mit der Ausbildung der BHS, und kann ebenso wie Agrin von Astrozyten gebildet werden. Weiter wurde Laminin auch in der neuromuskulären Endplatte lokalisiert (Sanes et al., 1990). Trotz dieser Analogien zu Agrin ist bis heute die physiologische Rolle von Laminin bei der

Aufrechterhaltung der BHS nicht ausreichend verstanden und es gibt nur sehr wenig Untersuchungen zu möglichen pathologischen Veränderungen der Laminin-Expression im Falle einer Schädigung der BHS.

Als wichtiger Bestandteil der ECM ist schließlich noch Fibronectin zu erwähnen, ein hochmolekulares Protein, welches in Form dünner Filamente vorzufinden ist. Funktionell interagiert es einerseits mit Zelloberflächen, andererseits mit interzellulären Strukturen und dient somit vermutlich dazu, einen Verbund zwischen den einzelnen Komponenten der ECM herzustellen. In dieser Arbeit wurde es bevorzugt als Markerprotein für die ECM verwendet, um einerseits diese von anderen Gefäßkomponenten abgrenzen zu können und andererseits ihre strukturelle Veränderungen im GBM darstellen zu können.

#### **1.4.1 Veränderungen der extrazellulären Matrix im Glioblastom**

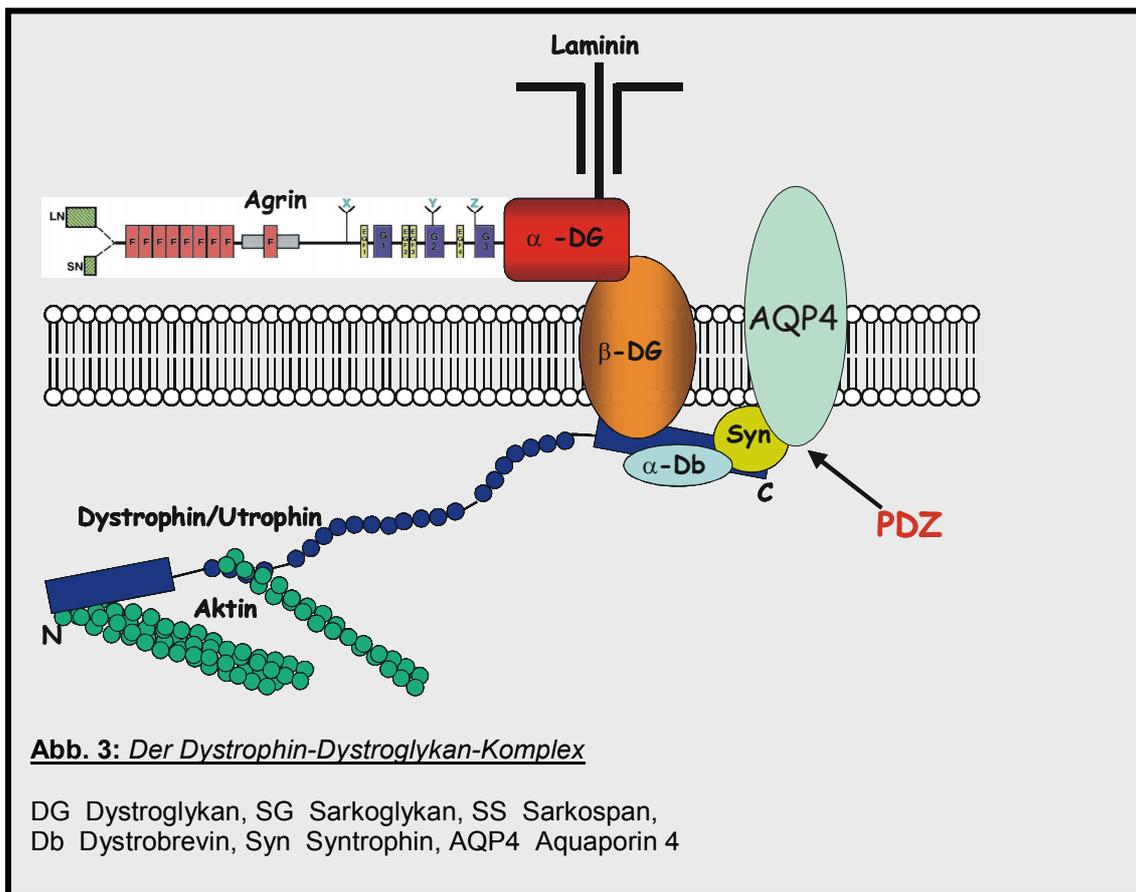
Die ECM von Gefäßen eines Glioblastoms erfährt tiefgreifende Veränderungen (Bertossi et al., 1997; Dinda et al., 1993; Hirano and Matsui, 1975). Auf mechanischem Weg wird sie von massiv einsprossenden Endothelzellen verdrängt und von diesen dann proteolytisch abgebaut. Dabei werden eine Vielzahl von Proteasen sezerniert, wie z.B. die aktuell verstärkt Beachtung findenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese unterstützen die angiogenetischen Prozesse indem sie spezifisch ECM-Bestandteile prozessieren. Im Glioblastom trifft dies vor allem auf MMP-2 und MMP-9 zu, die von proliferierenden Endothelzellen gebildet werden (Forsyth et al., 1999; Raithatha et al., 2000) und wesentlich zum infiltrativen Wachstum des Tumors beitragen (Chintala et al., 1999; Yamamoto et al., 2002). In der Folge kommt es zu einer dynamischen Umgestaltung der ECM und es werden verstärkt Wachstumsfaktoren freigesetzt, welche in der ECM vorsorglich für Angiogeneseprozesse gespeichert sind. Morphologisch zeigt sich diese Umgestaltung in einer extremen Verdickung der ECM, die pathognomonisch für Gefäße eines Glioblastoms ist. Es wird angenommen, dass sich der Tumor durch diese Hyperplasie auf Kosten des umliegenden Gewebes Raum für neue

Angiogeneseprozesse schafft (Vargova et al., 2003). Die schwerwiegendste Veränderung liegt jedoch vermutlich in der Aufspaltung der Basalmembran und dem daraus resultierenden Funktionsverlust spezieller ECM-Komponenten wie z.B. Agrin, von welchen eine wichtige Rolle bei der Integrität der BHS angenommen wird.

### **1.5 Der Dystrophin-Dystroglykan-Komplex**

Agrin und Laminin binden an  $\alpha$ -Dystroglykan, das ein Mitglied eines größeren molekularen Komplexes, des sogenannten Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes (DDC), ist. Der weitaus größte Teil des aktuellen Wissens über den DDC beruht auf Untersuchungen der Skelettmuskels, wo der DDC in der Membran der Muskelzelle lokalisiert ist und über Dystrophin und die beiden Dystroglykane die Aktinfasern des Zytoskeletts mit ECM-Komponenten verbindet und so für Stabilität und Zugfestigkeit sorgt (Ohlendieck, 1996). Eine pathologische Expression von Dystrophin bzw. eine Mutation im Dystrophin-Gen selbst führt zum klinischen Bild der Muskeldystrophien Duchenne und Becker (Monaco et al., 1986). Varianten des muskulären DDC kommen jedoch auch in anderen Geweben des Körpers vor, so ist er im Gehirn unter anderem in den perivaskulären Endfüßen der Astrozyten lokalisiert (Blake und Kröger, 2000; Zaccaria et al., 2001). Der astrozytäre DDC (Abb. 3) existiert in zwei unterschiedlichen Isoformen, einmal als Dystrophin-Dystroglykan- und einmal als Utrophin-Dystroglykan-Variante. Sowohl Dystrophin als auch Utrophin sind im Astrozyt analog zur Skelettmuskulatur einerseits über Aktin mit dem Zytoskelett und andererseits über Dystroglykan mit der Zellmembran verbunden. Dystroglykan ist ein transmembranöses Protein und besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die beide aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül hervorgehen (Ibraghimov-Beskrovnaya, 1992).  $\beta$ -Dystroglykan stellt hierbei die eigentliche Verankerung in der Zellmembran dar und ist direkt mit der C-terminalen Domäne von Dystrophin bzw. Utrophin verbunden. Weiter hat es - in der Muskelzellmembran- mit einer Reihe von Sarkoglykanen und

Sarkospan Kontakt, was vermutlich die Stabilität innerhalb der Membran erhöht.  $\alpha$ -Dystroglykan hingegen ragt als eine Art Rezeptor in die ECM hinein und kann dort über stark glykosilierte Domänen mit Molekülen wie Agrin (Gee et al., 1994) oder Laminin interagieren, was möglicherweise eine Signaltransduktion zwischen ECM und Zytoskelett ermöglicht.



Weitere Bindungspartner an der C-terminalen Domäne von Dystrophin sind  $\alpha$ -Dystrobrevin (Ueda et al., 2000) und Syntrophin, welches aus mehreren Untereinheiten besteht. Über die PDZ-Domäne von  $\alpha$ 1-Syntrophin ist schließlich das Wasserkanalprotein AQP4 verankert (Neely et al., 2001; Inoue et al., 2002), was sich morphologisch bei elektronenmikroskopischer Betrachtung in Form der geklusterten OPKs (Abb. 2) in den astrozytären Endfüßen zeigt.

Die Aquaporine sind eine ständig größer werdende Familie von Wasserkanälen, von welchen gegenwärtig 10 unterschiedliche Typen in Säugern entdeckt

wurden. Nimmt man die Subtypen aus Amphibien, Insekten, Pflanzen und Bakterien hinzu, sind bis heute über 30 unterschiedliche Wasserkanalproteine bekannt. Es handelt sich bei diesen Aquaporinen um kleine (~30kDa), hydrophobe Proteine, die sich als Tetramere in Membranen von Epithel- und Endothelzellen zusammenlagern. Jedes Monomer besteht aus 6 transmembranösen,  $\alpha$ -helikalen Domänen mit zytoplasmatischen Amino- und Carboxy-Termini, wodurch eine wasserdurchlässige Pore in der Zellmembran entsteht (Cheng et al., 1997; Walz et al., 1997). Dabei sind manche Aquaporine, darunter auch AQP4, selektiv ausschließlich für Wasser durchlässig, andere jedoch auch für lösliche Substanzen wie beispielsweise Glycerol, weswegen sie auch unter dem Begriff Aquaglyzeroprine zu einer eigenen Gruppe zusammengefasst werden. AQP4 nimmt bei der maximal möglichen Durchsatzmenge für Wasser eine einzigartige Stellung unter allen Aquaporinen ein (Yang und Verkman, 1997), weiter ist es das einzige Wasserkanalprotein, welches eine morphologisch sichtbare Struktur - in Form der OPKs - erzeugen kann. Die Ausbildung von OPKs lässt sich in allen Bereichen des Gehirns nachweisen, mit Ausnahme des *Nervus olfactorius* (Mack und Wolburg, 1986) und des *Plexus chorioideus* (Mack et al., 1987). Schon daran lässt sich erkennen, dass AQP4 als wichtigste Komponente der OPKs eine wichtige Rolle bei der Flüssigkeitsbalance zwischen Blut und Gehirn einnimmt.

Bei pathologischen Prozessen innerhalb des Gehirns wie z.B. fokalen Ischämien, mechanischen Verletzungen, Hyponatriämie und insbesondere bei Neoplasien, kommt es zu einer Überexpression von AQP4. Diese Beobachtung trifft auch auf das Glioblastom zu, in welchem AQP4 über die gesamte Zellmembran der Astrozyten verteilt exprimiert wird (Saadoun et al., 2002b). Wie bereits erwähnt, beschränkt sich unter physiologischen Bedingungen der Ort der AQP4-Expression weitgehend auf die glio-mesenchymale Grenzfläche der *Glia limitans superficialis et perivascularis*, wodurch die Verteilung über die ganze Zelloberfläche als pathologisch zu werten ist und überdies mit massiven vasogenen Ödemen und einem Polaritätsverlust der Astrozyten einhergeht. Es ist allerdings bis heute nicht abschließend geklärt, welche Rolle die Aquaporine

in der Ödementstehung spielen, d.h., ob erst die Überexpression von AQP4 zum ödematösen Anschwellen der Astrozytenendfüße führt, oder ob dieses Ereignis einen Kompensationsmechanismus als Reaktion auf den Integritätsverlust der BHS und die dadurch einströmende Flüssigkeit darstellt. Die starke Korrelation ( $p < 0,0001$ ; Saadoun et al., 2002b) zwischen dem Öffnen der BHS und der Hochregulierung der AQP4-Expression zeigt lediglich, dass beide Ereignisse in ödematöse Prozesse involviert sind. Von Untersuchungen an AQP4-Knockout-Mäusen ist jedoch bekannt, dass sich der Verlust von AQP4 protektiv auf eine Ödementstehung auswirkt (Manley et al., 2000), weshalb aktuell erstere Variante, also eine Ödementstehung in Folge einer Überexpression von AQP4, als wahrscheinlicher gilt. Welches molekulare Ereignis aber für diese Überexpression von AQP4 und den Polaritätsverlust der Astrozyten verantwortlich ist, bzw. wie generell die physiologische als auch pathophysiologische Expression und Lokalisation von AQP4 reguliert wird, liegt nach wie vor im Dunkeln.

## **1.6 Fragestellung**

Neben dem sehr schnellen und infiltrativen Wachstum stellen vasogene Ödeme das größte klinische Problem im Laufe der Pathogenese einer jeden Gehirnläsion dar. Diese können bis heute jedoch nur relativ unzulänglich durch Gabe von Glukokortikoiden und Barbituraten, osmotische Diurese und als letzte Möglichkeit durch eine dekompressive Kraniektomie behandelt werden (Roberts et al., 1998). Neben effektiven therapeutischen Maßnahmen stellt das Hauptproblem hierbei das mangelnde Verständnis der molekularen Mechanismen dar, die sowohl in die Ödementstehung als auch in die Ödembeseitigung involviert sind. Sowohl für die Durchführung aktueller Behandlungsoptionen als auch für die Entwicklung neuer, wirksamerer Medikamente ist es somit von großer Wichtigkeit, mehr über die Pathomechanismen dieser mitentscheidenden Faktoren im Überleben eines Patienten zu erfahren.

In der vorliegenden Arbeit sollen die molekularen Veränderungen näher untersucht werden, welche im Glioblastom zum Integritätsverlust der Blut-Hirn-Schranke und der darauf folgenden Ödementstehung beitragen. Der Fokus der Arbeit liegt hierbei insbesondere auf der immunzytochemischen Darstellung des Wasserkanalproteins Aquaporin 4, des Dystrophin-Dystroglykan- bzw. Utrophin-Dystroglykan-Komplexes, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Immunhistochemische Methoden**

#### **2.1.1 Gewebepräparation**

Das humane Tumorgewebe (Glioblastom) wurde sowohl von Frau PD Dr. Bornemann (Institut für Hirnforschung, Tübingen) zur Verfügung gestellt, als auch in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Duffner (Neurochirurgie, Tübingen) nach therapeutischen Operationen an Patienten aus dem Operationssaal abgeholt. Insgesamt wurden 10 Tumore untersucht.

Das Hirngewebe von drei gesunden, erwachsenen, weiblichen Wistar-Ratten stammte aus dem Veterinäramt Tübingen. Verwendet wurde es zu Kontrollzwecken, um die Verteilung der interessierenden Antigene in gesundem Gewebe darstellen zu können.

Alle Gewebeproben wurden in nativem Zustand in Tissue-Tek (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und für ein langsames und schonendes Einfrieren in eine Stickstoff-Gas-Atmosphäre gegeben. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie dann bei einer Temperatur von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit einem Cryostaten (2800-Frigocut E, Reichert-Jung, Arnsberg) wurden von den Proben  $12\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgenommen. Schließlich wurden die Objektträger mit den Schnitten für 30 Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf einer Wärmeplatte (H 22 electronic, Gerhardt, Bonn) luftgetrocknet und danach bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur späteren Verwendung eingefroren.

Die Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin erfolgte durch eine 10minütige Inkubation in einer Poly-L-Lysin-Lösung und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser. Die beschichteten Objektträger wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

**Agenzien:**

- Poly-L-Lysin-Lösung:  
Poly-L-Lysin (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA) mit Aqua bidest.  
1:200 verdünnt

**2.1.2 Behandlung des Gewebes mit Antikörpern**

Die Proben wurden nach dem Auftauen nochmals für 5 Minuten auf einer Wärmeplatte bei 37 °C luftgetrocknet und daraufhin 10 Minuten mit 4 °C kaltem Ethanol und eine Minute mit Aceton postfixiert. Nach einem Waschschrift von 10 Minuten mit TBS wurden sie 30 Minuten lang geblockt und danach eine Stunde bei Raumtemperatur, bzw. über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3x10 Minuten in TBS gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation mit den Cyanin- oder FITC-konjugierten Sekundärantikörpern in Blockpuffer unter Lichtausschluss und ein weiterer Waschschrift von 2x10 Minuten in TBS und 1x5 Minuten in einem TBS-T-Puffer. Eingedeckt wurde schließlich mit Glycerol (INC Biomedicals, Inc., Aurora, USA).

Bei Verwendung der anti-Aquaporin-4- und anti- $\alpha$ 1-Syntrophin-Antikörper wurden die Proben nach dem ersten Waschschrift für 10 Minuten bei 98 °C auf einer Wärmeplatte gekocht, wobei das Austrocknen des Gewebes durch einen Natrium-Citrat-Puffer verhindert wurde. Die weiteren Markierungsschritte erfolgten in der beschriebenen Reihenfolge. Zum Ausschluss von Kreuzreaktionen der sekundären Antikörper wurde in Kontrollgeweben der Primärantikörper weggelassen und statt dessen das Gewebe alleine mit dem Block-Puffer inkubiert.

Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops (LSM 410, Carl Zeiss, Oberkochen), die aufgenommenen Bilder wurden im Anschluss mit einem Grafik-Programm (Adobe Photoshop 5.5) digital nachbearbeitet.

## Puffer und Agenzien

- TBS-Puffer:  
50mM Trisma Base (Sigma)  
1mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt)  
150 mM NaCl (Merck)  
werden in Aqua dest. gelöst und am pH-Meter mit 32% HCl (Merck) auf pH 7,4 eingestellt
  
- TBS-T-Puffer:  
50mM Trizma Base (Sigma)  
1mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck)  
150 mM NaCl (Merck)  
0,1% Triton-X 100 (Serva, Heidelberg)  
werden in Aqua dest. gelöst und am pH-Meter mit 32% HCl (Merck) auf pH 7,4 eingestellt
  
- Block-Puffer:  
10g Magermilchpulver (Merck)  
800 $\mu\text{l}$  10% Natrium-Azid  
6ml 10% Triton-X 100 (Serva)  
200 ml TBS; pH 7,4  
unter leichter Erwärmung eine Stunde lang rühren
  
- Natrium-Azid:  
 $\text{NaN}_3$  (Merck) 1:10 mit PBS verdünnt
  
- PBS:  
1,37M NaCl (Merck)  
20,7mM KCl (Merck)  
40,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)  
14mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)

werden in Aqua dest. gelöst und am pH-Meter mit 32% HCl (Merck) auf pH 7,4 eingestellt

- Natrium-Citrat-Puffer (Stammlösung):  
29,4 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)  
in Aqua bidest. lösen und mit 0,1 M Citrat (Merck) am pH-Meter auf pH 6 eingestellt.  
Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt

### **Primärantikörper**

- anti-Agrin (Klon 45):  
polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnungsansatz 1:500  
(bereitgestellt von Dr. Stephan Kröger, Universität Mainz)
- anti-Agrin (Klon 46-LB):  
polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnungsansatz 1:1000  
(bereitgestellt von Dr. Willi Halfter, University of Pittsburgh, USA)
- anti- $\alpha$ -Dystroglykan:  
polyklonal, gezogen im Schaf, Verdünnungsansatz 1:1000 (bereitgestellt von Dr. Stephan Kröger, Universität Mainz)
- anti-Aquaporin-4:  
polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnungsansatz 1:100  
(Chemicon International, Inc., Hofheim/TS)
- anti-Aquaporin-4:  
monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (Acris GmbH, Hiddenhausen)

- anti- $\beta$ -Dystroglykan:  
monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1: 100  
(Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, England)
- anti-Fibronektin:  
polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnungsansatz 1:1000 (DAKO  
Diagnostika GmbH, Hamburg)
- anti-Fibronektin:  
polyklonal, gezogen im Schaf, FITC-konjugiert, Verdünnungsansatz  
1:400 (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln)
- anti-von-Willebrand-Faktor:  
monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:800 (DAKO)
- anti-Utrophin:  
polyklonal, gezogen in der Ziege, Verdünnungsansatz 1:100 (Santa Cruz  
Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA)
- anti-Dystrophin:  
monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (Sigma,  
Saint Louis, Missouri, USA)
- anti- $\alpha$ 1-Syntrophin:  
polyklonal, gezogen in der Ziege, Verdünnungsansatz 1:50 (Santa Cruz  
Biotechnology, Inc.)

### **Sekundärantikörper**

- Esel anti-Hase:  
konjugiert mit CY2 (Dianova GmbH, Hamburg)

- Esel anti-Schaf:  
konjugiert mit CY3 (Dianova)
  
- Esel anti-Maus:  
konjugiert mit CY3 (Dianova)
  
- Esel anti-Maus:  
konjugiert mit Fluorescein [FITC] (Dianova)
  
- Ziege anti-Hase:  
konjugiert mit CY3 (Dianova)
  
- Ziege anti-Hase:  
konjugiert mit CY2 (Dianova)
  
- Ziege anti-Maus:  
präadsorbiert  
konjugiert mit CY2 (Dianova)

## **2.2 Histologische Methoden**

### Hämatoxylin-Gegenfärbung nach Harris

Die Präparation und die Behandlung der Proben erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll (Immunhistochemische Methoden). Zur histologischen Darstellung aller verwendeter Proben wurde eine herkömmliche Hämatoxylin-Gegenfärbung nach Harris durchgeführt. Um Kondenswasser zu vermeiden wurden die Proben dabei nach dem Auftauen zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im ersten Schritt wurde das Gewebe für 10 Sekunden in einer Formalin-Lösung fixiert und daraufhin kurz mit destilliertem

Wasser gespült. Nach 30 Sekunden in einer Hämatoxylin-Lösung (Merck) folgten 3x10 Sekunden Spülen mit destilliertem Wasser, im Anschluss daran wurden die Proben mit Ammoniak-Alkohol gebläut. Weiter wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2x2 Minuten 70%, 2x2 Minuten 96%, 2x 4 Minuten 100%), 3x4 Minuten in Xylol (Merck) inkubiert und schließlich mit Pertex (medite, Burgdorf) eingedeckt. Die Bilder wurden an einem Durchlicht- und Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert S 100, Carl Zeiss) mit integrierter Kamera gemacht und mit Photoshop 5.5 (Adobe) digital nachbearbeitet.

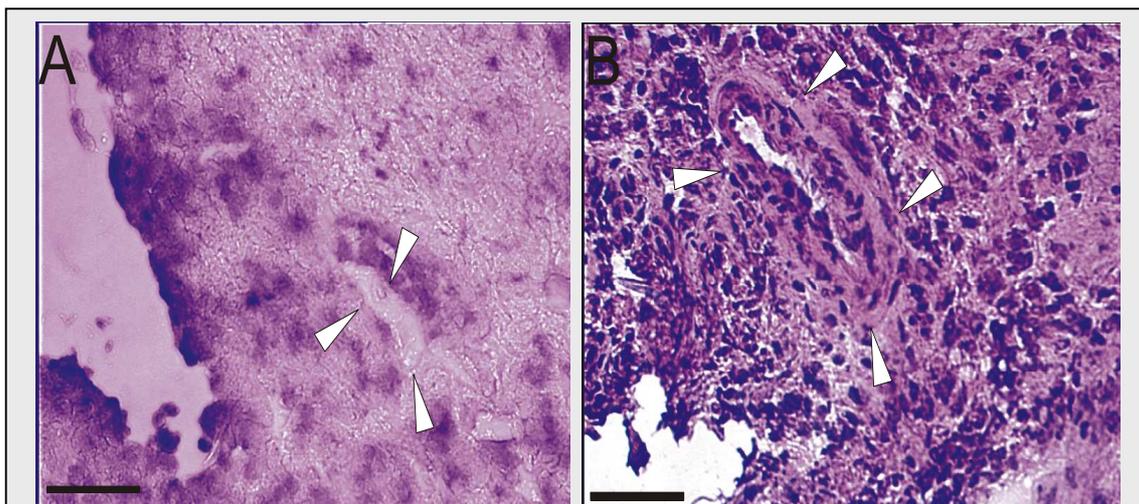
## **Agenzien**

- Formalin-Lösung:  
Formalin (Merck) 1:25 mit Aqua dest. verdünnt
  
- Ammoniak-Alkohol:  
200 ml 70% Alkohol (Merck)  
6 ml Ammoniak (Merck)

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zehn unterschiedliche Gewebeproben von Patienten mit einem Glioblastom mittels immunhistochemischen und histologischen Methoden untersucht. Die Zielsetzung der Untersuchungen war hierbei, die molekularen Pathomechanismen der Ödementstehung und des Integritätsverlustes der Blut-Hirn-Schranke in neoplastischen Prozessen des Gehirns weiter aufzuklären, wobei der Fokus der Arbeit insbesondere auf dem Wasserkanalprotein Aquaporin 4, dem Dystrophin-Dystroglykan- bzw. Utrophin-Dystroglykan-Komplex in den perivaskulären astrozytären Endfüßen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix lag.

Um eine pathologische Expression der untersuchten Moleküle innerhalb des Glioblastom-Gewebes im Vergleich mit gesundem Hirngewebe darstellen zu



**Abb. 4:** Hämatoxylin-Gegenfärbung nach Harris im Ratten- und Glioblastom-Gewebe.  
**A:** Gesundes, erwachsenes Rattengehirn: Die Basalmembran der Gefäße (Pfeile) zeigt sich von regelrechter Dicke, der Gesamteindruck des Gewebes entspricht dem Normalzustand des zentralen Nervensystems.  
**B:** Die typischen Charakteristika eines Glioblastoms sind in diesem Gewebeschnitt deutlich zu sehen: Die Basalmembran des Gefäßes (Pfeile) ist hyperplastisch verändert und stark verdickt, was sich deutlich in der Einengung des Lumens bemerkbar macht. Weiter sieht man das Glioblastom-typische Bild der „bunten Schnittfläche“ mit großem Mitose- und Zellreichtum. Bar = 25µm

können und um die korrekte Bindung der Antikörper an die zu untersuchenden Antigene zu überprüfen, wurde zu Kontrollzwecken das Hirngewebe gesunder, erwachsener Ratten verwendet. Dieses kommt bezüglich seiner Zusammensetzung und Struktur menschlichem Gewebe sehr nahe und zeigt

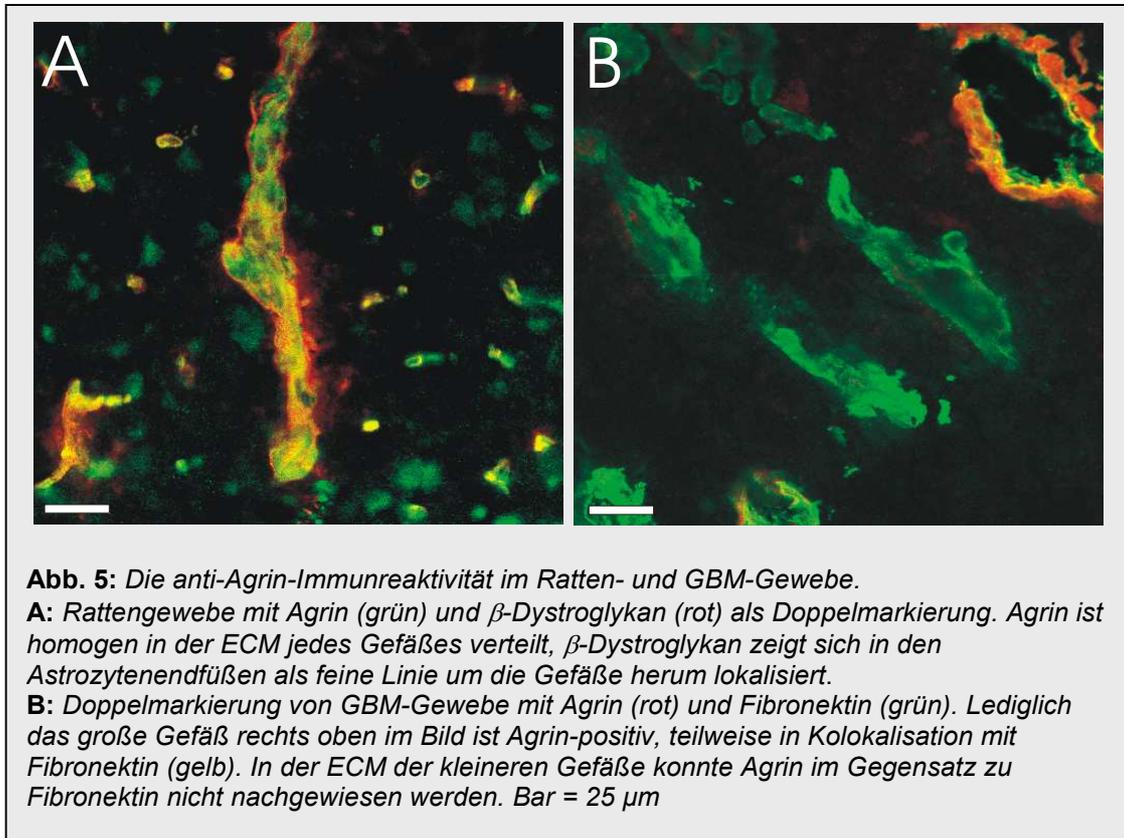
nach heutiger Literatur keine Unterschiede in der Verteilung und Lokalisation der in dieser Arbeit betrachteten Antigene.

Vor jeder immunhistochemischen Markierung wurden alle verwendeten Gewebeproben zunächst zur histologischen Darstellung mit einer herkömmlichen Hämatoxylin-Gegenfärbung nach Harris behandelt, um den Zustand des Gewebes besser beurteilen zu können (Abb. 4). Hierbei wies das Rattengewebe die für das zentrale Nervensystem typische geordnete Struktur ohne besondere Auffälligkeiten auf. Die Gefäße zeigten sich regelhaft mit normaler Lumengröße und einer feinen, teilweise nur schwer erkennbaren Basalmembran. Das Glioblastom-Gewebe wurde auf die typischen Charakteristika wie Nekrosen, zystische Zerfallshöhlen, eine „bunte Schnittfläche“ und die glomeruloiden Gefäßproliferationen hin überprüft. Über die histologische Darstellung wurde somit auch sichergestellt, dass die unterschiedlichen Patientenproben dem WHO-Grad IV entsprachen.

### **3.1 Untersuchungen der anti-Agrin-Immunreaktivität**

In einem ersten Ansatz wurden Rattengewebe und humanes Tumorgewebe auf ihre Immunreaktivität gegenüber Agrin getestet. Im Rattengewebe zeigte sich die Expression von Agrin sehr homogen über die ECM der Gefäße verteilt. Diese gleichmäßige Verteilung war sowohl innerhalb jedes Gefäßes als auch innerhalb des gesamten Gewebeschnittes vorzufinden (Abb. 5a). Im Glioblastom-Gewebe war hingegen eine große Variabilität bezüglich der anti-Agrin-Immunreaktivität zu sehen. Während das Molekül in den meisten Basalmembranen größerer Gefäße vorzufinden war, konnte es in kleineren Gefäßen nicht nachgewiesen werden (Abb. 5b). Die Agrin-negativen Gefäße wurden über die spezifische Markierung der ECM durch anti-Fibronectin-Antikörper identifiziert. Innerhalb dieser Doppelmarkierung von Agrin und Fibronectin zeigten einige Gefäße eine Kolokalisation beider Antigene (Abb. 5b), andere jedoch eine sehr inhomogene Verteilung: Die Lokalisation von Agrin war entweder auf die endotheliale Seite des perivaskulären Raumes

beschränkt, oder es konnte überhaupt keine Immunreaktivität gegenüber Agrin nachgewiesen werden (Abb. 7c,e). Auffällig war bei den Gefäßen mit veränderter Agrinexpression, dass ihre ECM eine verdickte und unregelmäßige



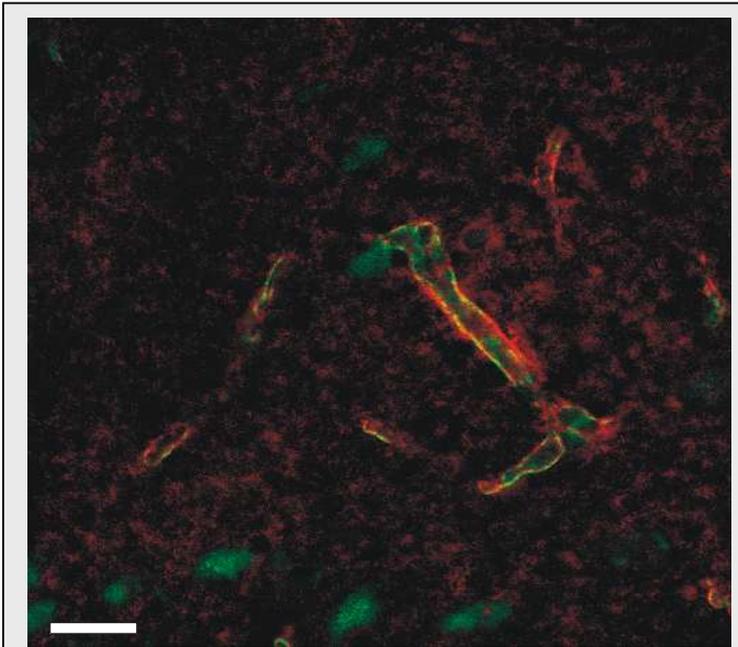
Struktur aufzeigte, was auf hyperplastische und proliferative Prozesse der Gefäße hinweist.

### 3.2 Die physiologische und pathophysiologische Expression von AQP4

Im nächsten Schritt wurde die Expression von AQP4 in beiden Gewebetypen genauer analysiert. Im Rattengehirn zeigte sich das nach aktuellem Wissensstand zu erwartende Bild einer ausschließlich perivaskulären Verteilung von AQP4 in den astrozytären Endfüßen; Dabei war AQP4 mit den Dystroglykanen kolokalisiert (siehe unten und Abb. 6, 8). Auch im Gliomgewebe bestätigten sich die Ergebnisse aus früheren Beobachtungen, die von einer Verteilung von AQP4 über die ganze astrozytäre Zellmembran in allen

Bereichen des Schnittes berichten. Die Immunreaktivität war in diesen Markierungen hauptsächlich auf Membranen der Astrozyten beschränkt, konnte jedoch nicht im Zytoplasma selbst nachgewiesen werden (Abb. 7d,f).

Weitere Untersuchungen an Folgeschnitten von Gliomgewebe, welche einerseits einer Doppelmarkierung gegen Fibronectin und Agrin sowie



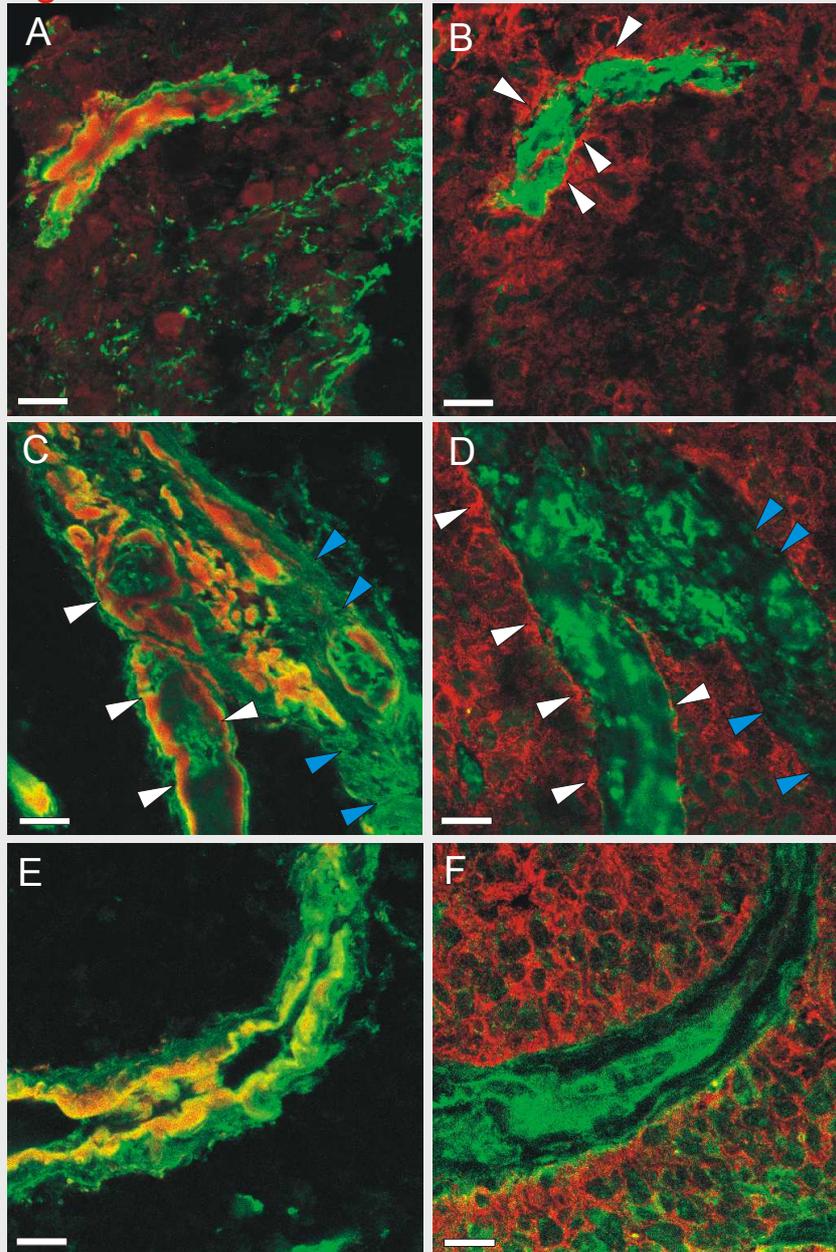
**Abb. 6:** Doppelmarkierung von Gefäßen des Rattengehirns: AQP4 (rot) ist ausschließlich in den perivaskulären Endfüßen lokalisiert, stellenweise gemeinsam (gelb) mit  $\beta$ -Dystroglykan (grün). Bar = 25  $\mu$ m

andererseits von Fibronectin und AQP4 unterzogen wurden, zeigten gänzlich neue Ergebnisse: AQP4 war nur noch dann perivaskulär in den Endfüßen der Astrozyten in geklusterter Form anzutreffen, wenn Agrin auf der glialen Seite der ECM vorhanden war (Abb. 7a-d). Wenn Agrin nicht glial lokalisiert war oder nur auf der endothelialen Seite

nachgewiesen wurde, so war auch keine Klusterung von AQP4 um das Gefäß vorhanden (Abb. 7c-f). Unabhängig von der geklusterter Form von AQP4 am Gefäß war in jedem Gewebeschnitt zusätzlich auch das Glioblastom-typische Bild der AQP4-Verteilung über alle Zelloberflächen zu sehen. In den Gefäßen mit veränderter Expression von Agrin war neben der fehlenden Klusterung von AQP4 auch stets eine massive, hyperplastische Verdickung der ECM nachweisbar. Also korreliert die Expression von Agrin auf der glialen Seite des perivaskulären Raumes sowohl mit der Klusterung von AQP4 in den gefäßumgebenden astrozytären Endfüße als auch mit der Gefäßwanddicke.

**Agrin/Fibronektin**

**AQP4/Fibronektin**



**Abb. 7:** Agrin/Fibronektin- und AQP4/Fibronektin-Doppelmarkierung von Folgeschnitten im Glioblastom-Gewebe.

**A:** Agrin ist endothelial und glial gleichmäßig in der leicht verdickten ECM lokalisiert.

**B:** AQP4-Immunreaktivität ist verstärkt perivaskulär anzutreffen (Pfeile, Klusterung in den Astrozytenendfüßen) und nur schwach im umliegenden Gewebe.

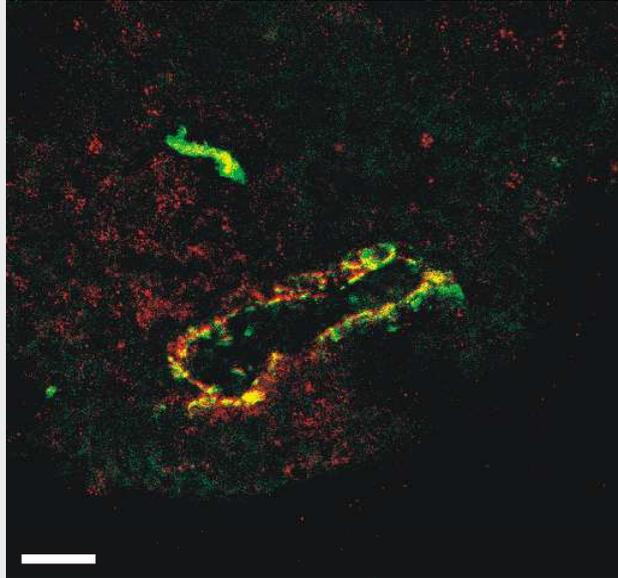
**C:** Gefäßaufzweigung: links ist Agrin relativ gleichmäßig und strukturiert in der ECM zu sehen (weiße Pfeile), rechts zeigt es sich sehr ungleichmäßig mit endothelialer Tendenz, teilweise ist es nicht mehr vorhanden (blaue Pfeile). **D:** In den glialen Agrin-positiven Bereichen zeigt sich eine deutliche AQP4-Klusterung am Gefäß (weiße Pfeile), wohingegen die Bereiche ohne bzw. mit endothelial lokalisiertem Agrin keine AQP4-Klusterung mehr aufweisen (blaue Pfeile). Das umliegende Gewebe zeigt eine Verteilung von AQP4 über alle Zellmembranen.

**E:** Die ECM dieses Gefäßes ist stark verdickt, Agrin ist nur noch endothelial lokalisiert.

**F:** Entsprechend zeigen sich am Gefäß keine AQP4-Kluster mehr, sondern vielmehr eine Expression von AQP4 in allen Zellmembranen des gesamten Gewebes. Bar = 25 µm

### 3.3 Auswirkungen der AQP4-Umverteilung im GBM auf die Komponenten des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes

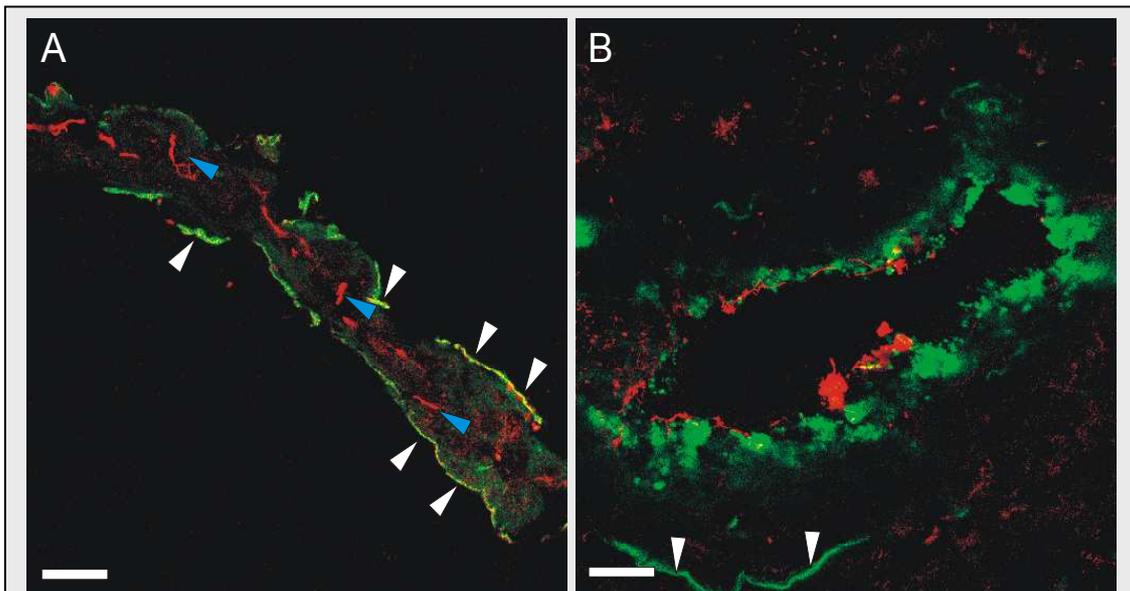
Nach dem Nachweis einer Korrelation zwischen einer glialen Lokalisation von Agrin und der Klusterung von AQP4 im Astrozytenendfuß stellte sich nun die Frage, ob die Umverteilung von AQP4 über die gesamte Zellmembran der Astrozyten in Abwesenheit von Agrin auf der glialen Seite der ECM, irgend einen Einfluss auf das Expressionsmuster von



**Abb. 8:** Gefäßdoppelmarkierung des Rattengewebes. AQP4 (grün) und  $\alpha$ -Dystroglykan sind beide in den perivaskulären Endfüßen lokalisiert, in vielen Bereichen sind die Moleküle kolokalisiert (gelb). Bar = 25  $\mu$ m

Bestandteilen des DDC hat. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Verteilung der Dystroglykane des Astrozytenendfußes näher untersucht, wobei auch in diesem Ansatz wieder Rattengewebe als Kontrolle diente. In allen Kontrollschnitten waren sowohl  $\alpha$ -Dystroglykan (Abb. 8) als auch  $\beta$ -Dystroglykan (Abb. 6) ausschließlich perivaskulär in den Endfüßen nachweisbar, was ihrer physiologischen Lokalisation entspricht. Innerhalb des Glioblastom-Gewebes zeigte sich jedoch ein komplett anderes Bild. Die Immunreaktivität gegenüber  $\alpha$ -Dystroglykan war zwar in vielen Gefäßen perivaskulär bzw. glial vorhanden, jedoch über große Bereiche hinweg unterbrochen und unregelmäßig strukturiert. Weiter konnten  $\alpha$ -Dystroglykan-positive Strukturen in luminalen Bereichen mancher Gefäße nachgewiesen werden (Abb. 9a). Teilweise traten diese Strukturen auch auf, ohne dass perivaskulär eine Immunreaktivität von  $\alpha$ -Dystroglykan in den Endfüßen vorhanden war (Abb. 9b). In Doppelmarkierungen beider Dystroglykane zeigten

sich die Moleküle stellenweise in den perivaskulären Endfüßen kolokalisiert (Abb. 9a), wobei die Expression von  $\beta$ -Dystroglykan auf diese Bereiche beschränkt blieb. Im Glioblastom tritt somit offensichtlich eine voneinander unabhängige Expression der beiden Dystroglykane auf. Die Expression von  $\beta$ -Dystroglykan ist dabei regelrecht auf den glialen Endfuß beschränkt, wohingegen  $\alpha$ -Dystroglykan in diesen Bereichen nur unregelmäßig oder überhaupt nicht nachweisbar ist, jedoch von Strukturen im Lumenbereich der Gefäße (blaue Pfeile in Abb. 9a) exprimiert wird.

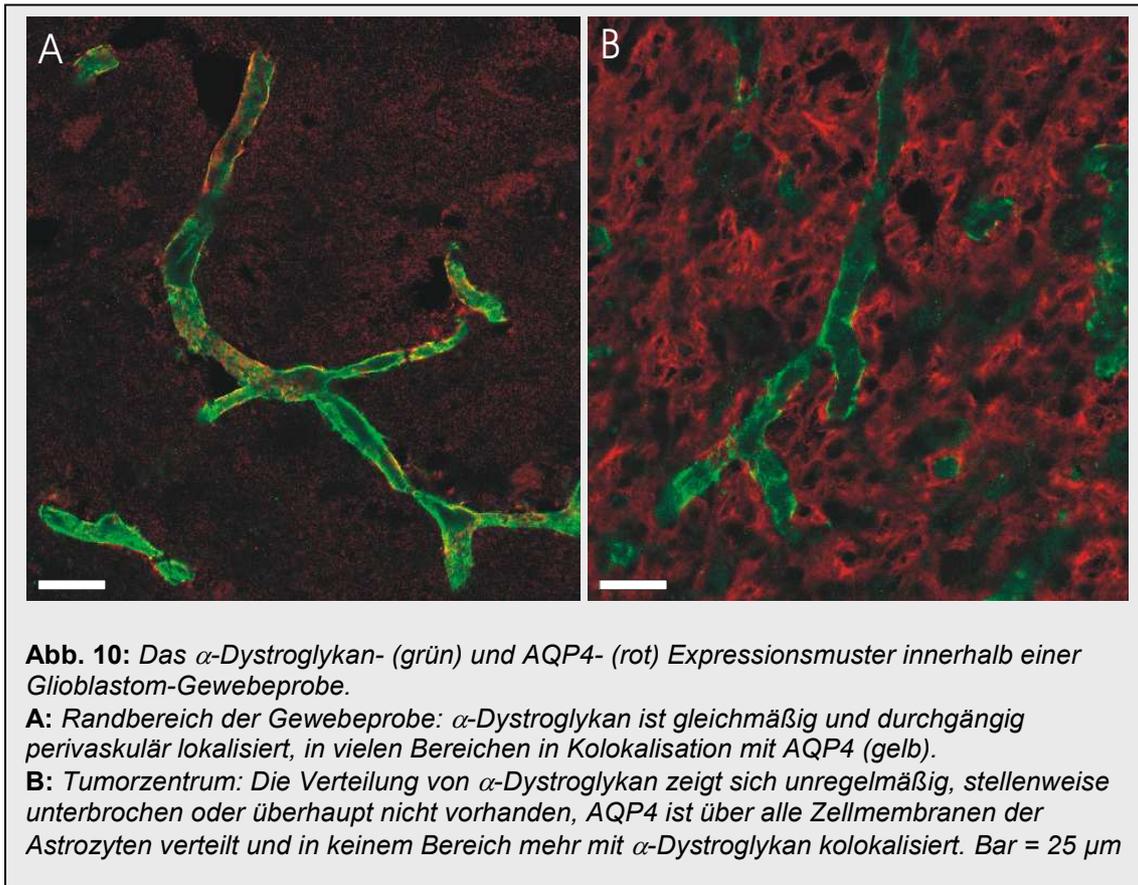


**Abb. 9:** Die Dystroglykan-Expression im Glioblastom.

**A:**  $\beta$ -Dystroglykan (grün) ist ausschließlich perivaskulär lokalisiert.  $\alpha$ -Dystroglykan (rot) ist nur unregelmäßig perivaskulär anzutreffen (gelb, weiße Pfeile). In großen Bereichen zeigt sich eine starke Immunreaktivität gegenüber  $\alpha$ -Dystroglykan in luminalen Strukturen des Gefäßes (blaue Pfeile). **B:** Doppelmarkierung mit anti-vWF- (grün) und anti- $\alpha$ -Dystroglykan-Antikörpern (rot).  $\alpha$ -Dystroglykan wird auf der luminalen Seite des Endothels exprimiert. Die Pfeile zeigen die Eigenfluoreszenz der Lamina elastica externa. Bar = 25  $\mu$ m

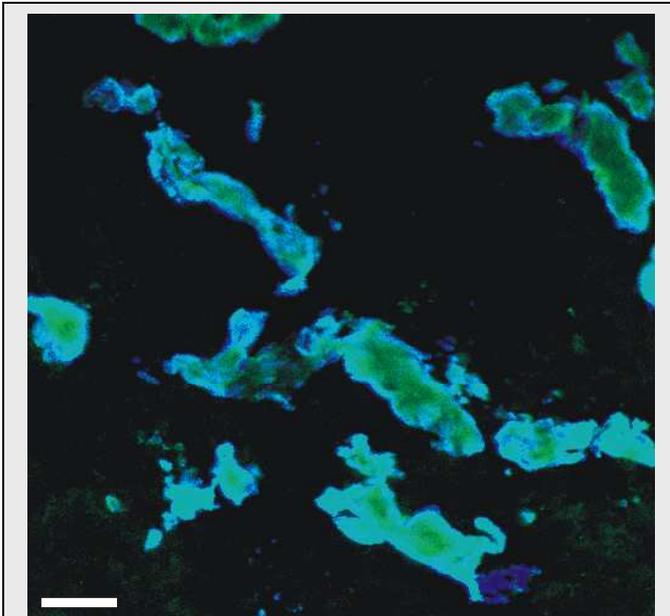
Um diese  $\alpha$ -Dystroglykan-positive Strukturen mancher Gefäße näher charakterisieren zu können, wurden verschiedene immunhistochemische Markierungen mit endothelspezifischen anti-vWF-Antikörpern durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es sich bei den Strukturen im Lumenbereich um hyperplastisches Endothel handelt, welches offensichtlich in der Lage ist,  $\alpha$ -Dystroglykan exprimieren zu können (Abb. 9b). Diese Fähigkeit des Endothels wurde innerhalb gliomatösen Gewebes in dieser Arbeit zum ersten Mal überhaupt nachgewiesen.

In einem folgenden Ansatz wurde das variable Expressionsmuster von  $\alpha$ -Dystroglykan innerhalb eines GBM genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass in den Exzisionsrändern der Tumorprobe  $\alpha$ -Dystroglykan perivaskulär gleichmäßig und durchgängig exprimiert wurde und gemeinsam mit AQP4 in Kolokalisation anzutreffen war. AQP4 wurde hierbei nur in geklusterter Form in den Endfüßen exprimiert (Abb. 10a). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen



konnte in zentralen Bereichen des Tumors keine perivaskuläre Kolokalisation der beiden Moleküle mehr nachgewiesen werden.  $\alpha$ -Dystroglykan zeigte die bereits in früheren Gewebeschnitten beobachtete, unregelmäßige Verteilung, AQP4 hingegen war in Glioblastom-typischer Weise über alle Zellmembranen verteilt (Abb. 10b). Die Tatsache, dass beide Moleküle in keinem zentralen Tumorbereich kolokalisiert vorzufinden waren (keine gelben Bereiche in Abb. 10b) legt nahe, dass es sich auch in dieser Schnittserie nicht um gliales, sondern um endothelial exprimiertes  $\alpha$ -Dystroglykan handelt.

Durch die fehlende Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan in zentrale Tumorbereichen geht der Bindungspartner von Agrin und somit die Verbindung zwischen der ECM und der Membran der Astrozyten verloren. Da neben Agrin auch Laminin an  $\alpha$ -Dystroglykan bindet, war somit auch das Expressionsmuster

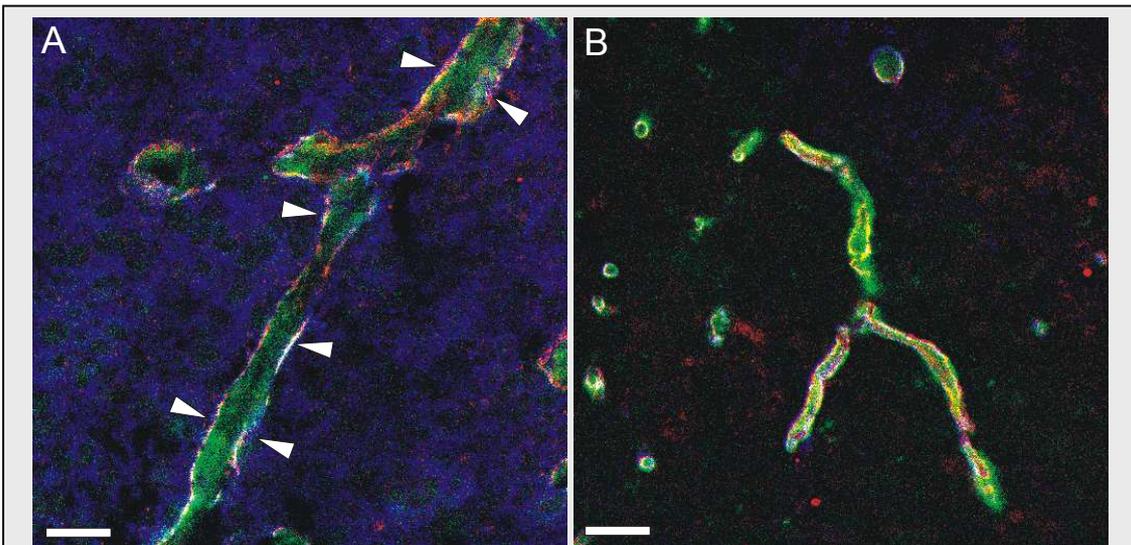


**Abb. 11:** *Doppelmarkierung von GBM-Gewebe mit Laminin (blau) und Fibronectin (grün). Während Fibronectin gleichmäßig über die gesamte ECM verteilt ist, wird Laminin hauptsächlich auf der glialen Seite der ECM exprimiert, in fast allen Bereichen in Kolokalisation mit Fibronectin (türkis). Bar = 25  $\mu$ m*

dieses ECM-Moleküls für diese Arbeit von Interesse. In Doppelmarkierungen mit Fibronectin und Laminin (Abb. 11) zeigte sich jedoch nicht die zu erwartende Analogie zur Agrin-Verteilung, sondern vielmehr ein homogene Expression von Laminin in der gesamten glialen Seite der ECM, dabei in nahezu allen Bereichen in Kolokalisation mit Fibronectin.

Um nun abschließend das Expressionsmuster der noch verbleibenden DDC-

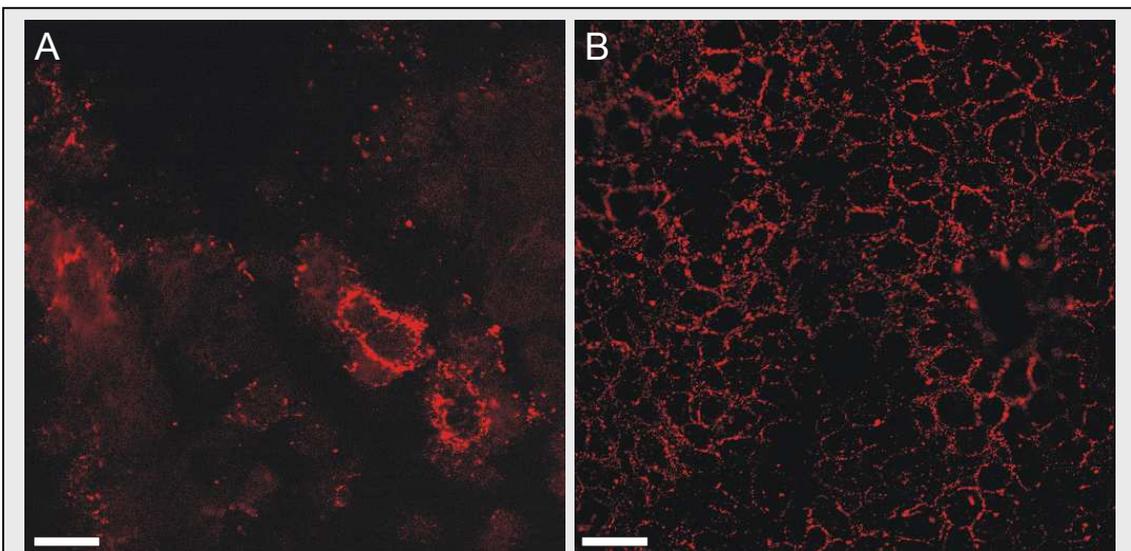
Komponenten zu vervollständigen, wurden zunächst Markierungen der Hauptkomponenten Dystrophin und Utrophin vorgenommen. Bei diesen Untersuchungen ergab sich, dass die Expression beider Moleküle auf die Zellmembranen des Astrozytenendfußes beschränkt blieb. Dies war auch unabhängig davon der Fall, ob Veränderungen der Expression und Verteilung von AQP4,  $\alpha$ -Dystroglykan oder Agrin zu beobachten waren. Da auch keine Kolokalisation von Dystrophin oder Utrophin mit AQP4 nachzuweisen war, zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass unter Gliombedingungen AQP4 dissoziiert von den DDC-Komponenten in den Astrozytenmembranen auftritt (Abb. 12a). Im Rattenkontrollgewebe zeigte sich eine deutliche perivaskuläre Kolokalisation von Dystrophin, Utrophin und AQP4 (Abb. 12b), was dem intakten physiologischen Expressionsort der Moleküle entspricht.



**Abb. 12:** Das Dystrophin- (grün), Utrophin- (rot) und AQP4- (blau) Expressionsmuster im Glioblastom und in der gesunden, erwachsenen Ratte.

**A:** Glioblastom: Die Expression von Dystrophin und Utrophin ist auf die perivaskulären Endfüße beschränkt, AQP4 ist in kleinen Bereichen noch am Gefäß geklustert (lila und türkis, Pfeile), gleichzeitig aber von den Komponenten des DDC dissoziiert und über alle Membranoberflächen verteilt.

**B:** Ratte: Dystrophin, Utrophin und AQP4 sind ausschließlich in den perivaskulären Endfüßen anzutreffen, nahezu in allen Bereichen des Gefäßes kolokalisiert (lila, gelb, türkis). Bar = 25  $\mu$ m



**Abb. 13:** Das Verteilungsmuster von  $\alpha$ 1-Syntrophin (rot) in Ratten- und GBM-Gewebe.

**A:** Ratte: Die Expression von  $\alpha$ 1-Syntrophin ist auf die perivaskulären Endfüße beschränkt.

**B:** GBM:  $\alpha$ 1-Syntrophin ist über alle Membranoberflächen des Gewebes verteilt. Bar = 25  $\mu$ m

Wenn AQP4 also dissoziiert und unabhängig von Komponenten des DDC in Membranen vorkommen kann, war der nächste logische Schritt, die Verteilung von  $\alpha$ 1-Syntrophin, das Verbindungsglied zwischen Dystrophin/Utrophin und AQP4, näher zu fokussieren.  $\alpha$ 1-Syntrophin bindet AQP4 über seine PDZ-Domäne und verankert den Wasserkanal so in der Zellmembran.

Die daraufhin durchgeführten Markierungen des Glioblastom-Gewebes mit anti- $\alpha$ 1-Syntrophin-Antikörpern hatten zum Ergebnis, dass  $\alpha$ 1-Syntrophin analog zu AQP4 eine Immunreaktivität über die gesamte Astrozytenmembran verteilt zeigt (Abb. 13), also im Glioblastom ebenfalls dissoziiert von allen DDC-Komponenten auftreten kann. Im Rattengewebe war die Immunreaktivität gegen  $\alpha$ 1-Syntrophin auf die perivaskulären Astrozytenendfüße beschränkt, wo es über  $\alpha$ -Dystrobrevin mit Dystrophin oder Utrophin verbunden ist.

Die Ergebnisse werden noch einmal tabellarisch wie folgt zusammengefasst:

**Tabelle 2:**

*Vergleichende Übersicht der wichtigsten Antigenverteilungen in zentralen Tumorbereichen und im gesunden Rattengehirn. \* sehr variabel, AQP4 Aquaporin 4,  $\alpha$ -DG  $\alpha$ -Dystroglykan,  $\beta$ -DG  $\beta$ -Dystroglykan,  $\alpha$ -Syn  $\alpha$ 1-Syntrophin, Dys Dystrophin, Utro Utrophin*

	AQP4		Agrin	$\alpha$ -DG		$\beta$ -DG	$\alpha$ -Syn		Dys	Utro
	End-fuß	ganze Zelle		endo-thelial	glial		End-fuß	ganze Zelle		
<b>GBM, zentral</b>	-/+	+++	-/+++ *	+++	(+)	+++	-	++	++	++
<b>Ratte, Gehirn</b>	+++	-	+++	-	++	+++	++	-	++	++

**Tabelle 3:**

Vergleichende Übersicht der wichtigsten Antigenverteilungen in peripheren Tumorbereichen und im gesunden Rattengehirn. AQP4 Aquaporin 4,  $\alpha$ -DG  $\alpha$ -Dystroglykan,  $\beta$ -DG  $\beta$ -Dystroglykan, Dys Dystrophin, Utro Utrophin

	AQP4		Agrin	$\alpha$ -DG		$\beta$ -DG	Dys	Utro
	End-fuß	ganze Zelle		endo-thelial	glial			
<b>GBM, Peripherie</b>	+++	-	++	-	++	+++	++	++
<b>Ratte, Gehirn</b>	+++	-	+++	-	++	+++	++	++

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die Korrelation zwischen der glialen Expression von Agrin und der Klusterung des Wasserkanalproteins AQP4 in den perivaskulären Astrozytenendfüßen**

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass im humanen Glioblastom der Verlust der Expression des Heparansulfat-Proteoglykans Agrin auf der astroglialen Seite der perivaskulären ECM mit der Umverteilung des Wasserkanalproteins AQP4 über die gesamte gliale Zellmembran korreliert (Warth et al., 2004). Die Expression von AQP4 über alle Astrozytenmembranen korreliert wiederum positiv mit der Entstehung von Ödemen (Saadoun et al., 2002b), welche in der Folge zu einer starken Zunahme des Hirndrucks und dadurch zu schwerwiegenden, klinischen Komplikationen führen. In einer immunhistochemischen Studie verschiedener Glioblastom-Proben konnte von Rascher et al. (2002) gezeigt werden, dass die Expression von spezifischen Tight-junction-Proteinen im Endothel der Hirngefäße direkt von der Expression von Agrin in der perivaskulären ECM abhängig ist. In diesen Untersuchungen konnte in Agrin-negativen Gefäßen die Expression einiger endothelialer Tight-junction-Proteine nicht mehr nachgewiesen werden, was funktionell wenn nicht dem Verlust, zumindest einer schweren Schädigung der BHS entspricht. Im Weiteren wurde in dieser Studie eine gegenläufige Korrelation des Verlustes von Agrin und der Expression des Glykoproteins Tenascin, eines weiteren Bestandteils der ECM, nachgewiesen. Da Tenascin jedoch physiologischerweise nur während der Entwicklung – also in einem Zustand, in dem die BHS noch nicht geschlossen ist – sowie in Wundheilungs- und Gewebeneubildungsprozessen exprimiert und im erwachsenen Gehirn nicht mehr gebildet wird (Jones und Jones, 2000), bestärken alle diese Ergebnisse die Hypothese von Barber und Lieth (1997), dass Agrin einen direkten Einfluss auf die Aufrechterhaltung der BHS zwischen den Endothelzellen von Hirngefäßen hat. Weiter wird diese Hypothese von der Tatsache unterstützt, dass Agrin nur in der ECM von Gefäßen mit spezifischen Barriereigenschaften

exprimiert wird, wohingegen in normalen Gefäßen keine Expression von Agrin nachzuweisen ist ( Barber und Lieth, 1997).

Auch molekulare Untersuchungen zur Pathogenese des Morbus Alzheimer weisen in die gleiche Richtung: Im Gehirn von Alzheimer-Patienten lässt sich ebenfalls ein Verlust von Agrin in der perivaskulären ECM nachweisen, wobei es in diesem Fall nicht zu einem totalen Verlust des Heparansulfat-Proteoglykans kommt, sondern Agrin in Form von sogenannten senilen Plaques in der ECM abgelagert wird. Diese pathologisch veränderten Gefäße weisen ebenfalls – wie auch in Gefäßen des Glioblastoms schon mehrfach aufgezeigt - Störungen der BHS auf (Donahue et al., 1999; Berzin et al., 2000).

Nach dem Nachweis der Agrin-Expression im zentralen Nervensystem wurde bezüglich der genauen Herkunft des Moleküls festgestellt, dass sowohl Astrozyten in vivo und in vitro (Tsen et al., 1995; Stone und Nikolics, 1995), als auch Endothelzellen während der Entwicklung (Stone und Nikolics, 1995) in der Lage sind, Agrin zu exprimieren. Andere Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass die Sekretion von Agrin von den Endothelzellen selbst reguliert wird (Lieth et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnten die einzigen bisher bekannten Ergebnisse über die Expression von Agrin im Glioblastom (Rascher et al., 2002) reproduziert werden, sowie neue Erkenntnisse zum Verteilungsmuster des ECM-Moleküls hinzugewonnen werden. Untersuchungen mit einem Laser-Scan-Mikroskop nach immunhistochemischer Markierung ergaben stets eine große Variabilität der Expression innerhalb eines Gewebeschnittes. In fast allen größeren Gefäßen konnte Agrin in der ECM nachgewiesen werden, wohingegen es in kleinen Gefäßen nicht mehr exprimiert wurde (Abb. 5b). Darüber hinaus konnte eine immer geringer werdende Expression von Agrin ausgehend von der Peripherie bis ins Zentrum der Tumoren beobachtet werden. Besonders in zentralen Bereichen war die Verteilung des Moleküls sehr inhomogen, was für eine exaktere Beschreibung der Lokalisation von Agrin die Doppelmarkierung mit Fibronectin, einem spezifischen ECM-Marker, welcher im Glioblastom stark exprimiert wird (Öz et al., 2000), nötig machte. Dabei zeigte sich, dass die Lokalisation von Agrin entweder auf die endotheliale Seite der ECM beschränkt, oder überhaupt keine Immunreaktivität gegenüber

Agrin vorhanden war (Abb. 7c,e). Funktionell spiegelt diese Beobachtung, welche in auffälliger Weise mit der hyperplastischen Verdickung der Gefäßwände korrelierte, in jedem Fall eine Kommunikationsunterbrechung zwischen der ECM und dem Zytoskelett der Gliomzelle wieder. Die endotheliale Lokalisation von Agrin erklärt sich möglicherweise dadurch, dass die neoplastisch veränderten Astrozyten kein Agrin mehr in die ECM sezernieren, wohingegen proliferierende Endothelzellen während der Angiogenese wie schon im Laufe der Embryonalentwicklung (Stone und Nikolics, 1995) diese Funktion erneut erwerben, um ihren Adhäsions- und Proliferationsprozessen gerecht werden zu können.

Vom transmembranösen Wasserkanalprotein AQP4 wird gegenwärtig angenommen, dass es ursächlich für den Wasseraustausch zwischen vaskulären und astroglialen Kompartimenten verantwortlich ist. Im Weiteren ist AQP4 im großen Ausmaß an der Entstehung vasogener Ödeme des zentralen Nervensystems beteiligt, wobei seine spezifische Rolle in diesem Prozess bis heute nicht genau bekannt ist. Ödeme sind das Resultat einer gestörten Balance zwischen Flüssigkeitsproduktion bzw. Flüssigkeitseinstrom und der Clearance und führen bei vielen pathologischen Prozessen des Gehirns zu einer starken Überexpression von AQP4. Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob erst die Überexpression AQP4 infolge des Integritätsverlustes der BHS zu den Ödemen führt, oder ob es sich vielmehr um eine reaktive Überexpression handelt, also einen Versuch der Astrozyten die einströmende Flüssigkeit wieder zu beseitigen. Den einzigen Hinweis auf diese ungeklärte Frage geben erste Ergebnisse aus Versuchen mit AQP4-knockout-Mäusen, welche nach dem experimentellen Verschluss einer das Gehirn versorgenden Arterie weitaus geringerem Maße Ödeme ausbilden und im Vergleich zu normalen Mäusen ein wesentlich besseres klinisches Outcome haben (Manley et al., 2000). Das Fehlen von AQP4 schützt das Gehirn also offensichtlich vor Ödemen, was eine Rolle von AQP4 bei der Entstehung und nicht bei der Clearance von Ödemen fast zwingend nahe legt. Die Tatsache, dass nach chemischer oder physikalischer Verletzung des Gehirns (Vizueté et al., 1999) sowie nach fokaler Ischämie (Taniguchi et al., 2000) eine Überexpression von

AQP4-mRNA nachgewiesen wurde, deutet darauf hin, dass es der Integritätsverlust der BHS selbst ist, welcher reaktiv die AQP4-Überexpression stimuliert und somit die Ödementstehung ermöglicht. Neben AQP4 kommt es in Hirntumoren auch zu einer verstärkten Expression von Aquaporin-1 (Saadoun et al., 2002a), ob diese Tatsache jedoch ebenfalls zur Ödementstehung beiträgt, ist nicht abschließend geklärt.

Nach der Lokalisation von AQP4 in den perivaskulären Endfüßen der Astrozyten konnte mittels elektronenmikroskopischen Methoden gezeigt werden, dass das Protein Bestandteil der orthogonalen Partikelkomplexe (OPKs) ist (Yang et al., 1996; Rash et al., 1998), bzw. es ohne die Expression von AQP4 bei Knockout-Mäusen zu keiner nachweisbaren Aggregation von OPKs kommt (Verbavatz et al., 1997). Während der Entwicklung des Gehirns erwerben die Astrozyten bezüglich der OPK/AQP4-Verteilung eine Polarität (hohe Dichte in den Endfüßen, geringe Dichte in den Membranen ohne ECM-Kontakt), von welcher eine wichtige Rolle sowohl bei der Induktion als auch bei der Aufrechterhaltung der BHS angenommen wird (Wolburg 1995a; Wolburg 1995b). Aus früheren Untersuchungen von humanen Glioblastom-Geweben mittels Freeze-Fracture-Technik war bekannt, dass Astrozyten unter pathologischen Bedingungen ihre OPK-spezifische Polarität verlieren und ebenfalls ihre absolute Menge an OPKs drastisch reduzieren (Neuhaus, 1990). Während Cuevas et al. (1984) OPKs in Astrozytomen nachgewiesen haben, konnte später gezeigt werden, dass lediglich in niedriggradigen Astrozytomen (WHO I und II) OPKs vorhanden sind, wohingegen in anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen keine OPKs mehr nachweisbar sind (Hatton und Sang, 1990). Wenn man nun die älteren, mittels Replikas gewonnenen Ergebnisse über OPKs mit Ergebnissen von neueren Methoden wie beispielsweise der elektronenmikroskopischen anti-AQP4-Immuncytochemie (Nielsen et al., 1997) vergleicht, muss Folgendes daraus geschlossen werden: Die parenchymalen Astrozytenmembranen mit einer sehr geringen OPK-Dichte von ungefähr  $10-40/\mu\text{m}^2$  können nach immunhistochemischen Markierungen kein positives AQP4-spezifisches Signal abgeben. Da die Dichte der OPKs im Glioblastom noch geringer (Neuhaus, 1990) bzw. null ist (Hatton und Sang,

1990), kann auch hier in parenchymalen Astrozytenmembranen kein positives Signal bei immunhistochemischer Markierung von AQP4 zu erwarten sein. Diese Tatsache ist in sofern von Bedeutung, da sowohl in der vorliegenden Arbeit (Abb. 7d,f, 10b, schematisch in Abb. 14) als auch nach Ergebnissen von Saadoun et al. (2002b) und Aoki et al. (2003) in diesen Membranbereichen ohne OPKs ein starkes AQP4-spezifisches Signal nachzuweisen war. Diese Beobachtungen lassen somit nur eine mögliche Schlussfolgerung zu: In diesen parenchymalen, gliomatösen Membranen muss AQP4 außerhalb der OPKs vorkommen. Die Erkenntnis einer OPK-unabhängigen Expression von AQP4 ist völlig neu, obwohl aktuelle Ergebnisse mit Methoden des Fracture-Labeling zeigen, dass auch in Astrozytenkulturen AQP4-positive, intramembranöse Partikel außerhalb der OPKs existieren (Wolburg et al., in Vorbereitung). Trotz dieser Beobachtung erlauben es die vorliegenden Befunde nicht zu beurteilen, ob es sich

1. beim AQP4, welches nicht in einem OPK organisiert ist, um ein Molekül handelt, das von einem zuvor existenten OPK dissoziiert ist, oder
2. ob es sich um ein neu synthetisiertes Molekül handelt, welches durch ein fehlerhaftes Targeting nicht die vorgesehenen Domänen im Astrozytenendfuß erreicht und sich stattdessen in anderen Membranbereichen einlagert.

Da AQP4 also offensichtlich außerhalb von OPKs existieren kann, lag es im folgenden Untersuchungsschritt nahe, sich näher mit den möglichen Ursachen dieser Beobachtung zu befassen. Die Ergebnisse von Folgeschnitten am Glioblastom mit anschließender Doppelmarkierung mit Agrin/Fibronectin sowie AQP4/Fibronectin (Abb. 7a-f) stellen die Grundlagen für einen ersten, jedoch nur als hypothetisch zu betrachtenden Erklärungsversuch der aufgezeigten Pathologien dar. In den Versuchen an Folgeschnitten konnte AQP4 nur dann perivaskulär in geklusterter Form in den Astrozytenendfüßen nachgewiesen werden, wenn Agrin in der glialen Seite der ECM lokalisiert war (Abb. 7a-d). Im Falle, dass Agrin nur endothelial oder gar nicht nachgewiesen werden konnte, zeigte sich auch keine Klusterung von AQP4 in den Endfüßen (Abb. 7c-f,

schematisch in Abb. 14). Dieser Befund der Korrelation zwischen glial exprimiertem Agrin und der Klusterung von AQP4 in den OPKs ist neu und liefert im Zusammenhang mit den Funktionen von Agrin an der neuromuskulären Endplatte einen entscheidenden Hinweis. In der neuromuskulären Endplatte wird Agrin ebenfalls in der ECM exprimiert und klustert Acetylcholinrezeptoren (McMahan, 1990) und Natrium-Kanäle (Sharp und Caldwell, 1996), indem es extrazellulär den DDC bindet und auf diese Weise die über den DDC gebundenen Kanäle und Rezeptoren in der Zellmembran verankert. Betrachtet man nun die vorliegenden Ergebnisse der Korrelation zwischen Agrin und AQP4 im astrozytären Endfuß, unterstützen diese stark die Hypothese, dass Agrin auch an den Astrozyten in der Lage ist, über die Bindung an den DDC den Wasserkanal AQP4 in den Endfüßen in Form der OPKs zu klustern. Weitere Hinweise für diese Hypothese liefert die Tatsache, dass die Anwesenheit von Dystrophin selbst für die Klusterung von AQP4 unabdingbar ist (Vajda et al., 2002). Die Bedeutung von Agrin für die Klusterung des gesamten DDC wird ebenso durch Experimente unterstrichen, in welchen die ECM der Retina inklusive Agrin durch eine intraokulare Injektion von Kollagenasen völlig aufgelöst wurde, was in einer Verteilung des DDC über die gesamte Zellmembran der glialen Müllerzellen resultierte (Blank et al., 2002). In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese formulieren, dass AQP4 nicht der einzige Bestandteil der OPKs ist, sondern möglicherweise auch noch weitere Komponenten des DDC in OPKs enthalten sind. Dies ergibt sich fast schon zwingend, wenn man alleine die morphologische Struktur eines OPK näher betrachtet (Abb. 2), welcher ja mehrere transmembranöse AQP4-Wasserkanalproteine enthält. Da jedes dieser Moleküle über einen eigenen DDC an seinem Platz verankert ist und dieser ebenfalls mit  $\alpha$ -Dystroglykan über transmembranöse Bestandteile verfügt (Abb. 3), müsste wenigstens dieses Molekül direkt mit einem OPK assoziiert nachweisbar sein. Um diesen Nachweis zu erbringen, sind allerdings Freeze-Fracture-Methoden mit anschließender Immunogoldmarkierung der erzeugten Replikas notwendig, was auch aktuell angestrebt wird.

Für die Veränderungen im Glioblastom bedeuten diese Erkenntnisse, dass sich im Prinzip durch den Verlust von Agrin und die erneute Expression von Tenascin wieder ähnliche Zustände wie im Laufe der embryonalen Entwicklung etablieren, in welchen die BHS durchgängig ist und die Astrozyten noch keine OPK-spezifische Polarität aufweisen. Diese bildet sich erst im Laufe der Entwicklung parallel zu einer stetig ansteigende Konzentration von Agrin in der ECM aus (Nico et al., 2001) und führt zur Klusterung des DDC und AQP4 am Astrozytenendfuß. Der Verlust von Agrin in der ECM von Glioblastom-Gefäßen erklärt also möglicherweise nicht nur die Öffnung der BHS, sondern auch den Polaritätsverlust der Astrozyten und damit die unkontrollierte Verteilung von AQP4 über die gesamte Zellmembran und die daraus resultierenden Ödeme.

Bei der Suche nach Gründen für den Verlust von Agrin fallen zunächst die proliferativen, hyperplastisch veränderten Gefäße auf, welche der morphologischer Ausdruck für vielfältigen Prozesse innerhalb der ECM sind. In den Mittelpunkt des Interesses fallen hierbei primär die zahlreichen Proteasen, welche die Bestandteile der ECM prozessieren und so Platz für neoangiogenetische Vorgänge und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren schaffen. So konnten beispielsweise VanSaun und Werle (2000) aufzeigen, dass die MMP-3 (Stromelysin-1) in der Lage ist, Agrin spezifisch zu spalten und durch sogenanntes Shedding das Heparansulfat-Proteoglykan-Molekül nahezu vollständig aus der ECM entfernen kann. Allerdings konnte bis heute trotz des Nachweises der Expression von MMP-3 in in vitro kultivierten Glioblastom-Zelllinien nicht in Glioblastom selbst detektiert werden (Vince et al., 1999). Ob die im GBM stark exprimierte Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 (Forsyth et al., 1999; Raithatha et al., 2000) eventuell in der Lage sind, ebenfalls Agrin zu prozessieren, wurde bis heute nicht untersucht.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Verlust von Agrin liegt darin, dass es sich nicht um einen Abbau wie beim Shedding durch MMPs handelt, sondern das Molekül einfach nicht mehr exprimiert wird. Einen Ansatzpunkt für diese Möglichkeit bieten die Ergebnisse aus dieser Arbeit, dass Agrin in den meisten Gefäßen endothelial, aber nicht auf der glialen Seite der ECM nachgewiesen werden konnte (Abb. 7e). Da Agrin sowohl von Astrozyten als auch von

Endothelzellen während der Entwicklung gebildet werden kann (Stone und Nikolics, 1995), liegt der Verdacht nahe, das die gliomatös veränderten Astrozyten ihre Fähigkeit Agrin zu bilden verlieren, während die durch Wachstumsfaktoren wie VEGF stimulierten Endothelzellen diese Fähigkeit wiedererlangen, um den nötigen Prozessen der vaskulären Proliferation gerecht zu werden. Dies würde zumindest die inhomogenen Verteilungsmuster von Agrin in der ECM erklären und hätte als Resultat den selben Effekt wie der totale Verlust des Moleküls, nämlich die Unterbrechung der Kommunikation zwischen Endothel und Astrozyten durch die ECM.

#### **4.2 Auswirkungen des Verlustes von Agrin und der Umverteilung von AQP4 auf Komponenten des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes**

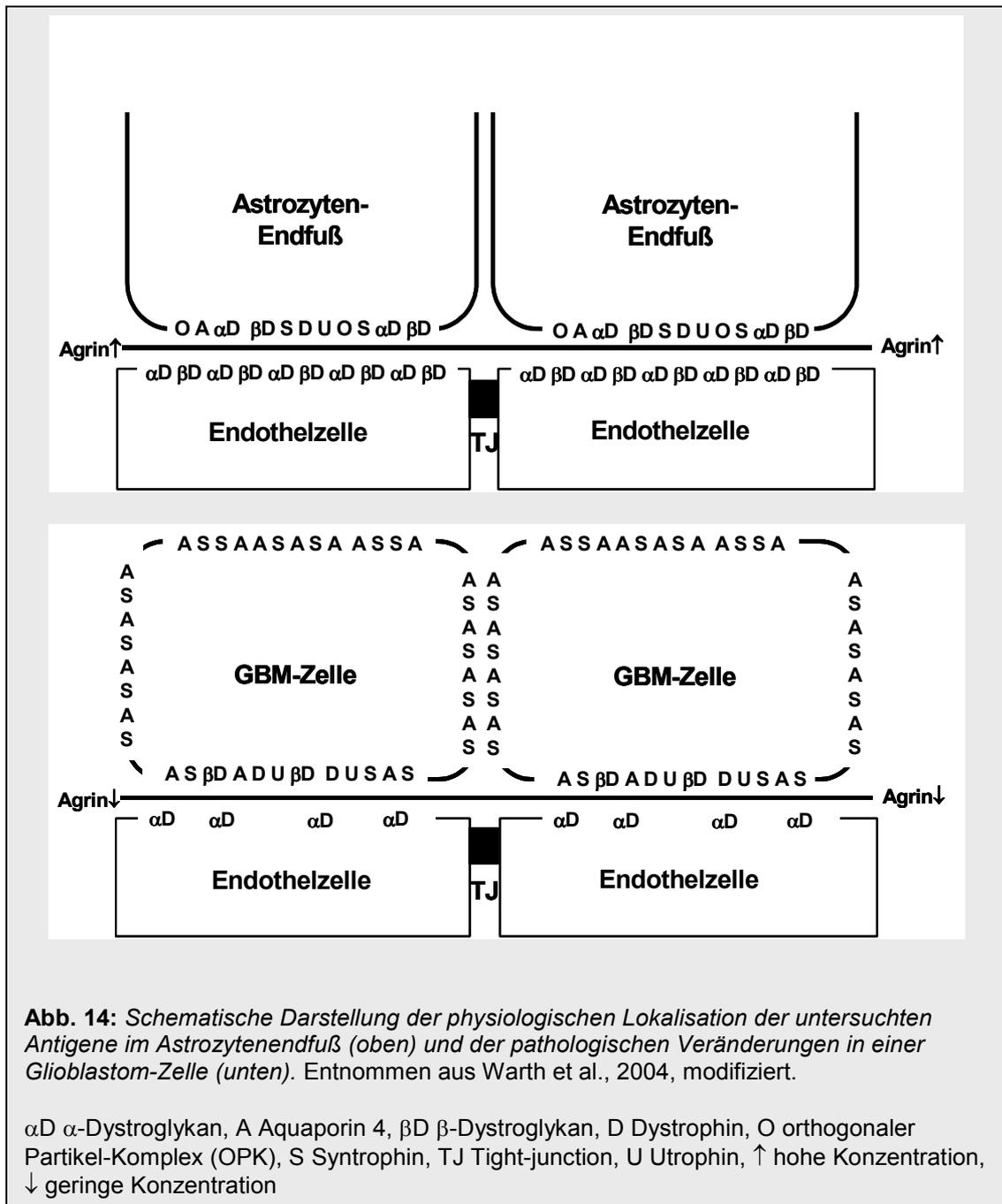
Nachdem die vorangegangenen diskutierten Befunde stark die Hypothese unterstützen, dass Agrin für die Klusterung von AQP4 und eventuell des gesamten DDC (Abb. 3) verantwortlich ist, stellte sich die Frage, ob der Verlust von Agrin und die Überexpression und Umverteilung von AQP4 einen Einfluss auf weitere DDC-Komponenten hat. Von Agrin ist bekannt, dass es von der extrazellulären Seite her an  $\alpha$ -Dystroglykan bindet (Gee et al., 1994), AQP4 hingegen ist über eine PDZ-Domäne am C-terminalen Ende von Syntrophin mit dem DDC verbunden (Neely et al., 2001). Durch weitere immunhistochemische Markierungen der meisten Bestandteile des DDC konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal aufgezeigt werden, dass auch die Dystroglykane im GBM ein pathologische Expressionsmuster aufweisen. Während  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglykan in der Tumorperipherie regelrecht in den perivaskulären Astrozytenendfüßen exprimiert wurden, zeigte sich im Tumorzentrum bei erhaltener Expression von  $\beta$ -Dystroglykan ein selektiver perivaskulärer Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan und stattdessen eine Expression des Moleküls auf der luminalen Seite von Endothelzellen (Abb. 9a,b). Das Endothelzellen in der Lage sind  $\beta$ -Dystroglykan zu exprimieren, wurde bereits früher beschrieben (Uchino et al., 1996; Yamamoto et al., 1997), auch wenn kontroverse Ergebnisse vorliegen, nach welchen Dystroglykan in Kapillaren des Gehirns nicht nachgewiesen werden

konnte (Tian et al., 1996). Durbeej et al. (1998) wiederum geht davon aus, dass die  $\alpha$ -Dystroglykan-positiven Signale im Endothel von Hirngefäßen ursprünglich von den gefäßassoziierten glatten Muskelzellen abstammen, welche  $\alpha$ -Dystroglykan in großem Maße exprimieren können. Allerdings spricht die in dieser Arbeit ausschließlich endotheliale Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan gegen diese Möglichkeit, da in diesem Bereich keine Muskelzellen lokalisiert sind. Betrachtet man einmal die drastischen morphologischen und funktionellen Veränderungen, welche Endothelzellen im Laufe der Angiogenese erfahren, so würde die Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan als einem in strukturgebende Prozesse stark involviertem Molekül, zumindest einen Sinn ergeben. Um ein neues Gefäß zu bilden, muss sich die Endothelzelle zunächst von der Basalmembran ablösen, die umgebende ECM abbauen um schließlich durch Proliferation und Migration ihre neue Position einnehmen zu können, wo sie ihre Gestalt ändert und einen zylindrischen Tubus bildet. Bei all diesen Vorgängen wäre ein strukturgebendes Rezeptormolekül wie  $\alpha$ -Dystroglykan sehr hilfreich, um eine Kommunikation zwischen den Zellen und der umliegenden Matrix zu ermöglichen. Diese Hypothese wird auch durch Untersuchungen von Hosokawa et al. (2002) zu Interaktionen des Endothels mit ECM-Komponenten bekräftigt, in welchen die Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan im Endothel neoplastischer und hyperplastischer Gewebe nachgewiesen werden konnte, was erneut seine wichtige Rolle bei angiogenetischen Prozessen unterstreicht. Aus Experimenten mit Endothelzellen der Aorta ziehen die Autoren sogar den Schluss, dass Angiogeneseprozesse erst über die Expression von Dystroglykan reguliert werden.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal überhaupt bei Tumoren des zentralen Nervensystems der selektive, perivaskuläre Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan bei erhaltener Expression von  $\beta$ -Dystroglykan beschrieben. Das Bild des Verlustes von  $\alpha$ -Dystroglykan zeigte sich besonders stark in zentralen Tumorbereichen (Abb. 9a,b, schematisch in Abb. 14), in welchen auch die Expression von Agrin vermindert und AQP4 nicht mehr in geklusterter Form in den Astrozytenendfüßen nachweisbar war. Da beide Dystroglykane jedoch durch posttranslationale Spaltung aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein

hervorgehen (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993), wirft dieser Befund einige Fragen auf. Da  $\beta$ -Dystroglykan korrekt perivaskulär lokalisiert ist, scheinen zumindest bei der Spaltung des Vorläuferproteins keine pathologischen Prozesse abzulaufen. Wenn  $\alpha$ -Dystroglykan also intrazellulär gebildet wird aber nicht in den astrozytären Endfüßen nachweisbar ist, kann entweder ein Problem beim Targeting des Moleküls vorliegen, oder aber das Molekül wird nach seinem Einbau in den DDC extrazellulär wieder abgebaut. Eine mögliche Erklärung für letztere Variante stellen erneut die proliferativen Spaltungsprozesse innerhalb der ECM eines Glioblastoms dar, insbesondere die Expression unterschiedlicher MMPs. Diese Möglichkeit der Prozessierung von Dystroglykan durch MMPs wird auch stark von den Ergebnissen von Yamada et al (2001) unterstützt. Obwohl im Gehirn nicht detektierbar, konnte in dieser Studie in unterschiedlichen Geweben die spezifische Spaltung der extrazellulären, C-terminalen Domäne von  $\beta$ -Dystroglykan durch membranständige MMPs nachgewiesen werden. Aus dieser Desintegration des DDC resultiert, dass das an das C-terminale Ende von  $\beta$ -Dystroglykan gebundene  $\alpha$ -Dystroglykan nicht mehr als Rezeptor für ECM-Komponenten wie Agrin oder Laminin zur Verfügung steht und somit die physiologisch enorm wichtige Kommunikation zwischen ECM und Zelle verloren geht. Auch wenn diese Hypothese mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht weiter vertieft werden kann, liefert das reine Ergebnis des perivaskulären Verlustes von  $\alpha$ -Dystroglykan weitere Einblicke in die vielfältigen Pathologien eines Glioblastoms und unterstützt die mögliche Variante, dass Agrin für die Klusterung von AQP4 verantwortlich ist. Da  $\alpha$ -Dystroglykan quasi als extrazellulärer Rezeptor für Agrin dient und so die Verbindung zwischen Endothel, ECM und astrozytärem Zytoskelett ermöglicht, stellt der Verlust des Moleküls funktionell betrachtet einen Kommunikationsverlust zwischen allen BHS-induzierenden Komponenten dar. Sollte Agrin weiter über seine Bindung an  $\alpha$ -Dystroglykan und damit an den DDC die Klusterung von AQP4 bewirken können, wäre auch diese Verbindung funktionell unterbrochen. Somit würde sich auch erklären, dass der Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan in zentralen Tumorbereichen mit einem OPK-spezifischen Polaritätsverlust der Astrozyten

und der Umverteilung von AQP4 über die gesamte Zellmembran einher geht. Ob jedoch der Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan das erste Ereignis ist und daraufhin infolge des Mangels eines Bindungspartners Agrin in der glialen ECM-Seite nicht mehr lokalisiert werden kann, oder ob primär der Verlust von Agrin eine Auswirkung auf die Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan hat, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht definitiv entschieden werden.



Die Feststellung, dass die beiden Dystroglykane separat voneinander exprimiert werden können, kann zwar momentan nicht weiter vertieft werden, wurde jedoch auch schon bei anderen pathologischen Prozessen innerhalb des menschlichen Körpers nachgewiesen. So konnten Sgambato et al. (2003) zeigen, dass in primären Brust- und Prostatatumor-Zelllinien sowie in promyelozytischen Leukämiezellen die Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan reduziert ist. In Karzinomen des Kolons konnte bei erhaltener Expression von  $\beta$ -Dystroglykan ein Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan nachgewiesen werden, wobei bei dieser Beobachtung von den Autoren von einer progressiven Veränderung im Laufe der Pathogenese des Tumors ausgegangen wird. Dieses Ereignis des  $\alpha$ -Dystroglykan-Verlustes korrelierte in allen untersuchten Gewebeproben mit der Malignität des Tumors und der mittleren Überlebenszeit der Patienten, was abermals die wichtige Rolle der Dystroglykane bei Organisations- und Proliferationsprozessen belegt. Zu nahezu identischen Ergebnissen kommt auch eine Studie von Henry et al. (2001), in welcher die Expression der Dystroglykane in primären Brust- und Prostatatumoren analysiert wurde. Außerhalb neoplastischer Gewebe wird ein selektiver Verlust von  $\alpha$ -Dystroglykan lediglich in Muskelbiopsien von Patienten mit kongenitaler Muskeldystrophie vom Fukuyama-Typ beschrieben (Hayashi et al., 2001), mit den Folgen einer instabilen und strukturell veränderten Skelett- und Herzmuskelfibrillenmembran.

Neben den Dystroglykanen stellen Dystrophin und Utrophin die Hauptbestandteile des DDC dar. Jeweils eines der beiden Moleküle verbindet im Astrozyten das Aktin des Zytoskeletts mit dem N-terminalen Ende von  $\beta$ -Dystroglykan und sorgt so für eine Stabilisierung und Organisation des gesamten Zellapparates. Wie die meisten der bereits beschriebenen DDC-Komponenten kommen auch Dystrophin und Utrophin im Gehirn lediglich in den astrozytären Endfüßen sowie der *Glia limitans superficialis* und *perivascularis* vor. Bei Experimenten, in welchen die ECM der Retina durch die Injektion von Kollagenase aufgelöst wurde (Blank et al., 2002), zeigte sich der DDC über die gesamte Zellmembran verteilt, was die Theorie zur Klusterung des gesamten DDC durch ECM-Komponenten bekräftigt. Da sich zu diese Experiment sehr

ähnliche Veränderungen der ECM auch im Laufe der Genese eines GBM abspielen, lag zunächst die Vermutung nahe, dass sich auch hier eventuell ein Polarisationsverlust des DDC analog zur AQP4-Verteilung zeigen könnte. Durch immunhistochemische Markierungen der Antigene konnte jedoch nachgewiesen werden, dass trotz des Verlustes von Agrin und der Umverteilung von AQP4, sowohl Dystrophin als auch Utrophin in polarisierter Form in den perivaskulären Endfüßen verbleiben (Abb. 12a, schematisch in Abb. 14). Diese Tatsache beweist nun definitiv, da AQP4 mit keinem der beiden Moleküle in Kolokalisation nachzuweisen war, dass das umverteilte Wasserkanalprotein in dissoziierter Form außerhalb der OPKs vorkommen muss. Dies wird auch von der Tatsache untermauert, dass es im Glioblastom bei nachgewiesenem Verlust der OPKs (Hatton und Sang, 1990), parallel zu einer starken Überexpression von AQP4 kommt. Wie allerdings Dystrophin und Utrophin ihre Polarität in den Astrozytenendfüßen aufrechterhalten, lässt sich nur spekulativ näher erläutern. Einerseits verbleibt möglicherweise die Verbindung zu Aktin, welches die beiden Moleküle physiologischerweise stabilisiert, andererseits besteht die Möglichkeit, dass es neben Agrin weitere ECM-Bestandteile wie z.B. Laminin gibt, die eine verankernde Funktion auf den DDC ausüben. Da Laminin im Glioblastom in der gesamten ECM nachweisbar ist (Abb. 11), müssten möglicherweise in diese Richtung weitere Versuche angestrebt werden.

Da AQP4 über die PDZ-Domäne von Syntrophin mit dem DDC verbunden ist, ergab sich der nächste logische Schritt durch die Darstellung der Verteilung von  $\alpha$ 1-Syntrophin. Aus dieser Versuchsreihe resultierte, dass  $\alpha$ 1-Syntrophin gemeinsam mit AQP4 über die gesamte Zellmembran der Astrozyten verteilt auftrat (Abb. 13b, schematisch in Abb. 14), ebenso dissoziiert von den am Endfuß verbleibenden DDC-Komponenten. Obwohl allgemein davon ausgegangen wird, dass  $\alpha$ 1-Syntrophin wichtig für das korrekte Targeting von AQP4 ist ( Neely et al., 2001; Vajda et al., 2002; Amiry-Mogghadam et al., 2003), kann das Molekül alleine offensichtlich nicht die Umverteilung von AQP4 verhindern. Diese Tatsache deutet an, dass AQP4 und  $\alpha$ 1-Syntrophin bei ihrer Umverteilung über die gesamte Astrozytenmembran miteinander verbunden

bleiben und möglicherweise gemeinsam vom DDC dissoziieren, was jedoch mit Immunpräzipitationsexperimenten genauer untersucht werden muss. Sollte dies der Fall sein, ergäbe sich auch die Möglichkeit, dass Agrin AQP4 nicht auf direktem Wege klustert, sondern über die Verankerung von  $\alpha$ 1-Syntrophin den Wasserkanal auf seiner Position in den OPKs hält. Bei dieser Variante ist weiter daran zu denken, dass der erste Schritt im Umverteilungsprozess auch die Dissoziation von  $\alpha$ 1-Syntrophin vom DDC sein könnte, gefolgt vom Targeting von AQP4, welches sich an die PDZ-Domäne des umverteilten  $\alpha$ 1-Syntrophins anlagert. Auch ein primäres fehlerhafte Targeting von  $\alpha$ 1-Syntrophin an den DDC bleibt als Möglichkeit offen. Da jedoch über diese Bindungs- und Targetingvorgänge im Astrozyten bis heute nur sehr wenig bekannt ist, sind intensive Untersuchungen in dieser Beziehung dringend notwendig, bevor genauere Rückschlüsse auf die Pathomechanismen gezogen werden können. Betrachtet man abschließend alle Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang, so zeigt sich in der Pathogenese eines GBM hypothetisch gesehen ein progressiver Verlauf, welcher zu den aufgezeigten Veränderungen führt. Da ein Tumor einen enormen Bedarf an Nährstoffen hat, ist die Angiogenese ein bedeutender Prozess in seinem Verlauf. Um dem Tumor Wachstum zu ermöglichen, wird die gefäßassoziierte ECM proteolytisch abgebaut und so Platz für seine Proliferation geschaffen. Diese Vorgänge werden neben der Sekretion von Kollagenasen und Proteasen im GBM auch durch die massive Freisetzung von MMPs gewährleistet (Forsyth et al., 1999; Raithatha et al., 2000), von welchen von membranständigen Varianten in vielen Geweben eine selektive Abspaltung des C-terminalen Endes von  $\beta$ -Dystroglykan nachgewiesen werden konnte (Yamada et al., 2001). In der perivaskulären ECM des Gehirns würde eine solche Spaltung der Dystroglykane dazu führen, dass die Bindungsstelle für Agrin,  $\alpha$ -Dystroglykan, nicht mehr vorhanden ist und beide Moleküle ihre Verankerung mit dem DDC verlieren. Somit lägen sie als Fragmente ungebunden in der ECM vor, wo sie von MMPs weiter prozessiert werden können, was auch den Verlust der beiden Moleküle im GBM erklären würde. Als Ergebnis wäre selbst bei Anwesenheit von Agrin keine Klusterungsfunktion des Heparansulfat-Proteoglykans mehr möglich, was in der

Dissoziation des Wasserkanals AQP4 und  $\alpha$ 1-Syntrophin vom DDC, sowie dem Verlust der OPK-spezifischen Polarität der Astrozyten resultiert. Da diese eine entscheidende Bedeutung bei der Induktion und Aufrechterhaltung der BHS zugeschrieben wird (Wolburg 1995a; Wolburg 1995b), wäre mit dieser Hypothese auch der Integritätsverlust der BHS und die daraufhin entstehenden Ödeme zu erklären.

### 4.3 Ausblick

Mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden konnten einige pathologische Prozesse der Ödementstehung bei Hirntumoren näher dargestellt werden. Dennoch bleiben einige Fragen offen, für deren Klärung weitere molekulare und physiologische Untersuchungen notwendig erscheinen. Z.B.:

1. Ist die Transportkapazität des Wasserkanalproteins AQP4 außerhalb der OPKs identisch mit dem physiologischen Durchsatz oder nicht?
2. Welche Auswirkungen hat eine Veränderung der transportierten Wassermenge auf die Entstehung von Ödemen, insbesondere da AQP4 ja über alle Membranoberflächen verteilt ist?
3. Welche Faktoren regulieren die Expression von AQP4?
4. Ist AQP4 wirklich der einzige Bestandteil der OPKs oder sind eventuell noch andere Komponenten wie z.B.  $\alpha$ -Dystroglykan an deren Bildung und Klusterung beteiligt?
5. Welche Prozesse führen zum Verlust von Agrin in der ECM bzw. lässt sich möglicherweise eine Inhibition von MMPs analog zu Neoplasien in anderen Geweben ( Maekawa et al., 1999) therapeutisch nutzen?
6. Welche Funktion hat die endotheliale Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan bei Proliferations- und Angiogeneseprozessen?

Die Wissenschaft ist noch weit davon entfernt all diese Fragen zu verstehen, aber der Nachweis der dynamischen Veränderungen der OPKs und den

Komponenten des DDC unter den neoplastischen Prozessen des GBM ist ein weiterer Schritt, detailliertere Einblicke in die zahlreichen Interaktionen zwischen Endothelzellen, der ECM und den Astrozyten bei der Induktion und Aufrechterhaltung der BHS-Integrität zu erlangen. Die Arbeitsgruppe um Peter Agre hat vorgeschlagen, den Komplex aus Syntrophin und AQP4 zur Vermeidung oder Abschwächung von Ödemen therapeutisch zu trennen (Amiry-Moghaddam et al., 2004). Denn sie fanden, dass in der Syntrophin-knockout-Maus gegenüber dem Wildtyp eine hypernatriämische Wasserintoxikation zu einem verzögerten Ödem führt.

In dieser Arbeit hingegen konnte nahegelegt werden, dass im gliomatösen Ödem Syntrophin und AQP4 zusammenbleiben und sich dennoch das Ödem als schwere klinische Konsequenz zeigt. Das legt, zusammen mit dem vorher Aufgezeigten, den Schluss nahe, dass wohl weniger die Spaltung des Syntrophin-AQP4-Komplexes einen therapeutischen Effekt haben dürfte, als vielmehr der Herunterregulation oder dem wie auch immer zu begründenden Verschwinden von Agrin in der ECM Einhalt zu gebieten. Es wird also vorgeschlagen, Agrin verstärkt in den Fokus einer möglichen Ödemtherapie zu nehmen.

## 5. Zusammenfassung

Die Entstehung vasogener Ödeme als Folge des Integritätsverlustes der Blut-Hirn-Schranke ist eines der größten klinischen Probleme sowohl bei chemisch-physikalischen Traumata als auch bei Tumoren des zentralen Nervensystems, insbesondere bei der Pathogenese des Glioblastoms. Verantwortlich für diese Störung des Flüssigkeitsaustausches zwischen den einzelnen Gehirnkompartmenten zeigt sich das Wasserkanalprotein Aquaporin-4 (AQP4), welches als bisher einzig bekannter Bestandteil der sogenannten orthogonalen Partikelkomplexe (OPK) in den perivaskulären Endfüßen der Astrozyten geklustert wird. Diese Partikelkomplexe werden ausschließlich konzentriert in Membranbereichen exprimiert, in welchen der Astrozyt mit dem Mesenchym in Kontakt tritt, wie dies perivaskulär oder an der Gehirnoberfläche in Form der *Glia limitans superficialis et perivascularis* der Fall ist. Parenchymale Membranbereiche zeigen immunzytochemisch kein AQP4-spezifisches Signal. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Methoden die Expression von AQP4 im humanen Glioblastom untersucht und mit dem Expressionsmuster des extrazellulären Matrix-Heparansulfat-Proteoglykans Agrin sowie Bestandteilen des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes (DDC), welcher den Wasserkanal über eine PDZ-Domäne in der Zellmembran verankert, korreliert. Zu Kontroll- und Vergleichszwecken wurde jeweils Gehirngewebe von gesunden Ratten mituntersucht.

Nach Visualisierung der Markierungen mittels Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) zeigte sich, dass das polare Expressionsmuster von AQP4 und seines Anker moleküls  $\alpha$ 1-Syntrophin im Gliomgewebe verloren geht und beide Moleküle über alle astrozytären Membranoberflächen verteilt nachweisbar sind. Dieser Befund korrelierte positiv mit dem Verlust bzw. einer endothelial orientierten Lokalisation von Agrin in der perivaskulären extrazellulären Matrix. Ebenso konnte eine verminderte bis fehlende Expression des glialen  $\alpha$ -Dystroglykans, des Rezeptormoleküls für Agrin, dargestellt werden. Interessanterweise war andererseits eine starke Immunreaktivität gegenüber  $\alpha$ -Dystroglykan auf der endothelialen Seite von Gefäßen nachweisbar. Die

Expression der Hauptkomponenten des DDC, Dystrophin und Utrophin, blieb trotz des Polaritätsverlustes bzw. der Umverteilung von AQP4 und  $\alpha$ 1-Syntrophin über die gesamte Zellmembran ausschließlich auf die Astrozytenendfüße beschränkt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass im Glioblastom eine räumliche Dissoziation von AQP4 und  $\alpha$ 1-Syntrophin vom DDC stattfindet und sich in der Folge beide Moleküle in unpolarisierter Form über die gesamte Zellmembran verteilen. Welche spezifischen Auswirkungen dies auf die Ödementstehung im Glioblastom hat, bleibt zu klären. Da die Dissoziation der beiden Moleküle jedoch positiv mit dem Verlust von Agrin in der extrazellulären Matrix korreliert, wird mit den vorliegenden Ergebnissen stark die Hypothese unterstützt, dass Agrin über die Bindung an  $\alpha$ -Dystroglykan direkt für die Klusterung von AQP4 bzw. möglicherweise des gesamten DDC in Form der OPKs verantwortlich ist und somit eine wichtige Rolle sowohl bei Induktionsvorgängen als auch bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke spielt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug F-M, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003) An  $\alpha$ -syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial endfeet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 2106-2111
2. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP (2004) Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB*, 18: 542-544
3. Balabanov R, Dore-Duffy P (1998) Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain-barrier. *J Neurosci Res*, 53: 637-644
4. Bandopadhyay R, Orte C, Lawrenson JG, Reid AR, De Silva S, Allt G (2001) Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol*, 30: 35-44
5. Barber AJ, Lieth E (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn*, 208: 62-74
6. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L (1997) Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct Pathol*, 21: 41-49
7. Berzin TM, Zipser BD, Rafii MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa EG (2000) Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21: 349-355
8. Blake DJ, Kroger S (2000) The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci*, 23: 92-99
9. Blank M, Blake DJ, Kroger S (2002) Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience*, 111: 259-273
10. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40: 648-677

11. Cheng A, Van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK (1997) Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature*, 387: 627-630
12. Chintala SK, Tonn JC, Rao JS (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci*, 17: 495-502
13. Cuevas P, Gutierrez Diaz JA, Reimers D (1984) Assemblies of intramembranous particles in astrocytoma: a preliminary report. *Acta Anat*, 118: 107-109
14. Davies DC (2002) Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumors. *J Anat*, 200: 639-646
15. Dinda AK, Sarkar C, Roy S, Kharbanda K, Mathur M, Khosla AK, Banerji AK (1993) A transmission and scanning electron microscopic study of tumoral and peritumoral microblood vessels in human gliomas. *J Neurooncol*, 16: 149-158
16. Donahue JE, Berzin TM, Rafii MS, Glass DJ, Yancopoulos GD, Fallon JR, Stopa EG (1999) Agrin in Alzheimer's disease: altered solubility and abnormal distribution within microvasculature and brain parenchyma. *Proc Natl Acad*, 96: 6468-6472
17. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA (2000) Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res*, 60: 55-69
18. Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissue. *J Histochem Cytochem*, 46: 449-457
19. Fazeny-Dorner B, Wenzel C, Veitl M, Piribauer M, Rössler K, Dieckmann K, Ungersböck K, Marosi C (2003) Survival and prognostic factors of patients with unresectable glioblastoma multiforme. *Anticancer Drugs*, 14: 305-312
20. Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik P, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR (1999) Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer*, 79: 1828-1835
21. Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S (1994) Dystroglycan- $\alpha$ : a dystrophin-associated glykoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell*, 77: 675-686

22. Groothuis DR, Vriesendorp FJ, Kupfer B, Warnke PC, Lapin GD, Kuruvilla A, Vick NA, Mikhael MA, Patlak CS (1991) Quantitative measurements of capillary transport in human brain tumors by computed tomography. *Ann Neurol*, 30: 581-588
23. Hatton JD, Sang, HU (1990) Orthogonal arrays are absent from the membranes of human glioblastomatous tissues. *Acta Anat*, 137: 363-366
24. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19: 13-26
25. Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K (2001) Selective deficiency of  $\alpha$ -dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology*, 57: 115-121
26. Henry MD, Cohen MB, Campbell KP (2001) Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum Pathol*, 32: 791-795
27. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-c expression during glioma progression. *Int J Cancer*, 98: 362-369
28. Hirano A, Matsui T (1975) Vascular structures in brain tumors. *Hum Pathol*, 6: 611-621
29. Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K, Masaki T (2002) Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci*, 115: 1487-1496
30. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glykoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355: 696-702
31. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, Campbell KP (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet*, 2: 1651-1657
32. Inoue M, Wakayama Y, Liu JW, Murahashi M, Shibuya S, Oniki H (2002) Ultrastructural localization of aquaporin 4 and alpha1-syntrophin in the vascular feet of brain astrocytes. *Tohoku J Exp Med*, 197: 87-93
33. Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325: 253-257

34. Jones FS, Jones PL (2000) The Tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, 218: 235-259
35. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, 23: 1-10
36. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 215-225
37. Kniessel U, Wolburg H (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*, 20: 57-76
38. Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 100 : 323-331
39. Lieth E, Barber A, Gardner TW (1995) Astrocyte expression of brain microvascular agrin-related protein is induced by endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 6: 337a
40. Long DM (1970) Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J Neurosurg*, 32: 127-144
41. Mack A, Neuhaus J, Wolburg H (1987) Relationship between orthogonal arrays of particles and tight junctions as demonstrated in cells of the ventricular wall of the rat brain. *Cell Tissue Res*, 248: 619-625
42. Mack A, Wolburg H (1986) Heterogeneity of glial membranes in the rat olfactory system as revealed by freeze-fracturing, *Neurosci Lett*, 65: 17-22
43. Maekawa R, Maki H, Yoshida H, Hojo K, Tanaka H, Wada T, Uchida N, Takeda Y, Kasai H, Okamoto H, Tsuzuki H, Kambayashi Y, Watanabe F, Kawada K, Toda K, Ohtani M, Sugita K, Yoshioka T (1999) Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenylosulfonyl-phenylalanine hydroxyamic acid (BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor, *Cancer Res*, 59: 1231-1235
44. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen A, Cha P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema following acute water intoxication. *Nature Med*, 6: 159-163

45. McComb RD, Jones TR, Pizzo SV, Bigner DD (1982) Immunohistochemical detection of factor VIII/von Willebrand factor in hyperplastic endothelial cells in glioblastoma multiforme and mixed glioma-sarcoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 41 : 479-489
46. McLendon RE, Halperin EC (2003) Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated? *Cancer*, 98: 1745-1748
47. McMahan UJ (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55: 407-418
48. Monaco AP, Neve RL, Coletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323: 646-650
49. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14108-14113
50. Neuhaus J (1990) Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size, and correlation with intramembranous particles. *Glia*, 3: 241-251
51. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Quondamatteo F, Herken R, Errede M, Ribatti D, Svelto M, Roncali L (2001) Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci*, 114: 1297-1307
52. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam A, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17: 171-180
53. Nitkin RM, Smith MA, Magill C, Fallon JR, Yao YM, Wallace BG, McMahan UJ (1987) Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J Cell Biol*, 105: 2471-2478
54. Norenberg MD (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53 : 213-220
55. Ohlendieck K (1996) Towards an understanding of the dystrophin-glykoprotein complex : linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers. *Eur J Cell Biol*, 69: 1-10

56. Oz B, Karayel FA, Gazio-Lu N, Ozlen F, Balci K (2000) The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*, 6: 118-124
57. Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA (2001) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg*, 15: 101-108
58. Peters A, Palay SL, Webster H: The fine structure of the nervous system. 3. Auflage, Oxford University Press, New York, 1991
59. Plate KH (1999) Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58 : 313-320
60. Plate KH, Risau W (1995) Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*, 15: 339-347
61. Raithatha SA, Muzik H, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Edward DR, Forsyth PA (2000) Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro-oncol*, 2: 145-150
62. Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H (2002) Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol*, 104: 85-91
63. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, 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 USA*, 95: 11981-11986
64. Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34: 207-217
65. Roberts I, Schierhout G, Alderson P (1998) Absence of evidence for the effectiveness of five interventions routinely used in the intensive care management of severe head injury: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65: 729-733
66. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S (2002a) Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer*, 87: 621-623
67. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA (2002b) Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72: 262-265

68. Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD (1990) Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*, 111: 1685-1699
69. Seitz RJ, Wechsler W (1987) Immunohistochemical demonstration of serum proteins in human cerebral gliomas. *Acta Neuropathol*, 73: 145-152
70. Sgambato A, Migaldi M, Montanari M, Camerini A, Brabcaccio A, Rossi G, Cangiano R, Losasso C, Capelli G, Trentini GP, Cittadini A (2003) Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am J Pathol*, 162: 849-860
71. Sharp AA, Caldwell JH (1996) Aggregation of sodium channels induced by a postnatally upregulated isoform of agrin. *J Neurosci*, 16: 6775-6783
72. Stone D, Nikolics K (1995) Tissue- and age-specific expression patterns of alternatively spliced agrin mRNA transcripts in embryonic rat suggest novel developmental roles. *J Neurosci*, 15: 6767-6778
73. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 78: 131-137
74. Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M (1996) Dystroglycan in the cerebellum is a laminin  $\alpha 2$ -chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci*, 8: 2739-2747
75. Tsen G, Napier A, Halfter W, Cole GJ (1995) Identification of a novel alternatively spliced agrin mRNA that is preferentially expressed in non-neural cells. *J Biol Chem*, 270: 15934-15937
76. Uchino M, Hara A, Mizuno Y, Fujiki M, Nakamura T, Tokunaga M, Hirano T, Yamashita T, Uyama E, Ando Y, Mita S, Ando M (1996) Distribution of dystrophin and dystrophin-associated protein 43DAG ( $\beta$ -dystroglycan) in the central nervous system of normal controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. *Intern Med*, 35: 189-194
77. Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Fujii Y, Takayama I, Mei X, Ohno S (2000) Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett*, 283: 121-124
78. Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, Wertz K, Stodkilde-Jorgensen H, Sulyok E, Doczi T, Neely JD, Agre P, Frokiar J, Nielsen S (2002) Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in

- dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 13131-13136
79. VanSaun M, Werle MJ (2000) Matrix metalloproteinase-3 removes agrin from synaptic basal lamina. *J Neurobiol*, 43: 140-149
80. Vargova L, Homola A, Zamecnik J, Tichy M, Benes V, Sykova E (2003) Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia*, 42: 77-88
81. Verbavatz JM, Tonghui M, Gobin R, Verkman AS (1997) Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *J Cell Sci*, 110: 2855-2860
82. Vince GH, Wagner S, Pietsch T, Klein R, Goldbrunner RH, Roosen K, Tonn JC (1999) Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. *Int J Dev Neurosci*, 17: 437-445
83. Vizquete ML, Venero JL, Vargas C, Ilundain AA, Echevarria M, Machado A, Cano J (1999) Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis*, 6: 245-258
84. Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, Engel A (1997) The tree-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature*, 387 : 624-627
85. Warth A, Kroger S, Wolburg H (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol*, 107: 311-318
86. Weller M, Muller B, Koch R, Bamberg M, Krauseneck P (2003) Neuro-oncology working group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol*, 21: 3276-3284
87. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jaaskelainen J, Ram Z (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncol*, 5: 79-88
88. Wolburg H (1995a) Orthogonal arrays of intramembranous particles : a review with special references to astrocytes. *J Hirnforsch*, 36: 239-258
89. Wolburg H (1995b) Glia-neuronal and glia-vascular interrelations in blood-brain barrier formation and axon regeneration in vertebrates. In:

Vernadakis A, Roots B: Neuro-glial interactions during phylogeny, Humana Press Inc, Totowa NJ, 479-510

90. Wolburg H, Neuhaus J, Kniessel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 107: 1347-1357
91. Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K, Okuyama A, Maekawa R, Shimizu T, Matsumura K (2001) Processing of  $\beta$ -dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genetics*, 10: 1563-1569
92. Yamamoto M, Ueno Y, Hayashi S, Fukushima T (2002) The role of proteolysis in tumor invasiveness in glioblastoma and metastatic brain tumors. *Anticancer Res*, 22: 4265-4268
93. Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Ikeya K, Kondo E, Saito K, Osawa M (1997) Localization of laminin subunits in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy: an immunohistochemical investigation. *Acta Neuropathol*, 94: 173-179
94. Yang B, Brown D, Verkman AS (1996) The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 271: 4577-4580
95. Yang B, Verkman AS (1997) Water and glycerol permeability of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs. *J Biol Chem*, 272: 20782-20786
96. Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC (2001) Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience*, 104: 311-324

## Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

- Herrn Prof. Dr. Hartwig Wolburg für die Überlassung meines Dissertationsthemas und die zu jeder Zeit hervorragende und motivierende Betreuung
- Frau PD Dr. Bornemann und Herrn PD Dr. Duffner für die Bereitstellung der humanen Tumorgewebe
- Herrn Prof. Dr. Stephan Kröger und Herrn Dr. Willi Halfter für die Bereitstellung von Antikörpern
- Anita für das Korrekturlesen der Arbeit und die Unterstützung während der gesamten Dissertation
- den Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolburg, insbesondere Friederike, für die nützlichen Hilfestellungen bei der Immunhistochemie und Laser-Scan-Mikroskopie, sowie Anne, für die Hilfe bei den HE-Färbungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Warth A, Kroger S, Wolburg H (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol*, 107: 311-318

Unveröffentlichte Beiträge:

Wolburg H, Kröger S, Warth A, Duffner F, Rascher-Eggstein G (2002) The extracellular matrix and the blood-brain barrier. *Fifth symposium on "Signal transduction in the blood-brain barriers"*. Potsdam, 15.12.2002

Wolburg H, Warth A, Ibsch M (2003) Kalium- und Wasserkanäle in Astrozyten und Müllerzellen: zur Bedeutung der Gliazell-Polarität für die Blut-Hirn-Schranke und die Integrität der Netzhaut. *Fortüne-Kolloqium*, Tübingen, 10.10.2003

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name Arne Warth  
geboren 23.11.1979  
in Stuttgart

Eltern Brigitte und Martin Warth  
Familienstand verheiratet

### Schulbildung

1986 – 1999 Freie Waldorfschule Winterbach-Engelberg  
1999 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1999 – 2000 Paulinenpflege, Berufsschule für Sprach- und Hörgeschädigte, Winnenden

### Studium

Ab 2000 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
09/2002 Ärztliche Vorprüfung  
2002 – 2006 Promotion am Pathologischen Institut der Universität Tübingen, Abteilung für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartwig Wolburg  
08/2003 1. Staatsexamen  
09/2005 2. Staatsexamen  
10/2005 Praktisches Jahr, 1. Tertial, Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen  
02/2006 Praktisches Jahr, 2. Tertial, Pathologie, Institut für Pathologie, Universität Tübingen  
06/2006 Praktisches Jahr, 3. Tertial, Chirurgie, Kantonsspital Graubünden, Chur, Schweiz  
28.11.2006 3. Staatsexamen