

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische
Anatomie

**Bildung von Orthogonalen Partikelkomplexen und
Expression von Aquaporin 4 und Aquaporin 1 in
kultiviertem Glioblastomgewebe in Abhängigkeit von
der Kultivierungsdauer**

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

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

vorgelegt von

Mitrovic, Sandra

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Schöls

Tag der Disputation: 01.03.2018

„I don't care that they stole my idea, I care that they don't have any of their own.”

N. Tesla

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Historisches über die Bluthirnschranke.....	1
1.2 Aufbau und Funktion der BHS.....	3
1.3 Aquaporine.....	4
1.3.1 AQP1.....	8
1.3.2 AQP4.....	9
1.4 Das Gehirn im Ungleichgewicht.....	11
1.4.1 Glioblastom.....	12
1.5 Aufgaben und Zielstellung.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Explantatgewebe.....	15
2.1.1.1 Transportmedium für Explantatgewebe.....	15
2.1.1.2 Herstellung des Transportmediums der Gewebeexplantate ...	15
2.1.1.3 Zellkulturmedium.....	16
2.1.2 Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente.....	16
2.1.3 Material und Puffer für die Immunhistologie.....	17
2.1.3.1 Herstellung der Pufferlösung TBS.....	18
2.1.3.2 Herstellung der Stammlösung Citratpuffer.....	18
2.1.3.3 Herstellung des Tris-Puffers.....	18
2.1.3.4 Auswahl der Antikörper.....	19
2.1.3.5 Herstellung des Eindeckmediums Mowiol.....	19

2.1.4	Material und Puffer für Ultradünnschnitte	20
2.1.4.1	Herstellung von Araldit.....	21
2.1.4.2	Herstellung der Richardsonlösung.....	21
2.1.4.3	Herstellung von Bleicitrat	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Gewinnung von Explantatgewebe	23
2.2.2	Gefrierbruch.....	24
2.2.2.1	Auswertung der Replikas.....	25
2.2.3	Immunhistologie	26
2.2.3.1	Fixierung und Einbettung der Explantatkultur	26
2.2.3.2	Anfertigen von Paraffinschnitten.....	26
2.2.3.3	Entparaffinierung und Demaskierung	27
2.2.3.4	Markierung mit Antikörpern.....	28
2.2.4	Anfertigen der Färbung von Kontrollhirngewebe	29
2.2.5	Konventionelle Elektronenmikroskopie.....	29
2.2.5.1	Fixierung und Nachfixierung des Gewebes	30
2.2.5.2	Entwässerung und Einbettung des Gewebes	31
2.2.5.3	Herstellung von Semidünnschnitten	32
2.2.5.4	Herstellung von Ultradünnschnitten	32

3	Ergebnisse	36
3.1	Gefrierbruchanalyse des frischen und kultivierten GBM-Gewebes zum Nachweis von OPKs	37
3.2	AQP1- und AQP4-Expression anhand Fluoreszenzmikroskopie	43
3.3	Ultrastruktur der GBM-Explantate	48
3.4	Vergleich von Ultradünnschnitt und Gefrierbruch.....	51
4	Diskussion	54
4.1	OPKS, AQP4 und AQP1 im Gliom	54
4.2	Kultivierungssysteme	58
4.3	Zusammenfassung der Beobachtungen	60
4.4	Ausblick.....	60
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AQP	Aquaporin
BHS	Bluthirnschranke
CaCl	Kalziumchlorid
Cy™	Cyanin
d	day / Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diaminidino-2-phenylindolhydrochlorid
DDC	Dystrophin-Dystroglycan-Komplex
Diluent	Verdünnungsmittel
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E-face	extraplasmatic fracture face
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor / Wachstumsfaktor
EM	Elektronenmikroskop
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum / Fötales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

GBM	Glioblastom
GB	Gefrierbruch
h	hour / Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HC	Hypoxiecluster
HCl	Chlorwasserstoff
IH	Immunhistochemie
IMP	Intramembranpartikel
MMP	Matrix-Metalloprotease
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OPKs	Orthogonale Partikelkomplexe
PE	Plexusepithel
PFA	Formaldehyd
P-face	protoplasmatic fracture face
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
ROI	Region of interest / Bereich von Interesse
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
UD	Ultradünnschnitt
we	week / Woche

Abkürzungsverzeichnis

WHO Weltgesundheitsorganisation

ZNS Zentral Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Maus-Darstellung nach Goldmann	3
Abb. 2: Aquaporin Monomer und AQP Tetramer	6
Abb. 3: Schematische OPK-Darstellung und OPKs anhand von Gefrierbruch....	7
Abb. 4: Aufbau Aquaporin (Tani et al., 2014).....	7
Abb. 5: Materialprozessierung	22
Abb. 6: Doppellipidschicht mit E-face, P-face und Proteinen	25
Abb. 7: Schematische Darstellung eines eingedeckelten Objektträgers	33
Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskop.....	34
Abb. 9: Schlitzträger.....	35
Abb. 10: Lasermikroskop - Zeiss LSM 510 META	35
Abb. 11: Gefrierbruch GBM 627-13	40
Abb. 12: Gefrierbruch GBM 626-13	42
Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von AQP4: gesunder Cortex (Maus, A) im Vergleich zu frisch entnommenen GBM 627-13 (B) und GBM 626-13 (C).....	45
Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von AQP1 im humanen Plexus chorioideus im Vergleich zu GBM 627-13 und GBM 626-13 (frisch fixiert)	46
Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von AQP1 (grün) und AQP4 (rot) in GBM 627-13 und GBM 626-13 im Vergleich nach 2 Tagen in Kultur .	47
Abb. 16: UD627-13	49
Abb. 17: UD626-13	50
Abb. 18: Kultiviertes GBM 627-13 (A, B: GB C,D: UD)	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Astrozytome nach WHO 12

Tabelle 2: Explantatgewebe..... 15

Tabelle 3: Transportmedium für Explantatgewebe..... 15

Tabelle 4: Material für Zellkultur..... 16

Tabelle 5: Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente..... 16

Tabelle 6: Material und Puffer für die Immunhistologie 17

Tabelle 7: Auswahl der Antikörper 19

Tabelle 8: Material und Puffer für Ultradünnschnitte 20

Tabelle 9: Entparaffinierung und Demaskierung 27

Tabelle 10: Inkubierte Antikörper 28

Tabelle 11: Markierte Sekundärantikörper 28

Tabelle 12: Abfolge der Fixierung und Nachfixierung 30

Tabelle 13: Entwässerung und Einbettung des Gewebes..... 31

Tabelle 14: Vergleich der Gewebereihen GBM 627-13 und GBM 626-13 39

1 Einleitung

1.1 Historisches über die Bluthirnschranke

Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts weiß man um eine Art Schrankensystem im Gehirn, die sogenannte Bluthirnschranke (BHS), zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und der Homöostase.

Der deutsche Arzt und Chemiker Paul Ehrlich (1854-1915) gilt als einer der Wegbereiter der Chemotherapie und wird allgemein als Entdecker der Bluthirnschranke genannt. Ihm fiel, wenn auch eher zufällig, bei seiner Forschungsarbeit ein Zusammenhang zwischen dem Blutkreislaufsystem und dem Zentralnervensystem (ZNS) auf. Er injizierte eine an Serumalbumin gebundene kationische Vitalfärbung und zeigte, dass alle Organe durchgefärbt wurden außer dem Gehirn und dem Rückenmark [01]. Er nahm an, dass die Affinität des Stoffes ausschlaggebend sei, ob diese Substanz ins Gehirn gelangt oder nicht.

Edwin Goldmann verwendete Trypanblau und Isaminblau und zeigte ebenfalls, dass das ZNS bei parenteral gespritztem Farbstoff nicht durchgefärbt wird, jedoch aber bei direkter Injektion ins Rückenmark oder bei Injektion des Farbstoffs in den Liquor cerebrospinalis. Nur dann beobachtete er, dass das Rückenmark und das Gehirn sich anfärbten [02] (Abb. 1).

Damit war klar, dass es eine Barriere im Gehirn zwischen den Blutgefäßen und dem ZNS-Gewebe, sowie zwischen den Blutgefäßen und dem Liquorraum geben muss, nicht aber zwischen dem Liquorraum und dem ZNS.

Ähnliche Untersuchungen machte Lewandowsky 1900 mit Toxinen. Er konnte in seinen Tierversuchen mit Kaninchen und Hunden zeigen, dass Toxine weitaus stärker wirkten, wenn diese subarachnoidal injiziert wurden [03]. Dabei spritzte er Ferrozyannatrium in wechselnder Konzentration subarachnoidal und intravenös. Er stellte fest, dass die subarachnoidal gespritzte Injektion mit Ferrozyannatrium schwere pathologische Krankheitsbilder hervorrief, während bei intravenöser Gabe die Tiere die annähernd hundertfache Menge des Toxins

fast unbeschadet überstanden. Er nahm zudem an, dass nicht nur physikalische Eigenschaften wie die Korngröße des Stoffes, sondern auch die chemische Zusammensetzung für den Übertritt bestimmter Stoffe ins Gehirn zuständig sei. Nachdem diese Ergebnisse vorlagen, wurde ersichtlich, dass eine Art Schutz- und Regulationsmechanismus vorhanden sein muss, damit schädliche Substanzen nicht ohne weiteres ins Gehirn gelangen können.

Zu jener Zeit war die Funktion dieser „Schutzschranke“ nicht annähernd geklärt und bewiesen. Beim Versuch, dieses Phänomen zu beschreiben, machte Lewandowsky erstmalig Gebrauch vom Begriff „Barriere“. Dieser setzte sich durch und wird seither verwendet [1-3]. Die Lokalisation der BHS konnte aber erst viele Jahrzehnte später visuell mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen erfolgen [4]. Reese und Karnovsky konnten 1967 in Experimenten am Endothel von Hirnkapillaren feststellen, dass die Meerrettichperoxidase, welche wegen ihres Molekulargewichts von 40,000 sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch darzustellen war, interendothelial, aber nicht über Tight Junctions gelangte. Sie stellten auf diese Weise fest, dass das Endothel, morphologisch betrachtet, selbst die BHS darstellt und eine praktisch undurchdringliche Grenze zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf bildet [1]. Nahezu zeitgleich forschte Brightman mit Ferritin und Meerrettichperoxidase und zeigte ebenfalls, dass die intraventrikulär gespritzte Lösung die Ependymzellen passiert, aber vom Endothel gestoppt wird [5].

Die systematische Erforschung der Funktion der BHS geht auf Bradbury (1979) zurück. Er untermauerte die Annahme, dass die Hauptaufgabe der BHS darin besteht, die Homöostase im Gehirn aufrechtzuerhalten, und spezifische exogene und endogene Toxine vor dem Eindringen ins Gehirn zu verhindern [04].

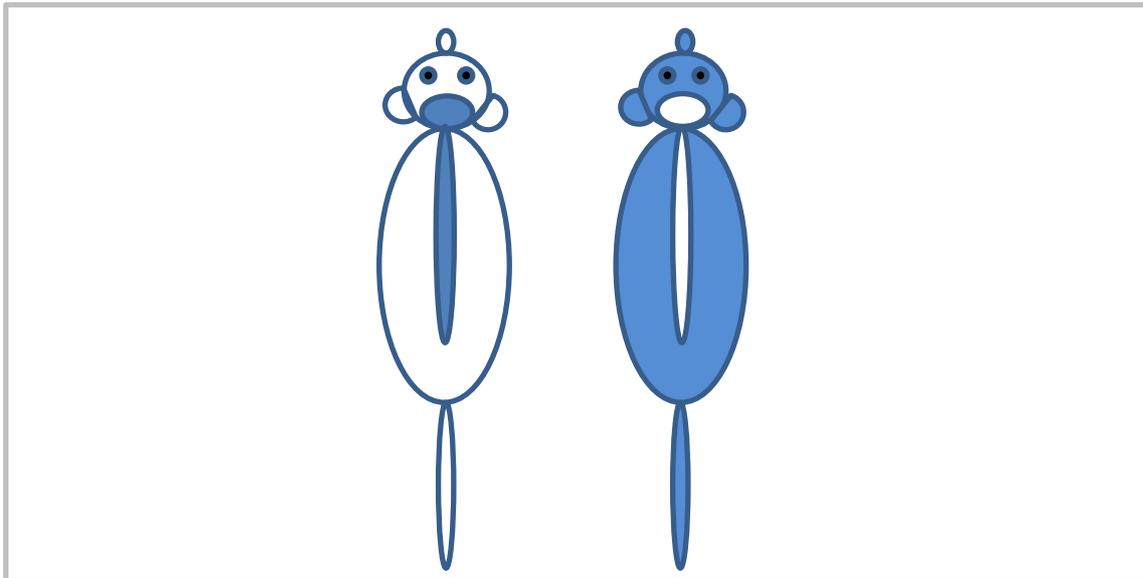


Abb. 1: Maus-Darstellung nach Goldmann

Abbildung 1:

vereinfachte, skizzenhafte Maus-Darstellung nach Goldmann, intrazerebrale Injektion von Trypanblau führt zur Färbung von ZNS (links), intravenöse Injektion durchfärbt das Körpergewebe (rechts) Original.

1.2 Aufbau und Funktion der BHS

Anders als in anderen Organen des Körpers muss das Gehirn vor freier Diffusion von Blutplasma geschützt werden, damit neurotoxische Substanzen nicht ungehindert eindringen können. Dieses Gleichgewicht bewegt sich durch die Limitation der Ausdehnungsfläche des knöchernen Schädels in sehr engen Grenzen. Neben der Funktion als Barriere muss die BHS sowohl den Abtransport von Stoffwechselprodukten als auch den Transport von Nährstoffen ins Gehirn sicherstellen, wie den Energie- und Sauerstoffbedarf. Zudem muss sichergestellt sein, dass sich die Ionenkonzentration, Hormone und Transmitter im Gleichgewicht befinden.

Strukturell betrachtet besteht die BHS aus Endothelzellen, welche von einer 50-150nm dicken Basallamina, bestehend aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen umfasst werden. Die Endothelzellen bilden spezielle Tight Junctions zur Zell-Zell-Verbindung aus. Sie sind primär für die Durchlässigkeit

verantwortlich und bilden zusammen mit den Astrozyten, Perizyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix die Neurovaskuläre Einheit [2,6]. Die Tight Junctions der BHS sind dichter als jene der peripheren Blutgefäße [4,7,8]. Occludin und die Claudine 1, 3 und 5 tauchen an der BHS auf [9] und dichten den apikalen Bereich zur abluminalen Seite ab. Sie sind mitbeteiligt an der Bildung dieser Tight Junctions. Einen genaueren Überblick der Unterteilung der Claudine und deren Auftauchen an der E-Face und an der P-Face anhand der Gefrierbruchtechnik geben Wolburg et al. [9] (siehe auch 2.2.2.1.).

An der Grenze von der apikalen zur abluminalen Seite findet die Kommunikation der neuronalen und vaskulären Seite statt und es wird sichergestellt, dass unter physiologisch gesunden Bedingungen die BHS im Gleichgewicht ist. Zwischen der neuronalen und der vaskulären Seite bilden die Astrozyten sogenannte Endfußstrukturen. Hauptsächlich dienen die Astrozyten der Neuronenversorgung mit Nährstoffen und der Aufrechterhaltung der Ionenkonzentration, ermöglichen aber auch eine freie Diffusion zwischen dem Endothel und dem Parenchym [10,11].

1.3 Aquaporine

Die Diffusion von Wassermolekülen ins Gehirn hinein und aus dem Gehirn hinaus wird über spezielle Kanal-Proteine geregelt. Möchte man der Erklärung für dieses „Wasserleitungssystem“ der Zellen in diesem Zusammenhang nachgehen, sind die sog. Aquaporine (AQP) zu untersuchen [12-15].

Da Wasser für alle Stoffwechselforgänge im Körper als Voraussetzung eines funktionierenden Organismus betrachtet wird und Menschen, Tiere und Pflanzen zum Großteil aus Wasser bestehen, rücken die Aquaporine in ein besonderes Licht. Wasser wird zwar ständig benötigt, soll aber nicht unkontrolliert in alle Richtungen fließen. Die Bedeutung der Aquaporine wird insbesondere vor dem Hintergrund deutlich, dass ein wesentlicher Unterschied

zwischen der diffusiven und kanalvermittelten Permeabilität für Wasser besteht [16-19].

Bereits in den 1920er Jahren ist erkannt worden, dass die Plasmamembran von Zellen durch eine Lipiddoppelschicht gebildet wird, durch die eine Diffusion von Wasser möglich sein muss. Dieser Prozess verläuft bidirektional und tritt mit niedriger Durchlässigkeit bei allen Zellmembranen auf. Die unterschiedliche Permeabilität von Zellen ist aber lange Zeit nicht erklärbar gewesen. Nach heutigem Wissensstand ist bekannt, dass es einen Unterschied zwischen Zellmembranen mit und ohne Aquaporine gibt. Zellmembranen, die Aquaporine enthalten, sind hochdurchlässig. Das ist charakteristisch für die Hochdurchlässigkeit für Wasser, da dies fast widerstandslos die Membranen passiert [12,13].

Der Wassertransport in Gewebe und Zellen dient der Homöostase sowie der Volumenregulation [20].

George Benga und seinen Mitarbeitern gelang es 1985, das erste Wasserkanalprotein in roten Blutzellen zu entdecken [21-23]. Im Jahr 1988 reinigte (isolierte) Peter Agre dieses Protein durch Zufall und konnte an der Membran roter Blutkörperchen einen Wassertransport beobachten [24,25].

Agre und seine Arbeitsgruppe stellten fest, dass das Aquaporin regulierend wirkt, und mit seinem bidirektionalen Mechanismus in beide Richtungen keine Energie verbraucht. Aquaporine sind also nicht nur einfache „Kanäle“ [26]. Sie benannten das neu-wiederentdeckte Wasserkanalprotein CHIP28. Ein Jahr später erhielt es den neuen Namen Aquaporin 1 [27].

Mittlerweile sind mindestens 13 Aquaporine bei Säugern beschrieben [28]. Acht an der Zahl sind als reine Aquaporine identifiziert und dienen dem Transport von Wasser. Aquaglyceroproteine können neben Wasser auch kleine organische Moleküle wie Harnstoff und Glycerol transportieren. Integriert in die Plasmamembran weisen sie eine Größe von ca. 30kDa auf und sind hydrophob [26]. Alle weisen eine annähernd ähnliche Aminosäuresequenz und Struktur auf [29]. Die Primärstruktur wird von 268 Aminosäuren gebildet. Diese

durchspannen als sechs α -Helices die Membran, daher der Begriff des integralen Membranproteins [30]. Schleifenartig verbinden sich die Helices über fünf sogenannte Loops (s. Abb.4, H1-H6) miteinander, welche wiederum den extrazellulären und zytoplasmatischen Eingang des Wasserkanalproteins bilden. Jeweils zwei der Loops formen über die Bildung je einer Halbpore einen Wasserkanal. Der porenartige Wasserkanal eines einzelnen AQP-Monomers wird über die Anordnung der Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin (s.Abb.:4 HB und HE) gebildet. Diese charakteristische Aminosäuresequenz ist für die Sanduhr-ähnliche Gestalt der Monomere verantwortlich [31-33]. In den Zellmembranen selber lagern sich jeweils vier der Aquaporin-Monomere, welche jeweils einen Wasserkanal im Zentrum haben, zu Tetrameren zusammen [26,30,34] (Abb. 2).

Das Außergewöhnliche einer bestimmten, besonders im ZNS vorkommenden AQP-Isoform, des AQP4, ist die Tatsache, dass sie mit der Methode der Gefrierbruchtechnik direkt im Elektronenmikroskop zu beobachten ist [35]. Kein anderes Aquaporin lässt sich so spezifisch rein morphologisch nachweisen (Abb. 3, und siehe unten).

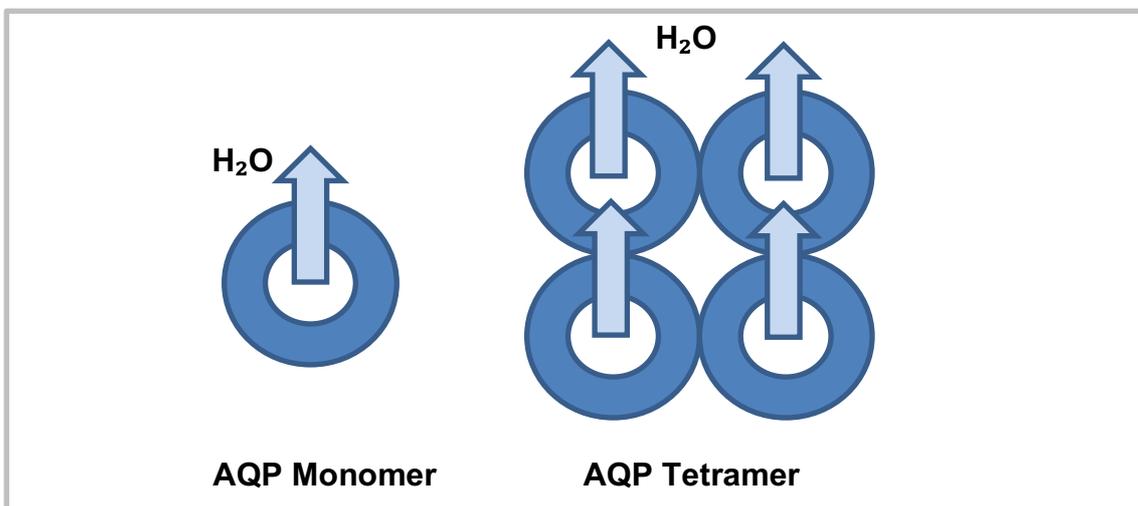


Abb. 2: Aquaporin Monomer und AQP Tetramer

Abbildung 2:

stark vereinfachte Darstellung eines Aquaporin Monomers und eines AQP Tetramers (Original)

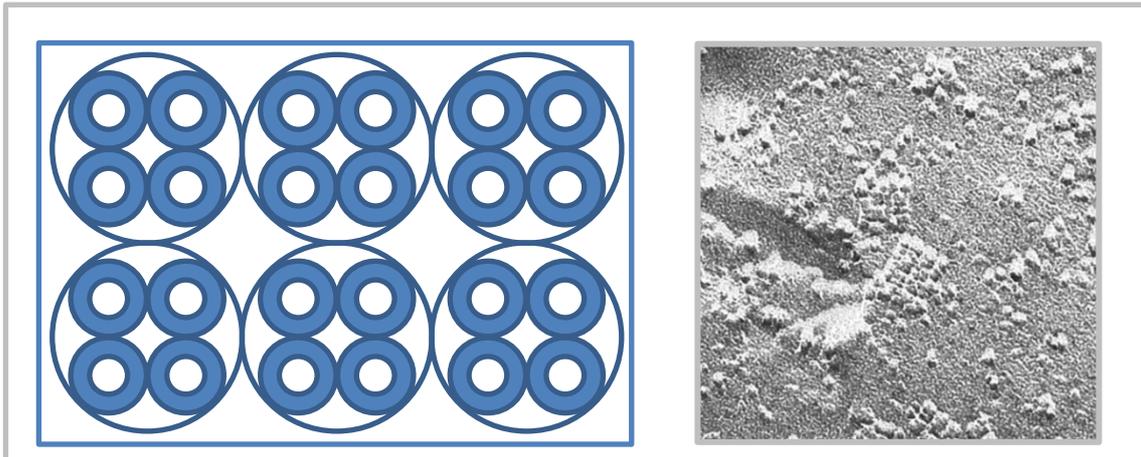


Abb. 3: Schematische OPK-Darstellung und OPKs anhand von Gefrierbruch

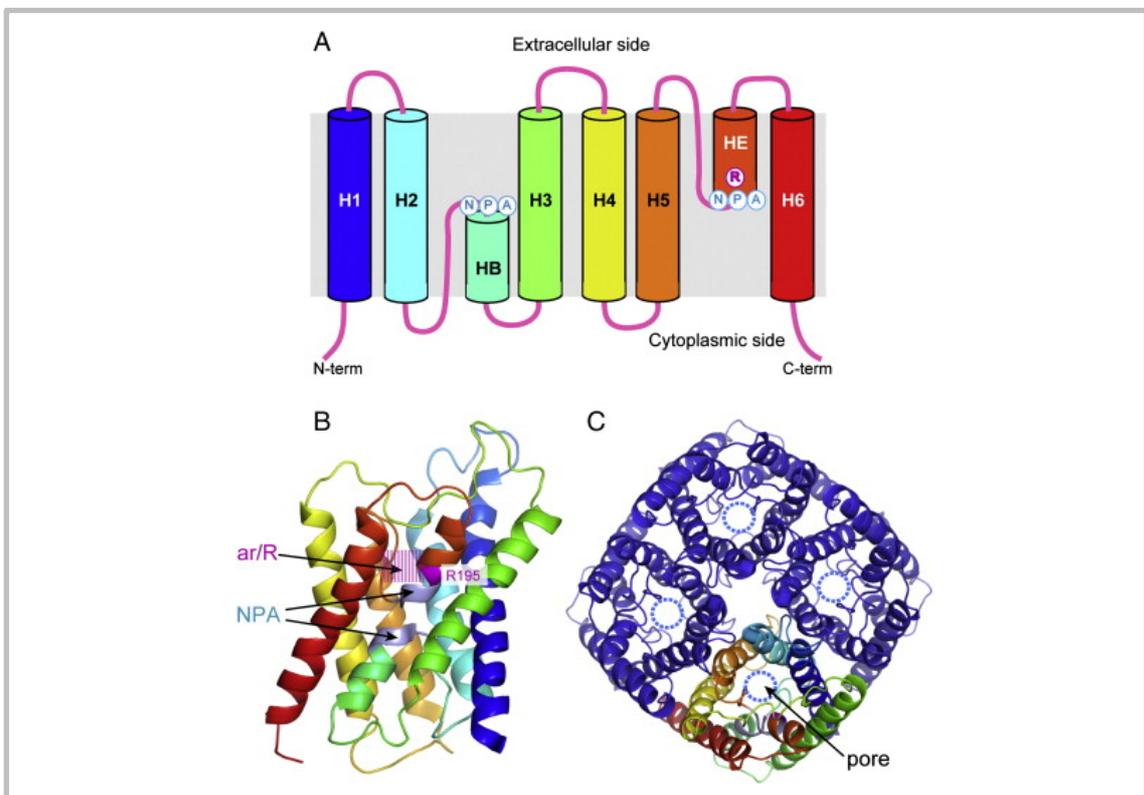


Abb. 4: Aufbau Aquaporin (Tani et al., 2014)

Abbildung 4:

A: Verbindung der einzelnen Helices

B: einzelnes Aquaporin (Monomer)

C: Aquaporin Anordnung als Tetramer

1.3.1 AQP1

Aquaporin 1 war der erste Wasserkanal und wurde an roten Blutkörperchen von George Benga und seiner Arbeitsgruppe im Jahre 1985 entdeckt [36]. Es besteht wie im Kapitel Aquaporine bereits erwähnt aus 268 Aminosäuren und wird an der gesunden BHS nicht exprimiert [3]. Dem kleinen transmembranösen Protein wird eine führende Rolle beim Wassertransport zugeschrieben.

Aquaporin1 ist am Epithel des Plexus choroideus nachzuweisen [37]. Dieses Gewebe im Inneren des Gehirns ist in erster Linie dafür zuständig, den Liquor cerebrospinalis, also das Kammerwasser, zu produzieren [38]. Ebenso am Korneaendothel und allen Gefäßendothelzellen, außer jedoch an den blutführenden Gefäßen im Gehirn [39]. Kobayashi et al. zeigten dies mithilfe von RT-PCR an Versuchen an frisch isoliertem Rattenhirn [40].

Im gesunden Gehirn wird kein AQP1 exprimiert [3], außer am Plexusepithel (s.o.), es wird aber neben der Zellmigration auch für die Tumorinvasion und Angiogenese verantwortlich gemacht [41,42]. An AQP1-Knockout Mäusen wurde die Bedeutung von AQP1 bei der Migration untersucht. Saadoun und seine Mitarbeiter zeigten, dass bei AQP1-Knockout Mäusen das Tumorwachstum verringert war und stellten eine reduzierte Vaskularisierung des Tumors fest. Zusätzlich zeigten sie, dass mit AQP1 transfizierte Zellen, die üblicherweise kein AQP1 besitzen, die Migration von nicht-endothelialen Zellen stimuliert wird [43]. Auch Hu und Verkman beschrieben in ihren in vitro-Zelllinien, dass eine AQP1-Expression mit einer beschleunigten Migration der Tumorzellen des Mäusemelanoms B16F10 und des Mammakarzinoms 4T1 einhergeht [42].

Gleichermaßen wird die Bildung von Ödemen im Gehirn mit einer Hochregulierung von AQP1 begleitet [44,45]. Trotz dieser Kenntnis weiß man jedoch noch wenig über den Mechanismus von AQP1 im normalen Gehirn [46]. Verkman und Mitra zeigten an Mäusen, dass diese ohne das Protein AQP1 phänotypisch normal zu sein schienen [47].

Die Hochregulierung von AQP1 unter pathologischen Veränderungen im Gehirn untermauert die Eignung als Target für viele Tumorerkrankungen [3,48,49].

Hu und Verkman untersuchten dies *in vitro* und konnten das in ihrer Arbeit mit transfizierten B16F10 und 4T1 Tumorzellen zeigen. Ihre Analyse ergab, dass die Wasserpermeabilität *in vitro* im Vergleich zum Kontrollgewebe um das Fünf- bis Zehnfache anstieg, wenn dieses mit AQP1 behandelt wurde [42]. In einer anderen Studie von Hindy et al. konnte anhand von humanem GBM Explantatgewebe *in vitro* ein Zusammenhang und eine Korrelation mit einer signifikanten Expression von AQP1 und der Malignität gezeigt werden [50]. Hayashi et al. zeigten einen erhöhten Verbrauch an Glucose und eine erhöhte Glykolyse in Gliomzellen [45].

1.3.2 AQP4

Nachdem die Hochregulierung und Verwendung von AQP1 als therapeutisches Target beschrieben wurde, soll nun auf die Hochregulierung von AQP4 im Gliom eingegangen werden [48,51].

Anders als AQP1 wird AQP4 auch im gesunden Gehirn exprimiert und tritt dort als Hauptwasserkanal auf. AQP4 ist hauptsächlich an den superficiellen und perivaskulären Astrozytenendfüßen nachzuweisen, welche die *Glia limitans superficialis et perivascularis* bilden [51,52].

Strukturell liegt AQP4 in zwei molekularen Subformen vor, der Isoform M23 und der Isoform M1. AQP4-M23 besteht aus 301 Aminosäuren und kommt in dreifach höherer Konzentration vor als die größere Isoform AQP4-M1 mit 323 Aminosäuren. AQP4-M23 ist gefrierbruchtechnisch sehr groß und bildet Cluster. M1 bildet kleine orthogonale Partikelkomplexe aus [31,53]. Werden beide Isoformen zusammen in Zellen transfiziert, bilden sich die klassischen orthogonalen Partikelkomplexe (OPKs) aus, die seit vielen Jahren gut bekannt sind und die denen der Astrozyten *in vivo* ähneln [53,54]. Verkman konnte zeigen, dass im Zentrum von OPKs hauptsächlich M23-Moleküle vorzufinden sind, während M1 um das Zentrum verteilt ist [55]. Die Isoform M23 bildet große OPKs aus und weist eine höhere Wasserdurchflussrate auf als Isoform M1 [53].

OPKs werden morphologisch als Äquivalent zu AQP4 betrachtet [56]. Allerdings soll der Vollständigkeit halber gesagt sein, dass AQP4 auch exprimiert sein kann, z.B. in niederen Vertebraten, ohne OPKs zu bilden. Aber wenn OPKs auftreten, ist davon auszugehen, dass es sich um das morphologische Äquivalent von AQP4 handelt.

Die Umverteilung von AQP4 steht zudem in Zusammenhang mit dem Dystrophin/ α - β Dystroglykankomplex, und den extrazellulären Matrixproteinen Laminin und Agrin [57,58]. Die Umverteilung von AQP4 geht mit einem Mangel an Agrin und einem Verlust von α -Dystroglykan einher [59]. Die Arbeitsgruppe um Amiry-Moghaddam stellte ebenso Beobachtungen mit α -Syntrophin an und beschrieb einen AQP4-Abfall in perivaskulären Endfusssmembranen, dafür aber eine deutliche Zunahme an Neuropil-nahen Membranen in Astrozyten der α -Syntrophin-Knockout Maus [60,61].

Es steht fest, dass es bei malignen Astrozytomen zu einer massiven Hochregulation der AQP4-Protein Expression kommt. Dieser Befund gilt ebenso sowohl für neoplastische Astrozyten als auch für reaktiv veränderte Astrozyten, die in der Peripherie von Tumoren lokalisiert sind [51].

Eine Hochregulation von AQP4 ist aber nicht nur auf Hirntumore beschränkt. Physikalische Traumata [62] oder fokale Ischämie [63] führen ebenfalls zu einer Hochregulation von AQP4 in den BHS geschädigten Regionen.

Bei den für diese Arbeit im Fokus stehenden Glioblastomen kommt es jedoch bei dieser Erkrankung zu einer Aufhebung der Polarität in den Astrozytenendfüßen bezüglich des Auftretens von OPKs. Normalerweise enthalten die Astrozyten-Endfußmembranen an der Oberfläche (*Glia limitans superficialis*) und an den Blutgefäßen (*Glia limitans perivaskularis*) die meisten OPKs. An den Stellen, wo der Astrozyt keinen Kontakt zur Extrazellulären Matrix (ECM) mehr hat, werden nur noch vereinzelt OPKs gefunden [64]. Dieser Verteilungsmodus wird als Polarität aufgefasst. Im Tumor bedeutet nun die Verringerung der Polarität, dass die Dichte der OPKs in gliomatösen

Membranen, die zu den Gefäßen gerichtet sind, nahezu gleich ist wie die Dichte der OPKs in Membranen, die nicht zu den Gefäßen gerichtet sind.

Inzwischen geht man davon aus, dass die Polarität der Astrozyten ursächlich mit der ECM zusammenhängt, die hauptsächlich aus Kollagenen, Elastin, Laminin, Fibronectin, Entaktin, Thrombospondin, und Proteoglykanen wie z.B. Agrin besteht. Der Verlust der Polarität lässt vermuten, dass dies die Entstehung von Ödemen im Tumorgebiet negativ begünstigen könnte, als auch verantwortlich für das Anschwellen von Gliomzellen zu sein scheint [51].

1.4 Das Gehirn im Ungleichgewicht

Bei pathologischen Prozessen wie Entzündungen der Hirnhäute, Traumata, Ödemen und Hirntumoren wird eine Veränderung der BHS beobachtet [11]. In höhergradigen Astrozytomen kommt es zur Hochregulation von AQP4-Protein im Vergleich zum gesunden Gehirn an der BHS [48,65] und gleichzeitig zu einer Reduktion der OPKs führt [66]. Im Gliom werden die Aquaporine AQP1, AQP4 und AQP9 nachgewiesen [3,43,51,59,67,68]. AQP4 wird im Falle eines Tumors hochreguliert und auf alle Zellen umverteilt, was mit einer Zunahme von Permeabilität einhergeht [51,65]. Die Umverteilung ist vermutlich ein Grund für das Anschwellen der Gliomzellen und die Entstehung von Ödemen im Tumorgebiet [44,51]. Im krankhaft veränderten Gehirn wird auch AQP1 hochreguliert und beschleunigt die Migration, was die Entstehung von Rezidiven begünstigen könnte [42,43,69].

Dennoch ist über Interaktion zwischen normaler Glia und Gliomzellen noch nichts Genaues bekannt [70].

1.4.1 Glioblastom

Kaum eine Erkrankung ist widerspenstiger und aussichtsloser zu bekämpfen als das Glioblastom [71]. Es gehört zur Gruppe der Astrozytome mit dem höchsten Malignitätsgrad [72].

Gehirntumore werden ihrer Zellart entsprechend in Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome unterteilt [05] und sind der Statistik zufolge über 75% astrozytären Ursprungs [73-75].

Einteilung	Bezeichnung
WHO Grad I	Pilozytisches Astrozytom
WHO Grad II	Fibrilläres Astrozytom, Protoplasmatisches Astrozytom, Gemistozytäres Astrozytom
WHO Grad III	Anaplastisches Astrozytom
WHO Grad IV	Glioblastom

Tabelle 1: Klassifikation der Astrozytome nach WHO

Obwohl ein Anstieg der Erkrankung in den letzten Jahren beschrieben wird und auch mögliche Faktoren, wie beispielsweise ionisierende Strahlung, chemische Karzinogene, Passivrauchen und andere, welche einen Ausbruch im negativen Sinne zu verstärken scheinen, ist der Ursprung weitgehend unklar [76].

Der bösartigste Tumor unter ihnen ist, wie bereits erwähnt das Glioblastom (GBM), welches zu 80% aller Fälle diagnostiziert wird und über die Hälfte der Neuerkrankungen ausmacht [77]. Das GBM gilt als primärer Tumor und wird nach der WHO als Klasse IV Tumor angesehen [78].

Primäre Tumoren entwickeln sich „ne novo“ aus hirneigenen Gliazellen und sind zu über 90% bei Patienten mit einem Durchschnittsalter von 55 Jahren vorzufinden. Sekundäre Tumoren bilden sich aus niedriggradigen Tumoren (z.B. Astrozytom WHO Grad II und III) [79]. Die Patienten mit sekundären Tumoren sind mit einem Durchschnittsalter von 40 Jahren jünger und liegen mit

einer etwas besseren, nämlich mittleren Überlebensrate über der mit an primärem GBM erkrankten Patienten [80]. Typische Kennzeichen eines primären Tumors sind die Überexpression des Wachstumsfaktors EGFR, spontane Mutationen von PTEN und ein Fehlen (der Verlust) des Chromosoms 10 [81]. Beim sekundären Tumor sind genetische Veränderungen häufiger anzutreffen, ebenso wie Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase-1 (IDH1), TP53 und das Fehlen von 19q [82]. Trotz des unterschiedlichen strukturellen Musters beider Gruppen und ihren pathologisch veränderten Genen konnte dennoch eine zuverlässige Differenzierung in der Charakterisierung der IDH1-Mutation vorgenommen werden [83].

Im Therapieansatz und Therapieerfolg sind keine bemerkenswerten Unterschiede zur Behandlung primärer oder sekundärer Glioblastome zu verzeichnen [79].

Als sogenannter Goldstandard wird nach wie vor eine dreifache Therapie durch Tumorresektion, Bestrahlungs- und Chemotherapie angestrebt [84-86]. Trotz Forschung und Fortschritt in der Medizin geht eine derartige Diagnose mit einer mittleren Überlebensrate von 12-15 Monaten einher [71,87]. In klinischen Studien scheiterten Versuche, das Wachstum des malignen Tumors durch Gabe von Medikamenten zu unterbinden, kläglich [88,89].

Letztendlich ist, wie schon erwähnt, die eingeschränkte Durchlässigkeit des Blut-Gehirn-Kreislaufes maßgeblich dafür verantwortlich, die regelrechte Funktion und Aufrechterhaltung der Homöostase durch den Schutz vor Eindringen neurotoxischer Substanzen zu gewährleisten [89,90]. Das invasive, schnelle Wachstum und die Entstehung von lebensbedrohlichen Hirnödemen führt zum Zusammenbruch der BHS [46].

Der Zusammenhang mit der Hochregulierung der Aquaporine 1 und 4 bei Tumoren drängt dazu den Fokus verstärkt auf in vivo- und in vitro-Modelle zu lenken und ist aufgrund des Schweregrads der Erkrankung dringend notwendig.

1.5 Aufgaben und Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu zeigen, ob anhand eines in vitro-Kultivierungssystems das Auftreten von OPKs in Kultur erhalten werden kann. Dabei wurden GBM-Resektate der WHO Klasse IV als Explantate kultiviert und anhand Gefrierbruch, Immunhistologie und Ultradünnschnitt untersucht. Es ist bereits bekannt, dass AQP4 sowohl im gesunden als auch im pathologischen Zustand exprimiert wird. Mit zunehmendem in vitro-Alter geht AQP4 jedoch in primären Tumorzellkulturen verloren [91,92]. Aufgrund der Umverteilung von AQP4 im krankhaft veränderten Gehirn liegt daher ein Fokus auf der Expression der Wasserkanäle AQP4 und damit verbunden die Ausprägung der OPKs in Kultur, welche AQP4 beinhalten. Neben der Umverteilung von AQP4 wird auch AQP1 im Tumor hochreguliert [44,48,51]. In dieser Arbeit soll anhand der Ergebnisse gezeigt werden, wie sich humanes Gliomgewebe sowohl unkultiviert als auch kultiviert verhält. Das Gewebe wurde frisch nach Entnahme, nach zwei und vier Tagen in Kultur, nach zwei und vier Wochen in Kultur, als auch bis zu 46 Tage in Kultur mittels Gefrierbruch, Immunhistologie und Ultradünnschnitt untersucht. Zukunftsziel soll es sein, anhand der Ergebnisse mehr Informationen zur Kultivierbarkeit von GBM-Gewebe zu erhalten, um damit eine Vorarbeit zu leisten, ein verbessertes vitro-Modell zur Untersuchung von Therapeutika zu etablieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Materialien und Stoffe sowie Herstellerangaben und Firmennamen tabellarisch dargestellt.

2.1.1 Explantatgewebe

Bezeichnung	Klassifizierung
GBM 626/13:	IDH, 1 neg.; MGMT neg, WHO IV
GBM 627/13:	IDH, 1 neg.; MGMT neg, WHO IV

Tabelle 2: Explantatgewebe

2.1.1.1 Transportmedium für Explantatgewebe

Material	Hersteller/Firma
DMEM, 25mM HEPES modification	Gibco by life technologies, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin 100000 units/ml Penicillin, 10000µm/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, P4333, Steinheim
Sterile Röhren, 50ml	Falcon Medical, Greiner, Frickenhausen

Tabelle 3: Transportmedium für Explantatgewebe

2.1.1.2 Herstellung des Transportmediums der Gewebeeplantate

Um ein Transportmedium für die Gewebeeplantate herzustellen, wurden 500ml DMEM mit 25mM HEPES + 1%Penicillin-Streptomycin gemischt und jeweils 25ml in 50ml Röhren aliquotiert und bei 4°C gelagert.

2.1.1.3 Zellkulturmedium

Material/Stoff	Hersteller/Firma
DMEM	Gibco by life technologies, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin 100000 units/ml Penicillin, 10000µm/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, P4333, Steinheim
FCS 10%	Lonza, Verviers, Belgien

Tabelle 4: Material für Zellkultur

2.1.2 Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente

Material/Stoff	Hersteller/Firma
Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg
Zellschaber	Fa. Corning, Bodenheim
Pioloform-Pulver	Fa. Wacker, Deutschland
Natriumhypochlorit 12%	Merck Chemicals, Darmstadt
Na-Cacodylat	Merck Chemicals, Darmstadt
Kupfernetzchen/Schlitzträger	Fa. Stork Veko, Eerbeek, Niederlande
HCl	Merck Chemicals, Darmstadt
Glycerol 30%	Merck Chemicals, Darmstadt
Glutaraldehyd 2,5%	Science Services, München

Tabelle 5: Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente

2.1.3 Material und Puffer für die Immunhistologie

Material/Stoff	Hersteller/Firma
Xylol	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 100%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 96%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 75%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
TBS-Puffer	(mehrere Hersteller, s. Rezept)
Citratpuffer	(mehrere Hersteller, s. Rezept)
Milliporewasser	-
Aqua dest.	-
Objektträger/SuperFrost	R.Langenbrinck, Emmendingen
Diluent	Zytomed, Berlin
Dapi	Zytomed, Berlin
Mowiol®	Merck Chemicals, Darmstadt
NaCl	Merck Chemicals, Darmstadt
CaCl	Merck Chemicals, Darmstadt
Zitronensäure	Merck Chemicals, Darmstadt
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tri-Na-Citrat Dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck Chemicals, Darmstadt
HCl	Merck Chemicals, Darmstadt
PFA 4,5%	Merck Chemicals, Darmstadt

Tabelle 6: Material und Puffer für die Immunhistologie

2.1.3.1 Herstellung der Pufferlösung TBS

Die zur Pufferung benötigte Tris Buffered Saline (TBS) wurde als Stammlösung angesetzt, welche dann als 3l Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde.

- 60,6g Trizma Base
- 88g NaCl
- 1,470g CaCl 2 x H²O
- 900ml in Aqua dest. lösen und mit 40ml konz. HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

2.1.3.2 Herstellung der Stammlösung Citratpuffer

Der zur Demaskierung der Antigene verwendete Citratpuffer wurde als Stammlösung mit einem pH von 6,0 wie folgt hergestellt:

- 29,4g tri-Na-Citrat Dihydrat in 850ml Aqua destillata lösen
- mit 0,1M Citronensäure auf pH 6,0 einstellen (2,1g/100ml)
- auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

1,2l der Stammlösung wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und erneut auf einen pH von 6,0 getestet.

2.1.3.3 Herstellung des Tris-Puffers

2,42g Tris wurden mit 100ml Aqua dest. vermischt und mit HCl auf einen pH von 9,5 eingestellt.

2.1.3.4 Auswahl der Antikörper

Antigen (AK)	Spezifität	Verdünnung	Hersteller/ Bezugsquelle
Primär Antikörper AQP1	monoklonal aus mouse	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg SC-32737
Primär Antikörper AQP4	polyklonal aus rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg SC-26812
Sekundär Antikörper	Cy™ 2 goat anti mouse	1:200	Fa.Dianova, Hamburg gαm 115-225-100
Sekundär Antikörper	Cy™ 3 goat anti rabbit	1:200	Fa.Dianova, Hamburg gαrab 111-165-144

Tabelle 7: Auswahl der Antikörper

2.1.3.5 Herstellung des Eindeckmediums Mowiol

2,4g Mowiol® 4-88 Reagent wurden in 6g Glycerin unter intensivem Rühren gelöst und 6ml Aqua dest. zugegeben. Im Anschluss wurde das Gemisch 2h stehen gelassen und 12ml 0,2M Tris-Puffer zugegeben. Die Mischung wurde 10-30 min im 50°C warmen Wasserbad gerührt und bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert.

2.1.4 Material und Puffer für Ultradünnschnitte

Material/Stoff	Hersteller/Firma
Glutaraldehyd 2,5%	Science Services, München
Na-Cacodylat	Merck KGaA, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Chem Pur, Karlsruhe
ETOH 50%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 80%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 96%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
ETOH 100%	VWR Prolab Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France
Aqua dest.	-
Miliporewasser	-
Propylenoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Renlam (für Araldit)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Araldite Hardener	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methylenblau	Merck Chemicals, Darmstadt
di-Natriumtetraborat	Merck Chemicals, Darmstadt
Perjodsäure	Merck Chemicals, Darmstadt
Azur II	Merck Chemicals, Darmstadt
Blei(II)-nitrat	Merck Chemicals, Darmstadt
Tri-Natrium-Dihydrat	Carls Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Tabelle 8: Material und Puffer für Ultradünnschnitte

2.1.4.1 Herstellung von Araldit

Das in der Arbeit verwendete, aus 3 Komponenten bestehende Kunstharz Araldit wurde in folgendem Mischungsverhältnis gleichmäßig vermengt und im Kühlschrank bis zum Gebrauch gelagert.

110g Renlam
+ 120g Araldit Hardener
+ 6,5g 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
= <u>Mischungsverhältnis für Araldit</u>

2.1.4.2 Herstellung der Richardsonlösung

Zum Färben der Semidünnschnitte wurde eine so genannte Richardsonlösung benötigt. Diese besteht aus einem Gemisch aus 2 Lösungen. Für Lösung A wurde 1%ige Perjodsäure in Aqua dest. (1g auf 100ml) mit 1%igem Azur II in Aqua dest. gelöst und vermischt. Lösung 2 wurde hergestellt aus 2g Methyleneblau, ebenso in 200ml Aqua dest. und durch Zufügen von 8g Na-Tetracarbonat hergestellt.

Für den Gebrauch der Lösung wurden Lösung 1 und 2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und verwendet.

2.1.4.3 Herstellung von Bleicitrat

Zur Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurden 1,33g Blei(II)-nitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) mit 1,76g Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) x H₂O und 30ml Aqua dest. in einen 50ml fassenden Messkolben vermischt und kräftig geschüttelt. Dem Gemisch wurden 8,0ml NaOH zugefügt und mit Aqua dest. aufgefüllt und auf einen pH von 12,0 eingestellt.

2.2 Methoden

In den Unterpunkten 2.2.1-2.2.4.1 folgt das methodische Vorgehen zur Untersuchung des verwendeten Gewebematerials.

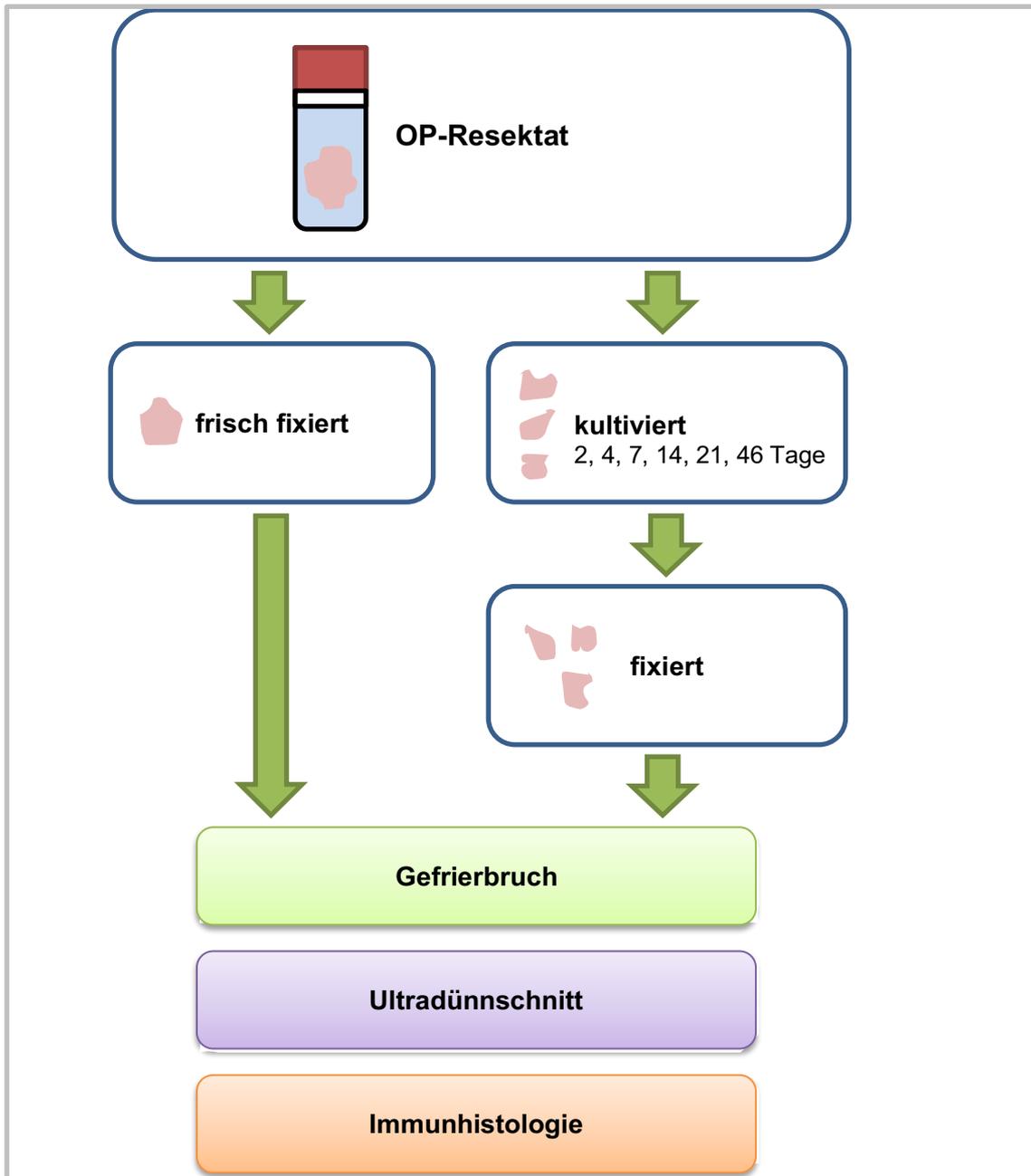


Abb. 5: Materialprozessierung

Abbildung 5:

Weg des Gewebes aus dem OP: frisches Material wurde fixiert und anhand der drei Methoden ausgewertet. Ebenso wurde das Gewebe kultiviert, dann fixiert und ausgewertet.

2.2.1 Gewinnung von Explantatgewebe

Unmittelbar nach der operativen Resektion von anonymisiert zu Forschungszwecken bereitgestellten Glioblastomen wurden die OP-Resektate in dafür vorgesehene Röhrchen mit Transportmedium (siehe 2.1.1.2) gelegt und in das Institut für Pathologie gebracht.

Alle verwendeten Lösungen und Transportbehältnisse waren dabei aseptisch und steril.

Ein Teil des gewonnenen Gewebes wurde unter sterilen Bedingungen frisch nach Entnahme für den Gefrierbruch, die Immunhistologie und die konventionelle Elektronenmikroskopie fixiert und zur weiteren Analyse vorbereitet.

Der andere Teil des entnommenen pathologischen Gewebematerials wurde in annähernd 5x5mm große Explantate zugeschnitten und in 6-well Platten zur Kultivierung ausgelegt (siehe Abb. 5).

Auf jedes zur Kultivierung vorgesehenen Glioblastomexplantat wurde jeweils 1 Tropfen FCS pipettiert und über Nacht im Brutschrank (Heracell™ von Heraeus, Hanau) inkubiert. Danach wurden die Explantate mit Kulturmedium geflutet und 2, 4 und 46 Tage und 1, 2 und 3 Wochen unter Standardbedingungen kultiviert. Nach den jeweiligen Kultivierungszeiten wurden die Explantate für die Elektronenmikroskopie und den Gefrierbruch mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert und weiterverarbeitet. Für die Immunhistologie wurden sie in 4,5% Paraformaldehyd fixiert. Die Kultivierung fand im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 100% Wassersättigung und 5% CO₂ statt.

2.2.2 Gefrierbruch

Die Gefrierbruchmethode wurde für diese Arbeit zur morphologischen Darstellung der OPKs eingesetzt, um die Architektur von Zellmembranen darzustellen.

Hierfür wurde das Gewebe mit 2,5% Glutaraldehyd für zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fixiert und im Anschluss bei 4°C in 0,1M Cacodylatpuffer (pH 7,4) gelagert.

Vor dem Brechen des Gewebes wurde dieses in 30% Glycerol inkubiert. Vom Gewebe wurden möglichst dünne Scheibchen abgeschnitten und zwischen zwei Goldplättchen (Durchmesser 3mm) schockgefroren.

Zum schnelleren Wärme-Kälte-Austausch erfolgte das Einfrieren in unterkühltem festem Stickstoff (-210°C).

Die Goldplättchen mit dem dazwischen eingefrorenen Gewebe wurden dann in die Balzers Gefrierbruch-Apparatur eingeschleust (BAF 400 D; BALZERS, FL Liechtenstein) und das Gewebe bei -150°C bei einem Vakuum von ca. 5×10^{-6} mbar gebrochen.

Darauf wurde das aufgebrochene Gewebe mit Platin (2nm) und Kohle (20nm) bedampft. Die Bedampfung mit Platin erfolgte dabei bei einem Winkel von 45°, mit Kohle bei einem Winkel von 90°.

Die dadurch entstandenen sogenannten Replikas wurden zuerst mit 12%-igem Natriumhypochlorit gereinigt, um restliches organisches Material zu entfernen, und dann mehrmals in destilliertem Wasser geschwenkt und gewaschen.

Die Replikas wurden auf mit Pioloform befilmte Kupfernetzchen aufgezogen, um am Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 8) EM 10, Zeiss, Oberkochen) die Auswertung des fixierten Gewebes vorzunehmen.

2.2.2.1 Auswertung der Replikas

Der Bruch verläuft entweder durch das Zellinnere oder genau zwischen der Doppelschicht der Membran. Bei einem Bruch durch die Doppelschicht werden die zwei Bruchflächen unterschieden.

Die P-face oder protoplasmatic fracture face ist sichtbar, wenn die äußere Membranhälfte weggebrochen wurde. Der Beobachter schaut von außen nach innen, auf die dem Cytoplasma angelagerte Membranhälfte. OPKs werden mit dieser Seite assoziiert.

Dagegen zeigt sich die E-face oder extraplasmatic fracture face dann, wenn das ganze Zytoplasma und die innere Membranhälfte weggebrochen wurden. Hier schaut der Beobachter aus der Zelle gegen die äußere, dem Extrazellulärraum zugewandte Membranhälfte. Die herausgebrochenen OPKs hinterlassen auf der E-face Abdrücke, so genannte Pits.

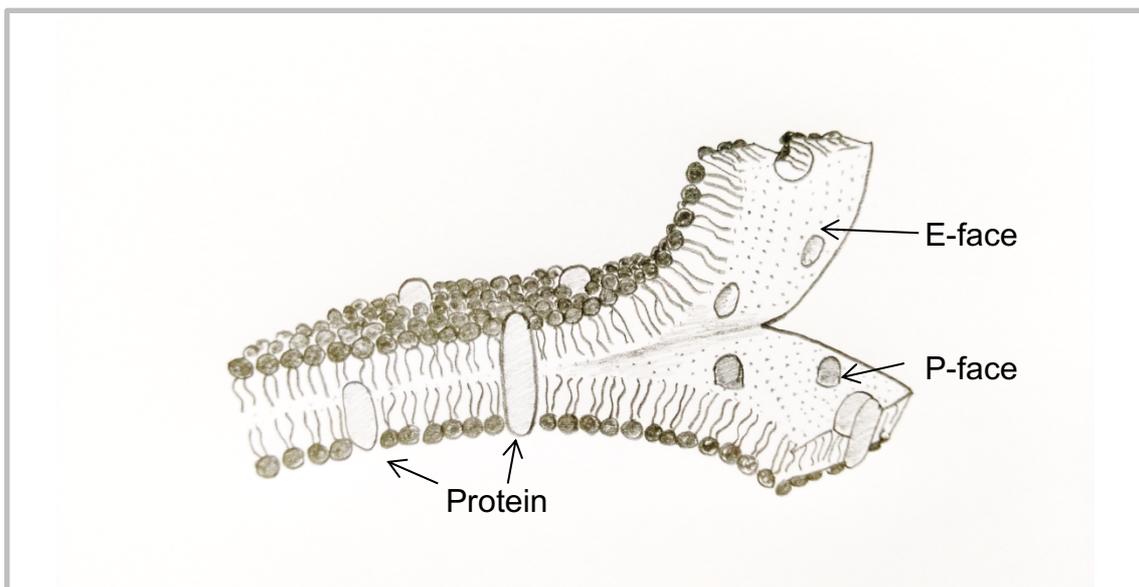


Abb. 6: Doppellipidschicht mit E-face, P-face und Proteinen

Abbildung 6:

Vereinfachte, skizzenhafte Darstellung einer Membran-Doppellipidschicht mit E-face, P-face und Proteinen (Zeichnung: S. Mitrovic)

2.2.3 Immunhistologie

Zur Untersuchung anhand der immunhistologischen Methode wurde das Gewebe wie in den Kapiteln 2.2.3.1–2.2.3.4 beschrieben fixiert und Paraffinschnitte zur Begutachtung und Auswertung angefertigt.

2.2.3.1 Fixierung und Einbettung der Explantatkultur

Die vorhandenen Gewebeproben wurden jeweils frisch, nach einem Tag, nach 4, 7, 11, 21 und 46 Tagen in Kultur in 4,5%igem Paraformaldehyd zur Untersuchung fixiert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet.

2.2.3.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die fertigen Paraffinblöcke wurden gekühlt und am Mikrotom in 3,5µm dicke Schnitte geteilt und auf silanisierte Glasobjektträger gebracht. Dabei wurde der Paraffinblock eingespannt und mit einem Messer im Wasserbad bei 46°C gestreckt und zum Trocknen über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.2.3.3 Entparaffinierung und Demaskierung

Der Entparaffinierung ging die Trocknung im Brutschrank bei 35°C voraus, mit welcher verhindert wurde, dass sich das Gewebe von dem Objektträger löst. Der Ablauf der Weiterbehandlung (Entparaffinierung, Demaskierung und Antikörper auftragen) wird in der Tabelle 9 beschrieben:

Material und Zeitangabe	Verfahren
3 x 5 min Xylol	Entparaffinierung
2 x 5 min ETOH 100%	
2 x 5 min ETOH 96%	
2 x 5 min ETOH 75%	
3 x 5 min TBS (unter Bewegung)	Pufferung
1 x 4 min Citratpuffer (in Wasserschnekkochtopf)	Demaskierung
Aqua dest.	Spülung
Eis > 20min	Kühlung
3 x 5min TBS (unter Bewegung)	Pufferung
Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit	Trocknung

Tabelle 9: Entparaffinierung und Demaskierung

2.2.3.4 Markierung mit Antikörpern

Im Anschluss an das oben beschriebene Procedere wurden die Antikörper nach Herstellerangaben mit Antibody-Diluent verdünnt.

Es erfolgte zunächst eine Markierung mit 100µl des Primärantikörpers sowie eine Negativkontrolle mit Diluent ohne Antikörper. Diese wurden dann bei 4°C über Nacht in Dunkelheit inkubiert (s.Tabelle 10 und Abb. 7).

Antikörper/Material	Verfahren/ Menge pro Objektträger
Primärantikörper AQP 1 + Diluent	1:100, 100µl
ohne AQP1 + Diluent	100µl
Primärantikörper AQP 4 + Diluent	1:100, 100µl
ohne AQP4 + Diluent	100µl

Tabelle 10: Inkubierte Antikörper

Die Markierung mit dem Sekundärantikörper erfolgte am nächsten Tag (s.Tabelle 11):

Antikörper/Material	Verfahren/ Menge pro Objektträger
3 x 10 min TBS	Pufferung
Sekundärantikörper Goat-anti-mouse Cy™ 2	Markierung, 1:200, 100µl
Sekundär Antikörper AQP4 Goat-anti-rabbit Cy™ 3	Markierung, 1:200, 100µl
1 h	Inkubation im Dunkeln
3 x 5 min TBS	Pufferung
Mowiol® (+ Deckglas)	Eindeckeln

Tabelle 11: Markierte Sekundärantikörper

Zur Auswertung am konfokalen Lasermikroskop (Abb. 10, Zeiss LSM 510 META, Oberkochen, Deutschland) wurden die Zellen mit einem HeNe-Laser (Excitation bei 543nm mit 40x Vergrößerung) betrachtet und die Fluoreszenzmarkierung dargestellt.

2.2.4 Anfertigen der Färbung von Kontrollhirngewebe

Bei dem humanen Kontrollhirngewebe handelt es sich um ein Subependymom mit Plexusepithel-Anschnitt. Der Plexus dient in diesem Falle der Kontrolle der AQP1 Expression im Gesunden. Die AQP1 Markierung des Kontrollhirns wurde mit dem Histologie Kit CINtec® Histology Kit der Firma Roche durchgeführt. Dieses gebrauchsfertige Visualisierungsreagenz besteht auf Basis eines Polymer-Reagenzes mit konjugierter Meerrettichperoxidase und goat-anti-mouse Antikörperfragmenten. Die Chromogen-Reaktion basiert auf der Meerrettich-Peroxidase-vermittelten Umwandlung eines DAB-Chromogens an denjenigen Stellen, an denen sich das Antigen befindet (Zitat entnommen aus Gebrauchsanweisung CINtec Histology/Roche). Da bekannt ist, dass AQP4 im GBM hochreguliert ist, wurde keine zusätzliche Kontrolle für AQP4 gemacht [93].

2.2.5 Konventionelle Elektronenmikroskopie

Um die Ultrastruktur der Explantate zu untersuchen, wurde das Präparationsverfahren für die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet. Dieses Verfahren beinhaltet Fixierung, Einbettung und Ultradünnschnittschneidetechnik. Das Gewebe wurde dabei mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert und entwässert und in Kunstharz (Araldit) eingebettet. Das in Araldit eingebettete Gewebe wurde anhand eines Ultra-Mikrotoms (Ultracut von Leica, Wetzlar) in Ultradünnschnitte von ca. 50-70nm geschnitten. Der Ablauf der Fixierung und Entwässerung wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.2.5.1 Fixierung und Nachfixierung des Gewebes

Ein Teil der OP-Resektate wurde unmittelbar nach Entnahme in gepuffertem 2,5% Glutaraldehyd vorfixiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Im Anschluss daran wurden die Präparate in Cacodylatpuffer überführt (s. Tabelle 12).

Material und Zeitangabe	Verfahren
2,5% Glutaraldehyd (gepuffert) 1-3h (bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Kühlschrank)	Vorfixierung
2 x 30 min Cacodylatpuffer (pH 7,4)	Pufferung
1-2h Cacodylatpuffer (pH 7,4) + 1% Osmiumtetroxid (Stammlösung 2% in Aqua dest.)	Nachfixierung
30 min 1mol Cacodylatpuffer (pH 7,4)	Pufferung
30 min 50% ETOH unvergällt	Entwässerung
Gesättigtes filtriertes Uranylacetat in 70% ETOH (über Nacht im Dunkeln)	Kontrastierung

Tabelle 12: Abfolge der Fixierung und Nachfixierung

2.2.5.2 Entwässerung und Einbettung des Gewebes

Es folgte die Entwässerung und Einbettung des Gewebes am zweiten Tag wie anhand Tabelle 13 dargestellt:

Material und Zeitangabe	Verfahren
1.Tag	
2 x 30min 50% ETOH unvergällt	Entwässerung
Gesättigtes, filtriertes Uranylacetat in 70% ETOH (über Nacht im Dunkeln)	Kontrastierung
2.Tag	
1 x 30 min 80% ETOH	Entwässerung
1 x 30 min 96% ETOH	
2 x 30min 100% ETOH	
1 x 20 min Propylenoxid	Intermedium
1 x 45-60 min Propylenoxid/Araldit 1:1	Infiltration
1 x 45-60 min Propylenoxid/Araldit 1:3	Infiltration
Reines Araldit	in Formen gießen
Gewebepräparat	einlegen und ausrichten
Weiterer Verlauf	
2 Tage bei 60° im Brutschrank	Auspolymerisation

Tabelle 13: Entwässerung und Einbettung des Gewebes

2.2.5.3 Herstellung von Semidünnschnitten

Der Semidünnschnitt wurde zur Orientierung hergestellt, um den gewünschten Bereich des Gewebes zu erfassen. Die auspolymerisierten Aralditblöcke wurden mit einer Fräse (Ultratrimm / Leica) weiterbearbeitet. Dabei wurde überschüssiges Araldit sowohl über als auch neben dem Gewebe weggefräst und die Schnittfläche des Blocks so auf eine für Semidünnschnitte sinnvolle Größe gebracht. Der gefräste Aralditblock wurde dann mit einem Glasmesser am Ultracut-Mikrotom in ca. 0,4µm dicke Schnitte geschnitten. Auf einen Glasobjektträger wurden 1-2 Tropfen Aqua bidest. aufgetragen und die Schnitte mit einem feinen Pinsel vom Wassertrog des Messers in den Tropfen übertragen. Zum Trocknen wurde der Objektträger bei 80°C auf eine Wärmeplatte gelegt. Die getrockneten Schnitte wurden mit einer gefilterten Richardson Lösung benetzt und 2 min. lang eingefärbt. Die Färbelösung wurde mit Leitungswasser abgespült und erneut getrocknet.

2.2.5.4 Herstellung von Ultradünnschnitten

Nach der Übersicht anhand des Semidünnschnitts zur Bestimmung der ROI (regions of interest) erfolgte das Trimmen des Aralditblocks. Die Schnittfläche des Gewebeblocks wurde mit einer Rasierklinge kleiner zugeschnitten (getrimmt). Im Anschluss wurde der gefräste und kleingetrimmte Aralditblock mithilfe eines Diamantmessers (Diatome, Science Services, München) in ultradünne Scheiben (50-70nm) geschnitten und mit einer Wimper auf mit Pioloform befilmte sogenannte Schlitzträger aus Kupfer aufgezogen und getrocknet.

Diese wurden dann in Petrischalen zur Kontrastierung gelagert. Die Schlitzträger (Abb. 9) wurden für ca. 10min auf die mit Parafilm und einem Bleizitratropfen vorbereiteten Petrischalen gelegt, anschließend mit Aqua bidest. abgespült und danach getrocknet. Die Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 8: EM 10, Zeiss, Oberkochen).

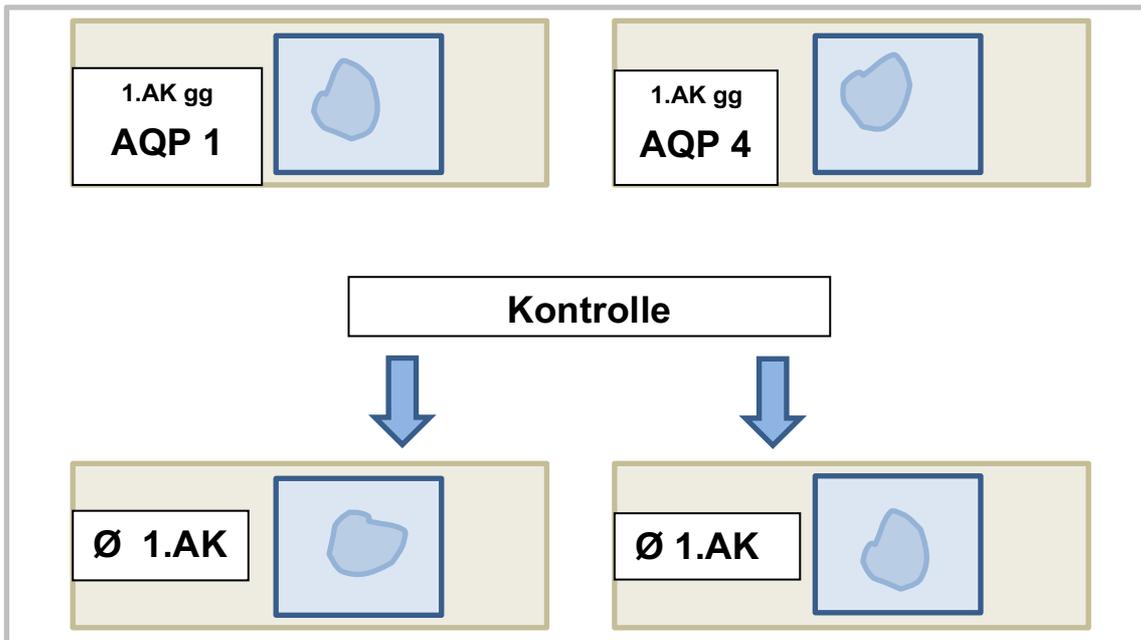


Abb. 7: Schematische Darstellung eines eingedeckelten Objektträgers

Abbildung 7:

Schematisch dargestellter Objektträger mit einem eingedeckelten Gewebestückchen und Deckglas, mit und ohne Antikörper zur Auswertung am konfokalen Lasermikroskop.



Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskop

Abbildung 8:

Transmissionselektronenmikroskop EM10 (Zeiss) am Institut für Pathologie und Neuropathologie, Tübingen
(mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pathologie und Neuropathologie, Tübingen)

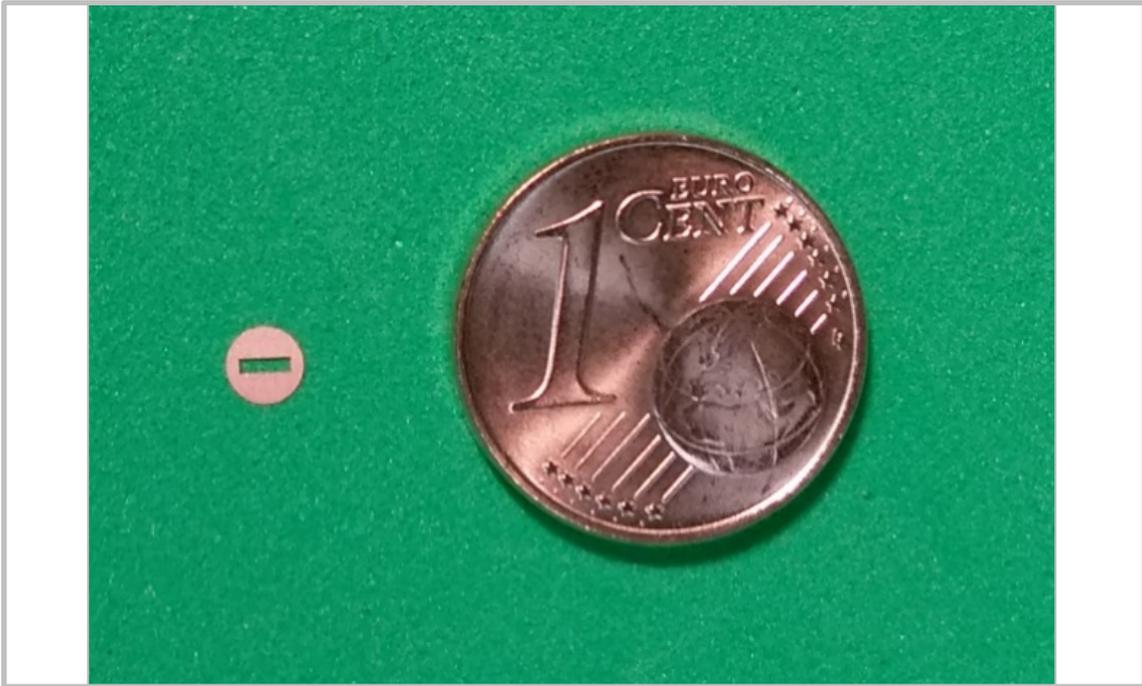


Abb. 9: Schlitzträger

Abbildung 9:
Schlitzträger (links) im Größenverhältnis zu einem 1-Eurocent Geldstück.



Abb. 10: Lasermikroskop - Zeiss LSM 510 META

Abbildung 10:
konfokales Lasermikroskop Zeiss LSM 510 META, Oberkochen, Deutschland
(Entnommen aus: Zeiss.com, product portfolio microscopes)

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde Gliomgewebe, welches aus dem OP gewonnen und anonymisiert zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurde, kultiviert. Bei den zur Untersuchung herangezogenen Gewebereihen handelte es sich um zwei Klasse IV Tumore nach WHO Klassifizierung (die genaue Bezeichnung des für diese Arbeit benutzten Gewebes: GBM 626-13 und GBM 627-13). Diese wurden jeweils als OP-Resektat in Transportmedium geliefert und je nach geplanter Untersuchungsmethode weiterbehandelt. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben und die Gewebereihen miteinander verglichen.

Der Zustand der GBM-Explantate wurde frisch nach Entnahme, nach 2 und 4 Tagen, nach 2 und 3 Wochen, sowie bis zu 46 Tagen in Kultur beurteilt. Die Untersuchung des explantierten, kultivierten und fixierten Gewebes fand sowohl durch Gefrierbruch zur morphologischen Identifikation der gliomatösen Zellmembranen als auch durch Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis von AQP4 und AQP1 und an Ultradünnschnitten zur elektronenmikroskopischen Auswertung der Ultrastruktur statt.

Ziel der Arbeit war es, Hinweise darauf zu bekommen, wie sich pathologisch verändertes Gliomgewebe in Kultur verhält und ob die Ergebnisse dieser Vorarbeit Weichen stellen können zur Etablierung eines Explantatkultursystems. Primär galt es herauszufinden, ob OPKs, welche als morphologisches Äquivalent zu AQP4 anzusehen sind, in Kultur gehalten werden können oder nicht. Dies wurde mittels Gefrierbruchtechnik untersucht. Ebenso stellte sich die Frage, ob die OPKs sich in Kultur verändern. Immunhistologisch wurde analysiert, ob AQP4 und AQP1 in Explantatkulturen exprimiert werden und ob sie sich abhängig von der Kultivierungszeit verändern. Von besonderem Interesse war es demnach zu erfahren, ob und wie lange AQP4 in Kultur exprimiert wird. AQP1 in Kultur zu halten, interessierte insofern, als dass dieses an der gesunden BHS nicht vorhanden ist. Neben dem Erhalt der OPKs in Kultur und der Expression von AQP4 und AQP1 wurde

auch die Ultrastruktur des Gewebes sowohl frisch nach Entnahme als auch kultiviert untersucht. Dies wurde anhand elektronenmikroskopischer Analyse von Ultradünnschnitten begutachtet.

3.1 Gefrierbruchanalyse des frischen und kultivierten GBM-Gewebes zum Nachweis von OPKs

Nach Untersuchung der Gewebereihe des Explantats mit der Bezeichnung GBM 627-13 lassen sich am unkultivierten und frisch nach Entnahme fixierten Gewebe auf der P-face der Membran deutlich OPKs, Hypoxiecluster und einzelne Intramembranpartikel beobachten (Abb.11, A).

Nach zwei Tagen in Kultur ist zu erkennen, dass die Membranarchitektur morphologisch intakt bleibt und OPKs und Intramembranpartikel weiterhin deutlich zu sehen sind (Abb. 11, B). Interessanterweise sind nun keine Hypoxiecluster erkennbar, wie auch zu allen weiteren Kultivierungszeitpunkten. Nach weiteren zwei Tagen zeigt die untersuchte Membran noch immer OPKs und einzelne Intramembranpartikel (Abb. 11, C). Zwei und vier Wochen später (Abb.6, D und E), aber auch noch nach 46 Tagen in Kultur (Abb. 11, F), weist die Membranarchitektur keine morphologischen Veränderungen auf. Zu jedem Kultivierungszeitpunkt sind hervorragend erhaltene OPKs in ihrer für GBMs typischen Anordnung zu beobachten. Die OPKs im frisch isolierten GBM sind anders ausgeprägt, als am gesunden Endfuß. Sie kommen in geringerer Anzahl vor und bilden teilweise Hypoxiecluster. Die OPKs im GBM ähneln eher denen an der parenchymalen Astrozytenmembran.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu jedem Kultivierungszeitraum OPKs zu erkennen sind und kein Hinweis auf einen Unterschied der Membranbeschaffenheit in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit zu beobachten ist im Vergleich zu frisch entnommenem GBM-Resektat (Tabelle 13).

Die Analyse der Gewebereihe GBM 626-13 dagegen lässt am frisch entnommenen, fixierten Gewebe keine OPKs erkennen. Zu sehen sind lediglich

Intramembranpartikel (Abb.12, A). Auch nach zwei Tagen in Kultur lassen sich keine OPKs finden (Abb. 12, B). Nach vier Tagen (Abb.12, C) sowie nach zwei (Abb.12 D) und vier Wochen (Abb.12, F) sind ebenfalls keine OPKs zu sehen. Es lassen sich vereinzelte Intramembranpartikel zu jedem Kultivierungszeitpunkt erkennen, aber keine typischen OPKs (Abb. 12, A-E).

Die P-face von frisch kultiviertem Gewebe des GBM 626-13 weist keinen erkennbaren Unterschied zur Membranstruktur nach drei Wochen (Abb. 12, E) auf.

Im zeitlichen Vergleich beider Gewebereihen zeigen sich Unterschiede in Bezug auf die Bildung von OPKs. So verändert sich die Membranarchitektur folgendermaßen:

Einzelne Intramembranpartikel sind in beiden Gewebereihen nachzuweisen. Jedoch findet man charakteristische OPKs anhaltend nur in der Gewebereihe GBM 627-13. Hier sind OPKs von Beginn an schon in frischem Zustand neben Intramembranpartikeln zu beobachten. In jeder Phase der aufsteigenden Kultivierungszeit von zwei und vier Tagen, zwei und drei Wochen und nach 46 Tagen sind OPKs deutlich zu erkennen (Abb. 11, GBM 627-13).

In Gewebereihe GBM 626-13 fehlen OPKs frisch nach Entnahme ebenso wie in kultiviertem Zustand nach zwei und vier Tagen wie auch nach zwei und drei Wochen in Kultur. Das GBM 626-13 wurde im vorliegenden Fall nicht nach 46 Tagen untersucht.

Gewebe- reihe	GBM 627-13			GBM 626-13		
	IMP	OPKs	Hypoxie- cluster	IMP	OPKs	Hypoxie- cluster
Frisch	✓	✓	✓	✓	✗	✗
2d	✓	✓	✗	✓	✗	✗
4d	✓	✓	✗	✓	✗	✗
2we	✓	✓	✗	✓	✗	✗
4we	✓	✓	✗	✓	✗	✗
46d	✓	✓	✗			

✓ = vorhanden ✗ = nicht vorhanden

Tabelle 14: Vergleich der Gewebereihen GBM 627-13 und GBM 626-13

Die Tabelle 14 ist die Vergleichsdarstellung der Untersuchungsergebnisse auf Intramembranpartikel und OPKs der Gewebereihen GB 627-13 und GBM 626-13. Dabei wurde bei GBM 626-13 der Zustand nach 46 Tagen nicht untersucht.

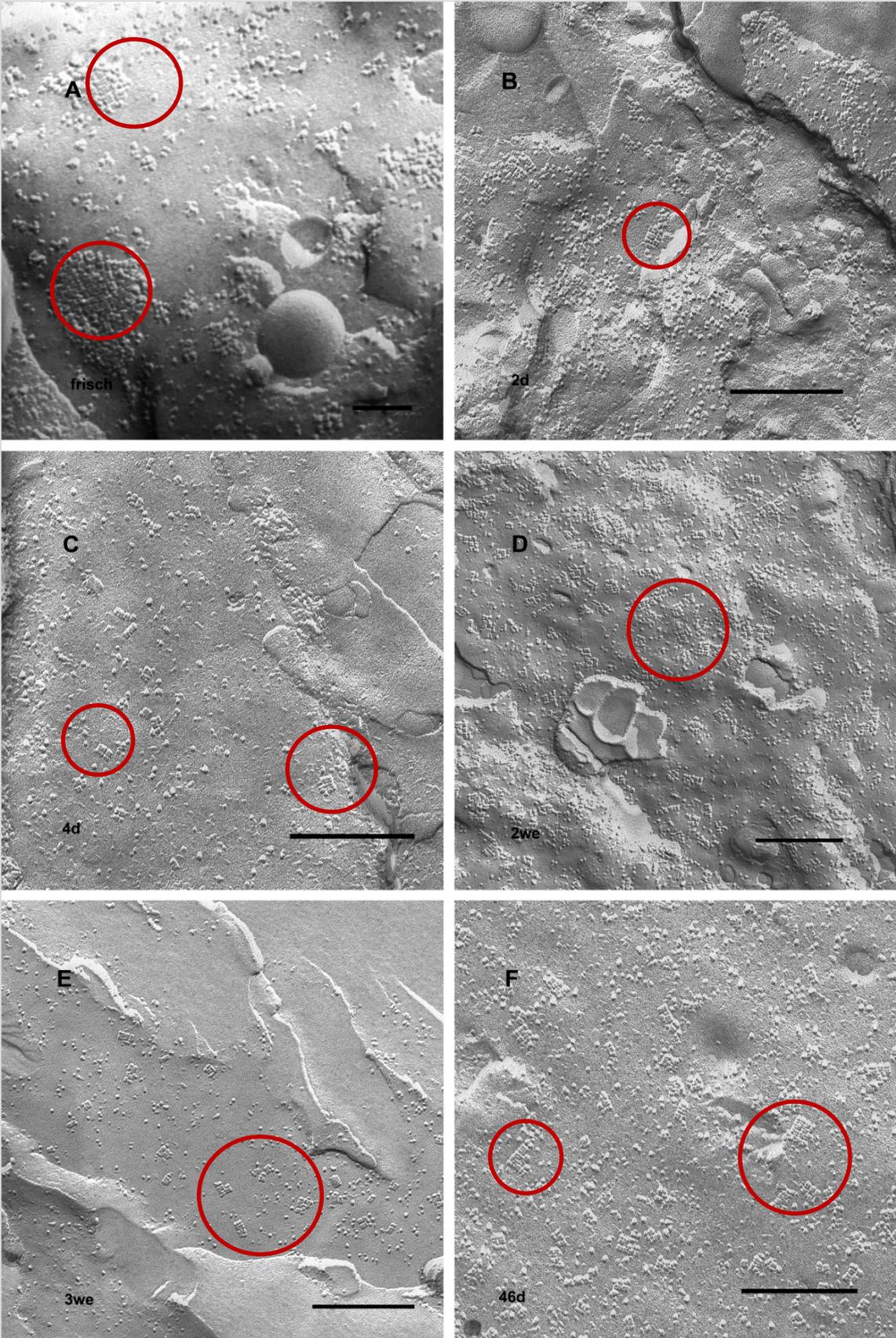


Abb. 11: Gefrierbruch GBM 627-13

Abbildung 11:

A-F zeigt Gefrierbrüche von GBM 627-13

A: frisch nach Entnahme, OPKs, Hypoxiecluster

B: 2 Tage in Kultur, gute Membranarchitektur mit vielen OPKs

C: 4 Tage in Kultur, OPKs

D: 2 Wochen in Kultur, OPKs

E: 3 Wochen in Kultur, OPKs F: 46 Tage in Kultur, OPKs

(Die Scalebar A-F der Abb. 11 entspricht 250nm)

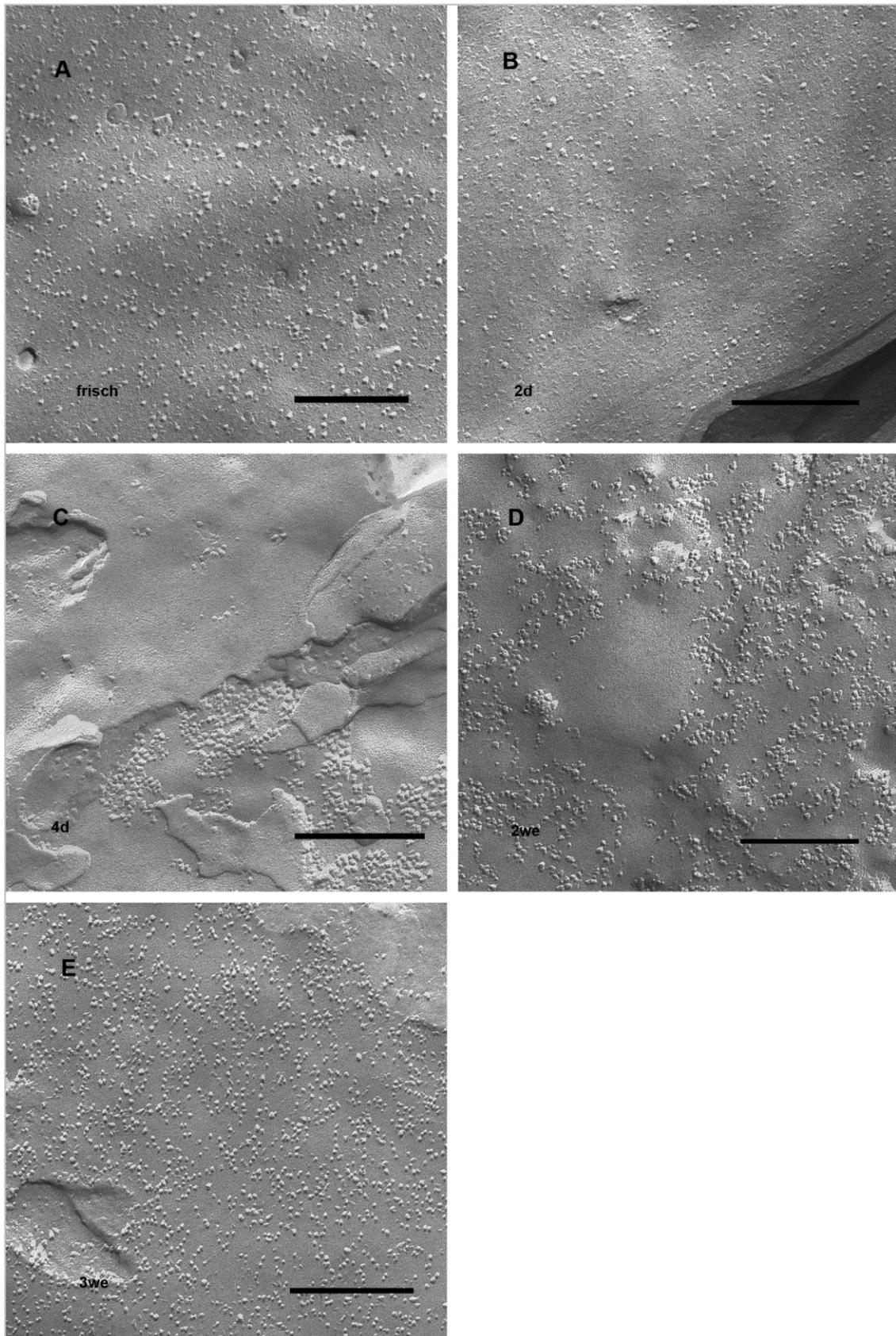


Abb. 12: Gefrierbruch GBM 626-13

Abbildung 12:

A-E zeigt Gefrierbrüche von Glioblastomgewebe (GBM 626-13)

A: frisch isoliertes GBM nach Entnahme, keine OPKs, Intramembranpartikel

B: 2 Tage in Kultur, ebenfalls keine OPKs, Intramembranpartikel

C: 4 Tage in Kultur, keine OPKs, Intramembranpartikel

D: 2 Wochen in Kultur, keine OPKs, Intramembranpartikel

E: 3 Wochen in Kultur, keine OPKs, Intramembranpartikel

(Die Scalebar A-E in Abb. 12 entspricht 250nm)

3.2 AQP1- und AQP4-Expression anhand Fluoreszenzmikroskopie

Das Glioblastomgewebe der beiden Gewebereihen (GBM 627-13 und GBM 626-13) wurde nach entsprechender Vorbereitung immunhistologisch untersucht.

Mithilfe der Immunfluoreszenzmarkierung durch Antikörper wurde die Verteilung von AQP4 und AQP1 sichtbar gemacht. Das GBM-Gewebe wurde einerseits sofort frisch nach Entnahme mit Paraformalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Ein zweiter Teil wurde erst nach zwei und vier Tagen und nach zwei und drei Wochen in Kultur fixiert, eingebettet und zur Auswertung vorbereitet. Die Paraffinschnitte wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, mit Antikörpern zum einen gegen AQP4 und zum anderen gegen AQP1 markiert und miteinander verglichen. Da bei 627/13 OPKs anhand des Gefrierbruchs nachzuweisen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass hier AQP4 analog anhand der Immunfluoreszenztechnik ebenso sichtbar gemacht werden kann. Diese Annahme wurde bestätigt. Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist bekannt, dass im Tumor AQP1 hochreguliert wird. Daher lag es nahe, dass auch in den GBM-Explantaten AQP1 nachzuweisen ist. Auch dies wurde teilweise bestätigt, wie im Folgenden beschrieben wird.

Anhand der Untersuchung beider Gewebereihen konnte das Auftreten von AQP4 und AQP1 in Kultur nachgewiesen werden. Das GBM 627-13 zeigt im Vergleich zum gesunden Cortex der Maus (Abb.13, A), wo AQP4 deutlich an der Oberfläche des Cortex (superfiziell) und entlang der Gefäßwände

(perivaskulär) markiert ist, eine klare Umverteilung von AQP4 (Abb.13, B). An den Gefäßwänden ist hier keine Immunfluoreszenzfärbung zu sehen.

Auch im GBM 626-13 wird AQP4, wenn auch leicht schwächer, exprimiert (Abb.13, C) und auch hier ist es umverteilt und nicht polarisiert an den Gefäßwänden zu finden.

Die Expression von AQP1 zeigt sich beim Vergleich von humanem Plexusepithel (PE) mit GBM 627-13 und GBM 626-13, nur am Randbereich (Abb. 14 A). Dagegen erkennt man an GBM 627-13 eine Hochregulation von AQP1 über das gesamte tumoröse Gewebe. Die Gefäßwände sind dahingehend unauffällig. Die Gewebereihe GBM 626-13 hingegen zeigt eine Expression von AQP1 nur an Gefäßwänden (Abb. 14, C).

Die Unterschiede der beiden GBMs nach zwei Tagen in Kultur werden in der Gegenüberstellung in Abbildung 13 nochmals bildlich dargestellt. Im GBM 627-13 ist auch nach zwei Tagen eine starke Ausprägung der Fluoreszenz durch die Hochregulierung von AQP1 (Abb.15, A) und AQP4 (Abb.15, B) zu erkennen. Im GBM 626-13 ist eine Expression von AQP1 nur an den Gefäßwänden (Abb.15, C) sichtbar. Die genaue Untersuchung von GBM 626-13 zeigt ebenso, dass AQP4 vorhanden ist, obwohl der Gefrierbruch derselben Probe keine OPKs nachweisen konnte (siehe Abb. 12).

Aufgrund der schlechten UD's mit längerer Kultivierungszeit wurde auf weitere immunhistologische Bilder verzichtet.

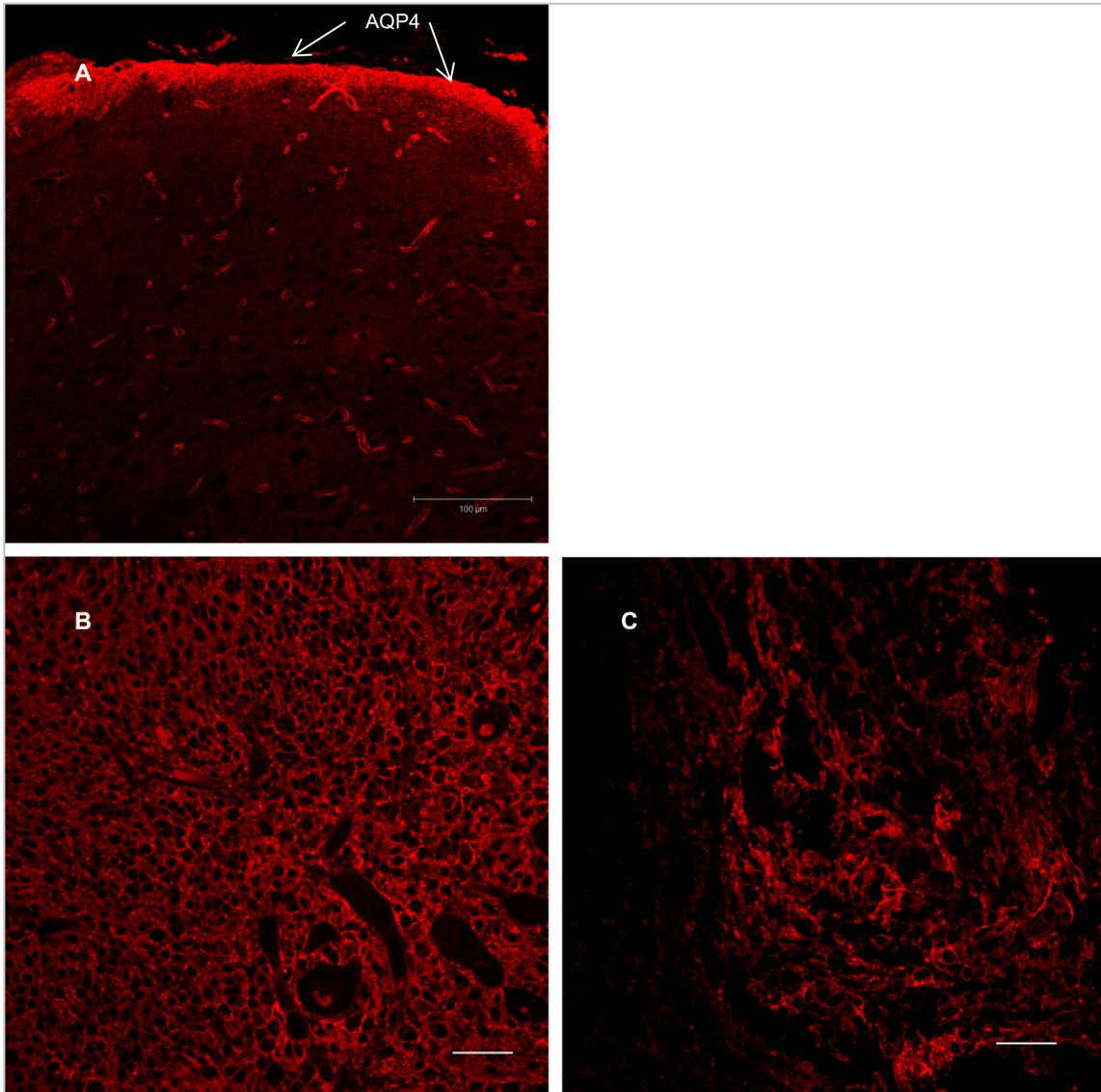


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von AQP4: gesunder Cortex (Maus, A) im Vergleich zu frisch entnommenen GBM 627-13 (B) und GBM 626-13 (C).

Abbildung 13:

- A: Maus Cortex (gesund), AQP4 stark exprimiert in der *Glia limitans superficialis* (s. Pfeile)
- B: GBM 627-13, frisch fixiert nach Entnahme, deutliche Hochregulierung und sichtbare Umverteilung von AQP4
- C: GMB 626-13, frisch fixiert nach Entnahme, Hochregulierung von AQP4. Dennoch wurden hier keine OPKs gefunden

(Scalebar in A entspricht 100μm, Scalebar in B und C entsprechen 50μm)

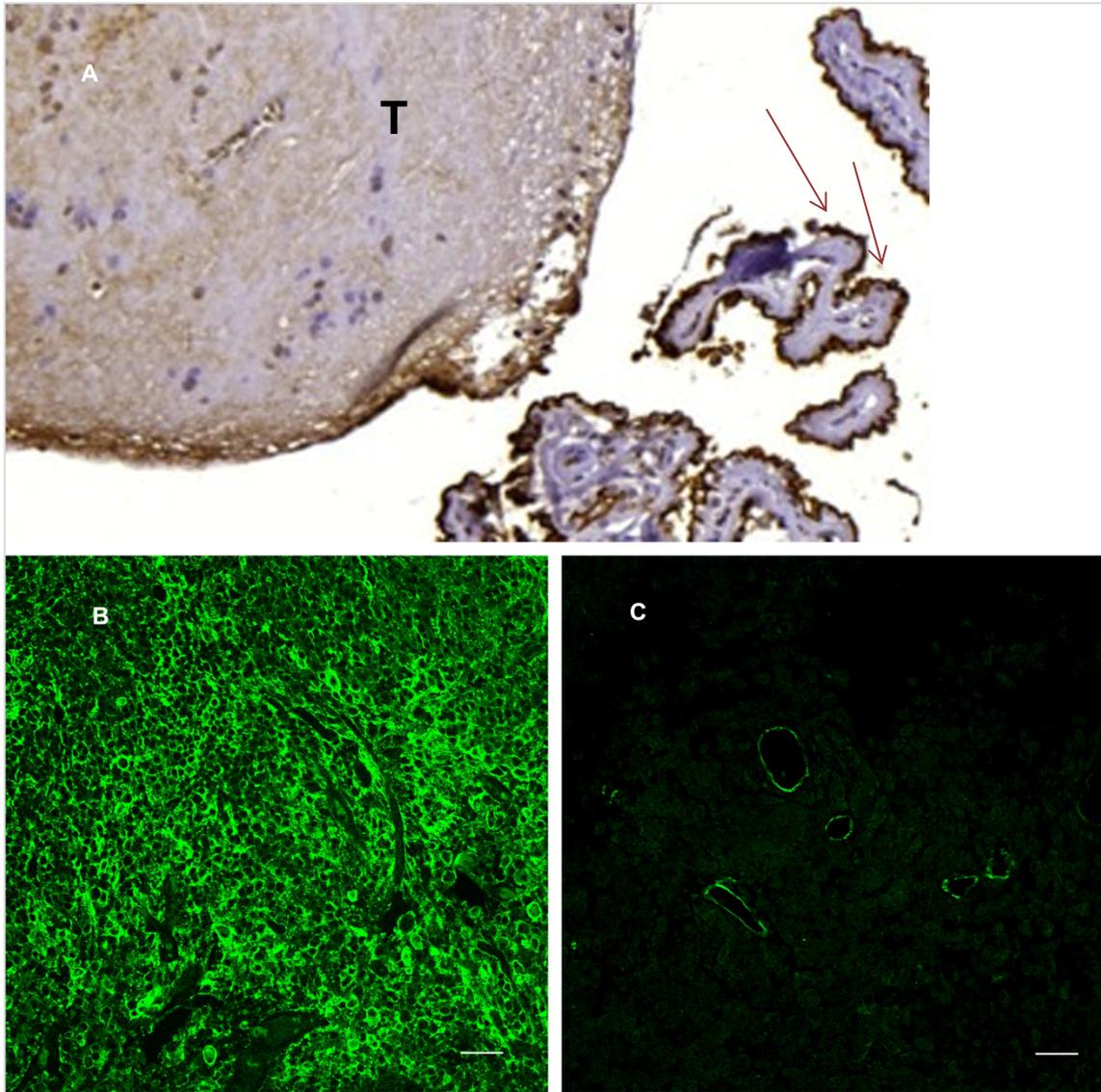


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von AQP1 im humanen Plexus chorioideus im Vergleich zu GBM 627-13 und GBM 626-13 (frisch fixiert)

Abbildung 14:

A: Humaner Plexus mit Expression von AQP1 im Randbereich
(s. Pfeile, Abb. A, T = Tumor, Ependyomom)

B: GBM 627-13 mit Hochregulation von AQP1 über gesamtes Explantat

C: GBM 626-13, Hochregulierung von AQP1 nur an den Gefäßwänden

(Scalebar in B und C entsprechen 50µm)

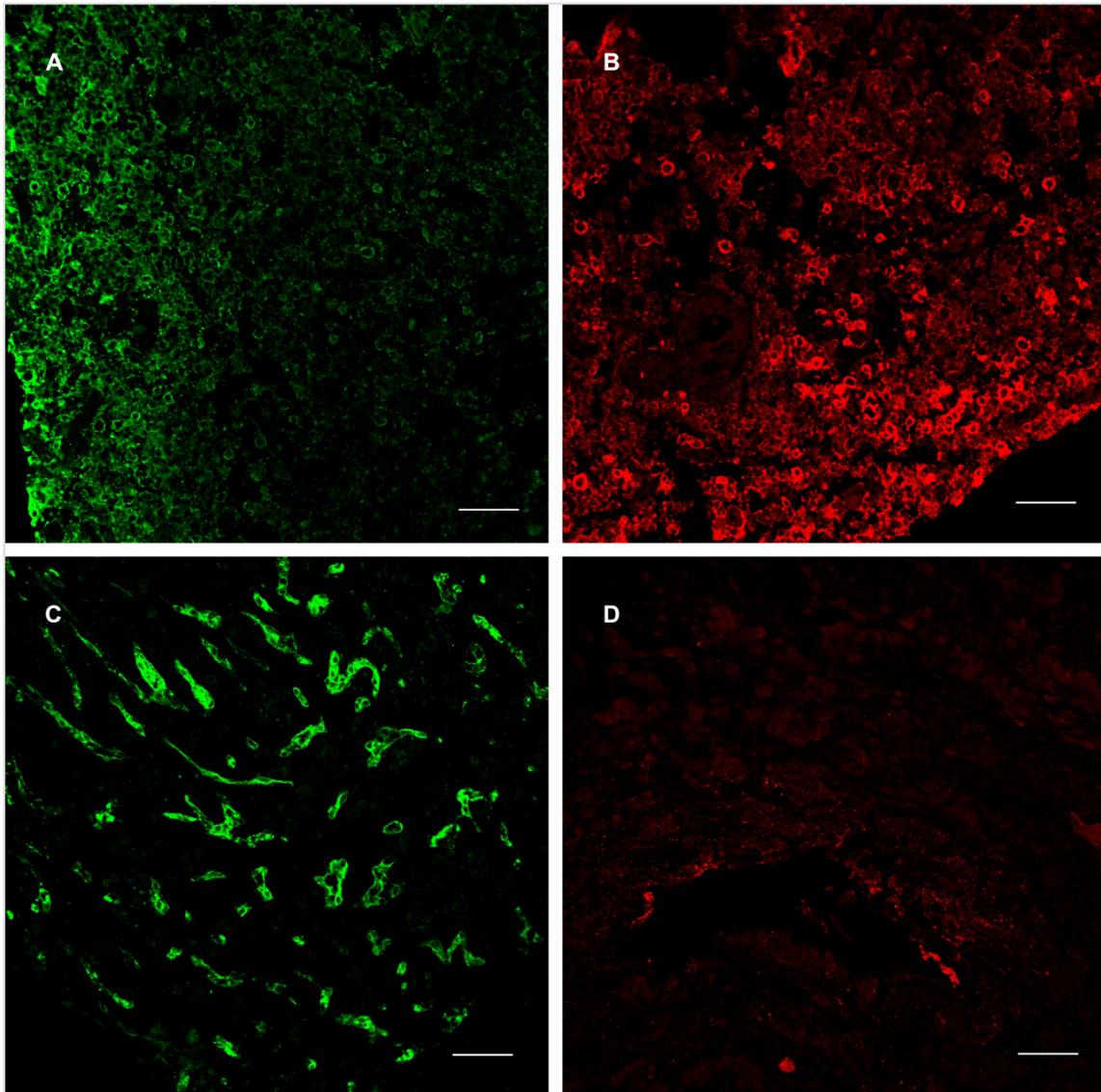


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von AQP1 (grün) und AQP4 (rot) in GBM 627-13 und GBM 626-13 im Vergleich nach 2 Tagen in Kultur

Abbildung 15:

A und B: GBM 627-13

A: Expression von AQP1 (grün)

B: deutliche Expression von AQP4 mit Umverteilung (rot).

Dieses Ergebnis stimmt mit dem Nachweis von OPKs im Gefrierbruch überein, im Unterschied zu GBM 626-13 (Abb. 13 C)

C und D: GBM 626-13 C: Expression von AQP1 an den Gefäßwänden (grün)

D: Expression von AQP4 (rot)

(Scalebar A-D entspricht 50µm)

3.3 Ultrastruktur der GBM-Explantate

Ergänzend zum Gefrierbruch und zur Immunhistologie wurde das dafür in Glutaraldehyd fixierte Untersuchungsmaterial auch mit konventioneller Elektronenmikroskopie in den bereits genannten Testzeiträumen untersucht. Hierbei wurde die ultrastrukturelle Beschaffenheit des Gewebes in Augenschein genommen. Anhand der Ultradünnschnitte konnte man sehen, dass das Gewebe frisch nach Entnahme gut erhalten war. Die Ergebnisse beider GBM sind zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. Die Zellorganellen sind sichtbar, ein deutlicher Interzellularspalt, einzelne Ribosomen sowie vereinzelt Mitochondrien. Auch sind viel raues Endoplasmatisches Retikulum und Tight Junctions zu sehen, ebenso eine intakte Zellmembran (Abb. 16, UD626, Bild A und Abb. 17, UD627, Bild A).

Die Untersuchung beider GBM-Gewebe nach zwei Tagen in Kultur zeigt bereits Anzeichen einer Nekrose der Zellen, der Zellverband löst sich auf. Die Zellorganellen lassen sich nicht mehr eindeutig identifizieren (Abb. 16 und 17 B). Nach vier Tagen in Kultur sieht das Gewebe noch zerstörter aus (Abb. 16 und 17 C). Zwei Wochen in Kultur setzt sich dies fort (Abb. 16 und 17 D).

Das Fazit der Ultradünnschnitt-Untersuchung lautet, dass bei beiden Gewebereihen der Zustand auf die typischen Zellmerkmale (wie gesunder Kern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum etc.) nur an frisch fixiertem, unkultiviertem Gewebe möglich war. Schon nach zwei Tagen in Kultur löste sich der Zellverband nekrotisch auf. Dieser Vorgang setzte sich in den Folgetagen in zeitlich aufsteigender Abfolge ebenfalls fort und Debris treten auf.

Unabhängig davon, um welche der beiden Gewebereihen es sich handelte, gab es nach dem zweiten Tag anhand der Ultrastruktur der Explantate keinen Hinweis auf die Dauer der Kultivierung (Abb. 17, UD626 Bild A-E, Abb. 16, UD627 A-D).

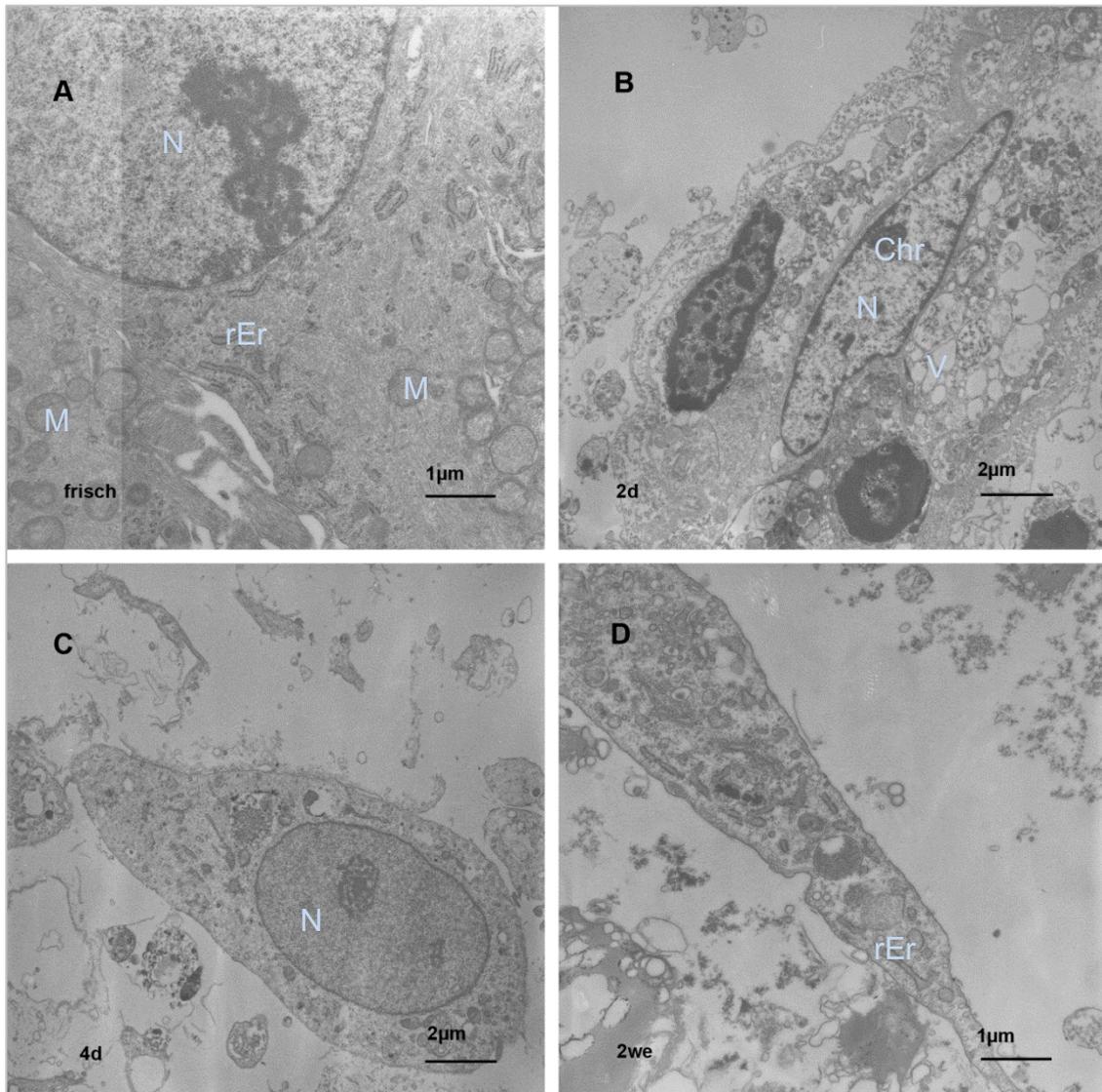


Abb. 16: UD627-13

Abbildung 16:

GBM 627-13. Ultradünnschnitte frisch nach Entnahme (A) und kultiviert (B-D)

- A: Zellkern (N), Zellmembran und Organellen: Endoplasmatisches Retikulum (rEr), Mitochondrien (die Schattenbildung in Bild A entspricht dem Artefakt im Negativ)
- B: 2 Tage in Kultur, Zellkern (N) mit kondensiertem Chromatin (Chr). Zellverband defekt, Vakuolen (V)
- C: 4 Tage in Kultur, Zellkern sichtbar, jedoch kein Zellverband mehr
- D: 2 Wochen in Kultur, Zellausläufer, kein Gewebeverband, Debris

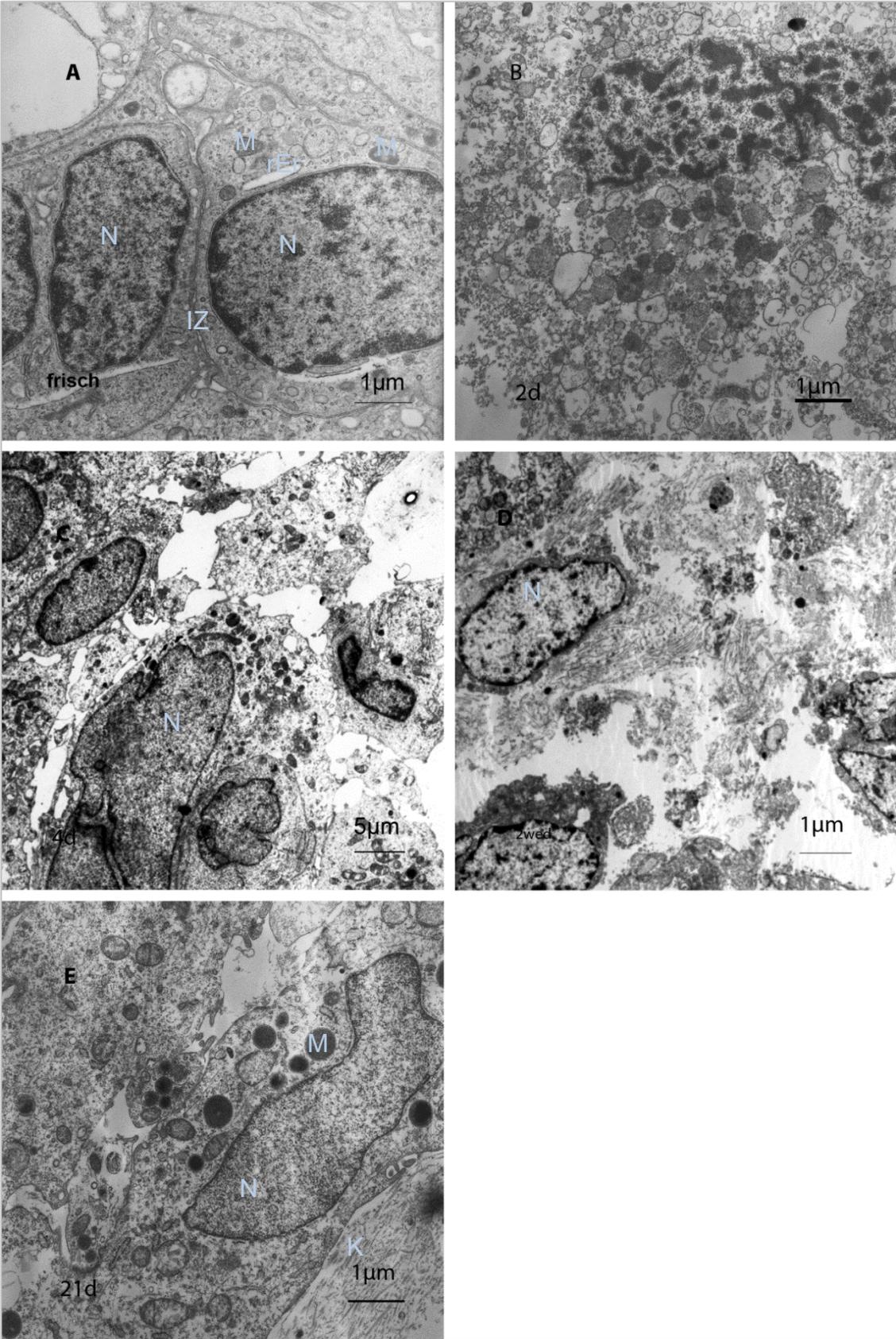


Abb. 17: UD626-13

Abbildung 17:

GBM 626-13, Ultradünnschnitte frisch nach Entnahme (A) und als Explantat (B-E)

A: frisch entnommenes Gewebe, mehrere Zellen (N=Zellkern) angeschnitten, guter Zellzusammenhalt, Interzellularrspalt (IZ), Mitochondrien (M), raues ER (rEr)

B: zwei Tage in Kultur, kein Zellverband mehr

C: 4 Tage in Kultur, der Zellverband hat sich gelockert und ist nicht intakt

D: 15 Tage in Kultur, kein Zellkernverbund und keine Membran

E: 21 Tage in Kultur, Zellkern (N), raues ER (rEr), Mitochondrien (M), Kollagenfasern (K)

3.4 Vergleich von Ultradünnschnitt und Gefrierbruch

Die Ergebnisse der Gefrierbruchmethode im Vergleich zu den Ultradünnschnitten und die Beschaffenheit der Membranarchitektur korrelieren nicht miteinander. Die gut erhaltene Membranstrukturen der Gefrierbrüche (Abb. 18 A und B) weist nicht von vornherein auf eine so defekte und zerstörte Ultrastruktur hin.

Die Ultrastruktur der kultivierten GBM-Explantate ist schon nach kurzer Kultivierungszeit zerstört. Am frisch nach der Entnahme fixierten Explantat zeigt sich ein noch gut erhaltener Zellverband, welcher sich jedoch schon nach zwei Tagen in Kultur aufzulösen scheint. Vier Tage, zwei Wochen und drei Wochen später ändert sich dies nicht. Die kultivierten Gewebeproben im Vergleich ließen keinen Rückschluss auf den Kultivierungszeitraum zu. Das Gewebe kann in Kultur nicht intakt erhalten bleiben (Abb. 18 C und D).

Betrachtet man den Gefrierbruch, lässt sich erkennen, dass die Membran außerordentlich lange stabil bleibt. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, falls OPKs im GBM frisch nach Entnahme vorhanden waren, konnten diese auch in Kultur gehalten werden. Jedoch kann nicht bestimmt werden, ob es sich um eine kurze oder lange Kultivierungszeit handelt. Die Membranarchitektur lässt keine Rückschlüsse darauf zu.

Der große Unterschied bei den beiden kultivierten Gewebereihen war folgender: waren im frischen Explantat keine OPKs zu erkennen, konnten diese auch in kultiviertem GBM nicht gefunden werden. Die Ultrastruktur liefert keinen Anhaltspunkt für die Beschaffenheit der Membran im Gefrierbruch. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die defekte Beschaffenheit der Ultrastruktur des kultivierten Gewebes auf keine so gut erhaltende Membranarchitektur im untersuchten Gefrierbruch vermuten lässt. Der ausgewerteten Kultivierungszeitpunkte des Gefrierbruchs sind konstant gleich gut, während die Ultrastruktur nach 2 Tagen bereits defekt ist.

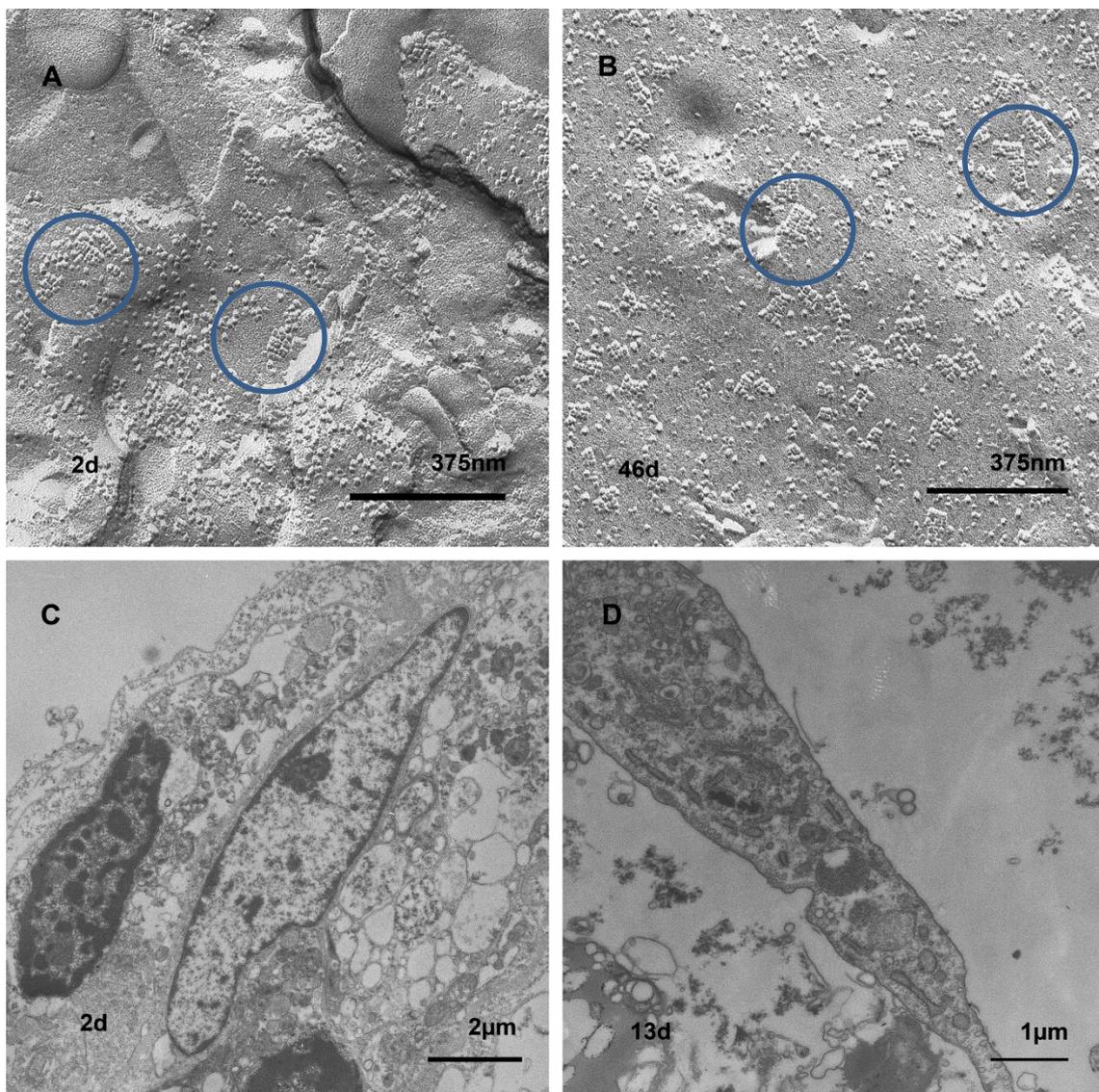


Abb. 18: Kultiviertes GBM 627-13 (A, B: GB C,D: UD)

Abbildung 18:

A: GB, 2 Tage in Kultur, deutlich sichtbare OPKs (Kreis)

B: 46Tage in Kultur, kein Unterschied zu A, sehr deutlich sichtbare OPKs (Kreis)

C: UD, 2 Tage in Kultur, kein Zellverband mehr, Vakuolen im Zytoplasma, keine Zellorganellen D: UD, 13 Tage in Kultur, Zellausläufer, kein Gewebeverband,

Debris

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, GBM-Resektate als Explantatkulturen zu kultivieren und anhand verschiedener Untersuchungsmethoden zu vergleichen. Primär ging es darum herauszufinden, ob sich AQP4 in Kultur halten lässt und ob auch OPKs erhalten bleiben. Ebenso wurden die Expression von AQP1 und die Ultrastruktur der Explantate ausgewertet. Die Ergebnisse sollen eine Vorarbeit zur Etablierung eines Kultivierungssystems von Explantaten leisten.

4.1 OPKS, AQP4 und AQP1 im Gliom

Seit der zufälligen Entdeckung der Aquaporine [27,94] sind mittlerweile 13 davon bei Säugern bekannt [13]. Im Gehirn sind AQP1 und AQP4 unter anderem bei der Tumorbildung, vasogenen und zytotoxischen Ödemen, sowie der Migration von Zellen beteiligt [48,95]. AQP1 wird im Gesunden am Plexus chorioideus, AQP4 in großer Fülle am Astrozytenendfuß exprimiert [96-99]. Im Tumor wird sowohl AQP1 hochreguliert als auch AQP4 umverteilt [48,65]. Immunhistologisch lassen sich AQP1 und AQP4 durch Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern nachweisen [59].

Wie bereits durch diverse Publikationen bekannt ist, treten OPKs als morphologisches Äquivalent von AQP4 [100,101] in Erscheinung. Es gibt zwei AQP4-Isoformen, nämlich die M1 Isoform mit 323 Aminosäuren und die Isoform M23, welche 301 Aminosäuren enthält [31]. Die Kombination beider führt in vivo zur Bildung von typischen OPKs und je nach Verhältnis der beiden Isoformen formieren sich unterschiedlich große OPK-Gitter [54]. Im GBM nimmt die Anzahl typischer OPKs und deren Dichte ab [93].

In dieser Arbeit konnte anhand der Gefrierbruchmethode nachgewiesen werden, dass sich OPKs tatsächlich in Kultur halten lassen. Da es sich bei den beiden Gewebereihen, die analysiert wurden, um einen primären Tumor der Klasse IV nach WHO Richtlinien handelte [75], lag die Vermutung nahe, dass die Auswertung übereinstimmende Ergebnisse liefern würde. Überraschend

jedoch war, dass OPKs scheinbar nur dann in Kultur erhalten werden können, wenn diese schon frisch nach Entnahme nachweisbar sind. In der Gewebereihe GBM627-13 waren fortlaufend OPKs zu jeder Kultivierungszeit nachzuweisen und kein Unterschied der Membranarchitektur in zeitlicher Abfolge erkennbar (Abb.6, A-F). Anhand des Gefrierbruchs waren OPKs in frisch fixiertem Zustand zu sehen und konnten bis zu 46 Tage in Kultur als OPKs identifiziert werden. Sowohl das frisch nach Entnahme fixierte Resektat (Abb.6, A) als auch das in Kultur gehaltene Explantat bei anschließender Fixierung lassen keine Entscheidung darüber zu, ob es sich um kultiviertes oder frisches Gewebe gehandelt hat. Auch über die Dauer der Kultivierung lässt sich auf diese Weise keine Aussage treffen.

Dieses Ergebnis steht ganz im Gegensatz zur Gewebereihe GBM626-13. Hier war das untersuchte Gewebe bereits frisch isoliert und untersucht frei von OPKs. Dies setzte sich auch bei der Kultivierung fort. Zu keinem Zeitpunkt sind in den Explantaten OPKs zu identifizieren gewesen. Dennoch konnte immunhistochemisch AQP4 nachgewiesen werden.

Nun stellt sich die Frage, weshalb in einem Fall zu jedem Kultivierungszeitpunkt fortlaufend OPKs auftreten, im anderen jedoch keine OPKs vorzufinden sind. Dafür gibt es viele Erklärungsmöglichkeiten. Diskutiert wird beispielsweise, dass die Anzahl der OPKs als Maß für Malignität gilt [93]. Da es sich aber bei den beiden entnommenen Tumoren nachweislich um einen primären Tumor der Klasse IV nach WHO gehandelt hat [75], muss diese Überlegung nicht weiter verfolgt werden.

Die Entnahmeregion aus dem entnommenen Tumor, ob Randbereich oder Zentrum, spielt mit Sicherheit eine ausschlaggebende Rolle [93]. Nicht jedes Gewebe lässt sich gleich gut kultivieren, zumal es sich bei entnommenem Tumor per se schon um entartetes und defektes Gewebe handelt. Unklar war auch, ob AQP4 als Protein in der OPK-freien Gewebereihe GBM 626-13 überhaupt existent ist. AQP4 konnte dort immunhistologisch eindeutig nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass AQP4 auch in einer Nicht-OPK-Form

vorkommen kann [102]. Die Unterschiede in der Stärke der Expression könnten auch ein Hinweis auf die Entnahmeregion sein (vgl. Abb.8, B und C). Die Randbereiche enthalten meist mehr AQP4 und OPKs als das Zentrum, da hier die Gliomzellen schon nekrotisch sind. Wächst das GBM in einer Gehirnregion, in der viel Myelin vorhanden ist, dann sind auch die Randregionen am gesunden Gehirn ohne OPKs und AQP4 (Petra Fallier-Becker, persönliche Mitteilung).

Bezugnehmend auf die Bildung von OPKs konnte gezeigt werden, dass Dystroglycan und Agrin für die Formierung zu OPKs ausschlaggebend sind [93]. Fernerhin ergaben vorangegangene Forschungsergebnisse, dass Astrozyten, die mit neuronalem Agrin kultiviert worden waren, große OPKs bildeten, wohingegen Astrozytenkulturen mit endotheliale Agrin normal große OPKs aufwiesen [103].

Die OPKs in GBM 627-13 tauchen in kleinen Gruppen und nicht als große Ansammlungen auf. Zieht man nun die Gewebereihe GBM 626-13 erneut zum Vergleich heran, stellt sich die Frage, ob das Nichtvorhandensein von OPKs mit dem Fehlen von Agrin und Dystroglycan zusammenhängt, wie es von Noell et al. (2009, 2012) für GBMs gezeigt wurde [92,102]. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu zeigen, ob es durch Zugabe von Agrin bei der Kultivierung zu einem Auftreten von OPKs kommen würde. Bekannt ist fernerhin, dass es in vivo durch die Umverteilung von AQP4 und ein Fehlen von Agrin und Dystroglycan im Gliom zu einem zytotoxischen Ödem kommt [93,104]. Diverse Arbeitsgruppen haben durch Versuche an Mäusen zeigen können, dass die Reduzierung von AQP4 im Gehirn ein zytotoxisches Ödem minimieren kann [104-106].

Agrin taucht in zwei Isoformen auf, welche zur Bildung von AQP-Protein-Tetrameren beitragen. Die zwei Isoformen sind die endotheliale splice Variante A/y0B/z0 und die neuronale Variante A/y4B/z8 [102,107]. Eine ausgeprägte Clusterung von OPKs wurde während den Versuchen zu dieser Arbeit nicht beobachtet. Die OPKs tauchten in kleinen Gittern über die Membran verteilt auf.

Wie oben beschrieben, fanden sich OPKs in frischem Gewebe, so konnten diese auch in Kultur gehalten werden. Fehlte die Anordnung zu OPKs jedoch schon im frischen Resektat, so fand auch keine Veränderung in Kultur statt. In entsprechenden Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass AQP4 gleichmäßig auf allen Zellmembranen verteilt ist, jedoch keine OPKs gefunden werden können, sobald kein Agrin in der ECM nachweisbar ist [103]. Aufgrund der Polarität der Astrozyten in vivo an der gesunden BHS kann geschlussfolgert werden, dass der ECM eine hohe Bedeutung zukommt, zumal sie beim GBM verändert ist. Interessant wäre in Folgearbeiten zu prüfen, ob in Gewebe, welches keine OPKs in unkultiviertem Zustand aufweist, durch Zugabe von Agrin in Kultur OPKs gebildet werden können. Der Vollständigkeit halber seien neben Agrin und Dystroglycan noch die Matrix Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 und die Matrix Metalloprotease 3 erwähnt, welche im GBM aktiv sind und durch Aufspaltung von Agrin [108] und Dystroglycan [109] die Möglichkeit der Bildung von OPKs indirekt verhindern.

Wie bereits erwähnt, konnten sowohl AQP4 als auch AQP1 immunhistologisch nachgewiesen werden. Es kommt im GBM zur Überexpression von AQP4. Zusätzlich wird durch den Verlust der Polarität an den Astrozytenendfüßen AQP4 über die komplette Zellmembran verteilt [48,65]. AQP1 ist im gesunden Gehirn nur am Plexusepithel vorhanden und wird im Gliom hochreguliert [48].

In dieser Arbeit konnte durch Immunfluoreszenzmarkierung gezeigt werden, dass sowohl in der Gewebereihe GBM627-13 als auch GBM626-13 Aquaporine exprimiert worden sind. Es kam in beiden Gewebereihen zu einer sichtbaren Hochregulierung und Umverteilung von AQP4 im Vergleich zum Cortex im gesunden Gehirn (Abb.13, A-C). Bei der Auswertung von GBM 626-13 fiel immunhistologisch nach zwei Tagen in Kultur besonders die starke Expression von AQP1 an den Gefäßen auf (Abb.15, C). Dies könnte im Vergleich zu GBM 627-13 auf einen großen Unterschied in der AQP1 Expression hinweisen, die je nach Entnahmeregion des Tumors womöglich stark differiert.

Die Hochregulierung von AQP1 an peripheren Blutgefäßen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben ebenso wie die damit verbundene Hochregulierung von AQP4 und die Malignität von Gliomen [3,48,110]. Ähnliche Ergebnisse beschrieben bereits Hayashi et al. 2007 [45]. Sie kultivierten humane 9L Gliosarcoma Zellen und konnten feststellen, dass die Expression bei Gabe von Dexamethason, NaCl, D-Glucose, Fructose, sowie Zugabe von Gerinnungsfaktoren und Sauerstoffmangel in direkter Wechselwirkung steht. Aus den Ergebnissen schlussfolgerten und bestätigten sie ebenfalls die Annahme von AQP1 als gutes therapeutisches Target. Potokar et al. geben in ihrem Review von 2016 einen Überblick über die Expression von AQP1, AQP4 und AQP9 und gehen auf die Struktur und das Auftreten der Aquaporine im gesunden und pathologischen Zustand ein. AQP4 ist sowohl unter gesunden als auch pathologischen Umständen im Gehirn vorhanden, während AQP1 und AQP9 nur pathologisch auftritt [111-113].

4.2 Kultivierungssysteme

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass Tumorzelllinien nicht immer dazu geeignet sind, die Situation im GBM in vitro zu untersuchen. So stellte sich heraus, dass AQP4 in primären Tumorzellkulturen mit zunehmendem in vitro-Alter verloren geht [91,92]. Ebenso konnten signifikante Unterschiede zwischen etablierten Gliomzelllinien wie U87 und primäre Zellkulturen sowohl bezüglich genetischer Veränderungen als auch in der Genexpression ausgemacht werden [114]. Um die in vivo-Situation besser zu simulieren, wurden neue, komplexere in vitro-Modelle gesucht und etabliert, wie z.B. Kokulturen aus Endothelzellen und Gliomzellen [115]. Shimizu et al. etablierten ein organotypisches Explantat-Kulturmodell aus humanem GBM-Gewebe. Sie zeigten, dass Gewebe drei Wochen in Kultur gehalten werden konnte [116].

Ungeachtet der Ergebnisse von Shimizu et al. [116] war es im Rahmen dieser Arbeit spannend zu analysieren, wie gut kultiviertes Gliomgewebe tatsächlich erhalten bleiben kann. Die Gefrierbrüche lieferten zu allen Kultivierungszeitpunkten eine intakte Membranarchitektur. Die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit stehen jedoch im Widerspruch zu den Untersuchungen von Shimizu et al. 2011 [116]. Zwar konnte in seiner Arbeit anhand eines neuen in vitro-Systems gezeigt werden, dass sich Explantate über drei Wochen in Kultur halten lassen, jedoch wurde dort nur lichtmikroskopisch auf den dreidimensionalen Zustand des Zytoskeletts eingegangen und dessen Erhalt dokumentiert. Dabei wurden große Ähnlichkeiten zum Ausgangsgewebe festgestellt, welches dafür verwendet werden kann, die Auswertung verschiedener Therapieansätze zu analysieren [117].

Die Analyse der Ultrastruktur von GBM 627-13 und 626-13 dagegen lieferte in beiden Fällen bereits nach zwei Tagen in Kultur erstaunlich schlechte Ergebnisse. Die Ultradünnschnitte zeigten schon nach einem Tag ein Auflösen des Zellverbandes. Der Zellverband war gelockert und die typischen Zellorganellen, wie Mitochondrien, Ribosomen, Golgi-Apparat und Endoplasmatische Retikula ließen sich nicht mehr eindeutig erkennen. Dies ließ sich auch während allen Kultivierungszeiten beobachten, sowohl nach einem Tag als auch nach 46 Tagen in Kultur. Das untersuchte Material war anhand von Ultradünnschnitten nur frisch nach Entnahme auf die vorhandenen Zellorganellen auswertbar. Zwar schien sich das Gewebe in Kultur nach etwa zwei Wochen partiell zu erholen, dennoch wurde kein Zellverband mehr sichtbar. Diskutiert werden kann, dass die vermeintliche Erholung des untersuchten Materials auch mit den guten Bedingungen bezüglich der Sauerstoffzufuhr in Kultur zusammenhängt.

Nach diesem Ergebnis der ultrastrukturellen Analyse von Explantatkulturen scheint es ratsam zu sein, nicht nur das lichtmikroskopisch nachweisbare Zytoskelett bei der Bewertung des Kultivierungssystems heranzuziehen, sondern auch das zu kultivierende Gewebe auf typische Zellorganellen zu untersuchen, bestenfalls zu jedem Kultivierungszeitpunkt. Zu erörtern gilt auch die Modifizierung der Nährstoffe im Zellkulturmedium, welche den Explantaten während der Kultivierung zugegeben werden, um eine möglichst gut erhaltene Ultrastruktur auch bei längerer Kultivierungszeit von Explantaten zu erzielen.

4.3 Zusammenfassung der Beobachtungen

Die für diese Arbeit ausgewerteten Gefrierbrüche von unterschiedlich lange kultivierten GBM-Explantaten schienen auf einen guten Gewebeerhalt hinzuweisen und die These des guten Gewebeerhalts durch das neue in vitro Verfahren zu untermauern. Zusätzlich dazu konnte mit der Immunfluoreszenzmarkierung eine Expression von AQP4 und AQP1 gezeigt werden, die aber in ihrer jeweiligen Ausprägung sehr unterschiedlich war und deshalb eine klare Interpretation nicht möglich machte. Ebenso wenig kann anhand der Gefrierbrüche eine reproduzierbare Interpretation der untersuchten Schnitte in Bezug auf den Kultivierungszeitpunkt dargelegt werden. Deshalb wurde neben der Membranarchitektur durch die Gefrierbruchmethode auch die Ultrastruktur an Ultradünnschnitten von kultivierten GBM-Explantaten untersucht und mit frisch isoliert fixierten OP-Resektaten verglichen. An kultivierten Explantaten konnten Nekrosen festgestellt werden. Dieser schlechte Gewebeerhalt erklärt auch, warum die Immunfluoreszenzfärbungen von AQP1 und AQP4 nicht ausgewertet werden konnten im Vergleich zu längeren Kultivierungszeiten.

Wie in vorherigen Studien richtig behauptet wurde, ist die Entnahmeregion aus dem Tumor von elementarer Bedeutung für die Kultivierung und die Etablierung eines funktionierenden in vitro-Systems [116,118] und bedarf weiterer Studien unter Einbeziehung des OP-Teams. Dabei wäre aufschlussreich zu erfahren, ob die Entnahmelokalisation ausschlaggebend für die Bildung von OPKs in Kultur ist [93].

Ebenso ist die Größe und Dicke der zu kultivierenden Gewebestücke wichtig für das Durchdringen von Nährmedium [119]. Ähnlich wie bei Shimizu lag die Stückchengröße der vorliegenden Arbeit bei 5x5mm (25mm²), also leicht über der von Sutherland geforderten Größe von 20mm² [119].

4.4 Ausblick

Die Therapieansätze zur Behandlung von Glioblastomen haben in den vergangenen Jahren stark zugenommen und sich verbessert. Dennoch ist trotz

dreifacher Therapie, bestehend aus Resektion des Tumors, Bestrahlungs- und Chemotherapie, weitere Forschung auf diesem Gebiet erforderlich, da die mittlere Überlebensdauer bei eineinhalb Jahren liegt [71]. Daher steht nun verstärkt im Fokus, ein humanes, organotypisches Explantatkultursystem zu entwickeln, um neue Therapieansätze zu etablieren.

Im Glioblastom wird AQP4 umverteilt, was die cerebrale Ödembildung begünstigt. Diese hypoxische Umgebung sorgt dafür, dass auch AQP1 exprimiert wird, welches an der gesunden Blut-Hirn-Schranke nicht nachzuweisen ist [48]. Wie erwähnt stehen die Aquaporine in direktem Zusammenhang mit der Migration und der Ödembildung bei der Tumorbildung von Gliomen [69,120,121]. Die Aquaporine 1 und 4 erscheinen daher als wichtige Targets auf der Suche nach neuen Modellen und Methoden [43]. Zukunftsziel ist es daher, Kultivierungsmethoden für Explantate so zu spezifizieren, dass die Wasserkanäle AQP4 und AQP1 in vitro exprimiert werden und dabei auch die Ultrastruktur erhalten bleibt. Dies wäre eine gute Grundlage, um anhand von kultiviertem Gliomgewebe die Wirkung von Therapeutika auf die Expression von AQP1 und AQP4 zu untersuchen.

Ein funktionierendes in vitro-System könnte die Weichen für Alternativmethoden zu Tierversuchen stellen. „Unter Alternativmethoden zum Tierversuch gemäß dem 3R-Konzept nach Russel und Burch (1959) sind Testverfahren zu verstehen, die entweder Tierversuche vollständig ersetzen (Replacement) oder – falls dies nicht möglich ist – zumindest eine Reduzierung der Anzahl der verwendeten Tiere (Reduction) bzw. eine Minderung des Belastungsgrades der Tiere (Refinement) erlauben“ (Quelle: Bundesministerium für Bildung und Forschung: BMBF).

Dabei muss sowohl Bezug genommen werden auf das Entnahmegebiet aus dem Tumor als auch auf die Vorgeschichte des Patienten. Diese schwerwiegende Erkrankung bei jedem Patienten individuell anzugehen und zu behandeln scheint im standardisierten Klinikalltag und in den standardisierten Behandlungsmethoden die größte Herausforderung überhaupt zu sein. Die

Frage, ob sich eine in vitro-Situation auf den Patienten übertragen lässt, ist ebenso kritisch zu beleuchten wie die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Versuchen an Tieren auf den Menschen. Derzeit sind jedoch nur zwei Ersatzmethoden zu Tierversuchen in der Datenbank von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) veröffentlicht. Daher ist eine 3D-Kultur als Zukunftschance mehr als erstrebenswert.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, humanes Glioblastomgewebe zu kultivieren und in Abhängigkeit der Kultivierungszeit zu untersuchen. Bei dem zur Verfügung gestellten Gewebe handelte es sich um einen höchst malignen, hirneigenen Tumor der WHO-Klasse IV.

Das OP-Resektat wurde sowohl unmittelbar nach Entnahme fixiert als auch in kultivierter Form fixiert und untersucht. Dabei sollte das Vorhandensein Orthogonaler Partikel Komplexe, der sogenannten OPKs, mittels der Gefrierbruchmethode ausgewertet werden. OPKs sind als morphologisches Äquivalent des Wasserkanalproteins Aquaporin 4 (AQP4) integraler Bestandteil jeder Astrozytenmembran. Wichtig war es, einen Hinweis darauf zu bekommen, ob diese Strukturen und somit die Expression von AQP4 in vitro anhand eines Kultivierungsmodells stabilisiert werden können und wie sie sich verhalten und/oder, ob sich OPKs in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer bilden bzw. erhalten bleiben.

Methodisch kamen neben dem Gefrierbruch die konventionelle Elektronenmikroskopie und Immunhistologie zum Tragen. Dabei wurde anhand der Elektronenmikroskopie die Ultrastruktur und mittels Immunhistologie die Expression von AQP4 und AQP1 untersucht und ausgewertet. In der Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass sich OPKs in Kultur halten lassen, wenn diese schon frisch nach Entnahme nachzuweisen waren, zum anderen, dass AQP4 und AQP1 in Kultur exprimiert werden. Überraschend war die Tatsache, dass sich die Membranarchitektur von unkultiviertem und kultiviertem Gewebe nicht unterscheiden ließ, der Ultradünnschnitt wies jedoch bereits nach einem Tag in Kultur einen zerstörten Gewebeverband auf. Es scheint daher von großer Wichtigkeit, die Ultrastruktur bei Kultivierung näher zu betrachten, da gezeigt werden konnte, dass die Membranbeschaffenheit wenig über den Erhalt der typischen Zellorganellen einer intakten Zelle aussagen kann.

Trotz der großen Fortschritte in den letzten Jahren auf diesem Gebiet der Gehirntumorforschung bedarf es jedoch noch weiterer Forschung zur

Etablierung eines funktionierenden Kultivierungssystems von Gliomgewebe. Zukunftsziel der Erarbeitung neuer Systeme ist dabei nicht nur ein besseres Konzept bei der Therapiewahl, sondern auch durch schnellere und reproduzierbare Kultivierungsmethoden neue Medikamente an humanem Gewebe zu testen. Dies kann in Zukunft eine verbesserte Diagnose und Prognose möglich machen. Wie gezeigt werden konnte, ist eine standardisierte Kultivierung von humanem Gliomgewebe verbesserungswürdig. Die Übertragbarkeit der Wirkung von Medikamenten von Tiermodellen auf den Menschen kann dabei noch nicht vorausgesagt werden. Dennoch lohnt es sich, den Fokus weg von Tierversuchen und hin zu in vitro Kultivierung zu lenken.

6 Literaturverzeichnis

1. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M (2006) Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat* 289: 3-8.
2. Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57: 173-185.
3. Endo M, Jain RK, Witwer B, Brown D (1999) Water channel (aquaporin 1) expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas. *Microvasc Res* 58: 89-98.
4. Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207-217.
5. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40: 648-677.
6. Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178-201.
7. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38: 323-337.
8. Wolburg H, Neuhaus J, Kniessel U, Krauss B, Schmid EM, et al. (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.
9. Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335: 75-96.
10. Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200: 629-638.
11. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.
12. Agre P (2004) Nobel Lecture. Aquaporin water channels. *Biosci Rep* 24: 127-163.
13. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, et al. (2002) Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3-16.
14. Benga G (2003) Birth of water channel proteins-the aquaporins. *Cell Biol Int* 27: 701-709.
15. Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P (2002) Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* 109: 1395-1399.
16. Benga G (2006) Water channel proteins: from their discovery in 1985 in Cluj-Napoca, Romania, to the 2003 Nobel Prize in Chemistry. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52: 10-19.
17. Benga G (2009) Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life* 61: 112-133.
18. Benga G (2012) The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications. *Mol Aspects Med* 33: 518-534.

19. Benga G (2012) On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med* 33: 514-517.
20. Agre P, Kozono D (2003) Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 555: 72-78.
21. Benga G (1988) Water transport in red blood cell membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 51: 193-245.
22. Benga G (1989) Water exchange through the erythrocyte membrane. *Int Rev Cytol* 114: 273-316.
23. Benga G, Popescu O, Pop VI (1985) Water exchange through erythrocyte membranes: p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of water diffusion in ghosts studied by a nuclear magnetic resonance technique. *Biosci Rep* 5: 223-228.
24. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 263: 15634-15642.
25. Preston GM, Agre P (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11110-11114.
26. Verkman AS (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118: 3225-3232.
27. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, et al. (1993) Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 265: F463-476.
28. Krane CM, Goldstein DL (2007) Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. *Mamm Genome* 18: 452-462.
29. Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol* 70: 301-327.
30. Walz T, Fujiyoshi Y, Engel A (2009) The AQP structure and functional implications. *Handb Exp Pharmacol*: 31-56.
31. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, et al. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 13052-13056.
32. Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK (1997) Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* 387: 627-630.
33. Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, et al. (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 387: 624-627.
34. Papadopoulos MC, Verkman AS (2013) Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 14: 265-277.
35. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF (2011) Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 287: 1-41.
36. Benga G (2004) The first water channel protein (later called aquaporin 1) was first discovered in Cluj-Napoca, Romania. *Rom J Physiol* 41: 3-20.
37. Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P (1993) Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7275-7279.

38. Wolburg H, Paulus W (2010) Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 75-88.
39. Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC (2014) Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 13: 259-277.
40. Kobayashi H, Minami S, Itoh S, Shiraishi S, Yokoo H, et al. (2001) Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neurosci Lett* 297: 163-166.
41. Tomita Y, Dorward H, Yool AJ, Smith E, Townsend AR, et al. (2017) Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci* 18.
42. Hu J, Verkman AS (2006) Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *Faseb j* 20: 1892-1894.
43. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS (2005) Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434: 786-792.
44. Nico B, Ribatti D (2011) Role of aquaporins in cell migration and edema formation in human brain tumors. *Exp Cell Res* 317: 2391-2396.
45. Hayashi Y, Edwards NA, Proescholdt MA, Oldfield EH, Merrill MJ (2007) Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells. *Neoplasia* 9: 777-787.
46. Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA (2001) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg* 15: 101-108.
47. Verkman AS, Mitra AK (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F13-28.
48. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S (2002) Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer* 87: 621-623.
49. Yool AJ, Brown EA, Flynn GA (2010) Roles for novel pharmacological blockers of aquaporins in the treatment of brain oedema and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37: 403-409.
50. El Hindy N, Bankfalvi A, Herring A, Adamzik M, Lambertz N, et al. (2013) Correlation of aquaporin-1 water channel protein expression with tumor angiogenesis in human astrocytoma. *Anticancer Res* 33: 609-613.
51. 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: 262-265.
52. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, et al. (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17: 171-180.
53. Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, et al. (2004) Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F501-511.
54. Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, et al. (2003) Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13609-13614.

55. Rossi A, Moritz TJ, Ratelade J, Verkman AS (2012) Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes. *J Cell Sci* 125: 4405-4412.
56. Rash JE, Yasumura T, Dudek FE (1998) Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord. *Cell Biol Int* 22: 731-749.
57. Noel G, Belda M, Guadagno E, Micoud J, Klocker N, et al. (2005) Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. *J Neurochem* 94: 691-702.
58. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, et al. (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14108-14113.
59. Warth A, Simon P, Capper D, Goepfert B, Tabatabai G, et al. (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: 1336-1346.
60. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, et al. (2004) Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *Faseb j* 18: 542-544.
61. Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, et al. (2003) 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: 2106-2111.
62. Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, Ilundain AA, Echevarria M, et al. (1999) Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis* 6: 245-258.
63. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, et al. (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 78: 131-137.
64. Rohlmann A, Gocht A, Wolburg H (1992) Reactive astrocytes in myelin-deficient rat optic nerve reveal an altered distribution of orthogonal arrays of particles (OAP). *Glia* 5: 259-268.
65. Warth A, Kroger S, Wolburg H (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* 107: 311-318.
66. Fallier-Becker P, Nieser M, Wenzel U, Ritz R, Noell S (2016) Is Upregulation of Aquaporin 4-M1 Isoform Responsible for the Loss of Typical Orthogonal Arrays of Particles in Astrocytomas? *Int J Mol Sci* 17.
67. Warth A, Mittelbronn M, Hulper P, Erdlenbruch B, Wolburg H (2007) Expression of the water channel protein aquaporin-9 in malignant brain tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15: 193-198.
68. Fossdal G, Vik-Mo EO, Sandberg C, Varghese M, Kaarbo M, et al. (2012) Aqp 9 and brain tumour stem cells. *ScientificWorldJournal* 2012: 915176.

69. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS (2008) Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 456: 693-700.
70. Dubois LG, Campanati L, Righy C, D'Andrea-Meira I, Spohr TC, et al. (2014) Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci* 8: 418.
71. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
72. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.
73. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, et al. (2015) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 17 Suppl 4: iv1-iv62.
74. DeAngelis LM (2001) Brain tumors. *N Engl J Med* 344: 114-123.
75. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131: 803-820.
76. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL (2007) Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 25: 867-890, vii.
77. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 494-503; quiz 491 p following 516.
78. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, et al. (2015) ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol* 129: 133-146.
79. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19: 764-772.
80. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, et al. (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-223; discussion 223-214.
81. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, et al. (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80: 65-72.
82. Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1: 44-51.
83. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360: 765-773.
84. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359: 492-507.
85. Clarke J, Butowski N, Chang S (2010) Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol* 67: 279-283.

86. Stupp R, Tonn JC, Brada M, Pentheroudakis G (2010) High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v190-193.
87. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10: 459-466.
88. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F (2015) Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discov Today* 20: 899-905.
89. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, et al. (2015) Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat* 19: 1-12.
90. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37: 13-25.
91. McCoy E, Sontheimer H (2007) Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes. *Glia* 55: 1034-1043.
92. Noell S, Ritz R, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Fallier-Becker P (2012) An allograft glioma model reveals the dependence of aquaporin-4 expression on the brain microenvironment. *PLoS One* 7: e36555.
93. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Ritz R, Tatagiba M, et al. (2012) Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma. *Cell Tissue Res* 347: 429-441.
94. Benga G, Popescu O, Borza V, Pop VI, Muresan A, et al. (1986) Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport. *Eur J Cell Biol* 41: 252-262.
95. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb j* 18: 1291-1293.
96. Mobasheri A, Marples D (2004) Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C529-537.
97. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L (2002) Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 367-378.
98. Verkman AS (2009) Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol* 212: 1707-1715.
99. Wolburg H (1995) Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch* 36: 239-258.
100. 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: 11981-11986.
101. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H (2011) Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* 55: 467-476.

102. Noell S, Fallier-Becker P, Deutsch U, Mack AF, Wolburg H (2009) Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes. *Cell Tissue Res* 337: 185-195.
103. Noell S, Fallier-Becker P, Beyer C, Kroger S, Mack AF, et al. (2007) Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci* 26: 2109-2118.
104. Papadopoulos MC, Verkman AS (2005) Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 280: 13906-13912.
105. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, et al. (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6: 159-163.
106. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C426-432.
107. Stone DM, Nikolics K (1995) Tissue- and age-specific expression patterns of alternatively spliced agrin mRNA transcripts in embryonic rat suggest novel developmental roles. *J Neurosci* 15: 6767-6778.
108. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, et al. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203: 1007-1019.
109. Sole S, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A, Planas AM (2004) Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 338-349.
110. Venero JL, Machado A, Cano J (2004) Importance of aquaporins in the physiopathology of brain edema. *Curr Pharm Des* 10: 2153-2161.
111. Potokar M, Jorgacevski J, Zorec R (2016) Astrocyte Aquaporin Dynamics in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 17.
112. Zelenina M (2010) Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int* 57: 468-488.
113. Badaut J, Brunet JF, Grollmund L, Hamou MF, Magistretti PJ, et al. (2003) Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl* 86: 495-498.
114. Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, et al. (2008) Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res* 6: 21-30.
115. Scism JL, Laska DA, Horn JW, Gimple JL, Pratt SE, et al. (1999) Evaluation of an in vitro coculture model for the blood-brain barrier: comparison of human umbilical vein endothelial cells (ECV304) and rat glioma cells (C6) from two commercial sources. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 580-592.
116. Shimizu F, Hovinga KE, Metzner M, Soulet D, Tabar V (2011) Organotypic explant culture of glioblastoma multiforme and subsequent single-cell suspension. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 3: Unit3.5.

117. Hovinga KE, Shimizu F, Wang R, Panagiotakos G, Van Der Heijden M, et al. (2010) Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells* 28: 1019-1029.
118. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, et al. (2010) Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 24: 1731-1745.
119. Sutherland RM (1988) Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240: 177-184.
120. Verkman AS (2012) Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med* 63: 303-316.
121. Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC (2008) Aquaporins--new players in cancer biology. *J Mol Med (Berl)* 86: 523-529.

01. Ehrlich P. Über die Beziehung chemischer Konstitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin, 1904).
02. Goldmann E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Abh. K Preuss Akad Wiss Phys Med 1913 1, S. 1-60)
03. Lewandowsky, Zur Lehre der Cerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. Für klinische Medizin Bd.40, 1900, S.480)
04. Bradbury M. The concept of a Blood-Brain-Barrier. In: sons JW, ed. Chichester, 1979).
05. Martin Trepel, 2015, Neuroanatomie: Struktur und Funktion, München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH

Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe bzw. unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde am Institut für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Hartwig Wolburg durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurochirurgie in Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung in Zusammenarbeit mit den Labormitgliedern Frau Ria Knittel und Frau Gabi Frommer-Kästle des Instituts für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen, durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Sandra Mitrovic

Kirchheim unter Teck, den 04.09.2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Hartwig Wolburg für die freundliche Stellung des interessanten Themas und Geduld in der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Fallier-Becker bedanken, die mich mit Begeisterung in die Thematik eingearbeitet hat und zu jeder Zeit mit wissenschaftlichem Rat zur Seite stand. Herausheben möchte ich, dass sie mir ermöglicht hat den 2nd World Congress on Aquaporins in Cluj (Rumänien) bei Prof. Benga und in Edinburgh (Schottland) das 13. European Meeting on Glial Cells zu besuchen.

Für die Unterstützung, Einsatz und die Durchführung der Gefrierbrüche gilt mein Dank Frau Ria Knittel. Ebenso danke ich Frau Gabi Frommer-Kästle für die Vorbereitung im Labor und die Anfertigung der vielen Ultradünnschnitte und Frau Yeliz Donat und Frau Dr. Susan Noell für das zur Verfügung gestellte Gewebe.

Bei Herrn Andreas Mack bedanke ich mich für die Zeit und die tollen Bilder am Lasermikroskop in der alten Anatomie in Tübingen.

Nicht vergessen möchte ich Herrn Öznur Öner, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen computertechnischen Problemen.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Marijane Bekjarska für das Korrekturlesen.