Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend

Immunhistochemische Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke im RG2-Gliom der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Carsten Ingo Alexander Rouven Wagner
aus
Stuttgart – Bad Cannstatt

2009

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Wolburg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. J. Wagner

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung **1**

1.1 Zur Geschichte der Blut-Hirn-Schranken Forschung 1

1.2 Struktur und Funktion der Blut-Hirn-Schranke 2

1.2.1 Blut-Hirn-Schranken-Endothel 4

1.2.2 Astrozyten 6

a. Historisches 6

b. Topologie und Zytoskelett 7

c. Gap Junctions 7

d. Orthogonale Partikelkomplexe (OPKs) 8

e. Physiologie und Polarität der Astrozyten 9

1.3 Die Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor 11

1.3.1 Humane Gliome 12

1.3.2 Das RG2-Gliom 13

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit 14

2. Material und Methoden **14**

2.1 Immunhistochemie und Histologie 14

2.2 Agenzien und Puffer 15

2.3 Antikörper 16

3. Ergebnisse **18**

3.1 Die immunhistochemische Struktur der Blut-Hirn-Schranke im Rattengliom 19

3.1.1 Endothel und Extrazelluläre Matrix 19

3.1.2 Astrogliamarker 19

4. Diskussion **26**

4.1 Zur Rolle der Astrozyten bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke 26

4.2 Molekulare Grundlagen der Astrozytenpolarität 28

4.3 Veränderungen der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2 in Hinblick auf den Verlust der Astrozytenpolarität 29
4.4 Veränderung der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2 in Hinblick auf das Expressionsmuster der Tight Junctions 32
4.5 Veränderung der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2, Implikationen für die Entstehung von Ödemen im Hirntumor 34
4.6 Ausblick: kann die morphologische Analyse von Zellen der Blut-Hirn-Schranke Vorschläge zur Therapie des Hirnödems ableiten? 37

5. Zusammenfassung 39

6. Literaturverzeichnis 41

Abkürzungsverzeichnis

AQP4	Aquaporin 4
α-DG	α-Dystroglycan
β-DG	β-Dystroglycan
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DDC	Dystrophin-Dystroglycan Complex
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
FITC	Fluorescein iso thio cyanat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
	(saures fibrilläres Gliafilamentprotein)
HSPG	Heparansulfat Proteoglycan
ICP	Intracranial pressure
	(intrakranieller Druck)
ISF	interstitielle Flüssigkeit
Kir4.1	inwardly rectifying potassium channel
	(Kaliumkanal)
MNU	N-methyl-N-nitrosurea
OPK	Orthogonale Partikel Komplexe
PBS	Phosphate buffered saline
	(Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDZ	PSD95 - Discs large - ZO1
PSD	Postsynaptic density
RG2	Ratten-Gliom Typ 2

TBS	Tris-buffered saline
	(Tris-gepufferte-Salzlösung)
TJ	Tight Junction
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
	(Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WHO	World Health Organisation
WT	Wild-Typ
ZO-1	Zonula-Occludens-Protein 1
ZSF	Zerebrospinalflüssigkeit
ZVO	Zirkumventrikuläre Organe

1. Einleitung

1.1 Zur Geschichte der Blut-Hirn-Schranken Forschung

In seiner 1885 erschienenen Studie „Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie“ machte Paul Ehrlich die zufällige Beobachtung, dass bei intravitaler Infusion von Farbstoffen wie Alizarin- und Indophenolblau in den Blutkreislauf des Säugetierorganismus, das Gehirn nur schwach oder gar nicht, andere Organe hingegen stark angefärbt wurden. Er kam zu dem Schluss: „..., dass die die Aufnahme beherrschenden Flächen am Gehirn,... feinstporöse Beschaffenheit besitzen, während im Gegenteil Leber- und Nierenzellen grobkörniges Material durchlassen.“ (Ehrlich, 1885).

Fünfzehn Jahre später, beschreibt Max Lewandowsky bei seinen Experimenten zur Wirkung von Strychnin und Natriumferrocyanat auf die Zellen der grauen Substanz im Säugetierorganismus, dass im Gegensatz zur peripheren bei der intrathekalen Injektion eine verstärkte Wirkung auftrete: „Es lässt sich dieser Widerspruch kaum anders erklären, als durch die Hypothese, dass die Capillarwand den Uebertritt bestimmter Stoffe, wie des Natriumferrocyanats verhindere,...“ (Lewandowsky, 1900).

Lewandowsky wird oft dafür zitiert, den Begriff „Bluthirnschranke“ in seiner 1900 erschienen Veröffentlichung geprägt zu haben. Der Begriff kommt aber in dieser Schrift nicht vor (Bechmann et al., 2006). An dieser Stelle sollte auch die herausragende Arbeit der Physiologin und Biochemikerin Lina Stern Erwähnung finden, die sich in Ihrer Schrift „La barrière hémato-encéphalique dans le condition normales et de la condition patologique.“ schon sehr früh zu den Vorgängen an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) äußerte (Stern, 1921; Dreifuss und Tikhonov, 2005).

In der mit beeindruckenden Farbtafeln illustrierten Abhandlung „Vitalfärbung am Zentralnervensystem“ zeigte Ernst Goldmann, ein Schüler Paul Ehrlichs, dass bei subarachnoidaler Injektion von Trypanblaulösung in die Zerebrospinalflüssigkeit das Gehirngewebe gefärbt wurde und somit in Zusammenschau mit den Beobachtungen seines Lehrers auf eine physiologische Barriere zwischen Blut und Gehirn geschlossen werden mußte (Goldmann, 1913).

Etwas mehr als fünfzig Jahre später veröffentlichen Reese und Karnowsky (Reese und Karnovsky, 1967) elektronenmikroskopische Aufnahmen, die zeigen, dass intravenös applizierte Meerrettichperoxidase die Kapillarendothelien von Hirngefäßen in Mäusen nicht überwindet. In Hinblick auf die Versorgung des Gehirns mit größeren Molekülen und die ausgeprägte Barrierefunktion der Tight Junctions (TJ) weisen sie aber auf die Notwendigkeit differenzierter Transportmechanismen hin.

1.2 Struktur und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Drei Barrieregrenzen limitieren und regulieren den Zutritt molekularer Bestandteile des Blutes zum Nervengewebe des Gehirns und seiner Flüssigkeitsräume: 1. Endothelzellen zwischen Blut und der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) des Gehirns (endotheliale Blut-Hirn-Schranke), 2. Epithelzellen des Plexus choroideus (vom Ursprung her Gliazellen) zwischen dem Blut und der ventrikulären Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) (innere (gliale) Blut-Liquor-Schranke), 3. Epithelzellen der Arachnoidea zwischen Blut und subarachnoidealer ZSF (äußere Blut-Liquor-Schranke). All diesen Barrieren ist gemein, dass sie durch Tight Junctions abgedichtet sind.

Die gliale-Blut-Liquor-Schranke im Plexus choroideus und in den Zirkumventrikulären Organen (ZVOs) ist notwendig, weil die Blutgefäße in diesen Organen wegen der fenestrierten Endothelzellen undicht sind und Blutstoffe in den Liquor und über die undichten Ependymzellen ins Hirngewebe eindringen würden. Undicht müssen diese Blutgefäße aber sein, damit die epithelialen Plexus choroideus-Zellen aus dem Blut den Liquor abscheiden können und in den ZVOs die neurosekretorischen Neurone, z.B. in der Neurohypophyse, ihre Neurohormone in die Blutbahn abgeben können. Eigentlicher Sitz der Blut-Liquor-Schranke sind die Plexus-Epithelzellen und die Tanyzyten der ZVOs.

Die Tight Junctions, früher auch Zonulae occludentes genannt, der Blutkapillar-Endothelzellen grenzen die luminale Seite von der abluminalen Seite ab, die der Basalmembran zugewandt ist. Dadurch wird die parazelluläre Diffusion von unerwünschten Molekülen verhindert. Zusätzlich sorgen die Tight Junctions für

eine Abgrenzung der apikalen von den luminalen Domänen der Endothelzellen und damit für polarisierte Eigenschaften: diese sind bedeutsam für die Organisation von Ionen-Kanälen und Transportern auf der Endothelzell-Membran.

Jenseits der subendothelialen Basalmembran liegen die Perizyten (Makrophagen mesenchymalen Ursprungs), die vollständig von einer Basalmembran umgeben sind, und die Astrozytenfortsätze, die sog. perivaskuläre Endfüße ausbilden. Die Rolle beider Zelltypen für die Induktion und Aufrechterhaltung der BHS ist bis heute noch nicht befriedigend aufgeklärt worden. Im Arteriolen- und Venolenbereich bilden die Astrozyten eine eigene Basalmembran aus, die im Kapillarbereich mit der endothelialen Basalmembran verschmilzt (Membrana limitans gliae perivascularis). Ähnliche Endfußstrukturen an der Oberfläche des Gehirns sorgen für die Bildung der Membrana limitans gliae superficialis.

Die parazelluläre Diffusionsbarriere geht mit einer extrem geringen Transzytoserate einher. Große hydrophile Moleküle, wie Proteine und Peptide können nur durch spezifische rezeptorregulierte oder weniger spezifische adsorptive Transzytose die Endothelzellen betreten. Auf metabolischer Ebene existiert ebenfalls eine Barriere, bei der durch Ekto-Enzyme wie Peptidasen und Nukleosidasen und durch intrazelluläre Enzyme wie Monoaminooxidasen und Cytochrom P450, neuroaktive und toxische Verbindungen inaktiviert werden können. Weiter wird eine hohe Anzahl an Ionen- und Wasser-Kanälen exprimiert die zum Erhalt der Homöostase der interstitiellen Flüssigkeit beiträgt, um ein optimales Medium zur Funktion der Neurone zur Verfügung zu stellen. Transporter, zum Beispiel für Glukose, Nucleoside, Purinbasen und Aminosäuren sorgen für die Ernährung des Gehirns (Abbott et al., 2006). Die BHS verhindert den Übertritt von im Blut befindlichen Antikörpern, Toxinen und wenn auch nicht immer gewünscht, auch einiger Medikamente und dient somit dem Schutz der Neurone. Gifte, wie das Choleratoxin (Zonula Occludens Toxin) sind in der Lage, diese Barriere durchlässiger zu machen (Fasano, 2000). Unpolare, lipophile Stoffe, wie Ethanol, Nikotin, Barbiturate und Narkosegase können die BHS überwinden. Polare und wasserlösliche Stoffe, wie z.B.

Glukose und Salze benötigen Transporter und Kanäle, um in das Gehirn zu gelangen. Im Vergleich zu zahlreichen anderen Endothelien, z.B. der Niere, haben die Endothelzellen des Gehirns keine Fenestrierungen, mit Ausnahme der Endothelzellen des Plexus choroideus und der ZVOs.

1.2.1 Blut-Hirn-Schranken-Endothel

Endothelzellen kleiden die innere Oberfläche der Gefäße im gesamten Organismus aus. Dabei bilden diese eine Schnittstelle zwischen dem zirkulierenden Blutstrom und dem umliegenden Hirnparenchym. Die Endothelzellen der Gehirnkapillaren besitzen eine geringe Höhe und interendotheliale Tight Junctions (Reese et al., 1967; Brightman und Reese, 1969). Bis heute wurden viele Tight Junction-Moleküle identifiziert, wie die Claudine, Occludin, ZO-1 bis ZO-3, Mitglieder der Ig-Superfamilie und viele weitere (Wolburg und Lippoldt, 2002; Vorbrodt und Dobrogowska, 2003).

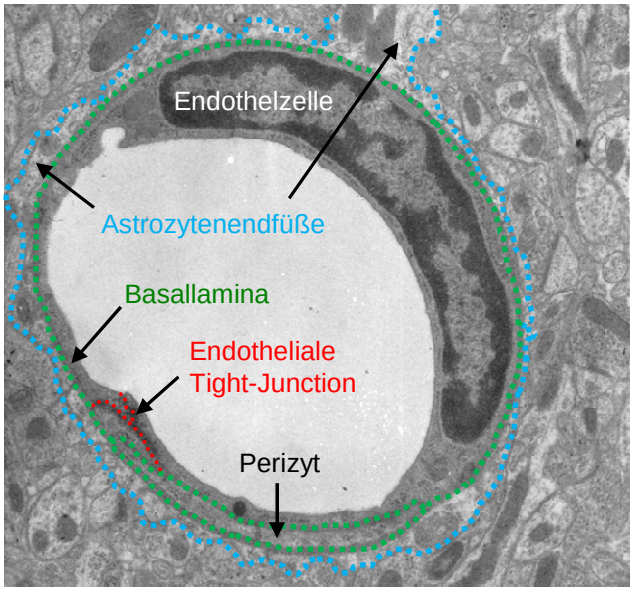

Abb. 1 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke am Beispiel eines elektronenmikroskopischen Bildes.

Claudine gelten als die Bestandteile der BHS, welche für die eigentliche Barrierefunktion verantwortlich sind (Turksen und Troy, 2004) und von denen inzwischen über 20 verschiedene Moleküle identifiziert werden konnten (Mitic et al., 2000). Von BHS-Endothelzellen werden mindestens vier Claudine exprimiert (Claudin-1, -3, -5 und -12) (Morita et al., 1999; Liebner et al., 2000; Nitta et al., 2003; Wolburg et al., 2003). In pathologischen Zuständen wie im humanen Glioblastom konnte ein partieller Verlust von Claudin-1 und -3 nachgewiesen werden (Wolburg et al., 2003). ZO-1, -2 und -3 sind periphere Membrankomponenten, welche an Transmembranproteine, wie die Claudine, gekoppelt sind und große

Proteinkomplexe bilden, die sogenannten zytoplasmatischen Plaques. ZO-1 war das erste periphere Membranprotein, das in Tight Junctions nachgewiesen wurde (Stevenson et al., 1986). Abluminal, also unmittelbar um die Endothelzellen der Hirnkapillaren, befindet sich die Basallamina, welche auch die Perizyten umgibt und zur extrazellulären Matrix zählt. Es wäre zu einfach, die Basallamina lediglich als ein statisches Gebilde aufzufassen, welches den Zellen nur mechanischen Halt verleiht. Es verhält sich vielmehr so, dass ihre Zusammensetzung dynamischen Prozessen unterliegt und unter anderem der Interaktion mit den Zellen dient und einen Einfluss auf Zellproliferation, -migration und -differenzierung hat (Hallmann et al., 2005). In der Basallamina der Gehirn-Endothelzellen lassen sich eine Reihe von Molekülen nachweisen, wie Agrin, Fibronektin, Kollagenen, Laminin und noch viele weitere (Yurchenco und Schittny, 1990; Barber und Lieth, 1997; Savettieri et al., 2000). Agrin, ein Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG) wurde erstmals von Nitkin et al. (1987) aus dem elektrischen Organ von Torpedo californica, einem kalifornischen Zitterrochen isoliert, und McMahan (1990) identifizierte Agrin als die Substanz, welche die Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran der motorischen Endplatte clustert. In Basalmembranen von Gefäßen mit speziellen Barriereeigenschaften, wie den Testes und im Thymus, ist das Muster der Agrinverteilung nicht von jener in Gehirnkapillaren zu unterscheiden (Barber et al., 1997). In einer Studie zur Schädigung von Gehirnkapillaren bei der Alzheimer Krankheit konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Agrin-Verteilung und Kapillarschäden besteht (Berzin et al., 2000), aber auch eine erhöhte Konzentration von Agrin in Alzheimer-Plaques wurde nachgewiesen (Donahue et al., 1999). Laminine werden von Astrozyten und Endothelzellen exprimiert, bilden bis zu 15 verschiedene Isoformen (Chiu et al., 1991; Hallmann et al., 2005) und konnten auch in der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen werden (Sanes et al., 1990). Das Glykoprotein Fibronektin tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Von den Hepatozyten gebildet, ist es zum einen in seiner löslichen Form in Blut und Körperflüssigkeiten und zum anderen als unlöslicher Bestandteil in der extrazellulären Matrix nachweisbar (Kosmehl et al., 1996). Fibronektin hat

vielfältige Funktionen und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Migration, Blutgerinnung, Wundheilung und bei der onkogenetischen Transformation (Schwarzbauer, 1991). Bei Schädigung der Hirnkapillaren kann es zur Extravasation von Plasma-Fibronektin kommen, welches dann immunhistochemisch nachweisbar ist (Nag, 1996).

1.2.2 Astrozyten

a. Historisches

1854 schreibt Rudolf Virchow in einer Arbeit zum histologischen Aufbau des Gehirns: „..., so muß ich schliessen, dass eine weiche, der Bindesubstanz im Grossen zugehörende Grundmasse überall die Nervenelemente der Centren durchsetzt und zusammenhält und dass das Ependym nur der an der Oberfläche über die Nervenelemente frei hervortretende Theil davon ist.“ (Virchow, 1854) Vier Jahre später, in einer 1858 am Pathologischen Institut zu Berlin gehaltenen Vorlesungsreihe doziert Virchow über die Eigenschaft des Ependyms und bemerkt: „Diese Eigenthümlichkeit der Haut , dass sie continuirlich in die Zwischenmasse, den eigentlichen Kitt, welcher die Nervenmasse zusammenhält, übergeht, dass sie in ihrer ganzen Erscheinung eine von den übrigen Bindegewebsbildungen verschiedene Masse repräsentiert, hat mich veranlasst, ihr einen neuen Namen beizulegen, den der N e u r o g l i a (Nervenkitt).“ (Virchow, 1859). In der gleichen Vorlesung spricht Virchow außerdem über „...gewisse sternförmige Elemente,...welche bis dahin als Nervenzellen betrachtet worden waren,...“ und dass diese „...unzweifelhaft der Neuroglia angehörten.“ Damit wurden die Sternzellen vorweggenommen, welche später durch von Kölliker und Weigert den Namen Astrozyten erhielten (Weigert, 1895; von Kölliker, 1896).

b. Topologie und Zytoskelett

Heute lassen sich Gliazellen am treffendsten als Nervensystem-spezifische Nicht-Nervenzellen definieren. Sie gehören mit den Oligodendrozyten und den Ependymzellen zur Makroglia. Diese werden je nach Aussehen und Kontakte ihrer Zellprozesse klassifiziert (Reichenbach, 1989). Astrozyten werden charakterisiert durch Endfüße, welche mit der Basallamina um Blutgefäße und / oder der Pia mater oder dem Glaskörper des Auges Kontakt haben. Im Gegensatz zur Ependymoglia besitzen Astrozyten keinen Kontakt zum Ventrikelsystem. Die Beschaffenheit dieser Zellen steht in Zusammenhang zu strukturellen und funktionellen Interaktionen und ist abhängig von ihrem Mikromillieu. Das klassische Zytoskelettelement der Astrozyten sind die Intermediärfilamente (10nm Durchmesser), von denen die wichtigsten vom Typ des sauren fibrillären Gliafilamentproteins (glial fibrillary acidic protein, GFAP) sind. Während der Embryonalentwicklung exprimieren Glioblasten allerdings Vimentin (Stichel et al., 1991), in reifen Astrozyten kommt kein Vimentin mehr vor. In reaktiven Astrozyten und Gliomzellen wird es reexprimiert (Eliasson et al., 1999).

c. Gap Junctions

Ein besonders auffälliges Element astroglialer Zellbiologie sind die Gap Junctions (siehe Abb. 2, A, vergrößerter Ausschnitt). Sie dienen dem interzellulären Austausch von niedermolekularen Substanzen und Signalstoffen und bewirken eine elektrische Kopplung (funktionelles Syncytium). Sie bestehen aus Gap Junction-Proteinen (Connexine), die 4 Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Loops besitzen und als Hexamere ein Connexon oder Halbkanal (hemichannel) bilden. Ein Hemichannel einer Zelle bildet mit dem Hemichannel der Partnerzelle einen ganzen funktionellen Kanal. Diese sind in einer Membrandomäne stark geclustert. Erst dieses Cluster nennt man eine Gap Junction. Vermutlich ist die Clusterung wichtig, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Halbkanäle beider Partnerzellen an den Loops andocken können. Das hauptsächliche

Connexin der Astrozyten ist das Cx43, ein Protein mit 43 Kilodalton Molekulargewicht.

d. Orthogonale Partikelkomplexe (OPKs)

Eine weitere strukturelle Membrankomponente der Astrozyten sind die sogenannten Orthogonalen Partikelkomplexe (OPK). Es sind Cluster von Untereinheiten, die einen Durchmesser von 7nm haben und nur mit Hilfe der Gefrierbruch-Technik dargestellt werden können (Wolburg, 1995), siehe Abb. 2. Ihr Hauptmerkmal ist die ungleiche Verteilung über die Zelloberfläche: bei direktem Kontakt mit der Basallamina (Membrana limitans superficialis et perivascularis) ist die Dichte 10-mal höher als im Neuropil. Diese Polarität geht in der Zellkultur, aber auch in Gliomzellen und überhaupt in reaktiven Astrozyten verloren oder wird reduziert. Viele Jahre lang waren die OPKs ausschließlich in der Gefrierbruchreplika erkennbar. Seitdem man weiß, dass die OPKs das Wasserkanalprotein Aquaporin-4 (AQP4) enthalten, lassen sie sich auch immunzytochemisch mit Antikörpern gegen AQP4 nachweisen (Rash et al., 1998; Rash et al., 2004).

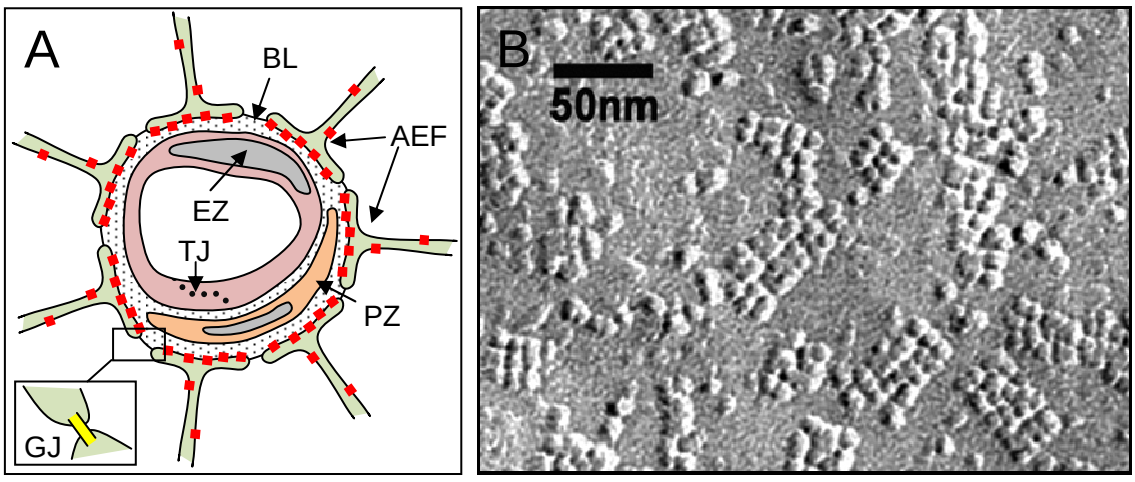

Abb. 2 Schema zur Verdeutlichung der Gliovaskulären Beziehungen. Abb. 2A: AEF (Astrozytenendfüße), EZ (Endothelzelle), TJ (Tight-Junction, schwarz gepunktet), PZ (Perizyt), rote Kästchen: OPKs (Orthogonale Partikelkomplexe, enthalten AQP4), GJ (Gap-Junction, gelb markiert), BL (Basallamina) Abb. 2B: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Astrozytenendfußstruktur mit OPKs.

e. Physiologie und Polarität der Astrozyten

Eine wichtige Funktion von Astrozyten ist der Erhalt der K^+-Homöostase im extrazellulären Raum (Kuffler und Nicholls, 1966). Da sich bei Aktivität der Neurone die K^+-Konzentration extrazellulär erhöht, muss diese schnell abgepuffert werden. Dies ist wichtig, um die Nervenzellen erregbar zu halten. Am effektivsten ist die räumliche Pufferung. Dadurch wird K^+ extrazellulär von einem Gebiet hoher Konzentration auf Grund hoher neuronaler Aktivität in ein Gebiet niedriger Konzentration umverteilt. Grundvoraussetzung ist eine hohe Kalliumleitfähigkeit der Gliazellmembran in synapsenfernen Gebieten.

Die Unterteilbarkeit der astroglialen Oberfläche in Endfußdomänen und parenchymale Domänen, die durch stärkere oder schwächere Anwesenheit von Kalium- und Wasserkanälen definiert ist, begründet eine Polarität des Astrozyten. Diese Polarität ist von enormer physiologischer Bedeutung und ermöglicht der Zelle die Fähigkeit zu räumlicher Pufferung des extrazellulären Kaliums. Strukturell äußert sich diese Polarität, wie oben schon beschrieben, in einer Anhäufung der OPKs in der Endfußmembran. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass, wo die astrogliale Membran den Kontakt zur perivaskulären Basalmembran verliert, die Dichte der OPKs drastisch abfällt. Also muss in der Basalmembran ein Prinzip wirksam sein, das die Polarität induziert.

In der Basalmembran sind, wie oben schon erwähnt, zahlreiche extrazelluläre Matrixkomponenten wie Laminin, Fibronektin, Kollagene, und Heparansulfat-Proteoglycane enthalten. Unter letzteren scheint Agrin besonders interessant zu sein, weil es in Gehirn-Mikrogefäßen akkumuliert, und zwar um den Zeitpunkt der BHS-Etablierung (Tag 20). Da im humanen Glioblastom die Immunreaktivität gegen Agrin stellenweise verloren geht (wobei nicht klar ist, ob wegen einer Herunterregulation oder einer enzymatischen Degradierung), und an diesen Stellen 1. die Tight Junction-Moleküle im benachbarten Endothel teilweise verschwinden (Rascher et al., 2002) und 2. AQP4 und Moleküle des Dystrophin-Dystroglycan-Komplexes (DDC) (α-Syntrophin und α-Dystroglycan, siehe Abb. 3) umverteilt werden (Warth et al., 2004), wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass Agrin für die Polarisierung des Astrozyten

eine überragende Rolle spielt und diese Polarisierung wiederum für die Aufrechterhaltung der endothelialen Blut-Hirn-Schranke.

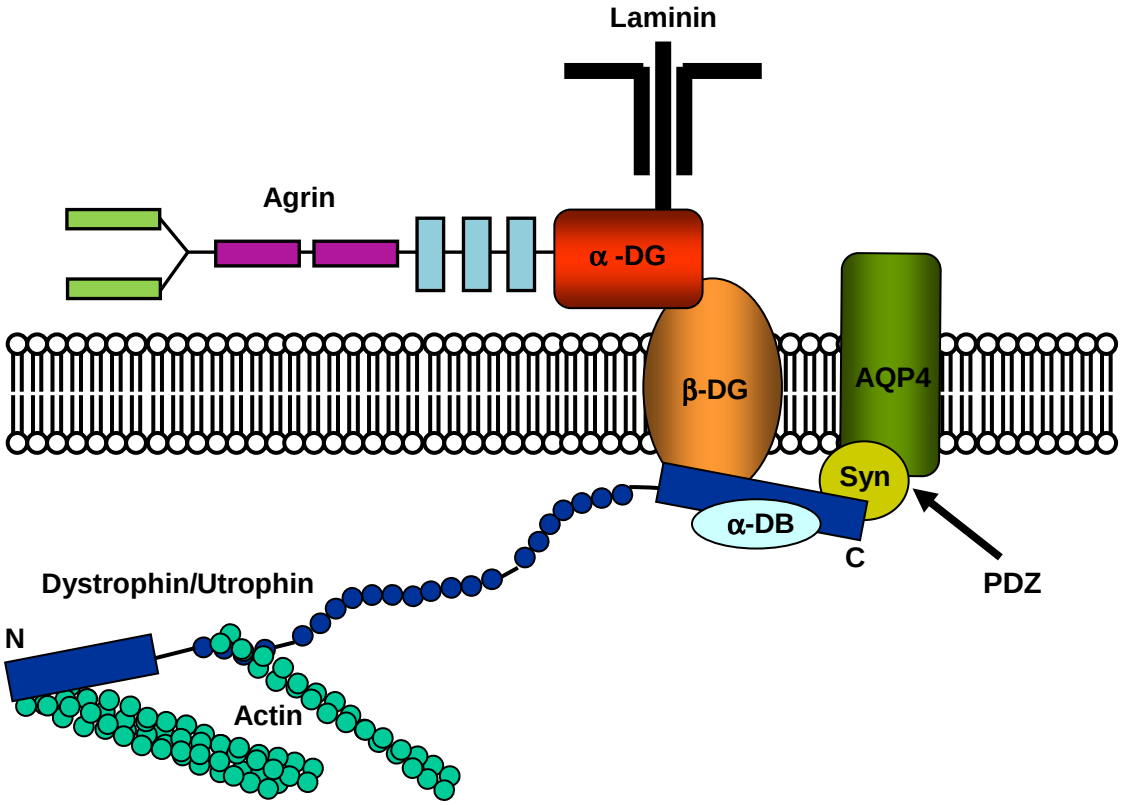

Abb. 3 Aufbau des Dystrophin-Dystroglycan Komplexes: α-DG (α-Dystroglycan), β-DG (β-Dystroglycan), AQP4 (Aquaporin4), α-DB (α-Dystrobrevin), Syn (Syntrophin), N (N-terminales Ende), C (C-terminales Ende), PDZ (**p**ostsynaptic density protein (PSD), **d**rosophila disc large, **z**onula occludens protein (ZO-1))

Da im Gliom einerseits die Umverteilung und Heraufregulation von AQP4 (Saadoun et al., 2002), andererseits eine Abnahme der OPK-Dichte (Neuhaus, 1990) beobachtet wurde, wurde angenommen, dass AQP4 auch außerhalb der OPK-Struktur vorkommen kann (Warth et al., 2004). Diese Situation könnte im Zusammenhang mit einer Dysregulation der räumlichen Pufferung indirekt zur Unterstützung der Entwicklung eines zytotoxischen und/oder vasogenen Ödems führen.

1.3 Die Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor

Wie jeder Tumor auch außerhalb des Gehirns, ist das Astrozytom und Glioblastom bestrebt, seine Proliferation und Migration dadurch zu fördern und zu stabilisieren, dass es Gefäßwachstum stimuliert. Das geschieht in erster Linie durch die Ausschüttung von VEGF, dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, dessen Rezeptoren auf der abluminalen Seite des Endothels sitzen (Machein et al., 1999). Dadurch proliferieren die Endothelzellen nicht nur, sondern werden durch Bildung von Fenestrierungen auch permeabel (Roberts und Palade, 1997; Esser et al., 1998). Parallel zu diesem angiogenetischen Weg verlieren im Hirntumor die Astrozyten überwiegend ihre Polarität. Die im reifen und normalen Gehirn auftretenden orthogonalen Partikelkomplexe (OPK), besitzen im Verhältnis zum Neuropil eine 10-mal höhere Dichte in direktem Kontakt zur Basallamina der Blutgefäße (Membrana limitans perivascularis) und zur Basallamina an der Oberfläche des Gehirns (Membrana limitans superficialis). Unter Zellkulturbedingungen ist diese typische Polarität aufgehoben und in Hirntumoren stark reduziert (Neuhaus, 1990). Ob und wie diese beiden Phänomene, Bildung von Fenestrierungen und Verlust der Polarität, miteinander kausal verknüpft sind, ist nicht bekannt. Jedenfalls geht zusätzlich die endotheliale Barrierefunktion verloren. Rascher et al. (2002) konnten zeigen, dass im humanen Glioblastom Agrin stellenweise verloren geht und dort, wo es fehlt, auch eines oder sogar mehrere Tight Junction-Proteine im entsprechenden Endothel verloren gingen. Außerdem wird in den pathologischen Gefäßen das extrazelluläre Glykoprotein Tenascin hochreguliert. Die Expression von Occludin und Claudin-5 ist in Gehirntumoren herunterreguliert (Liebner et al., 2000; Papadopoulos et al., 2001b) und auch Claudin-3 wurde sowohl im Glioblastom als auch während der Entzündung des ZNS vermindert bis gar nicht mehr nachgewiesen (Wolburg et al., 2003). Warth et al. (2004) konnten dann auf glialer (bzw. gliomatöser) Seite eine Umverteilung von Proteinen beobachten, die normalerweise nur an der perivaskulären Endfußmembran vorkommen. Durch die oben genannten Vorgänge wird die Entstehung eines Hirnödems begünstigt, welches auf den Verlust der endothelialen Barrierefunktion zurückgeht und zu einem Einstrom

von Flüssigkeit in das umliegende Hirngewebe führt. Dies wiederum erhöht die Morbidität und Mortalität unter Patienten, die an Hirntumoren leiden (Thapar et al., 1995; Papadopoulos et al., 2001a). Eine effektive immuntherapeutische Behandlung von Gehirntumoren ist nahezu unmöglich, da in kleinen Hirntumoren die BHS noch intakt ist und erst unter fortgeschrittenem Tumorwachstum die Kapillaren zunehmend permeabel werden (Fidler et al., 2002; Bauer et al., 2005).

1.3.1 Humane Gliome

Unter Gliomen versteht man eine heterogene Gruppe von Hirntumoren, die sich von den Gliazellen ableiten. Maligne Gliome zeigen ein invasives Wachstumsmuster und werden von der WHO in vier prognostische Grade eingeteilt, die auch für die Therapie eine Rolle spielen: Grad I (pilozytisches Astrozytom), Grad II (diffuses Astrozytom), Grad III (anaplastisches Astrozytom) und Grad IV (Glioblastom) (Louis et al., 2007). Das pilozytische Astrozytom tritt bevorzugt in der Kindheit auf und wächst langsam. WHO Grad II, III und IV Gliome wachsen diffus-infiltrativ und können als verschiedene Grade maligner Progression aufgefasst werden. Das Glioblastom, als bösartigster Tumor, tritt zur Zeit der Diagnose im Median mit 64 Jahren auf. Männer sind, was das Auftreten maligner Gliome insgesamt angeht, 40% häufiger betroffen als Frauen (CBTRUS, 2008). Die mittlere Überlebenszeit beträgt trotz optimaler Behandlung für das Glioblastom nur 12 bis 15 Monate und 2 bis 5 Jahre für das anaplastische Astrozytom (Wen und Kesari, 2008). Für die Mehrzahl maligner Gliome konnte bisher keine auslösende Ursache gefunden werden. Ein Zusammenhang besteht aber für kraniale Bestrahlung (Fisher et al., 2007). Bei 5% der Patienten mit malignen Gliomen besteht eine positive Familienanamnese, von denen wiederum einige mit seltenen genetischen Syndromen, wie Neurofibromatose, oder dem Li-Fraumeni Syndrom assoziiert sind (Farrell und Plotkin, 2007). Gliome präsentieren sich klinisch am häufigsten durch das Auftreten von Kopfschmerzen, Krampfanfällen, fokalen neurologischen Defiziten, Gedächtnisverlust, oder auch Persönlichkeits-veränderungen (Weller und Thomas, 2003; Wen et al., 2008). Über die

Therapieform des Tumors entscheidet der WHO-Grad des Glioms, die Lokalisation des Tumors, das Alter des Patienten und der Allgemeinzustand des Patienten (Weller, 2005). Die Standardtherapie für maligne Gliome beinhaltet die chirurgische Resektion, sofern ausführbar, Bestrahlung und Chemotherapie (Wen et al., 2008).

1.3.2 Das RG2-Gliom

Um die Pathologie humaner Gliome am Tiermodell studieren zu können induzierten Koestner et al. (1971) an Fischer-Ratten durch intravenöse Verabreichung von Nitrosoharnstoffverbindungen künstliche Hirntumore (Swenberg et al., 1972; Ko et al., 1980; Aas et al., 1995). Bei der systemischen Applikation von Nitrosoverbindungen, wie N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) bzw. N-methyl-N-nitrosurea (MNU), soll es vor allem im Nervensystem zur Alkylierung der DNA-Basen aufgrund eines verminderten DNA-Reparaturmechanismus kommen. Die alkylierten Basen führen dann zu Basenfehlpaarungen und Punktmutationen, die wiederum eine unkontrollierte Expression von Onkogenen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit daraus resultierender ungehemmter Zellproliferation zur Folge haben (Bilzer et al., 1989). Durch Klonierung dieser Tumorzellen wurde eine Zelllinie mit der Bezeichnung RG2 (rat glioma 2) entwickelt, welche auch den Namen D74-RG2 oder D74 trägt und seitdem in experimentellen Tumoren Verwendung findet. RG2-Tumore werden für eine große Anzahl unterschiedlicher Studien genutzt, in denen zum Beispiel die Gefäßpermeabilität, regionale Blutflussmessungen, der Tumormetabolismus und wie in der vorliegenden Arbeit in vivo Tumorwachstum und seine Effekte auf die BHS erforscht werden sollen (Barth, 1998). Die biologische Charakteristik von RG2-Gliomen gleicht humanen WHO Grad III und IV Tumoren. Sie zeichnet sich in Ihrer Neuropathologie und in ihrem Wachstum durch zellulären Pleomorphismus, erhöhte mitotische Aktivität, Proliferation von Blutgefäßen, Nekrosen, Invasivität und Ihrer Beeinträchtigung der BHS aus (Bilzer et al., 1989).

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Nach wie vor ist die Beziehung zwischen Tumormaliginität und Schrankenstörung nicht gut genug geklärt. In dieser Arbeit sollte daher im Rattengliom, das als Modellsystem des humanen Glioblastoms gilt, die Verteilung von BHS-relevanten Molekülen wie Agrin und AQP4, aber auch Mitgliedern des Dystrophin-Dystroglycan-Komplexes und Tight Junction-Molekülen untersucht werden. Begleitend sollten auch Veränderungen an den Tight-Junction Molekülen ZO-1 und Claudin-5 beschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Immunhistochemie und Histologie

Untersucht wurden vier Gehirne von 7 Wochen alten, männlichen Fischer-344-Ratten. Die Gehirne wurden von Herrn PD Dr. B. Erdlenbruch (Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Georg-August-Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Den Tieren wurden die Gehirne am 13. bzw. 14. Tag, nach Injektion von RG2-Tumorzellen (LGC Promochem GmbH, Wessel; American Type Culture Collection) in die rechten Großhirnhemisphären, entnommen. Die Großhirne wurden anschließend durch einen medialen Schnitt in die zwei Hemisphären geteilt und unmittelbar danach in Tissue-Tec (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingefroren. Vor den immunhistochemischen Färbungen wurden die in Tissue-Tec eingebetteten und bei –180℃ gefrorenen Großhirnhemisphären mit einem Gefriermikrotom (Kryostat 2800 Frigocut-E, Reichert-Jung, Nussloch) in 9 µm feine Scheiben geschnitten. Boxentemperatur: -26℃, Objektträgertemperatur: -21℃. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (60mm x 20mm), die zuvor auf einer Wärmeplatte (Gerhardt, H22 electronic, Bonn) bei 37℃ angewärmt wurden, aufgebracht. Die mit Gewebeschnitten versehenen Objektträger wurden anschließend nach folgendem Protokoll gefärbt: Fixierung mit Ethanol für 5min bei 4℃ im Kühlschrank, anschließend Fixierung für 1min mit Aceton bei Raumtemperatur, zweimal 5min mit TBS waschen, blocken für 30min mit skimmed milk / Triton. Inkubation mit Primärantikörper in

Dimethylsulfoxid (DMSO) oder skimmed milk / Triton im Kühlschrank bei 4℃ über Nacht oder für 1h bei Raumtemperatur. Dreimal 5min waschen mit TBS. Anschließend Inkubation mit Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur. Dreimal 5min waschen mit TBS. Eindecken mit Glycerol (MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) plus 10% TBS oder Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation). Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Axiovert 135M, Zeiss, Oberkochen) untersucht. Die Bilder wurden anschließend mit Adobe Photoshop nachbearbeitet (Version 5.5, Adobe, Mountain View, CA).

Für die histologische Darstellung der Gewebeproben wurde ein Hämatoxylin-Eosin-Färbungsverfahren durchgeführt: nach Lufttrocknung der Schnitte, färben für 15min in Hämatoxylin-Lösung (Merck), 10min bläuen in Leitungswasser, spülen in Aqua destillata, gegenfärben für 2min mit Eosin (Merck), entwässern über Ethanol 96% und 100%, klären mit Xylol (Merck) und eindecken in Pertex (medite, Borgdorf). Die Hämatoxylin-Eosin Schnitte wurden anschließend mit einem Durchlichtmikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen) untersucht.

2.2 Agenzien und Puffer

- TBS-Puffer: 30,3g Trizma Base (Sigma), 44,0g NaCl (Merck) und 0,735g Calciumchlorid-Dihydrat (Merck), in 4500ml Aqua Destillata lösen, am pH-Meter mit 32% HCl (Merck) auf pH 7,4 einstellen, Erlenmeyerkolben bis 5000ml auffüllen.

- Block-Puffer: 10g Magermilchpulver (Merck), 800µl 10% Natrium-Azid, 6ml 10% Triton-X 100 (Serva), in 200 ml TBS lösen; pH auf 7,4 einstellen und bei leichter Wärme eine Stunde rühren.

- PBS-Puffer: 8,0g NaCl (Merck), 0,2g KCl (Merck), 1,44g Na_2HPO_4 (Merck), 0,2g KH_2PO_4 (Merck) in 1000ml Aqua Destillata lösen, am pH-Meter mit 32% HCl (Merck) auf pH 7,4 einstellen.

- Poly-L-Lysin-Lösung: 20ml Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 180ml Aqua bidestillata verdünnen.

2.3 Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

- Anti-Aquaporin-4, monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnung 1:50 (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen)
- Anti-Agrin, monoklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnung 1:200 (freundlicherweise überlassen von Prof. Markus Rüegg (Eusebio et al., 2003), Biozentrum Universität Basel)
- Anti-β-Dystroglycan, monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnung 1:100 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, Großbritannien)
- Anti-Claudin-5, polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnung 1:200 (freundlicherweise überlassen von Dr. Stefan Liebner (Liebner et al., 2000), Universität Frankfurt)
- Anti-ZO-1, monoklonal, gezogen in der Maus, Verdünnung 1:100 (ZYMED Laboratories Inc., San Francisco, USA)
- Anti-Fibronektin, polyklonal, gezogen im Schaf, Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugiert, Verdünnung 1:600 (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln)
- Anti-Pan-Laminin, polyklonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnung 1:200 (DAKO Deutschland GmbH, Hamburg)

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

- Esel anti-Hase, konjugiert mit Cy2, Verdünnung 1:50 (Dianova GmbH, Hamburg)
- Ziege anti-Kaninchen, konjugiert mit Cy3, Verdünnung 1:400 (Dianova GmbH, Hamburg)
- Esel anti-Maus, konjugiert mit Cy3, Verdünnung 1:100 (Dianova GmbH, Hamburg)

- Ziege anti-Maus, konjugiert mit Cy3, Verdünnung 1:100 (Dianova GmbH, Hamburg)
- Ziege anti-Kaninchen, konjugiert mit Alexa Fluor 488, Verdünnung 1:100 (MoBiTec, Göttingen)

3. Ergebnisse

Um einen ersten Eindruck von den Gewebeproben zu erhalten, wurden Hämatoxilin-Eosin-Färbungen beider Hemisphären aller vier Rattenhirne angefertigt. Die Tumoren waren in den rechten Hemisphären schon mit bloßem Auge gut vom restlichen Gewebe abgrenzbar und sehr zellreich. Im Durchlichtmikroskop waren neben der hohen Zelldichte mit vielen Mitosen, auch nekrotische Areale, Blutungen und Fibrinausfällungen zu erkennen. Die Gefäße waren vor allem im Tumorzentrum dilatiert, mit teilweise glomerulär, blind endenden Strukturen.

Die Präparate in Abb. 4 sollen die für die späteren immunhistochemischen Färbungen gewählten Bildausschnitte verdeutlichen. Die tumorfreie linke Hemisphäre wurde dabei als Kontrolle zum Vergleich mit dem Tumor herangezogen.

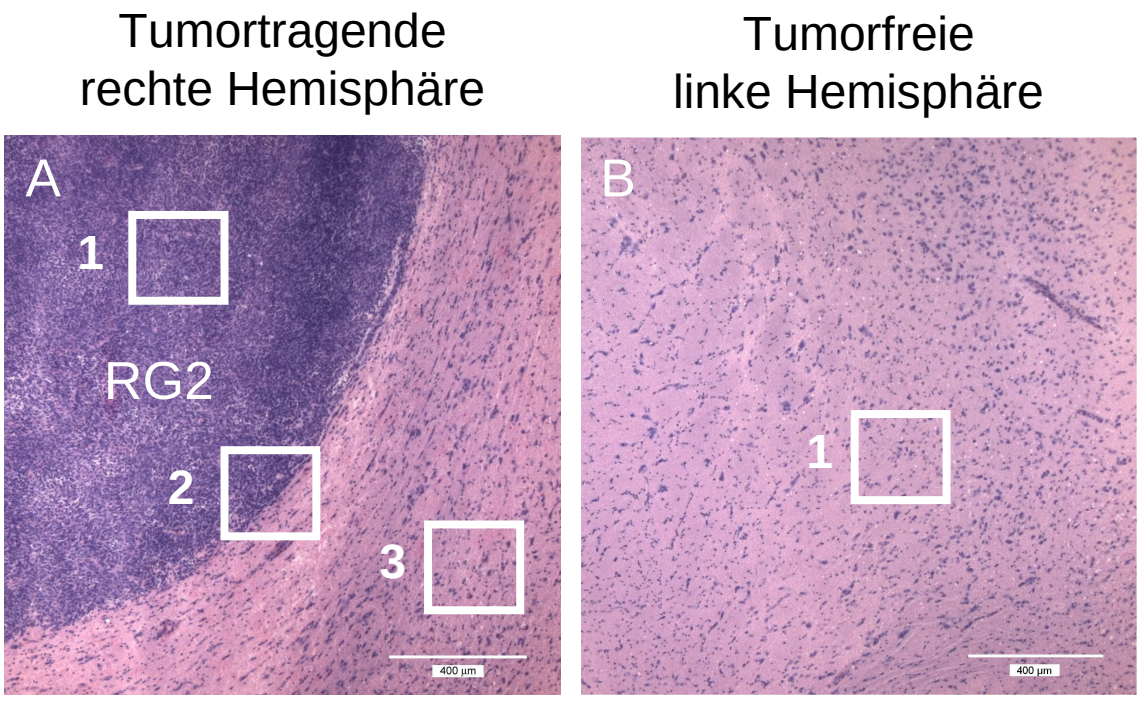

Abb. 4 Repräsentative Schnitte durch Rattenhirn-Hemisphären zur Verdeutlichung der Bildausschnitte in den Immunhistochemischen Aufnahmen anhand von Hämatoxilin-Eosin-Färbungen. **A** Tumortragende rechte Hemisphäre **1** RG2, **2** Übergang von Tumor in angrenzendes Gewebe, **3** Randbereich RG2-RB **B 1** Bildausschnitt aus der tumorfreien linken Hemisphäre (TfH). (Balken: 400 µm)

3.1 Die immunhistochemische Struktur der Blut-Hirn-Schranke im Rattengliom

3.1.1 Endothel und Extrazelluläre Matrix

Als Endothelmarker dienten Antikörper gegen Fibronektin bzw. Pan-Laminin. Die Immunreaktivität gegen Fibronektin war über die gesamte Tumormasse in allen Gewebeproben netzartig-diffus verteilt und endete abrupt zum Rand des Tumors hin (Abb. 8, E). Die Blutgefäße im Bereich des Tumors waren oft hyperplastisch dilatiert (Abb. 5 und 8, H) und zum Teil geschlängelt (Abb. 5, H). Gefäße wie im tumorfreien Gewebeanteil waren seltener zu finden. Das Verteilungsmuster von Laminin war dem des Fibronektin ähnlich (Abb. 6, 7 und 9, E). Die netzartige Verteilung war aber im Tumor weniger ausgeprägt. In den gegen Laminin gefärbten Proben waren ebenfalls dilatierte Gefäße zu finden (Abb. 9, H). Der Anti-Laminin AK zeigte eine höhere Affinität als der Anti-Fibronektin-AK, was sich in den Aufnahmen der tumorfreien Hemisphären widerspiegelt (Abb. 6, 7 und 9, B). Bei den Tight-Junction Molekülen lässt sich sagen, dass Claudin-5 vor allem in zentralen und dilatierten Tumorgefäßen (Abb. 8, I) eine im Verhältnis zu gesunden Hirnkapillaren (Abb. 8, C) eher plumpe Verteilung aufweist. Bei ZO-1 war der Unterschied weniger stark ausgeprägt. Hier zeigten auch die Tumorgefäße noch ein relativ feines Verteilungsmuster (Abb. 9, I), wie die Gefäße in der tumorfreien Hälfte (Abb. 9, C).

3.1.2 Astrogliamarker

Die Färbung gegen das HeparansulfatProteoglycan Agrin erbrachte in der tumorfreien Hemisphäre eine gute Abgrenzbarkeit des roten Signals vom restlichen Gewebe und war gleichmäßig um die Hirnkapillaren verteilt (Abb. 5, C). Im Tumor jedoch fehlte das Signal stellenweise völlig oder war, wie in der Abb. 5, I zu sehen nur sehr schwach nachweisbar. Für die Markierung von AQP4 kann ähnliches gesagt werden. In Abb. 6, I ist die Immunreaktivität um die Gefäße im Tumor nahezu aufgehoben. Im gesunden Gewebe jedoch findet sich das Signal für AQP4 regelmäßig um die Kapillaren verteilt (Abb. 6, C).

Dieses Verteilungsmuster ist sehr schön im Übergangsbereich von Tumorrand zu Tumorzentrum nachvollziehbar (Abb. 6, F). β-DG zeigt im Tumor ein diffuses Verteilungsmuster im gesamten Tumorgewebe, wobei Gefäße im Tumor noch ein gut erkennbares Signal für β-DG aufweisen (Abb. 7, I). Der Übergang von Tumor zu gesunden Gewebe ist jedoch nicht so scharf demarkiert (Abb. 7, F).

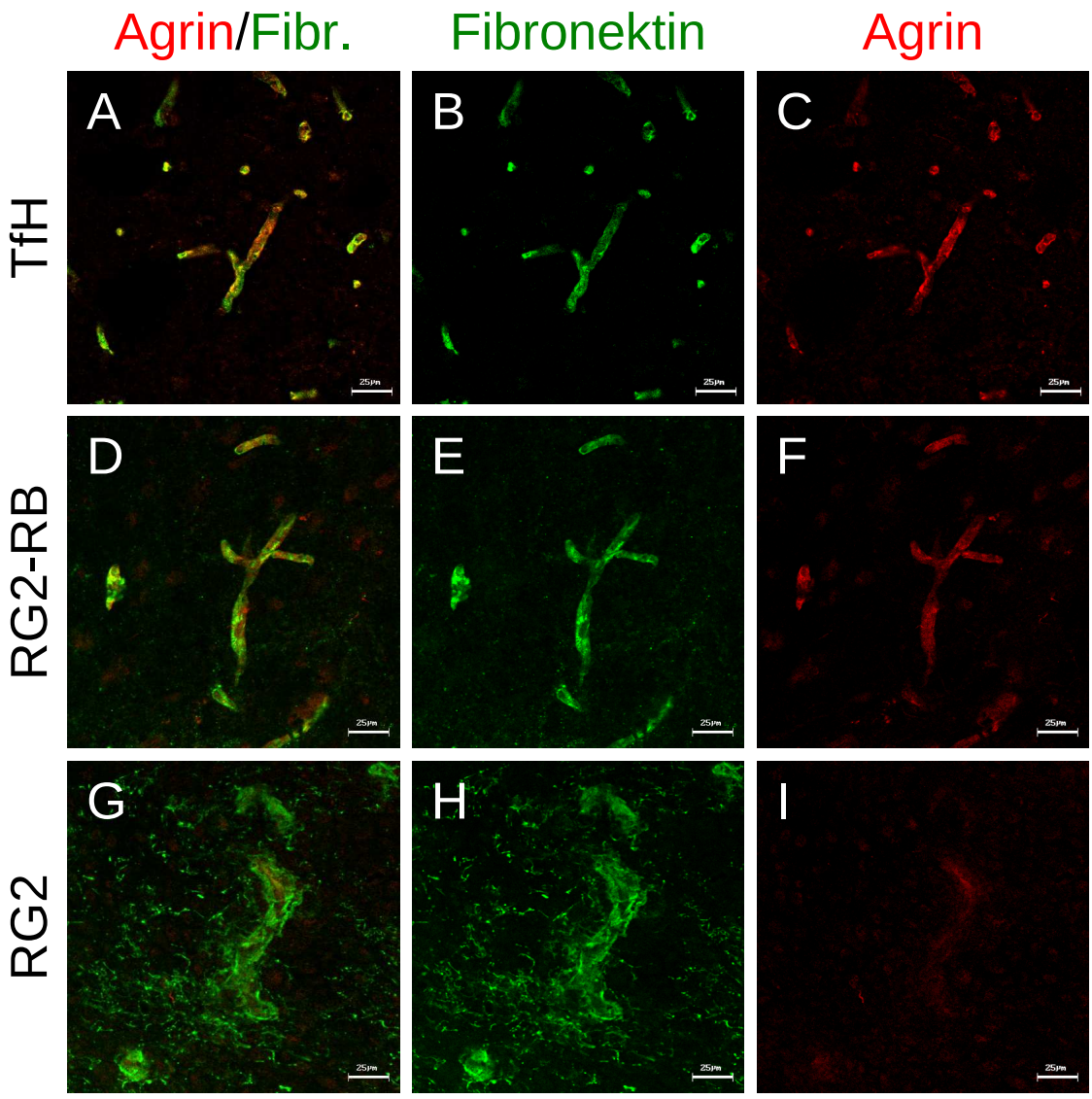

Abb. 5 Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Agrin (rot) und Fibronektin (grün) im RG2, jeweils an der tumorfreien linken und tumortragenden rechten Großhirnhemisphäre. **A** Gewebe der linken Tumorfreien Hemisphäre (TfH). **D** RG2-Randbereich (RG2-RB), außerhalb der Tumormasse. **G** Ausschnitt aus dem zentralen Bereich des RG2, aus der rechten Hemisphäre. **B**, **E** und **H** Separate Darstellung des grünen Kanals. **C**, **F** und **I** Separate Darstellung des roten Kanals. Das dilatierte Tumorgefäß (**G**, **H** und **I**) zeigt im roten Kanal nur noch ein sehr schwaches Agrin-Signal (**I**). In der tumorfreien linken Hemisphäre (**C**) und im angrenzenden Gewebe außerhalb der Tumormasse (**F**) zeigen sich im roten Kanal keine Veränderungen in der Immunreaktivität für Agrin. (Balken: 25 µm)

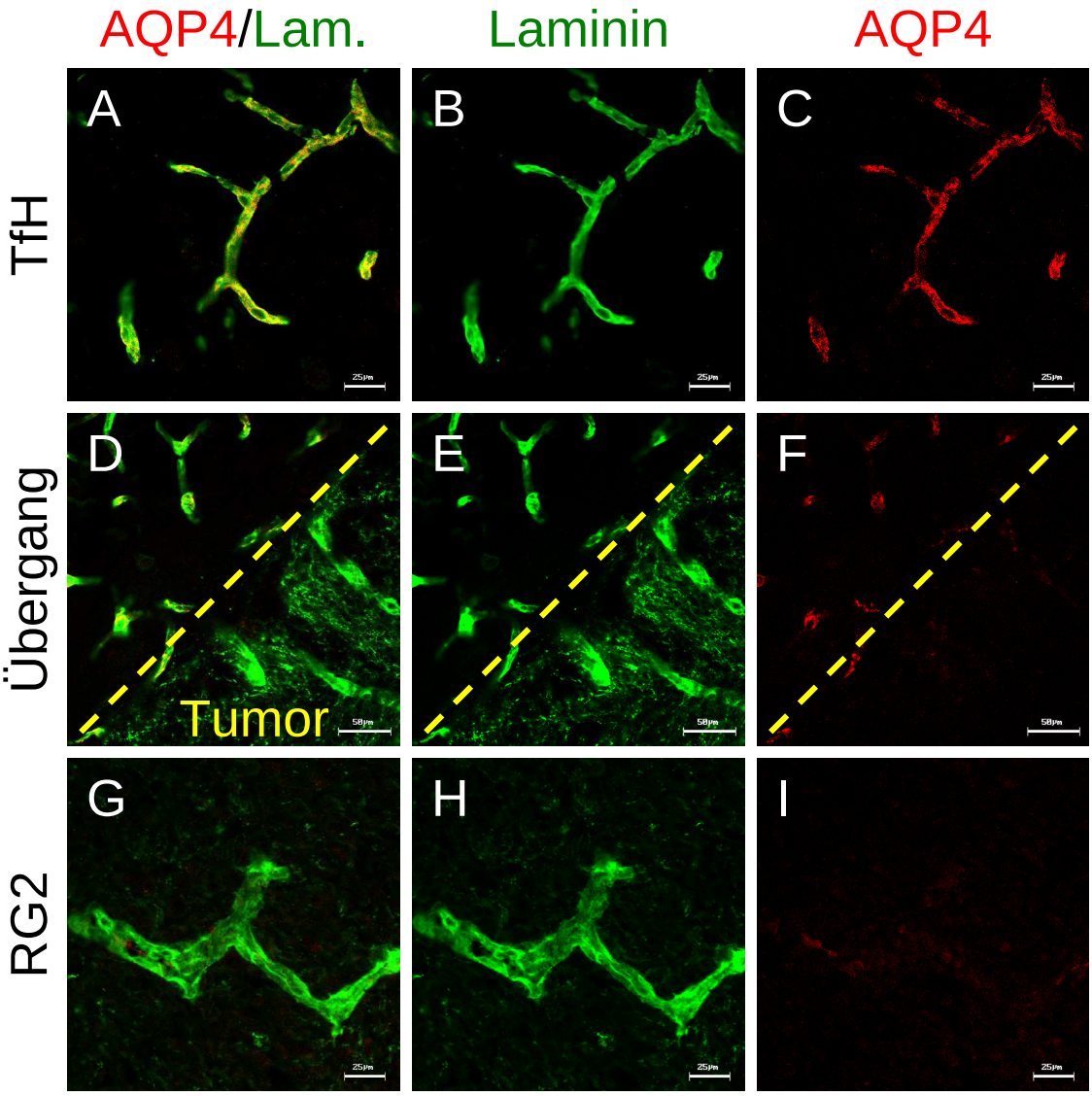

Abb. 6 Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen AQP4 (rot) und Laminin (grün) im RG2, jeweils an der tumorfreien linken und der tumortragenden rechten Großhirnhemisphäre. **A** Gewebe der linken Tumorfreien Hemisphäre (TfH). **D** Übergangsbereich von tumorfreiem Gewebe in die Tumormasse. **G** Ausschnitt aus zentralem Bereich des Tumors. **B**, **E** und **H** Separate Darstellung des grünen Kanals. **C**, **F** und **I** Separate Darstellung des roten Kanals. **A** Gesundes Gefäß. **G** Dilatiertes Tumorgefäß, welches im roten Kanal nur noch ein sehr schwaches AQP4-Signal zeigt (**I**). Die Blutgefäße in **D,** welche in Richtung Tumorzentrum ziehen, zeigen ebenfalls ein deutlich abgeschwächtes Signal, im Gegensatz zu den Gefäßen, die nicht von Tumorgewebe umgeben sind. In der tumorfreien linken Hemisphäre (**C**) hingegen zeigen sich im roten Kanal keine Veränderungen in der Immunreaktivität. (Balken: A-C und G-I 25 µm, D-F 50 µm)

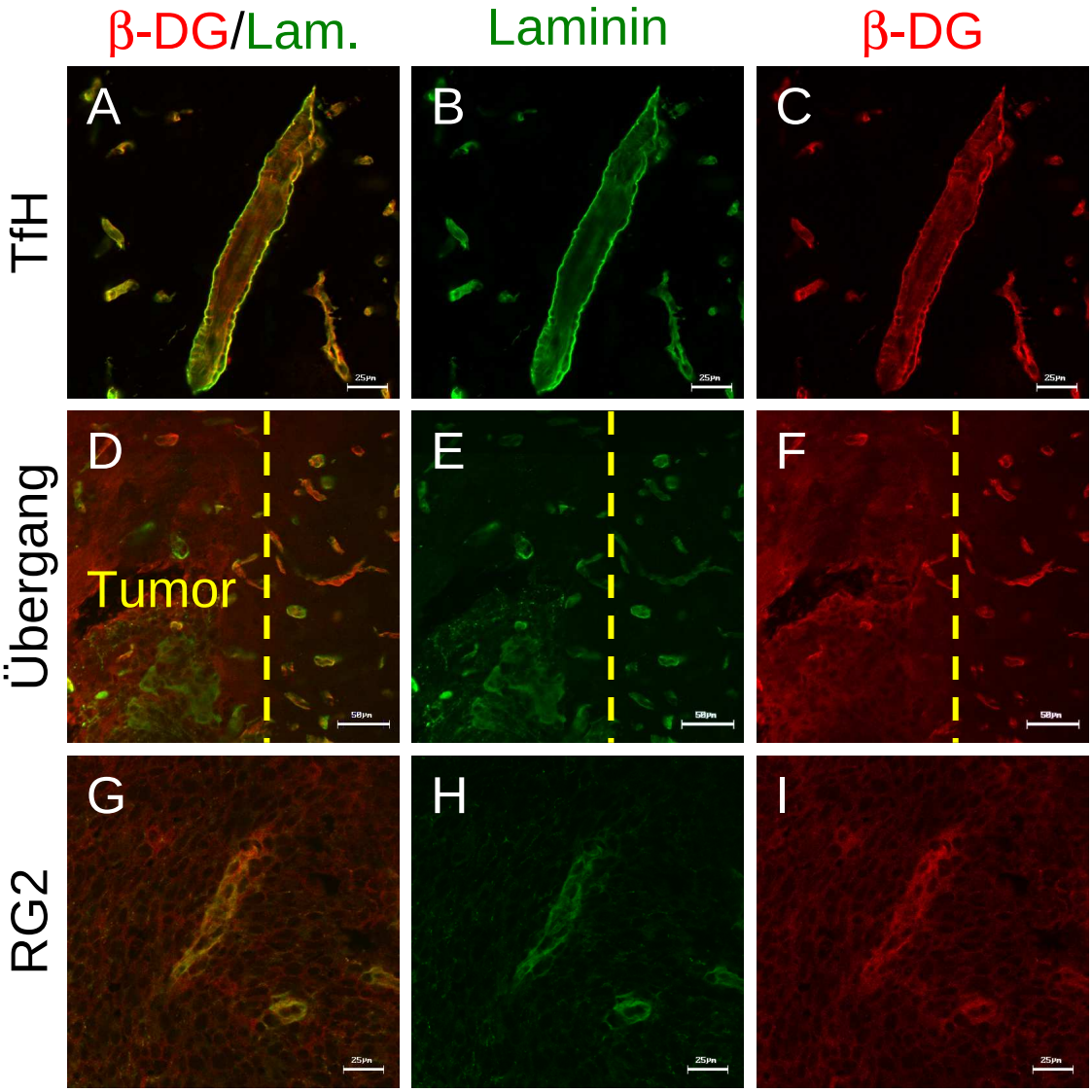

Abb. 7 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit den Basallamina-Protein Laminin (grün) und β-DG (rot) im RG2, jeweils in der linken tumorfreien und der rechten tumortragenden Hemisphäre. **A** Gewebe der linken Tumorfreien Hemisphäre (TfH). **D** Übergangsbereich von Tumorgewebe in tumorfreies Gewebe (Grenze durch gestrichelte Linie markiert). **G** Ausschnitt aus zentralem Bereich des Tumors. **B**, **E** und **H** Separate Darstellung des grünen Kanals. **C**, **F** und **I** Separate Darstellung des roten Kanals. **A** Gesundes Gefäß. **H** und **I** Im grünen und im roten Kanal ist das Signal für Laminin und β-DG diffus im Tumorgewebe um die Blutgefäße verteilt. (Balken: A-C und G-I 25 µm, D-F 50 µm)

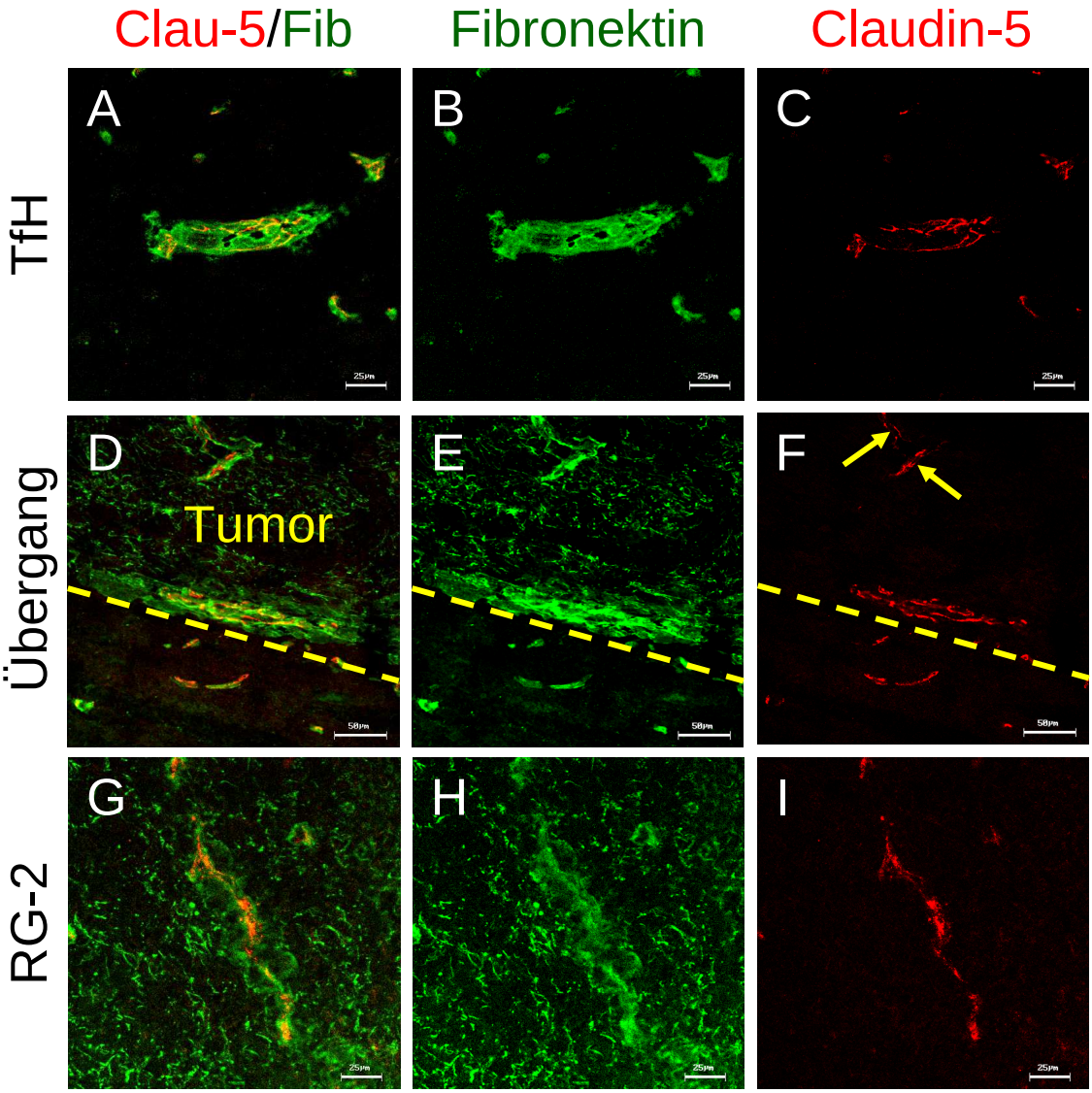

Abb. 8 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit dem Basallamina-Protein Fibronektin (grün) und dem Tight Junction-Molekül Claudin-5 (rot) im RG2, jeweils in der linken tumorfreien und der rechten tumortragenden Hemisphäre. **A** Gewebe der linken Tumorfreien Hemisphäre (TfH). **B** Übergangsbereich von Tumorgewebe in tumorfreies Gewebe (Grenze durch gestrichelte Linie markiert). **C** Ausschnitt aus zentralem Bereich des Tumors. **B**, **E** und **H** Separate Darstellung des grünen Kanals. **C**, **F** und **I** Separate Darstellung des roten Kanals. **A** Gesundes Gefäß. **D, E, G, H** Fibronektin weist im Tumorbereich eine diffuse Verteilung auf. **H** Die Gefäße im Tumor wirken verplumpt. **I** Claudin-5 tritt an dilatierten Tumorgefäßen in einem fleck- und punktförmigen Muster auf. **F** Kleinere Tumorgefäße zeigten aber überwiegend noch ein fein strukturiertes Signal für Claudin-5, siehe Pfeile (Balken: A-C und G-I 25 µm, D-F 50 µm)

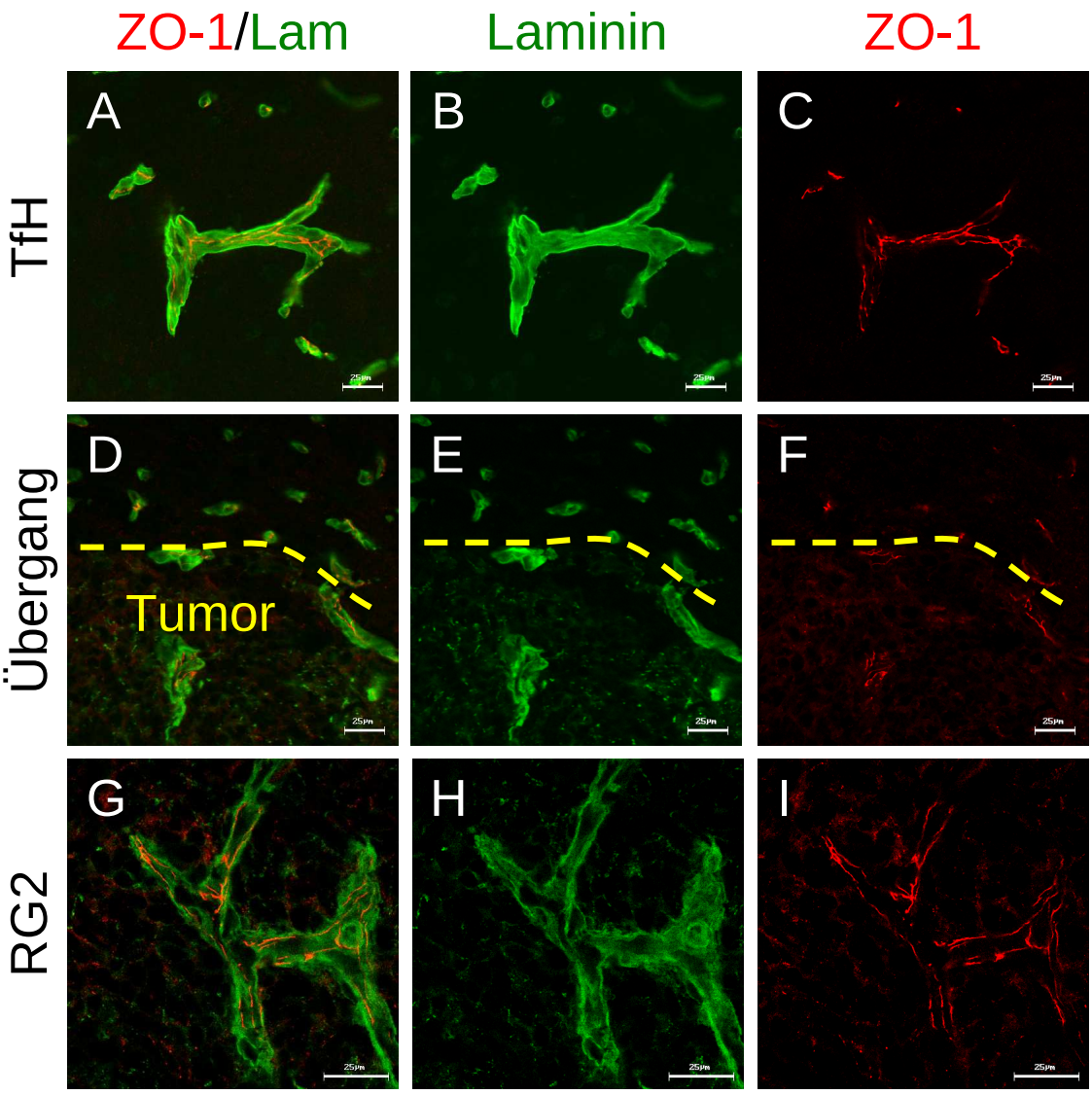

Abb. 9 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit dem Basallamina-Protein Laminin (grün) und dem Tight Junction-Protein ZO-1 (rot) im Rattengliom RG2, jeweils in der tumorfreien linken (TfH) und der tumortragenden rechten Hirnhemisphäre (RG-2). **A** Aufnahme aus der tumorfreien gesunden Hemisphäre. **D** Aufnahme aus dem Übergangsbereich. **G** Aufnahme aus dem Bereich des Tumorgewebes. **B**, **E**, **H** Separate Darstellung des grünen Kanals. **C**, **F**, **I** Separate Darstellung des roten Kanals. **I** Das ZO-1-Signal an Gefäßen im Tumorgewebe ist gleich stark ausgeprägt wie im gesunden Gewebe. Im Tumorgewebe ist das ZO-1 Signal auch diffus im umliegenden Gewebe zu sehen. (Balken: 25 µm)

4. Diskussion

4.1 Zur Rolle der Astrozyten bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke

Die Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (BHS), das Gehirn vor toxischen Substanzen und Unregelmäßigkeiten in der Blutzusammensetzung zu schützen, entwickeln sich im Laufe der Embryogenese allmählich. Die entscheidenden Strukturen für diese Barrierefunktion stellen die Tight Junctions dar. Sie verhindern die parazelluläre Diffusion von Wasser und wasserlöslichen Substanzen durch das Endothel der Gehirnkapillaren vorbei in das neuronale Parenchym des Gehirns.

Die Versperrung des parazellulären Weges impliziert nun aber die Notwendigkeit, dass im Blutplasma gelöste Nährstoffe, wie Glukose und Aminosäuren, die Neurone erreichen müssen. Außerdem muss überflüssiges Wasser, welches beim Glukosemetabolismus anfällt, das Gehirnparenchym wieder verlassen können, und unerwünschte Substanzen müssen wieder in das Gefäßlumen zurücktransportiert und Unregelmäßigkeiten in der Elektrolytzusammensetzung abgepuffert werden. Um all diese Aufgaben zu erfüllen, sind spezielle Transporter und Kanäle notwendig, die an der luminalen und abluminalen Seite der Endothelzellen lokalisiert sind. Aber nicht nur die Endothelzellen mit Ihrer komplexen Ausstattung, sondern auch die Astrozyten mit ihren Gap Junctions, Aquaporin- und Kaliumkanälen an ihren Endfußstrukturen leisten einen entscheidenden Beitrag zur Wasser- und Elektrolythomöostase. Da zur BHS auch die Endfußstrukturen der Astrozyten zählen und die Endothelzellen des Gehirns eine so hohe Spezialisierung aufweisen, stellt sich nun die Frage, in wieweit Astrozyten an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind.

Wie schon erwähnt, ist die Ausbildung der Barriereeigenschaften der BHS ein gradueller Prozess, der nicht einfach zu einem bestimmten Zeitpunkt unvermittelt auftritt, sondern allmählich und auch nicht in allen Teilen des ZNS synchron abläuft. Wakai und Hirokawa (1978) untersuchten die Reifung der BHS am Beispiel der Embryonal-Entwicklung des Hühnchens. Dafür wurde in die Allantoisvene von Hühnchenembryonen Meerrettichperoxidase injiziert und

anschließend licht- und elektronenmikroskopisch die Penetration des Markers vom Blut- in das Interstitium von Kleinhirn und Rückenmark untersucht. Erst um den 15. Tag war keine Permeabilität von Meerrettichperoxidase in das Interstitium des Gehirns mehr nachweisbar. Zahlreiche weitere in vivo- und in vitro- Experimente konnten den Einfluss von Astrozyten auf Endothelzellen nachweisen: Transplantationsversuche von Stewart und Wiley (1981) zeigten, dass Endothelzellen aus Zölomgewebe, welche in gefäßloses Gehirngewebe einsprossen, BHS-Eigenschaften gewinnen. Umgekehrt bilden Endothelzellen aus ZNS-Gewebe, das in avaskuläres mesodermales Gewebe vordringt, undichte Kapillaren aus. In einem weiteren Modell demonstrierten Hamm et al. (2004), dass die transendotheliale Permeabilität für Meerrettichperoxidase bei bovinen Gehirn-Endothelzellen die mit Rattenastrozyten in Co-Kultur gehalten wurden, erhöht war, wenn die Co-Kultur vorzeitig unterbrochen wurde. Interessanterweise wurde bei der Öffnung der endothelialen Tight-Junctions aber keine sichtbare Veränderung in der molekularen Zusammensetzung TJ-assoziierter Proteine, wie Claudin-5 und ZO-1 beobachtet.

Nun zu den Veränderungen an Astrozyten während der BHS-Reifung: Astrozyten entwickeln nicht nur Fortsätze zu den Endothelzellen, sondern auch zu Synapsen und den Ranvier-Knoten, besonders aber zur mesenchymalen Grenze an der Oberfläche des Gehirns. Neben verschiedenen Transportern konnte in der astroglialen Endfußmembran der Dystrophin-Dystroglycan Komplex (Blake und Kröger, 2000), das Wasserkanalprotein AQP4 (Amiry-Moghaddam et al., 2004a), der Kalium-Kanal Kir4.1, welcher eine bedeutende Rolle bei der räumlichen Pufferung von Kalium nach neuronaler Exzitation spielt (Kofuji und Newman, 2004), und die Orthogonalen Partikel Komplexe (OPKs, siehe Abb. 2, B) (Wolburg, 1995) nachgewiesen werden. Im Hühnchengehirn wurde die erste Expression von AQP4 zusammen mit dem ersten Auftreten der OPKs beobachtet (Nico et al., 2001). Das AQP4 Bestandteil der OPKs ist wurde in verschiedenen Studien bewiesen: Interessanterweise scheint diese Korrelation im Säuger nicht gegeben zu sein: im Mausgehirn wurde die Expression von AQP4 auf Proteinebene früher (etwa ab E15) als die Bildung der OPKs (um die Geburt herum) beobachtet (vorläufige Beobachtung im

Rahmen der Dissertation von Jörg Vollmer). Es gilt trotzdem festzuhalten, dass zum einen in der AQP4-knockout-Maus keine OPKs in den Astrozyten vorkommen (Verbavatz et al., 1997), zum anderen in mit AQP4-cDNA transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters OPKs gebildet werden (Yang et al., 1996). Zusätzlich wiesen Rash et al. (1998) durch direkte Immunogoldmarkierung von Gefrierbruchreplikas nach, dass Antikörper gegen AQP4 in Astrozytenmembranen von Rattenhirn 84% der OPKs markierten. Die OPKs sind an den perivaskulären Endfußmembranen um den Faktor 10 häufiger (100-400/μm^2), als in den parenchymalen Membranen im Neuropil (10-20/μm^2) (Neuhaus, 1990). Die Ungleichverteilung bedingt eine Polarität der Astrozyten, die für die Aufrechterhaltung der BHS von essentieller Bedeutung zu sein scheint. Während der Entwicklung des Rattengehirns zeigten Barber und Lieth (1997), dass sich Agrin um die Zeit der Entwicklung der BHS in den Gehirnkapillaren anreichert. Die entwicklungsbedingte Agrin-Expression im vaskulären Bereich muss als Hinweis darauf gewertet werden, dass dieses Molekül eine wichtige Rolle bei der Formation und Erhaltung der BHS spielt. Im nächsten Kapitel soll die Bedeutung der Astrozyten-Polarität für die BHS diskutiert werden.

4.2 Molekulare Grundlagen der Astrozytenpolarität

Die Polarität der Astrozyten äußert sich, wie oben schon erwähnt, in der ungleichen Verteilung der Orthogonalen Partikelkomplexe auf der Oberfläche der Astrozytenmembran (siehe Abb. 2, A und B) und tritt begleitend mit der Reifung der BHS auf (Nicchia et al., 2004). Während die epitheliale Polarität im Unterschied zwischen apikaler und basolateraler Membran besteht, die voneinader durch Tight Junctions abgegrenzt werden, besteht sie beim Astrozyten im Unterschied zwischen basaler Membran- und der parenchymalen Membrandomäne. Beide werden hier aber nicht durch Tight Junctions voneinander getrennt, die es bei Säuger-Astrozyten gar nicht gibt, sondern die Polarität ergibt sich durch den vorhandenen oder nicht-vorhandenen Kontakt mit der Basallamina. Der molekulare Aufbau der Endfußmembran, die mit der Basallamina Kontakt hat, wird in Abb. 3

verdeutlicht. Agrin und Laminin als Bestandteile der Extrazellulären Matrix binden an α-Dystroglycan (Gee et al., 1994). α-DG wiederum bindet an β-DG, das die mechanische Stabilität der Membrankomponenten unterstützt und über Dystrophin zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Aktin-Zytoskelett vermittelt (Higginson und Winder, 2005). Dystrophin seinerseits bindet auf der zytoplasmatischen Seite an α-Dystrobrevin, an dem bis zu vier α-Syntrophin-Moleküle binden können, von denen jedes eine PDZ-Domäne (*P*SD95 - *D*iscs large - *Z*O1) besitzt, welche unter anderem als Adapter für Membrankanäle dient, und an das C-terminale Ende von AQP4 oder den Kalium-Kanal Kir4.1 bindet (Peters et al., 1997; Neely et al., 2001; Connors et al., 2004). In Mäusen, die kein α-Syntrophin exprimieren, stellten Neely et al. (2001) fest, das die Gesamtmenge für AQP4 gleich blieb, die Verteilung des Wasserkanals in Hinblick auf die Polarität der Astrozyten sich jedoch veränderte: In hochauflösenden Immunogold-Markierungen war die AQP4 Expression an den Endfußmembranen merklich reduziert, an Membranen im Neuropil jedoch erhöht.

4.3 Veränderung der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2 in Hinblick auf den Verlust der Astrozytenpolarität

Da jede intakte Blut-Hirn-Schranke mit hoch-polaren Astrozyten assoziiert sind, muss man davon ausgehen, dass diese Polarität fundamental mit einer intakten Ausbildung der Barriereeigenschaften der Blut-Hirn-Schranke im gesunden Gehirn einhergeht und damit Basis für die Funktionstüchtigkeit des ZNS ist. In den folgenden Ausführungen soll nun auf die pathologischen Veränderungen der Astrozytenpolarität in Gliomen näher eingegangen werden. Hirntumore äußern sich unter anderem in einer Zunahme des intrakraniellen Druckes, der nicht nur durch eine reine Massenzunahme infolge des Tumorwachstums, sondern auch durch die Ausbildung vasogener Ödeme entsteht. Diese Ödembildung steht im Zusammenhang mit einer Störung des durch die Aquaporine geregelten Wasserflusses. Es folgt zunächst eine Diskussion zur Agrin-, beta-DG und AQP4-Verteilung an den Astrozyten:

Warth et al. (2004) konnten im humanen Glioblastom eine Umverteilung von AQP4 und α-Syntrophin nachweisen. Ob AQP4 dabei noch mit α-Syntrophin verbunden bleibt, muss allerdings noch in Immunpräzipitationsversuchen bestätigt werden. Die Restriktion von AQP4 an die Endfußmembran war nur erhalten, wenn Agrin ebenfalls an der perivaskulären Basallamina nachweisbar war. Dabei trat AQP4 nicht mehr auf die perivaskulären Astrozytenendfüße beschränkt auf, sondern war über die gesamte Oberfläche der Zelle umverteilt. β-DG blieb im humanen Glioblastom an die glialen Endfüße gebunden (Warth et al., 2004). Im RG2-Gliom war β-DG zwar auch perivaskulär nachweisbar, es fand sich jedoch auch ein diffuses Signal im restlichen Tumorgewebe (Abb. 7, I), das aber vermutlich unspezifische Hintergrundfärbung darstellt.

Saadoun et al. (2002) untersuchten immunhistochemisch die AQP4-Expression in humanen gesunden Hirngewebe und humanen ödematösen Gehirntumoren. AQP4 war in vier hochgradigen Tumoren (Daumas-Duport III oder IV) massiv hochreguliert und in einem nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse sind in soweit von Interesse, als dass bei Saadoun et al. (2002), wie bei Warth et al. (2004) im überwiegenden Teil der hochgradigen Gliome von einer massiven Hochregulation von AQP4 respektive Umverteilung die Rede ist, in einem der hochgradigen Gliome bei Saadoun et al. (2002) jedoch kein AQP4-Signal nachweisbar war. In der vorliegenden Arbeit im RG2-Gliom war ebenfalls die Immunreaktivität für AQP4 im Tumorgewebe und an den Tumorgefäßen nicht bis allenfalls nur sehr schwach zu sehen (Abb. 6, I). Vor allem im Übergangsbereich lässt sich dieser Verlust der Immunreaktivität sehr gut nachweisen (Abb. 6, F). Eine Koexpression von Agrin und AQP4, wie bei Warth et al. (2004), bestätigte sich auch im RG2-Gliom. Agrin wies in der Immunfluoreszenz im Tumor ein vergleichbar schwaches bis nicht mehr wahrnehmbares Signal, wie bei AQP4 auf (Abb. 5, I und Abb.6, I).

Agrin scheint für die Anbindung von AQP4 an die perivaskuläre Astrozytenendfußmembran eine entscheidende Rolle zu spielen: Noell et al. (2007) zeigten in Astrozytenkulturen, die in Agrin-konditionierten Medium gehalten wurden, eine Zunahme der AQP4-spezifischen Färbung, und in Gefrierbruchstudien zeigte sich eine vermehrte Klusterung orthogonaler

Partikelkomplexe, wenn statt der nicht-endothelialen Agrin-Isoform A0B0 die neuronale Isoform A4B8 Verwendung fand. In der gleichen Arbeit konnte in Schwellversuchen gezeigt werden, dass die Wassertransportkapazität erhöht war, wenn die Astrozyten mit neuronalem Agrin kultiviert wurden, unter dem vermehrt die AQP-Isoform M23 hochreguliert wurde. Interessanterweise hat diese AQP4-Isoform M23 eine wesentliche höhere Wassertransportaktivität als die Isoform M1 (Silberstein et al., 2004).

Da nun AQP4 im Tumor massiv hochreguliert und umverteilt wird (Saadoun et al., 2002; Warth et al., 2004), aber gleichzeitig der absolute OPK-Anteil reduziert ist (Neuhaus, 1990), bleibt nur noch der Schluss, dass mindestens unter pathologischen Bedingungen eines Hirntumors AQP4 außerhalb der OPKs auftritt.

Es ist naheliegend, dass der Verlust von Agrin zu einer Reduktion der OPK/AQP4 bezogenen Polarität der Astrozyten führt, was außerhalb der OPK-Struktur zu einer Umverteilung von freiem AQP4 zur Folge haben muss.

Die Polarität der Astrozyten äußert sich nicht nur in Hinblick auf die Verteilung von AQP4 in den OPKs, sondern auch hinsichtlich der Verteilung des Kaliumkanals Kir4.1, der wie AQP4 ebenfalls über sein C-terminales Ende an die PDZ-Domäne von α-Syntrophin Anschluss an den DDC findet. Dies wurde in Immunpräzipitationsexperimenten dargestellt (Connors et al., 2004). Kir4.1 tritt sowohl in Müllerzellen der Retina (Newman und Reichenbach, 1996), als auch in Gliazellen des ZNS auf und spielt eine wichtige Rolle bei der räumlichen Pufferung und dem Syphoning von Kalium im Interstitium des Gehirns. In alpha-Syntrophin Null-Mäusen führte der Verlust der AQP4 Polarität zu einer verzögerten Kalium clearance (Amiry-Moghaddam et al., 2003b). Da nun AQP4 und Kir4.1 über alpha-Syntrophin mit dem DDC verbunden sind, treten beide Kanäle in enger Nachbarschaft auf, was zu der Annahme führte, dass Ionenflüsse an den Wasserfluss gekoppelt sind (Nagelhus et al., 2004; Simard und Nedergaard, 2004). Schließlich belegen immunhistochemische Untersuchungen an humanen Glioblastomen, dass es nicht nur zu einer Umverteilung von AQP4, sondern auch von Kir4.1 an Astrozyten kommt (Warth et al., 2004; 2005). Bei gestörtem K-Efflux ist mit einer erhöhten intrazellulären

K-Konzentration zu rechnen, die wiederum einen in die Zelle gerichteten Wasserflux zur Folge hat und zu Zellschwellung führt (Zytotoxisches Ödem) (Nagelhus et al., 2004). Neuere Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen der AQP4-Verteilung und der Entstehung von epileptischen Anfällen: Transgene Mäuse denen AQP4 fehlt, haben eine signifikant längere Anfallsdauer im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, was mit einem Defizit bei der Kalium-Clearance einhergeht, die an Kir4.1 gekoppelt ist (Hsu et al., 2007).

4.4 Veränderung der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2 in Hinblick auf das Expressionsmuster der Tight Junctions

Der folgende Abschnitt diskutiert die Expression der Tight Junction Moleküle Claudin-5 und ZO-1 an Endothelzellen in humanen Gliomen und im RG2-Gliom. Unter den Tight Junction Molekülen erfüllen die Claudine die entscheidende Aufgabe der Etablierung einer parazellulären Barriere im Endothel der Gehirnkapillaren (Turksen et al., 2004). Die Claudine 1 und 2 wurden in der Forschungsgruppe um Furuse und Tsukita aus Hühnchen-Leber isoliert (Furuse et al., 1998a). Claudin-5 ist wie ursprünglich angenommen nicht nur auf Endothelzellen begrenzt (Morita et al., 1999), sondern findet sich auch in den Epithelien von Magen und dem Intestinaltrakt (Rahner et al., 2001). ZO-1 wurde von Stevenson (1986) aus TJ-angereichertem Rattenleber-Extrakt isoliert und stellt ein auf die zytoplasmatische Seite der TJ beschränktes Molekül dar, welches zwischen Occludin bzw. den Claudinen und dem Aktin-Zytoskelett vermittelt. Bis jetzt sind drei Zonula-Occludens Isoformen bekannt. Die Morphologie und Topologie der Tight Junctions lässt sich in Gefrierbruchreplikas anhand der Komplexität des Maschenwerkes der Tight Junction-Stränge und der Assoziation der Tight Junction-Partikel mit der protoplasmatischen Lipidschicht (P-Face) bzw. der extraplasmatischen Lipidschicht (E-Face) der Zellmembran untersuchen: In der reifen BHS des gesunden Rattenhirns sind die TJ-Partikel ungefähr gleich stark mit der P- wie mit der E-face assoziiert (Wolburg et al., 1994; Liebner et al., 2000). Isoliert man Endothelzellen in vitro, bilden sie Tight Junctions aus, die fast nur noch mit

der E-face assoziiert sind, und damit eine Morphologie annehmen, die der von peripheren Blutgefäß-Endothelien in vivo ähneln. Damit kann schon vermutet werden, dass es das Gehirnmilieu ist, das die E-face/P-face-Verteilung steuert. Tatsächlich kommt es zu einer verstärkten P-face Assoziation der TJ-Partikel, wenn bovine Gehirnendothelzellen mit Astrozyten kokultiviert oder in einem astrozytenkonditioniertem Medium kultiviert werden. Mit der P-face-Assoziation steigt auch der transendotheliale elektrische Widerstand (TER) an, und die Permeabilität der Endothelzellkultur für das Polysaccharid Inulin sinkt. Dies zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der endothelialen Barrierefunktion und der zytoplasmatischen Verankerung von TJ-Partikeln bestehen muss (Wolburg et al., 1994). Hinzu kommt, dass L-Fibroblasten nach Transfektion mit Claudin-1 oder Claudin-3 P-Face assoziierte, nach Transfektion mit Claudin-2 oder Claudin-5 mit der E-Face assoziierte TJs bilden (Furuse et al., 1998b). Das lässt vermuten, dass die gegenüber peripheren Endothelzellen unterschiedliche Morphologie der BHS-Tight Junctions eine bestimmte Stöchiometrie der Tight Junction-Proteine widerspiegeln (nämlich Claudin-3, 5- und 12), die vom Hirnmikromilieu genau kontrolliert wird. Dabei scheinen die unterschiedlichen Claudine für Stoffe unterschiedlicher Molekulargewichte eine unterschiedliche Permeabilität zu besitzen: Nitta et al. (2003) zeigten, dass ein niedermolekularer Marker, aber nicht der höhermolekulare Marker Mikroperoxidase in Claudin-5 knock-out Mäusen zu einer Extravasation in das umliegende Interstitium führte.

In humanen Glioblastomen konnten Liebner et al. (2000) in der Mehrheit der Tumorgefäße Claudin-5 in Tight Junctions nachweisen. In hyperplastischen Gefäßen wurde Claudin-5 jedoch nie direkt in den Tight-Junctions, sondern in einem punktförmigen Muster intrazellulär gefunden. Im RG2-Gliom war ein ähnliches Muster zu sehen: Auch hier wiesen die Tumorgefäße Claudin-5 in Tight Junctions auf, wohingegen in dilatierten Tumorgefäßen ebenfalls fleck- und punktförmige Signale im Bereich der Endothelzellen zu sehen waren (Abb. 8, I), kleinere Tumorgefäße zeigten aber überwiegend noch ein fein strukturiertes Signal für Claudin5 (siehe Abb. 8, F, Pfeile). Desweiteren zeigten Liebner et al. (2000), dass die Expression von Claudin1 in der Mehrheit der

Tumorkapillaren verloren gegangen war, bei unveränderter Immunreaktivität für ZO1. Im vorliegenden RG2-Gliom war ZO1 auch im Tumor unverändert nachweisbar (Abb. 9, I). Veränderungen der Tight-junction-Morphologie korreliert aber auch mit dem Verlust der Agrin-Immunreaktivität: Rascher et al. (2002) konnten zeigen, dass die Tight Junction-Moleküle Occludin, Claudin-5 und Claudin-1 in endothelialen Zellen fehlten, wenn Agrin nicht mehr in der Basallamina von Tumorgefäßen nachweisbar war. Dies ist auch im RG2-Gliom nachvollziehbar: Wenn man das nur noch sehr schwach ausgeprägte Agrin-Signal an einem dilatierten Tumorgefäß in Abb. 5, I mit der Expression von Claudin-5 in einem ähnlich veränderten Tumorgefäß vergleicht (Abb. 8, I), fällt auf, dass Claudin-5 dort in einem fleck- oder punktförmigen Muster auftritt, wo die Expression von Agrin gestört ist.

In den Färbungen gegen Fibronektin im RG2-Gliom fällt auf, das im Tumor ein fein verteiltes Signal für Fibronektin im Parenchym auftritt (Abb. 5 H und 8 H). Auf dem Hintergrund des Verlustes der Tight Junction-Integrität ist dieses Färbemuster gut nachvollziehbar: Auch bei Nag et al. (2000) wurde in Gehirnen von Ratten die Undichtigkeit und der Zusammenbruch der BHS durch den Nachweis von Fibronektin aus dem Blutplasma beschrieben. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte auch bei Ratten nach einem Kälteschaden im Kortex, nach kurzer Zeit eine erhöhte Permeabilität für Fibronektin (Nag et al., 2001).

Zusammengefasst lassen sich bei Mensch und Ratte vergleichbare Veränderungen in Hinblick auf die Barrierefunktion der BHS im Hirntumor feststellen.

4.5 Veränderung der molekularen Ausstattung der Blut-Hirn-Schranke im Hirntumor beim Menschen und im RG2, Implikationen für die Entstehung von Ödemen im Hirntumor

Igor Klatzo (1967) klassifizierte erstmals Gehirnödeme in zytotoxische und vasogene Typen. Das Gehirnödem ist Zeichen eines gestörten Wasserflusses, bei dem ein Wasserüberschuss im Extrazellularraum oder/und eine Zellschwellung vorliegt und verschiedene Formen unterschieden werden müssen (Papadopoulos et al., 2004b; Papadopoulos und Verkman, 2007): Beim

zytotoxischen Ödem dringt Wasser aus dem interstiellen Raum in das intrazelluläre Gehirnkompartiment ein, wobei die BHS intakt bleibt, der Extrazellulärraum aber reduziert wird. Grund kann der Ausfall der Na/K-ATPase oder der Abfall der extrazellulären Natrium-Konzentration sein. Das zytotoxische Ödem tritt in der Frühphase einer zerebralen Ischämie, bei Hypoxie und Hyponatriämie auf.

Beim vasogenen Ödem ist die BHS undicht. Proteinreiches Exsudat aus dem Plasma führt zur Vergrößerung des Extrazellulärraumes. Zum vasogenen Hirnödem kommt es bei Hirntumoren und bei Gehirnabszessen. Zuletzt unterscheidet man noch das Ödem bei Hydrozephalus. Dabei führt ein zu hoher Druck der Zerebrospinalflüssigkeit zu einer Extravasation von Zerebrospinalflüssigkeit durch das Ependym in das periventrikuläre Gehirnparenchym.

Insgesamt führt die Schwellung des Gehirns im nicht dehnbaren Schädel dann zur Erhöhung des intrakraniellen Druckes, was zu Ischämie, Herniation und zuletzt zum Tod des Individuums führen kann.

In der gegenwärtigen wissenschaftlichen Diskussion werden für die Entstehung des Gehirnödems beim Gehirntumor zum einen das vasogene Ödem durch den Zusammenbruch der BHS-Barriere mit Herunterregulation der Tight Junctions verantwortlich gemacht, und zum anderen eine Umverteilung der AQP4- und Kir4.1- Kanäle mit Störung der Kaliumclearance und folgendem zytotoxischem Ödem diskutiert (Warth et al., 2005). Durch die Coexpression von Kir4.1 und AQP4 wurde schon ein Zusammenhang in Volumenänderungen des Gehirns vermutet (Nagelhus et al., 2004). Die polare Verteilung von Kir4.1 an der Astrozytenmembran ist beteiligt an der räumlichen Pufferung von Kalium. Normalerweise besteht die räumliche Pufferung von Kalium darin, dass dort, wo viel Kalium extrazellulär entlassen wird, also im synaptischen Bereich, dieses sofort weggeschafft werden muss, um die Gefahr einer Dauererregung der Neurone zu vermeiden. Die Astrozyten sind die hauptsächlichen Elemente, die Kalium aus dem Extrazellularraum aufnehmen. Osmotisch wird Wasser nachgezogen. Sowohl Kalium wie Wasser müssen aber den Astrozyten wieder verlassen, damit er arbeitsfähig bleiben kann. Dies geschieht möglichst weit

weg von synaptischen Regionen, d.h. an der Hirnoberfläche oder an den Gefäßen, wo ausreichend viel extrazellulärer Raum vorhanden ist, um Kalium und Wasser abzugeben, also an den Endfußmembranen. Kann Kalium die Gliazelle an der Endfußmembran nicht mehr verlassen, weil Kir4.1 umverteilt ist, führt ein darauf folgender Wassereinstrom in die Zelle zu einer Zellschwellung. Ist AQP4 umverteilt, ist eine Zellschwellung möglich, da der Kaliumflux an den Wasserflux gekoppelt ist (Wolburg et al., 2008). Kir4.1 ist wie AQP4 über eine PDZ-Domäne an α-Syntrophin gebunden, wodurch eine Verbindung zum DDC besteht und dadurch auch Kontakt hat zu Agrin. Die Agrin-Immunreaktivität war im RG2-Gliom (Abb.5I) nicht bis sehr schwach ausgeprägt. Um die molekularen pathologischen Zusammenhänge in der Entstehung des Hirnödems zu beleuchten, wurden verschiedene Gehirnödemmodelle in der Ratte entwickelt.

Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen AQP4-Verteilung und Hirnödemen: Wie bei Warth et al (2004), so ist auch im RG2-Gliom (Abb. 6I) AQP4 nicht mehr perivaskulär lokalisiert. Dieses Verteilungsmuster spielt in weiteren Studien ebenfalls eine Rolle: AQP-4 defiziente Mäuse hatten bei akuter Wasserintoxikation in einem Gehirnödem-Modell eine höhere Überlebensrate als Wildtyp Mäuse (Manley et al., 2000). Die Wasserintoxikation erzeugte bei den Mäusen eine Serum-Hyponatriämie, die in Folge eines erhöhten osmotischen Gradienten wiederum zu einem erhöhten Wasserfluss in das Gehirn führte und ein zytotoxisches Ödem zur Folge hatte. War kein AQP4 vorhanden, unterblieb dieses zytotoxische Ödem, und die knockout-Tiere überlebten wesentlich besser als die Wildtyp-Tiere. Andere Versuche zeigten einen Zusammenhang zwischen der Verankerung von AQP4 und der Komplexierung von AQP4 mit DDC-Komponenten: α-Syntrophin-Null Mäuse, die eine verminderte AQP4-Expression an den astrozytären Endfußmembranen haben, entwickeln, ähnlich wie die AQP4-knockout-Tiere, eine reduzierte Gehirnschwellung nach zerebraler Ischämie und Wasserintoxikation (Amiry-Moghaddam et al., 2003a; 2004b).

Um das vasogene Hirnödem zu simulieren, wurden drei Modelle entwickelt: 1. Intraparenchymale Infusion von isotoner künstlicher Zerebrospinal-Flüssigkeit.

Hierbei kann das Hirnödem kontrolliert induziert werden, ohne die Barriere-Eigenschaften der BHS zu beeinflussen. 2. Ein durch Kälteapplikation hervorgerufenes Gehirngewebetrauma (freeze-injury-Modell), welches eine erhöhte und gut reproduzierbare BHS-Permeabilität hervorruft, und 3. die Implantation von Hirntumoren (Papadopoulos et al., 2004a). Im Hirntumormodell mit implantierten Melanomzellen bei AQP4-knockout Mäusen, entwickelte sich ein schlechteres neurologisches Outcome und höhere intrakranielle Drücke (ICP) als bei den Wild-Typ (WT) Kontrolltieren. Diese Experimente zeigten einen Zusammenhang zwischen AQP4-Deletion und begrenzter Hirnschwellung beim zytotoxischen Hirnödem und verstärkter Hirnödementwicklung im vasogenen Ödem.

In einer Studie, bei der 189 humane Gliome, WHO Grad I-IV untersucht wurden, ließen sich die Schlussfolgerungen, die am Tiermodell erhoben worden waren, nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen: Die protektive Rolle von AQP4 für das vasogene Hirnödem wurde in Frage gestellt (Warth et al., 2007). Grund war die Beobachtung, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen AQP4-Expression und Überlebenszeit in keiner der untersuchten WHO-Gruppen nachgewiesen werden konnte. Demzufolge ist kein AQP4-Effekt wirksam, der einer Tumorödementwicklung entgegenwirken könnte. Diese Ergebnisse haben unmittelbaren Einfluss auf die Entwicklung von Therapiestrategien, wie sie im abschließenden Kapitel diskutiert werden sollen.

4.6 Ausblick: kann die morphologische Analyse von Zellen der Blut-Hirn-Schranke Vorschläge zur Therapie des Hirnödems ableiten?

Bisher beinhaltet die Hirnödem-Therapie folgende Optionen: Verabreichung von Sedativa, hyperosmolaren Lösungen, wie Mannitol und hypertoner Kochsalzlösung, Gabe von Corticosteroiden bei Hirntumoren, chirurgische Resektion auslösender Läsionen und in extremen Fällen eine dekomprimierende Kraniektomie. Bei kritisch erkrankten Patienten wird zur Optimierung der Therapie auch noch der intrakranielle Druck und der zerebrale Perfusionsdruck invasiv überwacht. Viele dieser Therapien sind schon über 50 Jahre alt. Hauptstütze der Therapie von Ödemen bei glialen und nicht–glialen

Hirntumoren stellen seit 1960 die Kortikosteroide dar. Sie haben zu einer entscheidenden Reduzierung der perioperativen Mortalität und Morbidität geführt.

Gegenwärtig werden zahlreiche experimentelle Ansätze verfolgt, einige sind noch im präklinischen Stadium und andere in frühen klinischen Studien. Zu diesen Therapieansätzen zählen der Einsatz von Boswellia-Säuren, Thrombinantagonisten, Corticotropin releasing Faktor, VEGF-Inhibitoren und die Gabe von COX2–Hemmern. In der Behandlung von Hirnödemen konnten diese Substanzen aber keine Überlegenheit zu Kortikosteroiden aufweisen (Stummer, 2007).

Der Vorschlag von Papadopoulos et al. (2007), im Falle des vasogenen Ödems im Gliom AQP4 evtl. therapeutisch zu induzieren, wurde in der Studie an humanen Gliomen von Warth et al. (2007) für die Therapie im Menschen in Frage gestellt, da keine protektive Rolle für AQP4 im vasogenen Ödem bei Gliomen nachgewiesen werden konnte. Im Falle des zytotoxischen Ödems könnte eine Herunterregulation von AQP4 aber dennoch einen protektiven Effekt aufweisen, wie bei der Studie an AQP4-Null Mäusen, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Wasserintoxikation ein besseres neurologisches Outcome zeigten (Manley et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der Ödemtherapie könnte auch eine pharmakologische Einflussnahme auf die Integrität der Tight Junction Moleküle Occludin, Claudin-3 und Claudin.-5 darstellen, die aber leider bisher nicht bekannt ist. Auch in der Therapie der Epillepsie ist eine medikamentöse Therapie, die die AQP4 Expression moduliert, grundsätzlich denkbar, da AQP4 in Verbindung mit Kir4.1 die neuronale Excitabilität mit beeinflusst (Hsu et al., 2007). Allerdings müssen hierbei auch all die ungewünschten Nebeneffekte mit einkalkuliert werden, da AQP4 auch in vielen anderen Organen, wie im Ohr, dem Auge und der Niere, exprimiert wird.

5. Zusammenfassung

Die Aufgabe der Blut-Hirn-Schranke besteht im Schutz des Gehirns vor toxischen Substanzen und Unregelmäßigkeiten in der Blutzusammensetzung. Dabei leisten Tight Junctions und die Verteilung von Kalium- und Wasserkanälen einen wichtigen Beitrag zur Elektrolyt- und Wasserhomöostase. Um dies zu gewährleisten ist eine Polarisierung der Astrozyten notwendig, die sich durch den Kontakt mit der Basallamina etabliert und die Basis für die Funktionstüchtigkeit des ZNS darstellt. Das RG2-Gliom gleicht humanen WHO Grad III und IV Tumoren und dient, wie in der vorliegenden Arbeit, als Modell zur Untersuchung der pathologischen Vorgänge und Effekte auf die BHS. Wichtig dabei ist, dass Hirntumore ihre destruktive Wirkung nicht nur durch reine Massenzunahme entfalten, sondern auch durch die Ausbildung vasogener Ödeme.

Mit immunhistochemischen Methoden wurde in dieser Arbeit deshalb zunächst die Verteilung des Wasserkanals AQP4 und des Heparansulfat-Proteoglycans Agrin im RG2-Gliom untersucht. Beide Proteine waren im Tumor nicht mehr perivaskulär lokalisiert, was auf einen Verlust der Astrozytenpolarität hinweist. AQP4, welches normalerweise in den Orthogonalen Partikelkomplexen (OPK) an den perivaskulären Endfußmembranen organisiert ist, wird durch den Verlust von Agrin außerhalb der OPK-Struktur umverteilt.

Das Tight-Junction-Molekül Claudin 5 zeigte an dilatierten Tumorgefäßen ein fleck- und punktförmiges Verteilungsmuster, wohingegen ZO1 auch im Tumor unverändert nachweisbar war. Der Verlust der Tight Junction-Integrität erklärt die Extravasation des löslichen Fibronektins. Beide Veränderungen, der Verlust der Astrozytenpolarität und die gestörte Tight-Junction-Integrität, könnten so zu einem Zusammenbruch der BHS-Barriere führen.

Eine therapeutische Einflußnahme auf die AQP4-bedingte Polarität scheint weniger das vasogene, als vielmehr das zytotoxische Ödem zu betreffen, da für AQP4 keine protektive Rolle im vasogenen Ödem bei Gliomen beschrieben wurde. Im Falle des zytotoxischen Ödems könnte eine therapeutische Herunterregulation von AQP4 einen protektiven Effekt aufweisen, da AQP4-Null Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Wasserintoxikation ein besseres

neurologisches Outcome zeigten. Hauptsächlich aber wäre eine Re-Induktion der astroglialen Polarität, vielleicht durch Stimulierung der Agrin-Produktion, eine wünschenswerte Therapie, deren klinische Realisierung jedoch noch in weiter Ferne liegen dürfte.

6. Literaturverzeichnis

1. Aas AT, Brun A, Blennow C, Stromblad S, Salford LG (1995) The RG2 rat glioma model. J Neurooncol 23(3): 175-183.

2. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci 7(1): 41-53.

3. Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP (2004a) Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. Neuroscience 129(4): 999-1010.

4. Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003a) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. Proc Natl Acad Sci U S A 100(4): 2106-2111.

5. Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP (2003b) Delayed K+ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100(23): 13615-13620.

6. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP (2004b) 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 J 18(3): 542-544.

7. Barber AJ, Lieth E (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. Dev Dyn 208(1): 62-74.

8. Barth RF (1998) Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. J Neurooncol 36(1): 91-102.

9. Bauer H, Bauer HC, Haseloff RF, Blasig IE (2005) The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier. In: Kettenmann H, Ransom BR (Hrsg.) *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, Oxford: 325-333

10. Bechmann I, Galea I, Perry VH (2006) What is the blood-brain barrier (not)? Trends Immunol 28(1): 5-11.

11. 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(2): 349-355.

12. Bilzer T, Reifenberger G, Wechsler W (1989) Chemical induction of brain tumors in rats by nitrosoureas: molecular biology and neuropathology. Neurotoxicol Teratol 11(6): 551-556.

13. Blake DJ, Kröger S (2000) The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? Trends Neurosci 23(3): 92-99.

14. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J Cell Biol 40(3): 648-677.

15. CBTRUS (2008) Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000–2004. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States

16. Chiu AY, Espinosa de los Monteros A, Cole RA, Loera S, de Vellis J (1991) Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, Schwann cells, and schwannomas in culture. Glia 4(1): 11-24.

17. Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P (2004) The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. J Biol Chem 279(27): 28387-28392.

18. 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 Sci U S A 96(11): 6468-6472.

19. Dreifuss JJ, Tikhonov N (2005) Lina Stern (1878–1968): Physiologin und Biochemikerin, erste Professorin an der Universität Genf und Opfer stalinistischer Prozesse*. Schweizerische Ärztezeitung / Bulletin des médecins suisses / Bollettino dei medici svizzeri 86(26).

20. Ehrlich P (1885) Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie Verlag von August Hirschwald, Berlin: 66-72.

21. Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. J Biol Chem 274(34): 23996-24006.

22. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. J Cell Biol 140(4): 947-959.

23. Eusebio A, Oliveri F, Barzaghi P, Ruegg MA (2003) Expression of mouse agrin in normal, denervated and dystrophic muscle. Neuromuscul Disord 13(5): 408-415.

24. Farrell CJ, Plotkin SR (2007) Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. Neurol Clin 25(4): 925-946, viii.

25. Fasano A (2000) Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. Ann N Y Acad Sci 915: 214-222.

26. Fidler IJ, Yano S, Zhang RD, Fujimaki T, Bucana CD (2002) The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. Lancet Oncol 3(1): 53-57.

27. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL (2007) Epidemiology of brain tumors. Neurol Clin 25(4): 867-890, vii.

28. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998a) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol 141(7): 1539-1550.

29. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998b) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 143(2): 391-401.

30. Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S (1994) Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. Cell 77(5): 675-686.

31. Goldmann E (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem, Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute. Physikalisch-Mathematische Classe 1: 1-64.

32. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. Physiol Rev 85(3): 979-1000.

33. Hamm S, Dehouck B, Kraus J, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Risau W, Cecchelli R, Engelhardt B, Dehouck MP (2004) Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. Cell Tissue Res 315(2): 157-166.

34. Higginson JR, Winder SJ (2005) Dystroglycan: a multifunctional adaptor protein. Biochem Soc Trans 33(Pt 6): 1254-1255.

35. Hsu MS, Lee DJ, Binder DK (2007) Potential role of the glial water channel aquaporin-4 in epilepsy. Neuron Glia Biol 3(4): 287-297.

36. Klatzo I (1967) Presidental address. Neuropathological aspects of brain edema. J Neuropathol Exp Neurol 26(1): 1-14.

37. Ko L, Koestner A, Wechsler W (1980) Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. Acta Neuropathol 51(1): 23-31.

38. Koestner A, Swenberg JA, Wechsler W (1971) Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. Am J Pathol 63(1): 37-56.

39. Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. Neuroscience 129(4): 1045-1056.

40. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. Virchows Arch 429(6): 311-322.

41. Kuffler SW, Nicholls JG (1966) The physiology of neuroglia cells. *Ergebn Physiol*, 57: 1-90

42. Lewandowsky M (1900) Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. Z klin Medizin 39-41: 480-494.

43. 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(3): 323-331.

44. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 114(2): 97-109.

45. Machein MR, Kullmer J, Fiebich BL, Plate KH, Warnke PC (1999) Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and, capillary permeability in human brain tumors. Neurosurgery 44(4): 732-740; discussion 740-731.

46. Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS (2004) New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. Neuroscience 129(4): 983-991.

47. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema

after acute water intoxication and ischemic stroke. Nat Med 6(2): 159-163.

48. McMahan UJ (1990) The agrin hypothesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 55: 407-418.

49. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(2): G250-254.

50. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol 147(1): 185-194.

51. Nag S (1996) Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in cerebral vessels in chronic hypertension. J Neuropathol Exp Neurol 55(3): 381-388.

52. Nag S, Picard P, Stewart DJ (2000) Increased immunolocalization of nitric oxide synthases during blood-brain barrier breakdown and cerebral edema. Acta Neurochir Suppl 76: 65-68.

53. Nag S, Picard P, Stewart DJ (2001) Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood-brain barrier breakdown and repair after cold injury. Lab Invest 81(1): 41-49.

54. Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. Neuroscience 129(4): 905-913.

55. 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 U S A 98(24): 14108-14113.

56. Neuhaus J (1990) Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size, and correlation with intramembranous particles. Glia 3(4): 241-251.

57. Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci 19(8): 307-312.

58. Nicchia GP, Nico B, Camassa LM, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A (2004) The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. Neuroscience 129(4): 935-945.

59. 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(Pt 7): 1297-1307.

60. 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(6 Pt 1): 2471-2478.

61. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. J Cell Biol 161(3): 653-660.

62. Noell S, Fallier-Becker P, Beyer C, Kroger S, Mack AF, Wolburg H (2007) Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. Eur J Neurosci 26(8): 2109-2118.

63. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004a) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. FASEB J 18(11): 1291-1293.

64. Papadopoulos MC, Saadoun S, Binder DK, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004b) Molecular mechanisms of brain tumor edema. Neuroscience 129(4): 1011-1020.

65. Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA (2001a) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. Br J Neurosurg 15(2): 101-108.

66. Papadopoulos MC, Saadoun S, Woodrow CJ, Davies DC, Costa-Martins P, Moss RF, Krishna S, Bell BA (2001b) Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. Neuropathol Appl Neurobiol 27(5): 384-395.

67. Papadopoulos MC, Verkman AS (2007) Aquaporin-4 and brain edema. Pediatr Nephrol 22(6): 778-784.

68. Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. J Cell Biol 138(1): 81-93.

69. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology 120(2): 411-422.

70. 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(1): 85-91.

71. Rash JE, Davidson KG, Yasumura T, Furman CS (2004) Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. Neuroscience 129(4): 915-934.

72. 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 U S A 95(20): 11981-11986.

73. Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol 34(1): 207-217.

74. Reichenbach A (1989) Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Muller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. Glia 2(4): 250-259.

75. Roberts WG, Palade GE (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. Cancer Res 57(4): 765-772.

76. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA (2002) Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72(2): 262-265.

77. 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(4): 1685-1699.

78. Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Cestelli A (2000) Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. Neuroreport 11(5): 1081-1084.

79. Schwarzbauer JE (1991) Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. Bioessays 13(10): 527-533.

80. Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, Brown D, Van Hoek AN (2004) Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 287(3): F501-511.

81. Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. Neuroscience 129(4): 877-896.

82. Stern L (1921) La barrière hémato-encéphalique dans le condition normales et de la condition patologique. Schweiz Arch Neur 13: 604.

83. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J Cell Biol 103(3): 755-766.

84. Stewart PA, Wiley MJ (1981) Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. Dev Biol 84(1): 183-192.

85. Stichel CC, Muller CM, Zilles K (1991) Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity during rat visual cortex development. J Neurocytol 20(2): 97-108.

86. Stummer W (2007) Mechanisms of tumor-related brain edema. Neurosurg Focus 22(5): E8.

87. Swenberg JA, Koestner A, Wechsler W, Denlinger RH (1972) Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats. Cancer Res 32(12): 2656-2660.

88. Thapar K, Rutka JT, Laws ER (1995) Brain edema, increased intracranial pressure, vascular effects, and other epiphenomena of human brain tumors. In: Kaye AH, Laws ER (Hrsg.) *Brain tumors: an encyclopedic approach*, Churchill Livingstone, Edinburgh: 163-189

89. Turksen K, Troy TC (2004) Barriers built on claudins. J Cell Sci 117(Pt 12): 2435-2447.

90. Verbavatz JM, Ma T, 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 (Pt 22): 2855-2860.

91. Virchow R (1854) Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin 6(1): 135-138.

92. Virchow R (1859) Dreizehnte Vorlesung. 3. April 1858. Rückenmark und Gehirn. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institute zu Berlin*, Verlag von August Hirschwald, Berlin: 241-257

93. von Kölliker A (1896) Nervensystem des Menschen. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen* Wilhelm Engelmann, Leipzig, 2: 136-153

94. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH (2003) Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. Brain Res Brain Res Rev 42(3): 221-242.

95. Wakai S, Hirokawa N (1978) Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. Cell Tissue Res 195(2): 195-203.

96. 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(4): 311-318.

97. Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H (2005) Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K+ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. Acta Neuropathol 109(4): 418-426.

98. Warth A, Simon P, Capper D, Goeppert B, Tabatabai G, Herzog H, Dietz K, Stubenvoll F, Ajaaj R, Becker R, Weller M, Meyermann R, Wolburg H, Mittelbronn M (2007) Expression pattern of the water channel aquaporin-4 in human gliomas is associated with blood-brain barrier disturbance but not with patient survival. J Neurosci Res 85(6): 1336-1346.

99. Weigert C (1895) Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. Abhandlung der senckenbergischen naturforschenden Gesellschaft 19: 65-215.

100. Weller M (2005) Gliomas. In: Kettenmann H, Ransom BR (Hrsg.) *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, Oxford: 521-531

101. Weller M, Thomas DGT (2003) Primary tumors of the central and peripheral nervous system. In: Brandt T, Caplan LR, Dichgans J, Diener HC, Kennard C (Hrsg.) *Course and Treatment of Neurological Disorders*, Academic Press, San Diego: 827-863

102. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. N Engl J Med 359(5): 492-507.

103. Wolburg H (1995) Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. J Hirnforsch 36(2): 239-258.

104. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. Vascul Pharmacol 38(6): 323-337.

105. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel 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 (Pt 5): 1347-1357.

106. Wolburg H, Warth A, Noell S, Mack F (2008) Brain aquaporins and the blood-brain barrier in health and disease. In: Ribatti D, Nico B (Hrsg.) *Recent Advances in Angiogenesis in Central Nervous System* Kerala, Indien: 79-104

107. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. Acta Neuropathol 105(6): 586-592.

108. 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(9): 4577-4580.

109. Yurchenco PD, Schittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. FASEB J 4(6): 1577-1590.

Danksagungen

Einen herzlichen Dank möchte ich an folgende Personen richten:

- Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hartwig Wolburg für seine beispielhafte Betreuung und die ansteckende Begeisterung für dieses spannende Forschungsgebiet.
- Meiner freundlichen Arbeitsgruppe, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand: Gabi Frommer-Kästle, Ria Knittel, Dr. Karen Wolburg-Buchholz, Petra Fallier-Becker, Yeliz Donat
- Dr. Friederike Pfeiffer für die Einführung in die Immunhistochemie und die Laser-Scanning-Mikroskopie.
- PD Dr. B. Erdlenbruch und Frau cand. biol. Petra Hülper (Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Georg-August-Universität Göttingen) für die Überlassung der Rattengehirne mit RG2-Tumoren.
- PD Dr. Michel Mittelbronn (Edinger-Institut, Universitätsklinikum Frankfurt) für die Diskussionen zu immunhistochemischen Nachweisverfahren und histopathologischen Veränderungen an Rattenhirntumoren.
- Dr. Carmen König für die vielen konstruktiven Gespräche und den Spaß bei der Arbeit.
- Meinen Eltern für die Unterstützung in all den Jahren meiner Ausbildung und meines Studiums.

Lebenslauf

Name:	Carsten Ingo Alexander Rouven Wagner
Geburtsdatum:	02.09.1973
Geburtsort:	Stuttgart, Bad-Cannstatt
Schulbildung:	
1997-2000	Kolping Kolleg Stuttgart-Bad Cannstatt Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung:	
04/1993-03/1996	Ausbildung zum Krankenpfleger am Katharinenhospital Stuttgart
Berufstätigkeit:	
04/1996-04/2007	Krankenpfleger im Fachbereich Chirurgie, Innere-Medizin und ambulanter Pflege
Studium:	
04/2001-06/2008	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Praktisches Jahr:	
02/2007-01/2008	Chirurgie, Innere Medizin und Pädiatrie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
27.05.2008	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung