

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische
Anatomie

**Geht der Verlust der Polarität im Gliom einher mit der
Hochregulation einer Isoform des Wasserkanals
Aquaporin-4?**

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

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

**vorgelegt von
Wenzel, Ulrike
2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend
2. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Naumann

Tag der Disputation: 06.11.2020

Gewidmet denen, die mir die Erde zur Heimat werden ließen.

INHALT

Abkürzungen	vi
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Orthogonale Partikelkomplexe als Membrankomponenten zahlreicher Zellen	1
1.2 Aquaporin-4	4
1.3 Aufbau Astrozyt	7
1.4 Aufgaben von Astrozyten und die Rolle von Aquaporin 4	8
1.5 Astrozytom	11
1.6 Fragestellung	14
1.6.1 Gibt es Unterschiede im OPK-Verlust in Abhängigkeit von der Tumormalignität?	14
1.6.2 Geht der OPK-Verlust einher mit einer Veränderung des Verhältnisses der AQP4-Isoformen M23 und M1?	14
1.6.3 Wie stellt sich das M23/M1-Verhältnis in Zellkulturen von gesunden murinen Astrozyten und in humanen Gliomzellkulturen dar im Vergleich zu den Patientengeweben sowie im Vergleich zu gesundem Hirngewebe?	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Gewebe	15
2.1.2 Material für den Gefrierbruch	17
2.1.3 Material für die Immunhistochemie	18
2.1.4 Material für die qRT-PCR	20
2.1.5 Material für die Zellkultur	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Gewebegewinnung	21

2.2.2	Zellkultur	21
2.2.3	Immunhistochemie.....	22
2.2.4	Gefrierbruchtechnik.....	23
2.2.5	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR).....	27
2.2.6	Statistik	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Bestimmung der OPK-Dichte in Abhängigkeit von der Tumormalignität.....	32
3.2	Bestimmung von AQP4-M1 und AQP4-M23 mRNA in Astrozytomen unterschiedlicher Malignität.....	37
3.3	Bestimmung der AQP4-M23-und AQP4-M1-RNA in Kulturen von gesunden Astrozyten und von Gliomzellen	40
4	Diskussion.....	41
4.1	Diskussion der OPK-Abnahme	41
4.2	Diskussion der M23/M1-Relation.....	46
4.3	Diskussion der Zellkulturexperimente	50
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis	53
7	Veröffentlichungen	62
8	Erklärung zum Eigenanteil	63
9	Danksagung.....	64

ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Ausführlich
Abb.	Abbildung
AQP	Aquaporin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DAPI	2-[4-(Aminoiminomethyl-phenyl)] 1H-Indol-6-Carboximidamid Hydrochlorid
DDC	Dystrophin-Dystroglycan-Komplex
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
E-face	Extraplasmatic fracture face
EM	Elektronenmikroskop
FCS	Fetal calf serum
GBM	Glioblastoma multiforme
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HCl	Chlorwasserstoff
IHC	Immunhistochemie

IMP	Intramembranpartikel
μm	Mikrometer
MMP	Matrix-Metalloprotease
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OPK	Orthogonaler Partikelkomplex
P-face	Protoplasmatic fracture face
qRT-PCR	Quantitative Real-Time- Polymerasekettenreaktion
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Bruchlinie beim Gefrierbruch.	24
Abbildung 2: Gefrierbruchapparatur	25
Abbildung 3: Bedampfung der Bruchflächen.	26
Abbildung 4: A Astrozytom WHO-Grad II.....	33
Abbildung 5: Astrozytom WHO-Grad III	34
Abbildung 6: Glioblastom/Astrozytom WHO-Grad IV.....	35
Abbildung 7: OPK-Dichte in Abhängigkeit von der Tumormalignität.....	36
Abbildung 8: Relative Expressionsänderung von AQP4 M1	38
Abbildung 9: Relative Expressionsänderung von AQP4 M23	39
Abbildung 10: Astrozyt murin.....	40
Abbildung 11: Orthogonale Partikelkomplexe an einem astrozytären Endfuß	42

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: World Health Organization (WHO) Grading und IDH1 (Isocitratdehydrogenase (NADP (+)) 1) - Status der Patienten.....	16
Tabelle 2: Material für den Gefrierbruch	17
Tabelle 3: Material für die Immunhistochemie	19
Tabelle 4: Material für die qRT-PCR.....	20
Tabelle 5: Material für die Zellkultur.....	20
Tabelle 6: Primer (Homo sapiens)	29
Tabelle 7: Primer (Mus musculus)	29

1 EINLEITUNG

1.1 ORTHOGONALE PARTIKELKOMPLEXE ALS MEMBRANKOMPONENTEN ZAHLREICHER ZELLEN

Seit im Jahr 1968 erstmals über die Beobachtung erstaunlich geometrischer Strukturen in den Membranen von Leberzellen berichtet wurde (Landis and Reese 1974), ist über ihre Bedeutung intensiv geforscht und spekuliert worden (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2011). Betrachtet man diese Gebilde, deren Entdeckung und Visualisierung durch die Gefrierbruchelektronenmikroskopie ermöglicht wurde, kann man sich ihrem geheimnisvollen Zauber kaum entziehen. Obwohl im Lauf der Jahre einiges über diese Strukturen herausgefunden wurde, sind längst nicht alle Einzelheiten ihrer Zusammensetzung und Funktion bekannt. Zunächst soll also berichtet werden, was inzwischen an Erkenntnissen vorliegt.

Mit der Etablierung der Gefrierbruchelektronenmikroskopie in den 1960er Jahren gab es erstmals die Möglichkeit, morphologische Einblicke in die Ausstattung von Zellmembranen zu gewinnen. Diese Technologie ist in der Lage, Zellmembranen aufzubrechen und wird im Methodenteil beschrieben. Mit ihrer Hilfe können in die Membran eingelagerte Partikel wie z. B. Zellkontakte sehr genau und mit hohem Auflösungsverfahren untersucht werden. Man fand zunächst in Leberzellen, dann auch in intestinalen Epithelzellen und in Astrozyten Strukturen, die wegen ihres geometrischen Aufbaus als Orthogonale Partikelkomplexe (OPK) bzw. im englischen Schrifttum als Orthogonal Arrays/Assemblies of Particles (OAP) bezeichnet werden (Wolburg 1995) und zunächst für eine Sonderform der Gap Junctions, also Strukturen im Dienste der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen, gehalten wurden. Landis und Reese (1974) postulierten aber bereits 1974, dass es sich in Anbetracht der Lokalisation der untersuchten Membrandomänen eher um andere

Strukturen handeln müsse und vermuteten aufgrund des im ZNS gehäuften Auftretens in der Nachbarschaft zu Blutgefäßen und zum Subarachnoidalraum eine Aufgabe, die im Zusammenhang mit der Kontrolle der Stoffzusammensetzung im interstitiellen zerebralen Flüssigkeitshaushalt steht (Landis and Reese 1974). Im zentralen Nervensystem sind sie ausschließlich in Makrogliazellen wie Astrozyten und Ependymogliazellen zu finden (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2011), und tatsächlich sind die Astrozyten diejenigen Zellen, die am häufigsten im Hinblick auf OPKs untersucht wurden. Auf die Funktion der OPKs hatte man zunächst nur indirekte Hinweise, wie beispielsweise die Lage in Nachbarschaft von Kaliumkanälen, die man wegen gleicher Verteilung auf der Oberfläche von Astrozyten mit den OPKs in Beziehung brachte (Landis and Reese 1981). Auch ihre molekulare Zusammensetzung war lange unbekannt. Dann aber konnte eine Reihe von Experimenten zeigen, dass sie aus dem Wasserkanalprotein Aquaporin-4 (AQP4) bestehen: In den Zellmembranen von AQP4-defizienten Mäusen fehlten OPKs (Verbavatz et al. 1997), während sie in stabil mit AQP4 transfizierten CHO-Zellen reichlich vorhanden waren (Yang et al., 1996). Die um die Immunogold-Technik erweiterte Gefrierbruchmethode ergab die spezifische Markierung der OPKs mit anti-AQP4-Antikörpern (Rash et al., 1998). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist immer dann AQP4 vorhanden, wenn in der Gefrierbruchreplica OPKs vorkommen und es bildet deren wichtigste und womöglich einzige Komponente (Rash, Davidson et al. 2004). Andererseits kann auch dann AQP4 exprimiert sein (nämlich als AQP4-M1, s.u.), wenn keine OPKs sichtbar sind (Warth, Kroger et al. 2004).

Man hat sich den Eigenschaften der OPKs von vielen Seiten her genähert; neben der Gefrierbruchelektronenmikroskopie, die jahrelang die einzige Methode war, um OPKs sichtbar zu machen und bis heute einen unübertroffenen Zugang zur Morphologie bietet, wurden auch andere Möglichkeiten entwickelt, die OPKs als supramolekulare Strukturen beobachtbar zu machen, wie BN-PAGE, Quantum dot single particle tracking (Verkman, Rossi et al. 2012, Smith, Jin et al. 2014) und dSTORM (Smith and Verkman 2015). Die meisten Versuche beziehen sich aber mit

molekularbiologischen und biochemischen Methoden lediglich auf das Protein AQP4 an sich, ungeachtet seiner geometrischen Formation.

Auch Methoden der Bioinformatik erlauben zwar mit computergestützten Simulationsmodellen (MD: molecular dynamics) wertvolle Aussagen über die Beziehung von Struktur und Funktion bei Makromolekülen, haben aber Grenzen bei der Erforschung der Eigenschaften supramolekularer Gebilde, wie der orthogonalen Partikelkomplexe (Pisani, Simone et al. 2017). Mit Röntgenstrukturanalysen konnten zwar AQP4- Kristalle in ihrem Aufbau charakterisiert werden (Tani, Mitsuma et al. 2009) und inzwischen ist es sogar gelungen, natürlich gefaltetes, in OPKs organisiertes M23-AQP4 (s.u.) aus Zelllinien mit einem speziellen chromatographischen Trennverfahren (Native Size Exclusion Chromatography) zu isolieren und zu analysieren (Pisani, Simone et al. 2019). Aber die Entwicklung einer Methode, um integrale humane OPKs exprimieren, isolieren und kristallisieren zu können, steht noch aus, so dass deren subnanometrische Eigenschaften weiterhin unbekannt bleiben (Pisani, Simone et al. 2019).

Zur Annäherung an Sinn, Bedeutung und Bedingungen der OPK-Bildung sollen nun Vorkommen, Zusammensetzung, Funktion und Regulation sowohl in gesunden als auch in pathologisch veränderten Zellen betrachtet werden. Obwohl es auch in anderen Geweben vorkommt, ist die Rolle von Aquaporin 4 besonders in Niere und Gehirn untersucht worden. Diese Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit dem astrozytären Aquaporin 4, weil in der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit entstand, die Untersuchung und Charakterisierung der Blut-Hirn-Schranke im Vordergrund steht. Die hauptsächliche Aufgabe von AQP4 im zentralen Nervensystem ist der Wassertransport und die damit verbundene Rolle für den Flüssigkeitsabtransport (Glymphatics)(Iliff and Nedergaard 2013) sowie bei der Ödembildung (Lisjak, Potokar et al. 2017). Der Einfluss auf die Zellmigration wurde mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Während McCoy und Sontheimer (2007) nur für AQP1, nicht aber für AQP4 einen positiven Einfluss auf die Fähigkeit zu Migration fanden, war es bei Saadoun et

al. (2005) gerade das AQP4, welches die Migration unterstützte. Auf diesen Widerspruch soll in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

In dieser Arbeit soll vorwiegend die Rolle von Aquaporin 4 im pathologisch veränderten Gehirn bei malignen Hirntumoren betrachtet, zuvor aber ein Überblick über den aktuellen Kenntnisstand bezüglich Aufbau und Aufgaben des gesunden Astrozyten, insbesondere im Hinblick auf den mit der Expression von AQP4 und seiner Organisation in OPKs verbundenen Polarität gegeben werden.

1.2 AQUAPORIN-4

Obwohl schon lange daran gezweifelt wurde, dass transmembranärer Wassertransport auf reiner Diffusion beruht (Brown 2017), war die Suche nach den entsprechenden zellulären Transportmechanismen erst in den 1980er Jahren erfolgreich (Benga 2006). Inzwischen hat man sowohl bei Säugetieren als auch bei Pflanzen, Bakterien und Insekten Proteine entdeckt, die die Wasserpermeabilität erheblich vergrößern können und einen regulierten Transport ermöglichen. Diese Proteine, die alle eine ähnliche Struktur und Aminosäuresequenz haben, werden zusammengefasst zur Familie der Aquaporine mit mindestens 13 Mitgliedern (Li and Wang 2017).

Aquaporin 4 hat als Monomer ein Molekulargewicht von ungefähr 30kDa und besitzt sechs helikale Transmembrandomänen, die eine enge hydrophile Pore für wasserselektiven Transport bilden (Ho, Yeh et al. 2009).

Wie die anderen Aquaporine liegt AQP4 in Membranen als Tetramer vor, existiert aber als einziges Aquaporin natürlicherweise in mindestens sechs verschiedenen Isoformen (Moe, Sorbo et al. 2008, Lafrenaye and Simard 2019), von denen die beiden wichtigsten Vertreter als M1 und M23 bezeichnet werden: Durch alternatives Splicen entstehen eine lange (323 Aminosäuren) Isoform mit Translationsinitiation bei Met-1 (M1/ AQP4a) und eine kürzere (301 Aminosäuren) mit Translationsinitiation an Met-23 (M23/AQP4c)(Jung, Bhat et

al. 1994, Yang, Ma et al. 1995, Lu, Lee et al. 1996). Diese Isoformen können sich auch zu Heterotetrameren zusammenlagern (Neely, Christensen et al. 1999), wobei der relative Anteil der beiden Isoformen die Fähigkeit zur Ausbildung von orthogonalen Partikelkomplexen beeinflusst. M1-transfizierte Zellen haben gar keine oder sehr kleine OPKs, M23-transfizierte Zellen zeigen im Gegensatz dazu sehr große OPKs. Demgegenüber führt ein Gemisch aus beiden Isoformen zur Ausbildung von OPKs mittlerer Größe, die derjenigen bei Zellen *in vivo* ähnelt (Furman et al., 2003).

Im Gegensatz zu anderen Aquaporinen, die z.T. auch für kleine Moleküle wie Glycerol durchlässig sind, scheint AQP4 eher selektiv wasserpermeabel zu sein. Allerdings wurde unter bestimmten Bedingungen zusätzlich eine gewisse Transportfähigkeit für Ammoniak gefunden (Assentoft, Kaptan et al. 2016) und auch Durchlässigkeit für Kohlendioxid wurde beschrieben (Musa-Aziz, Chen et al. 2009).

Aquaporin-4 wird in der Plasmamembran von Astrozyten im zentralen Nervensystem, von Epithelzellen in Niere, Lunge, Magen und exokrinen Drüsen sowie im Skelettmuskel (Frigeri, Gropper et al. 1995, Vizzaccaro, Terracciano et al. 2018) und im Herzen (Politi, Ochoa et al. 2019) exprimiert. Seine Funktion beruht auf osmotischen Ungleichgewichten, die einen bidirektionalen Transport ermöglichen. Eine Regulation kann beispielsweise erfolgen durch Phosphorylierung (Yukutake and Yasui 2010), Palmitoylierung, posttranslationale Modifikation oder situationsangepasste bzw. zellspezifische Transskription (Umenishi and Verkman 1998).

Die Erforschung der genauen Aufgaben und der Funktionsweise von AQP4 wird erschwert durch die Tatsache, dass sich seine Wassertransportfähigkeit, im Gegensatz zu anderen bei Säugern bekannten Wasserkanälen, wegen eines fehlenden Cysteinrestes nicht durch Quecksilberverbindungen blockieren lässt, weshalb es lange Zeit auch als Mercurial Insensitive Water Channel (MIWC) bezeichnet wurde (Shi and Verkman 1996). Interessanterweise wurde zwar als möglicherweise spezifischer Inhibitor für AQP4 das als Leitsubstanz der

Diuretika aus der Klasse der Carboanhydrasehemmer bekannte Acetazolamid ins Spiel gebracht (Huber et al., 2007; (Tanimura, Hiroaki et al. 2009), jedoch scheint die Wirkung dieser Substanz auf die Wasserpermeabilität von AQP4 zumindest umstritten zu sein (Rodriguez-Grande, Konsman et al. 2017). Viele Versuche zu Aquaporin-4 stützen sich auf die Verwendung von AQP4-Knock-out-Mäusen, was angesichts von zahlreichen Kompensationsmechanismen (Nicchia, Pisani et al. 2016, Katoozi, Skauli et al. 2017, Wu, Zhang et al. 2017, Zhang, Xu et al. 2019) zu Interpretationsschwierigkeiten führt, aber dennoch wertvolle Hinweise zu seiner Rolle im Wasserhaushalt des Gehirns (Manley, Fujimura et al. 2000, Papadopoulos, Manley et al. 2004), bei der Astrozytenmigration und der Bildung von Glianarben (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005, Auguste, Jin et al. 2007), im Kontext der Neuroexzitation (Padmawar, Yao et al. 2005, Binder, Yao et al. 2006), in neurosensorischen Signalwegen (Li and Verkman 2001, Lu, Zhang et al. 2008) und bei neuroinflammatorischen Prozessen (Li, Zhang et al. 2011) ermöglicht hat.

Noch schwieriger gestaltet sich die Aufklärung der Frage, welche Signifikanz der speziellen Organisation in orthogonalen Partikelkomplexen zukommt. Einige Hinweise wurden gefunden im Zusammenhang mit den Möglichkeiten zum Wassertransport (Silberstein, Bouley et al. 2004, Fenton, Moeller et al. 2010): Hier gibt es Hinweise darauf, dass die in OPKs organisierte Isoform M23 nicht nur eine größere Transportkapazität hat als die längeren Isoformen, sondern auch sensitiver reagiert auf eine Regulation mittels der Proteinkinase C (PKC), die zur Internalisierung der Wasserkanäle führt und damit die Transportkapazität schnell senken kann.

Kontrovers diskutiert wird eine mögliche Bedeutung der OPKs bezüglich der Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion (Hiroaki, Tani et al. 2006, Zhang and Verkman 2008, Thompson and Sontheimer 2016).

Zunehmendes Interesse hat in den letzten Jahren die Beteiligung von AQP4 an der Neuromyelitis Optica (NMO) gefunden, einer der Multiplen Sklerose ähnlichen Erkrankung, bei der Antikörper gegen AQP4 im Zusammenhang mit

einer Schädigung von Astrozyten, Neuroinflammation und Demyelinisierung eine Rolle spielen (Lennon, Kryzer et al. 2005, Jarius, Aboul-Enein et al. 2008). Interessanterweise binden die Autoantikörper in der NMO bevorzugt an die AQP4- Isoform M23, und zwar insbesondere, aber nicht ausschließlich, wenn die Moleküle in OPKs organisiert sind (Nicchia, Mastrototaro et al. 2009, Crane, Lam et al. 2011, Iorio, Fryer et al. 2013). In diesem Zusammenhang wird inzwischen vermutet, dass die mangelnde Bindung von NMO-Antikörpern an das Aquaporin-4 im Skelettmuskel ihren Grund darin haben könnte, dass dieses dort in anderen Strukturen organisiert ist, welche zwar den OPKs in Astrozyten ähneln, aber eher als verstreute und teilweise lineare Gebilde vorliegen (Rosito, Nicchia et al. 2018).

Noch nicht geklärt ist, inwieweit die Antikörper pathogen wirken (Graber, Levy et al. 2008), (Hinson, Romero et al. 2012) (Rossi, Ratelade et al. 2012) (Hinson, Lennon et al. 2016), aber die bevorzugte Bindung an Aquaporin-4 in orthogonalen Partikelkomplexen könnte Funktionen beeinträchtigen, die mit dieser supramolekularen Anordnung verbunden sind.

1.3 AUFBAU ASTROZYT

Das Gewebe im zentralen Nervensystem besteht im Wesentlichen aus Nervenzellen und Gliazellen. Während die Nervenzellen für die elektrische Signalübertragung zuständig sind, übernehmen die unterschiedlichen Formen der Gliazellen spezifische Aufgaben, die für das regelrechte Funktionieren der neuronalen Aktivität unerlässlich sind. Die Gliazellen lassen sich einteilen in Makro- und Mikroglia, wobei die Mikrogliazellen, die die Makrophagen des zentralen Nervensystems darstellen, mesenchymaler Herkunft sind, während die Zellen der Makroglia ebenso wie die Neurone dem ektodermalen Neuralrohr entstammen, im Unterschied zu diesen aber ihre Fähigkeit zur Proliferation behalten und den Ausgangspunkt der Mehrzahl der Hirntumoren bilden. Die Makrogliazellen umfassen einerseits die Astrozyten mit ihren Untertypen Ependymzellen, Epithelzellen des Plexus choroideus, retinalen Pigmentepithelzellen und Pituizyten der Circumventrikularorgane, sowie andererseits die Oligodendrogliazellen, die als Hauptaufgabe die Myelinisierung

der Axone übernehmen. Die klassischen Astrozyten des Hirnparenchyms verdanken ihren Namen der Sternform. Mit ihren Ausläufern, deren Stabilität durch Intermediärfilamente vom Typ des astrozytenspezifischen Protein *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) gewährleistet wird, schaffen sie eine feinverzweigte Umgebung für die Nervenzellen (Reichenbach and Wolburg 2009). Außerdem sind Astrozyten durch eine große Zahl von Gap Junctions verbunden, sowohl untereinander als auch mit Oligodendrozyten zu einem das ganze ZNS durchziehenden funktionellen Synzytium. Die Ausstattung mit zahlreichen Ionenkanälen, Rezeptoren und Gap Junctions ermöglicht eine umfangreiche Kommunikation mit der Umgebung. Je nach Lokalisation nehmen die Astrozyten unterschiedlicher Typen verschiedene Morphologien an; so findet man in der grauen Substanz vornehmlich Astrozyten vom protoplasmatischen Typ, in der weißen Substanz überwiegt solche des fibrillären Typs. Allerdings stammt diese Unterscheidung aus dem 19. Jahrhundert und ist heute nicht mehr allgemein akzeptiert (Sosunov, Wu et al. 2014). Als weitere Variante der Makroglia ist noch die Radialglia zu nennen, die sich anfangs vom Ependym bis zur Oberfläche des Gehirns ausspannt und im sich entwickelnden Gehirn eine Leitstruktur für wandernde Neurone bildet und sich später zu multipolaren Astrozyten wandelt (Pollen, Nowakowski et al. 2015).

1.4 AUFGABEN VON ASTROZYTEN UND DIE ROLLE VON AQUAPORIN 4

War zunächst nur ihre Stützfunktion augenfällig, mit der sie das im zentralen Nervensystem fehlende bindegewebige Stroma ersetzen, offenbarten sich mit immer subtileren Untersuchungsmethoden zahlreiche weitere Aufgabengebiete der Astrozyten. Die Morphologie der Astrozyten reflektiert dabei ihre physiologische Funktion: Mit langen Ausläufern können sie Synapsen lamellenförmig einhüllen, an synapsenfernen Stellen bilden sie als Endfüße bezeichnete Strukturen aus (Wolburg, Noell et al. 2012). Diese Endfüße finden sich sowohl an den zerebralen Blutgefäßen als auch an den Grenzgebieten an der Oberfläche des Gehirns, die mit einer Basallamina bedeckt sind. Die

Kontaktzone zwischen Blutgefäß und Astrozyt wird als *Glia limitans perivascularis*, die Kontaktzone zwischen Astrozyten und der Oberfläche des Gehirns als *Glia limitans superficialis* bezeichnet. Hier wird die Polarität als eine wesentliche Eigenschaft des Astrozyten offenbar. Die Membrandomänen des Astrozytenendfußes, die die Basallamina des Endothels bzw. der Pia mater des oberflächlichen Gehirns berühren, sind extrem reich an Kaliumkanälen und Wasserkanälen des Typs AQP4, die bekanntlich als OPKs in Erscheinung treten. Sobald sich die Membran des Astrozyten von den mesenchymalen Räumen abwendet, um in die Tiefe des Parenchyms „abzutauchen“, wird die OPK-Dichte drastisch reduziert (Landis and Reese 1981, Anders and Brightman 1986). Physiologisch hat das folgende Konsequenz: Neuronale Synapsen entlassen bei Erregung viele Kaliumionen in den Extrazellularraum. Die Kaliumkonzentration muss aber schnell wieder absinken, um die Neurone wieder erregbar zu machen. Dazu aktivieren die Astrozyten einen Uptake-Mechanismus, um das Kalium effizient aufzunehmen. Osmotisch wird Wasser in die Astrozyten nachgezogen, was aber auf Dauer zu einer Schwellung und schließlich zum Platzen der Zelle führen würde. Das ist der Grund dafür, dass an synapsenfernen Stellen, d.h. an den Endfüßen der perivaskulären und superfiziellen Astrozytenfortsätze das Kalium wieder abgegeben wird, und zwar durch dort angesiedelte Kalium- und Wasserkanäle. Dieses Phänomen ist als räumliche Pufferung bekannt (Newman 1986, Kofuji and Connors 2003). Die Basallamina enthält extrazelluläre Matrixbestandteile wie z.B. Agrin, die dafür sorgen, dass das AQP4 an diese kritischen Kontaktzonen zwischen Gliazelle und Mesenchym gebunden wird (Rascher, Fischmann et al. 2002). Dieses Phänomen tritt als Polarität in Erscheinung. Agrin ist ein Proteoglykan aus der Gruppe der Heparansulfate, das vor allem für seine Fähigkeit bekannt ist, nikotinische Acetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Membran motorischer Endplatten in erstaunlicher Konzentration zu verankern. Verschwindet nun das Agrin, durch welchen Prozess auch immer (z.B. enzymatische Auflösung durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen), können das AQP4 und die Kaliumkanäle nicht mehr an diesen Endfußmembranen gehalten werden, die Kanäle gelangen an „verbotene“

Stellen, die Polarität der Gliazelle wird reduziert (Warth, Kroger et al. 2004, Wolburg, Noell et al. 2009).

Als Teil der neurovaskulären Einheit sind Astrozyten zusammen mit Endothelzellen, Perizyten und Neuronen maßgeblich beteiligt an der Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke, zudem können sie durch parakrine Faktoren zur Regulation des Blutflusses im Gehirn beitragen (Attwell, Buchan et al. 2010). Als Reaktion auf Verletzungen des Gehirns bilden sich durch Proliferation von Astrozyten Glianarben, die entgegen früherer Auffassungen kein Hindernis, sondern eher eine Unterstützung für die Aufrechterhaltung der synaptischen Funktionen sind (Anderson, Burda et al. 2016). Auch sind Astrozyten nicht nur zuständig für die Kontrolle der Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit, sondern auch aktiv beteiligt an der Regulation synaptischer Transmission (Dallerac, Chever et al. 2013); verschiedene Subtypen scheinen sogar einen Einfluss auf die Intelligenz (Tabata 2015), das Erinnerungsvermögen (Henneberger, Papouin et al. 2010), und das Verhalten, zumindest bei Nagetieren, (Oliveira, Sardinha et al. 2015) zu haben. Bei dieser Vielfalt an Aufgaben ist verständlich, dass astrozytäre Dysfunktionen bei zahlreichen Erkrankungen des Gehirns eine Rolle spielen (Trujillo-Estrada, Gomez-Arboledas et al. 2019). Nicht nur bei traumatischen, ischämischen, neoplastischen und neurodegenerativen Hirnpathologien sind sie von maßgeblicher Bedeutung, sondern auch bei psychiatrischen Erkrankungen wie der Depression (Zhou, Ikegaya et al. 2019) konnte eine Beteiligung von Astrozyten gefunden werden.

Die Bedeutung der Astrozyten für den zerebralen Wasserhaushalt wird schon durch die reiche Ausstattung mit Aquaporinen deutlich: diese ermöglichen Flüssigkeitsströme zwischen den intrazellulären, interstitiellen, vaskulären und ventrikulären Kompartimenten, welche unter der strikten Kontrolle osmotischer und hydrostatischer Gradienten stehen (Amiry-Moghaddam and Ottersen 2003). Die Rolle der astrozytär vermittelten Entsorgung von Abfallprodukten des Hirnstoffwechsels als Ersatz für das im ZNS fehlende Lymphsystem (Iliff, Wang et al. 2012) wird zunehmend unter dem Begriff *Glymphatic System* diskutiert

(Jessen, Munk et al. 2015). Das hierbei entworfene Modell beinhaltet eine entscheidende Rolle des paravaskulären Virchow-Robin-Raumes für den, über arterielle Pulswellen getriebenen, konvektiven Transport von Flüssigkeiten und könnte sehr gut die auffällige AQP4-Dichte an der hier lokalisierten *Glia limitans perivascularis* erklären.

1.5 ASTROZYTOM

Tumoren des zentralen Nervensystems sind zwar eher seltene Erkrankungen, stellen aber eine schwerwiegende Belastung für die Betroffenen dar. Der größte Anteil der hirneigenen, also nicht metastatischen, zerebralen Tumore geht nicht von Nervenzellen aus, sondern ist glialen Ursprungs, was sicher auch auf die bei diesen Zellen im Gegensatz zu den Neuronen lebenslang erhaltenen Teilungsfähigkeit zurückzuführen ist. Die altersstandardisierte jährliche Inzidenzrate in Europa (1995-2002) betrug bei den glialen Tumoren insgesamt 5 pro 100 000 Einwohner und bei der hier betrachteten Untergruppe der Astrozytome 4,6 pro 100 000 Einwohner (Crocetti, Trama et al. 2012).

Zur Planung der Behandlung sowie für wissenschaftliche Studien wird üblicherweise das Klassifikationssystem der World Health Organization (WHO) verwendet, in dem man die Gliome zum Zeitpunkt unserer Studie auf der Basis charakteristischer histomorphologischer Ähnlichkeiten mit ihrer mutmaßlichen Ausgangszelle als Astrozytom, Oligodendrogliom, Mischgliom (Oligoastrozytom) und Ependymom bezeichnet hat (Louis, Perry et al. 2016). Inzwischen werden zunehmend molekularpathologische Marker mit einbezogen (Schulz-Schaeffer 2017) und es gibt Hinweise darauf, dass die Tumoren sich nicht aus den jeweiligen ausgereiften Zelltypen, sondern eher aus Vorläuferzellen entwickeln (Lathia, Mack et al. 2015). Zusätzlich erfolgt eine Einteilung in vier Schweregrade nach histologischen Malignitätskriterien, wobei Grad I einem lokalisierten Wachstum entspricht, eher bei Kindern auftritt und in unserer Studie nicht berücksichtigt wird, während die Grade II bis IV 80% der

primären Hirntumore bei Erwachsenen ausmachen und diffus infiltrierend wachsen. Bei den hier untersuchten Astrozytomen werden diese bezeichnet als *Diffuses Astrozytom* (WHO-Grad II), *Anaplastisches Astrozytom* (WHO-Grad III) und *Glioblastom* (GBM, Glioblastoma Multiforme; WHO-Grad IV), wobei Grad II als niedriggradig (low grade), Grad III und IV als hochgradig (high grade) eingestuft werden (Wesseling and Capper 2018). Das Glioblastom kann entweder, wie in der Mehrzahl der Fälle und vor allem bei älteren Patienten, direkt entstehen als sogenanntes primäres Glioblastom oder aber im Sinne einer Progression aus einem Astrozytom niedrigeren Grades hervorgehen als sekundäres Glioblastom (Ohgaki and Kleihues 2013). Infiltrierende Astrozytome werden abhängig von der Lokalisation und Wachstumsrate meist durch Anfälle, Kopfschmerzen oder fokale neurologische Defizite klinisch auffällig (Hansen, Pedersen et al. 2019), verursacht durch die Tumormasse sowie ödematöse Veränderungen im umgebenden Gewebe. Gut differenzierte diffuse Astrozytome können über Jahre stabil bleiben und gewähren eine mittlere Überlebenszeit von mehr als fünf Jahren, in den meisten Fällen erfolgt aber schließlich doch eine Progression durch das Auftreten schneller wachsender Tumoranteile, so dass letzten Endes nahezu jedes diffuse Astrozytom als Glioblastom endet (Ding, Yu et al. 2017). Durch die diffuse Infiltration des Hirngewebes, deren Hintergründe in der Diskussion noch genauer beleuchtet werden sollen, ist auch bei der als *Gross Total Resection (GTR)* bezeichneten radikalen Resektion ein Verbleib von Resttumor kaum zu vermeiden (Brown, Brennan et al. 2016). Die Prognose für Patienten mit Glioblastom ist sehr schlecht und auch bei der gegenwärtig üblichen Kombinationstherapie aus Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie nach dem Stupp-Protokoll (Stupp and Roila 2009) bleibt nach der Diagnose nur noch eine mittlere Überlebenszeit von 15 Monaten (Urhie, Turner et al. 2018). Die Prognose ist etwas besser bei Tumoren mit einer Methylierung am MGMT-Gen, was damit zusammenhängt, dass die Expression des DNA-Reparaturproteins O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase den Tumor resistent macht gegenüber Alkylantien wie das im Stupp-Protokoll eingesetzte Temozolomid (Binabaj, Bahrami et al. 2018). Liegt dieses Gen methyliert vor und ist somit seine Expression verhindert, sind die

DNA- Reparaturmechanismen beeinträchtigt und die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika steigt an, insbesondere in Kombination mit Radiotherapie (Criniere, Kaloshi et al. 2007).

Auch die bei vielen Gliomen vorliegende IDH1-Mutation, die dazu führt, dass die Tumorzellen aufgrund des Mangels an der für die oxidative Carboxylierung von Isozitat zu Alpha-Ketoglutarat benötigten Isozitatdehydrogenase empfindlicher sind gegenüber oxidativem Stress, wurde als unabhängiger Faktor für längeres Überleben identifiziert (Bleeker, Atai et al. 2010).

1.6 FRAGESTELLUNG

1.6.1 GIBT ES UNTERSCHIEDE IM OPK-VERLUST IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TUMORMALIGNITÄT?

Wegen der drastischen Reduktion der OPK-Dichte in humanen Glioblastomen wollten wir herausfinden, ob eine graduelle Abnahme in der Ausbildung dieser Strukturen mit zunehmender Malignität zu beobachten ist.

1.6.2 GEHT DER OPK-VERLUST EINHER MIT EINER VERÄNDERUNG DES VERHÄLTNISSES DER AQP4-ISOFORMEN M23 UND M1?

Da im Gliom die Expression von Aquaporinen generell hochreguliert ist (Warth, Kroger et al. 2004) und dennoch eine Abnahme von OPKs zu beobachten ist, stellte sich die Frage, ob ein Überwiegen der Isoform M1 ursächlich für den OPK- Verlust ist.

1.6.3 WIE STELLT SICH DAS M23/M1-VERHÄLTNIS IN ZELLKULTUREN VON GESUNDEN MURINEN ASTROZYTEN UND IN HUMANEN GLIOMZELLKULTUREN DAR IM VERGLEICH ZU DEN PATIENTENGEWEBEN SOWIE IM VERGLEICH ZU GESUNDEM HIRNGEWEBE?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 GEWEBE

Die Tumorresektate wurden unter folgenden anonymisierten Bezeichnungen registriert:

Nummer	Bezeichnung	WHO-Grad	IDH-1-Status
1	143/13	II	mutiert
2	40/14	II	mutiert
3	13/14	II	mutiert
4	YD 56/13	II	mutiert
5	28/14	II	mutiert
6	YD 7/14	II	mutiert
7	41/14	III	mutiert
8	35/13 YD	III	mutiert
9	57/13 YD	III	mutiert
10	132/14	III	mutiert
11	18/14	III	mutiert
12	88/14	IV	mutiert

13	87/14	IV	mutiert
14	619/13	IV	mutiert
15	44/14	IV	Wildtyp
16	42/14	IV	Wildtyp
17	39/14	IV	Wildtyp
18	32/14	IV	Wildtyp
19	101/14	IV	Wildtyp
20	111/14	IV	Wildtyp
21	112/14	IV	Wildtyp
22	114/14	IV	Wildtyp

Tabelle 1: World Health Organization (WHO) Grading und IDH1 (Isocitratdehydrogenase (NADP (+)) 1) - Status der Patienten

2.1.2 MATERIAL FÜR DEN GEFRIERBRUCH

Material	Hersteller
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Glutaraldehyd 2,5%	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Glyzerol, 30%	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
HCl, 1N	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Kupfernetzchen	Stork Veko, Eerbeek, Niederlande
Natriumhypochlorit, 12%	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Natrium- Kakodylat 0,1M	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Pioloform-Pulver	Wacker Chemie AG, Deutschland
Zellschaber	Coming, Bodenheim

Tabelle 2: Material für den Gefrierbruch

2.1.3 MATERIAL FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE

Material	Hersteller
Antikörper primär für AQP4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Antikörper sekundär für AQP4	Fa. Dianova, Hamburg
Aqua destillata	
CaCl	Merck Chemicals, Darmstadt
Citratpuffer	Hergestellt aus Tri- Na-Citrat-Dihydrat und Zitronensäure, Anleitung s. u.
DAPI	Zytomed, Berlin
Diluent	Zytomed, Berlin
Ethanol	VWR Prolab Chemicals, Fontenay- sous- Bois, France
Glyzerin	Merck Chemicals, Darmstadt
HCl	Merck Chemicals, Darmstadt
Milliporewasser	
Mowiol	Merck Chemicals, Darmstadt

NaCl	Merck Chemicals, Darmstadt
TBS-Puffer	Hergestellt aus Trizma Base, NaCl, CaCl ₂ und HCl, Anleitung s. u.
Tri-Na-Citrat Dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe
Trizma Base	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	VWR Prolab Chemicals, Fontenay- sous- Bois, France
Zitronensäure	Merck Chemicals, Darmstadt

Tabelle 3: Material für die Immunhistochemie

Herstellung des Citratpuffers:

Stammlösung:

29,4 g Tri- Na- Citrat Dihydrat werden in 850 ml Aqua destillata gelöst, mit 0,1 M Citronensäure auf pH 6 eingestellt und mit Aqua destillata auf 1 l aufgefüllt.

Herstellung der Pufferlösung TBS:

Stammlösung:

60,6 g Trizma Base, 88g NaCl und 1,47 g CaCl₂ x H₂O werden in 900 ml Aqua destillata gelöst, mit konz. HCl auf pH 7,4 eingestellt und mit Aqua destillata auf 1l aufgefüllt.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird die Stammlösung jeweils im Verhältnis 1:10 mit Aqua destillata verdünnt.

2.1.4 MATERIAL FÜR DIE QRT-PCR

Material	Hersteller
Human Brain, Cerebral Cortex Total RNA	Clontech, Mountain View, USA
Mouse Brain Total RNA	Clontech, Mountain View, USA
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 4: Material für die qRT-PCR

2.1.5 MATERIAL FÜR DIE ZELLKULTUR

Material	Hersteller
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA),
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA),
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5: Material für die Zellkultur

2.2 METHODEN

Tumorgewebe von 27 Patienten mit Astrozytomen der WHO-Klassen II, III und IV wurden mittels Gefrierbruchtechnik und quantitativer Real Time- PCR (qRT-PCR) untersucht. Die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen hat das Projekt genehmigt (Projekt-Nummer 663/2013BO2) und sah keine Notwendigkeit, die Zustimmung der Patienten einzuholen. Alle Patienten wurden in der neurochirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen in den Jahren 2013 und 2014 behandelt.

2.2.1 GEWEBEGEWINNUNG

Die Tumorgewebeproben wurden direkt im Anschluss an die operative Resektion in sterile Transportgefäße überführt, welche je nach Verwendungszweck die oben beschriebenen verschiedenen Medien für die Gefrierbruchelektronenmikroskopie, die konventionelle Elektronenmikroskopie, die Immunhistochemie oder die Zellkultur enthielten. Bei der Auswahl der Gewebeproben wurde, insbesondere auch in Zusammenarbeit mit den Kollegen aus der Neurochirurgie, darauf geachtet, lediglich repräsentative Tumoranteile in die Untersuchungen einzubeziehen.

2.2.2 ZELLKULTUR

Für die humane Zellkultur wurde Glioblastomgewebe direkt nach der chirurgischen Entfernung unter sterilen Bedingungen in ein Transportmedium (HEPES buffered medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verbracht. Die Zellen wurden kurz darauf unter Verwendung von Trypsin enzymatisch isoliert, nach Zentrifugation mit Kulturmedium in Suspension gebracht, mittels 70µm-Zellfilter vereinzelt und in Kulturflaschen ausgesät. Die Inkubation erfolgte in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ mit DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1%

Penicillin und Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Für die humane Zelllinienkultur wurden U373-Zellen ebenso kultiviert.

Für die murine Zellkultur wurden Astrozyten aus dem Cortex von fünf Tage alten Mäusen isoliert analog der oben für das humane Glioblastom beschriebenen Methode und dann unter Standardbedingungen kultiviert (Crane, Tajima et al. 2010); (Tani, Mitsuma et al. 2009). Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Weiterverarbeitung der Zellen für die qRT-PCR und Gefrierbruchanalyse.

2.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE

Zur Untersuchung der Expression von Aquaporin 4 mittels immunhistochemischer Methoden wurde das Gewebe in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet, welche gekühlt und anschließend am Mikrotom in 3,5µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanisierte Glasobjektträger aufgebracht wurden.

Nach Trocknung im Brutschrank bei 35°C erfolgte die Entparaffinisierung und Demaskierung mittels Durchlaufen folgender Behandlung:

Einlegen in Xylol für 3x5 min.

Spülung mit EtOH 100% für 2x5 min.

Spülung mit EtOH 96% für 2x5 min.

Spülung mit EtOH 75% für 2x5 min.

Pufferung in TBS für 3x5 min.

Demaskierung mit 1x4 min. im Dampfdrucktopf

Spülung in Aqua destillata

Kühlung auf Eis für 20 min.

Pufferung in TBS für 3x5 min.

Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit und Trocknung.

Die Markierung erfolgt zunächst mit Primärantikörper für AQP4, der zuvor mit Antibody- Diluent 1:100 verdünnt wurde, durch aufbringen von 100µl Antikörperlösung auf jeden Objektträger sowie als Negativkontrolle jeweils ein Vergleich, auf den lediglich 100µl Antibody- Diluent aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht in Dunkelheit bei 4°C.

Am Folgetag wurde der Sekundärantikörper nach 3x10 min. Pufferung in TBS in einer Verdünnung mit Diluent von 1:200 aufgebracht, 1h inkubiert. Nach Pufferung für 3x5 min. in TBS und Aufbringen von Mowiol wurden die Objektträger mit Deckgläsern versehen.

Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss LSM 510 META, Oberkochen, Deutschland) mit einem HeNe- Laser bei 543 nm und 40facher Vergrößerung.

2.2.4 GEFRIERBRUCHTECHNIK

Die Gefrierbruchelektronenmikroskopie bietet die Möglichkeit, biologische Membranen und ihre Reaktion auf Umwelteinflüsse zu untersuchen, ohne diese durch chemische Fixationsverfahren zu verfälschen (Branton 1966) und wurde hier verwendet, um die Umverteilung von Aquaporin 4-Wasserkanälen in Astrozytomen morphologisch darzustellen.

Bei dieser Methode werden biologische Proben schockgefroren und auseinandergebrochen. An der Bruchfläche können strukturelle Details sichtbar gemacht werden, indem unter Vakuum aufgedampftes Platin sowie Kohlenstoff die Bruchfläche als sogenannte Replica stabilisieren und der Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop zugänglich machen (Severs 2007). Es hat sich herausgestellt, dass die Brüche stets innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran erfolgen.

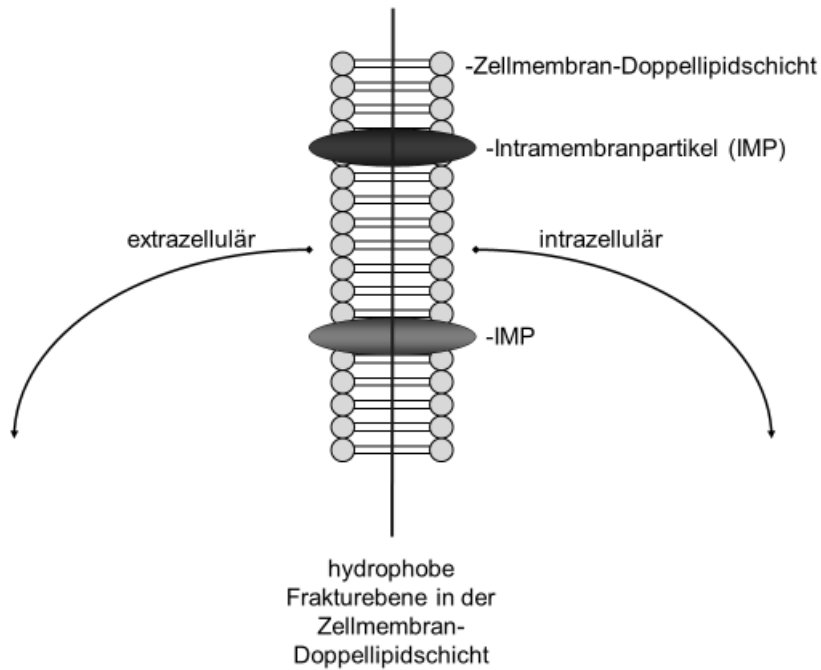


Abbildung 1: Bruchlinie beim Gefrierbruch (mit freundlicher Genehmigung modifiziert übernommen von H. Wolburg). Die Frakturebene verläuft innerhalb der hydrophoben Innenfläche der Doppellipidschicht der Zellmembran.

Als Vorbereitung für den Gefrierbruch wurde das Gewebe mit 2,5% Glutaraldehyd zunächst über zwei Stunden fixiert und anschließend bei 4°C in 0,1M Kakodylatpuffer (pH 7,4) aufbewahrt. Daraufhin wurden die Gewebe mit 30%igem Glyzerol gefriereschützt in flüssigem Stickstoff (-210°C) schockgefroren und in einer Gefrierbruchapparatur (BAF 400 D, Balzers, Liechtenstein) bei einer Temperatur von -150°C und einem Vakuum von ca. 5×10^{-6} gebrochen.

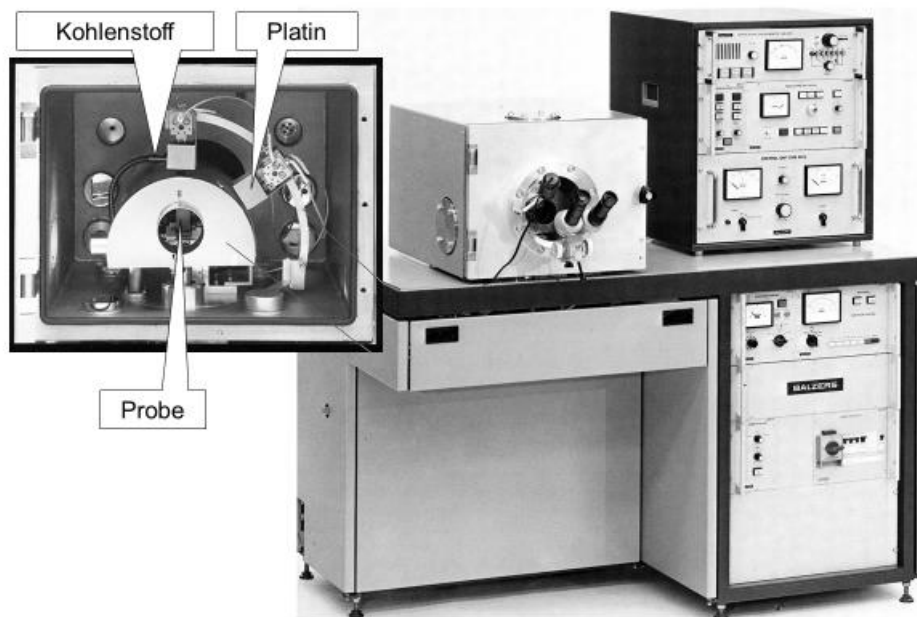


Abbildung 2: Gefrierbruchapparat

(modifiziert übernommen aus Katalog der Firma Balzers)

Die äußere Hälfte wird vom Inneren der Zelle aus betrachtet und als E- Face (extraplasmatische Seite) bezeichnet, die innere Hälfte wird von außen betrachtet und als P-Face (protoplasmatische Seite) bezeichnet.

Das gebrochene Gewebe wurde zur Verbesserung des Kontrastes unter einem Winkel von 45° mit einer Platinschicht von 2nm Dicke sowie zur Stabilisierung unter einem Winkel von 90° mit einer Kohleschicht von 20 nm Dicke bedampft.

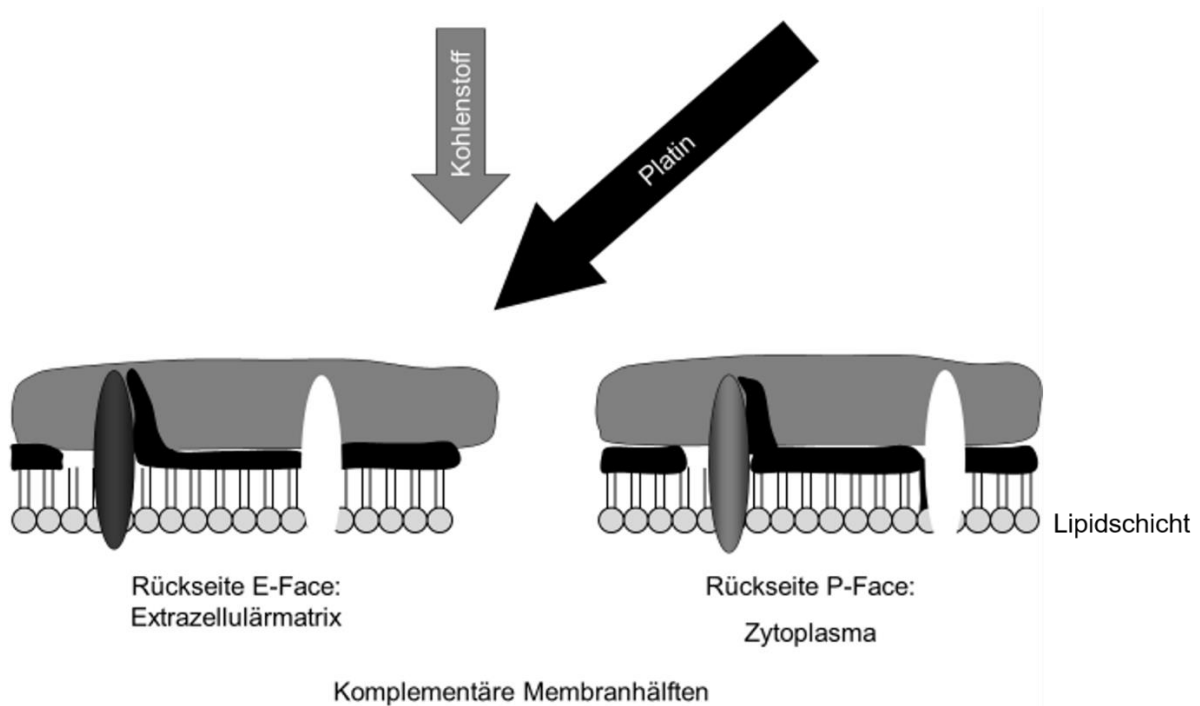


Abbildung 3: Bedampfung der Bruchflächen (mit freundlicher Genehmigung modifiziert übernommen von H. Wolburg). Die Bruchebene entlang der hydrophoben Innenfläche der Zellmembran-Doppellipidschicht wird nacheinander mit Platin und Kohlenstoff bedampft. Dabei werden in der jeweiligen Membranhälfte verbliebene Intramembranpartikel, die hier als Ellipsoide dargestellt sind, als Erhebungen sichtbar. Die Lücken, die entstehen, wenn der entsprechende Intramembranpartikel in der komplementären Membranhälfte verbleibt, werden entsprechend als Vertiefungen in der Replica erscheinen.

Anschließend wurde die so entstandene Replica mit 12%iger Natriumhypochloritlösung von Zellmaterial gereinigt und nach mehreren Spülungen in destilliertem Wasser auf zuvor mit Pioloform beschichtete Kupfergrids aufgebracht. Eine detaillierte Anleitung für die Durchführung von Gefrierbrüchen findet sich im Protokoll *Freeze-fracture electron microscopy* von Nicholas J. Severs (Severs 2007).

Die Replicaen wurden untersucht mit einem Elektronenmikroskop des Typs EM 10a (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland; (Wolburg-Buchholz, Mack et al. 2009). Für die Bestimmung der OPK- Dichte wurden dann von jedem Tumorgewebe bzw. jeder Zellkultur Replicaen repräsentativer Membranabschnitte ausgewählt, fotografiert und

die OPK-Dichten bestimmt als OPKs pro $4\mu\text{m}^2$ bei einer Vergrößerung von 100.000:1.

Für die Zählung war es zunächst einmal notwendig, Kriterien festzulegen, die einen orthogonalen Partikelkomplex als „typisch“ definieren. Unabdingbares Kriterium für die Einordnung einer Membrankomponente als OPK ist dabei, dass eine Zusammenlagerung von mindestens vier Tetrameren in einer orthogonalen Anordnung erkennbar ist. Da die Zählung aber dennoch durch viele Faktoren verfälscht werden kann (Rash and Giddings 1989) und einer gewissen Subjektivität unterliegt, ließen wir die Zählungen von mehreren Mitgliedern der Arbeitsgruppe wiederholt sowohl verblindet als auch unverblindet durchführen und bildeten dann den Mittelwert der gut übereinstimmenden Ergebnisse.

2.2.5 QUANTITATIVE REAL TIME-PCR (qRT-PCR)

Mit der Methode der qRT-PCR ist es möglich, quantitative Aussagen über die Genexpression in biologischen Proben zu treffen. Zu diesem Zweck wird die interessierende mRNA zunächst aus der Probe extrahiert, mittels einer reversen Transkription in DNA übersetzt und somit der Vervielfältigung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) zugänglich gemacht. In Echtzeit kann während des PCR- Zyklus aus Fluoreszenzsignalen die Menge der PCR-Produkte erfasst werden. Dabei wird für die relative Quantifizierung ein endogenes Referenzgen herangezogen, dessen Expression in den betrachteten Proben gleich sein sollte, weshalb sich die Verwendung der sogenannten Haushaltsgene anbietet, die nicht reguliert sind und in jeder Zelle unabhängig von äußeren oder inneren Einflüsse weitgehend konstant exprimiert werden. Man vergleicht dann für das Ziel- und das Referenzgen den Cp- Wert (crossing point), der manchmal auch als Ct-Wert (cycle threshold) bezeichnet wird und angibt, nach wie vielen PCR-Zyklen die Probe in einem detektierbaren Ausmaß amplifiziert wurde. Je stärker das betreffende Gen exprimiert wird, desto weniger Zyklen sind nötig, bis die Fluoreszenz entsprechende Werte erreicht.

2.2.5.1 RNA- Extraktion

Tiefgefrorene Tumorproben der oben erwähnten Astrozytome wurden der Gewebebank der Abteilung Neuropathologie des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen entnommen.

Die RNA der Proben sowie der Zellkulturen wurden gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers manuell extrahiert mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland)

Die RNA-Quantifizierung erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Als gesunde Kontrollen für die qRT-PCR wurde RNA aus dem zerebralen Kortex humaner Gehirne und aus dem Maushirn verwendet (Human Brain, Cerebral Cortex Total RNA/ Mouse Brain Total RNA, Clontech, Mountain View, USA).

2.2.5.2 cDNA-Synthese

Intron-umfassende Oligonukleotide wurden sowohl für humanes HPRT1, AQP4 M1 und AQP4 M1 als auch murines HPRT1, AQP4 M1 und AQP4 M23X (dies ist die im Maushirn der humanen AQP4 M23-RNA entsprechende Splicevariante, die ebenfalls zur Bildung des Proteins AQP4 M23 führt (Zelenin, Gunnarson et al. 2000)) unter Verwendung des Programms Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) hergestellt. Tabelle 6 und Tabelle 7 zeigen die Primersequenzen sowie die Produktgrößen. Das Programm Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) wurde verwendet, um die Spezifität der Primer zu überprüfen.

Primer	Sequenz	Produkt- größe
HPRT1 Ex6 für HPRT1 Ex7 rev	TGACTGGCAAACAATGC TTCGTGGGGTCCTTTTCACC	101 bp
AQP4 M1 Ex1 für AQP4 M1 Ex2 rev	GGGAAGGCATGAGTGACAG AAAGCTTGAGTCCAGACCCC	110 bp
AQP4 M23 Ex1 für AQP4 M23 Ex2 rev	TCTCTTTTCAGTAAGTGTGGACCT CATGGCCAGAAATTCCGCTG	114 bp

Tabelle 6: Primer (Homo sapiens)

Primer	Sequenz	Produkt- größe
HPRT Ex6 Mus für HPRT Ex7 Mus rev	CAAACCTTTGCTTTCCCTGGT GGCCTGTATCCAACACTTCG	91 bp
AQP4 M1 Mus Ex1 für AQP4 M1 Mus Ex2 rev	AGGAAGGCATGAGTGACA G GACTCCTTTGAAAGCCACCA	96 bp
AQP4 M23X Mus für AQP4 M23X Mus rev	TATGGTTCACGGGTTTGGAT CCCTTTGTCACCTGCTCATT	139 bp

Tabelle 7: Primer (Mus musculus)

Zur Durchführung der quantitativen Real Time PCR wurde jeweils 1µg der extrahierten RNA zusammen mit RNA-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des High-Capacity cDNA RT Kit (Thermo Fisher Scientific) revers transskribiert. Im qRT-PCR-Mix waren 10µl Real-Time SYBR Green PCR master mix, 1µl (20 ng) verdünntes reverses Transskriptionsprodukt, jeweils 2 µl der in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Primer sowie 7 µl DNase/RNase- freies Wasser enthalten. Die Polymerasekettenreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Auf 15 min bei 95°C folgten 40 Zyklen bei 94°C für 15s, 55°C für 30 s und 70°C für 30s in einem LightCycler 480 II (Roche, Basel, Schweiz). In jedem Durchgang waren sowohl Kontrollproben aus normalem Hirn als auch Wasser als Negativkontrolle enthalten. Alle Proben durchliefen die PCR als Triplikate, also in jeweils dreifacher Ausführung.

Als endogene Referenz wurde das Haushaltsgen HPRT1 verwendet.

Mit einem Durchlaufen von 40 PCR- Zyklen konnte bei der Analyse ein maximaler CP-Wert (crossing point value) von 35 erreicht werden. Der Cp-Wert gibt an, nach wievielen PCR- Zyklen ein konstantes Fluoreszenzniveau erreicht wird. CP-Werte zwischen 15 und 25 bedeuten starke Expression, zwischen 25 und 30 mittlere Expression und Werte über 30 schwache Expression.

Zur Beurteilung der Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, mit der man aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte spezifische PCR-Produkte von unspezifisch entstandenen Primerdimeren unterscheiden kann.

Aus den Cp-Werten der Triplikate wurde jeweils der Median gebildet und dieser dann in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA, USA) überführt. Die Expression von Aquaporin M1 und M23 wurde analysiert unter Verwendung der komparativen Δ CP- Methode (Schmittgen and Livak 2008), bei der folgende Formel Verwendung findet:

$$\Delta C_p = C_p (\text{Ziel-RNA}) - C_p (\text{Referenz-RNA})$$

Aus den so gewonnenen Werten berechnet man unter Zuhilfenahme der Formel

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_p (\text{Probe}) - \Delta C_p (\text{Kontrolle Normalhirn})$$

die relative Expression der Probe als $2^{-\Delta\Delta C_p}$

Zum Vergleich zweier Proben wird der sogenannte fold change angegeben, der bei Werten der relativen Expression >1 dieser entspricht, bei Werten <1 dem negativen Kehrwert der relativen Expression. Der Begriff fold change leitet sich her aus der Beschreibung der relativen Änderung einer Größe um den Faktor x als x -fold change, zu Deutsch x -fache Änderung,

Fold change >1) = rel. Expression

Fold change <1) = $-1/\text{rel. Expression}$.

Bei einem fold change von 1 bzw. -1 besteht kein Unterschied zwischen den betrachteten Proben bezüglich der interessierenden Genexpression.

Zur Ermittlung der M23/M1-Verhältnisse wurden die jeweiligen *fold changes* miteinander in Beziehung gesetzt.

2.2.6 STATISTIK

Zur Evaluierung der OPK-Dichten und der *fold changes* von AQP4-M1 und AQP4-M23 wurden unter Verwendung des Programmes GraphPad (Version 4, San Diego, CA, USA) zweiseitige ungepaarte t-Tests durchgeführt. Mit demselben Programm wurden die Streudiagramme zur Darstellung der in den Gefrierbruchreplicae ausgezählten OPKs erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 BESTIMMUNG DER OPK-DICHTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TUMORMALIGNITÄT

Mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik wurden Gewebeproben von Astrozytomen unter der Fragestellung, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl orthogonaler Partikelkomplexe und der Malignität nachweisen lässt, untersucht. Die Auswahl der Gewebeproben erfolgte anhand der Malignitätsskala der WHO- Klassifikation für diffuse Gliome (Fassung von 2007). Die Expression von AQP4 wurde durch immunhistochemische Methoden wie oben beschrieben überprüft. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, beschränkte sich die Auswahl bei den Astrozytomen Grad II und Grad III auf die molekularen Subtypen mit IDH-1-Mutation. Bei den Glioblastomen (WHO-Grad IV) hingegen stellt die Gruppe ohne IDH-1-Mutation nicht nur den größten Anteil dar, sondern ist auch der repräsentativere Vertreter dieser Tumorentität, so dass es sinnvoll erschien, lediglich diese Variante zu berücksichtigen. Die von jeder Tumorprobe angefertigten Gefrierbruchreplicae wurden im Elektronenmikroskop untersucht und nach sorgfältiger Auswahl repräsentativer Regionen fotografiert. Für jeden Patienten wurden mindestens fünf Fotografien ausgewertet. Von den niedrig malignen Astrozytomen vom WHO-Grad II waren sechs Proben vorhanden. Hier zeigten sich in den Membranen zum Teil gut organisierte Regionen mit mehreren OPK-Ansammlungen, aber Bereiche mit OPK-Dichten, wie sie für gesunde Astrozyten typisch wären, waren bereits hier nicht mehr auffindbar. Die Astrozytome vom WHO-Grad III waren mit fünf Proben vertreten. Hier zeigten sich in mehreren Membranabschnitten große Gebiete eng gepackter, aus Aquaporin 4 bestehender Intramembranpartikel. Solche Zusammenlagerungen wurden zuerst in Geweben mit kompromittierter Sauerstoffversorgung beobachtet und daher als Hypoxiecluster bezeichnet (Neuhaus et al., 1990). Ansonsten war das Bild ähnlich wie bei den Proben vom

WHO- Grad II. In den Replicaen der elf verschiedenen Astrozytome vom WHO- Grad IV, also den Glioblastomen, fanden sich nur noch sehr vereinzelt OPKs.

Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen repräsentative Gefrierbruchreplicaen der untersuchten Gliomgewebe:

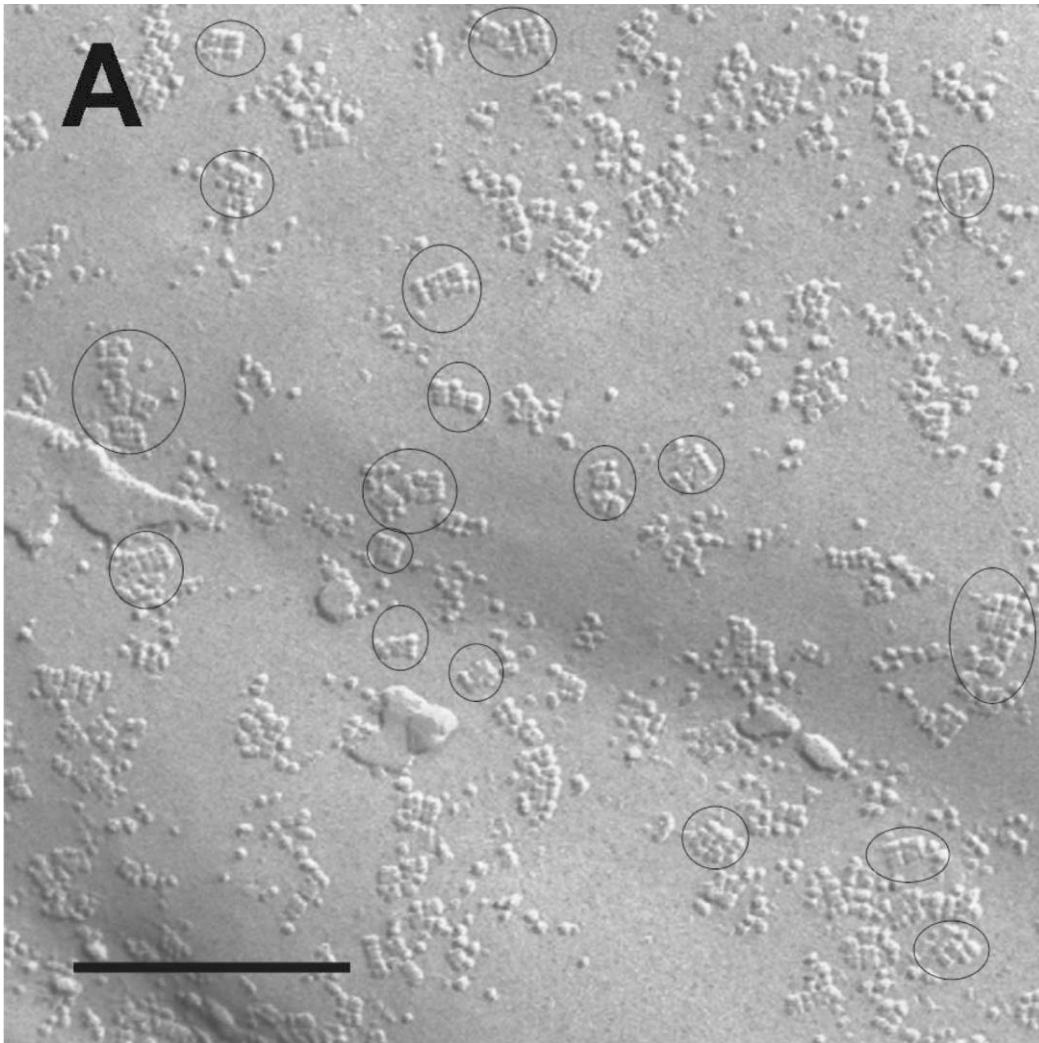


Abbildung 4: Astrozytom WHO-Grad II

(Gefrierbruchreplica, Balken entspricht 250 nm) (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016)

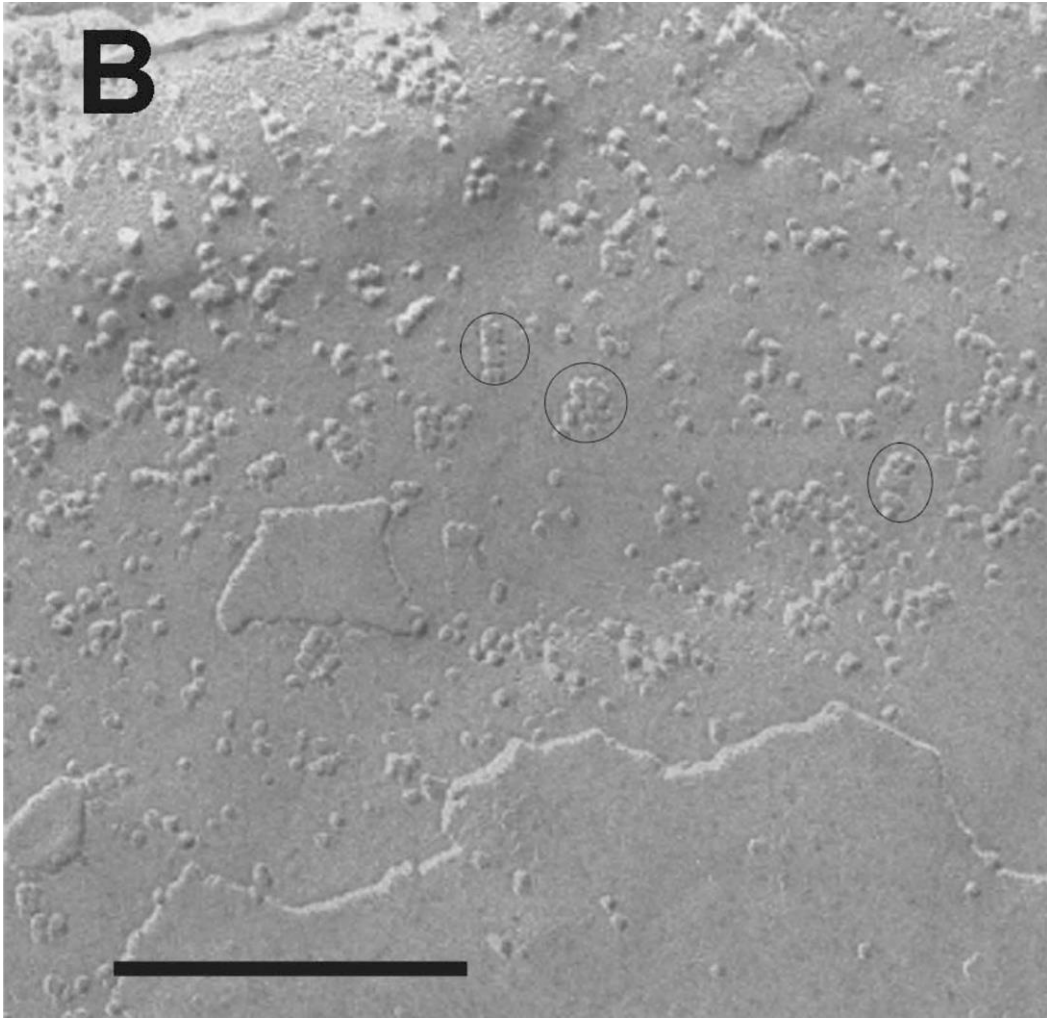


Abbildung 5: Astrozytom WHO-Grad III

(Gefrierbruchreplica, Balken entspricht 250 nm) (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016)

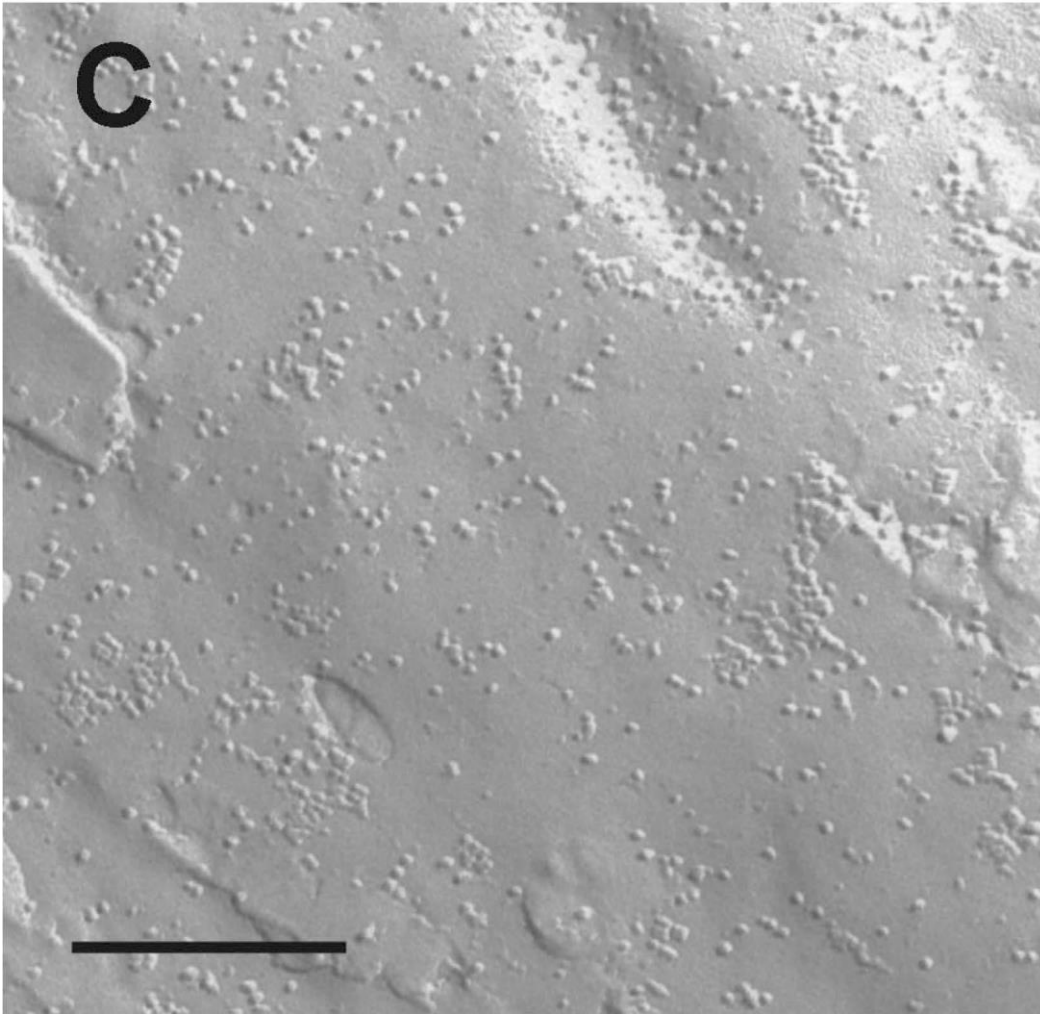


Abbildung 6: Glioblastom/Astrozytom WHO-Grad IV

(Gefrierbruchreplica, Balken entspricht 250 nm) (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016)

Die niedriggradigen Astrozytome (WHO-Grad II, Abb. 4) zeigen Zellmembranen mit orthogonale Partikelkomplexen. In den Membranen der maligneren Tumoren vom WHO-Grad III (Abb. 5) fanden sich weniger OPKs. Die Glioblastome (WHO-Grad IV, Abb. 6) bildeten nur sehr wenige OPKs aus. Die Quantifizierung erfolgte bei allen Tumorgewebeproben durch Auszählung der OPKs pro $4\mu\text{m}^2$. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Auszählung grafisch dargestellt.

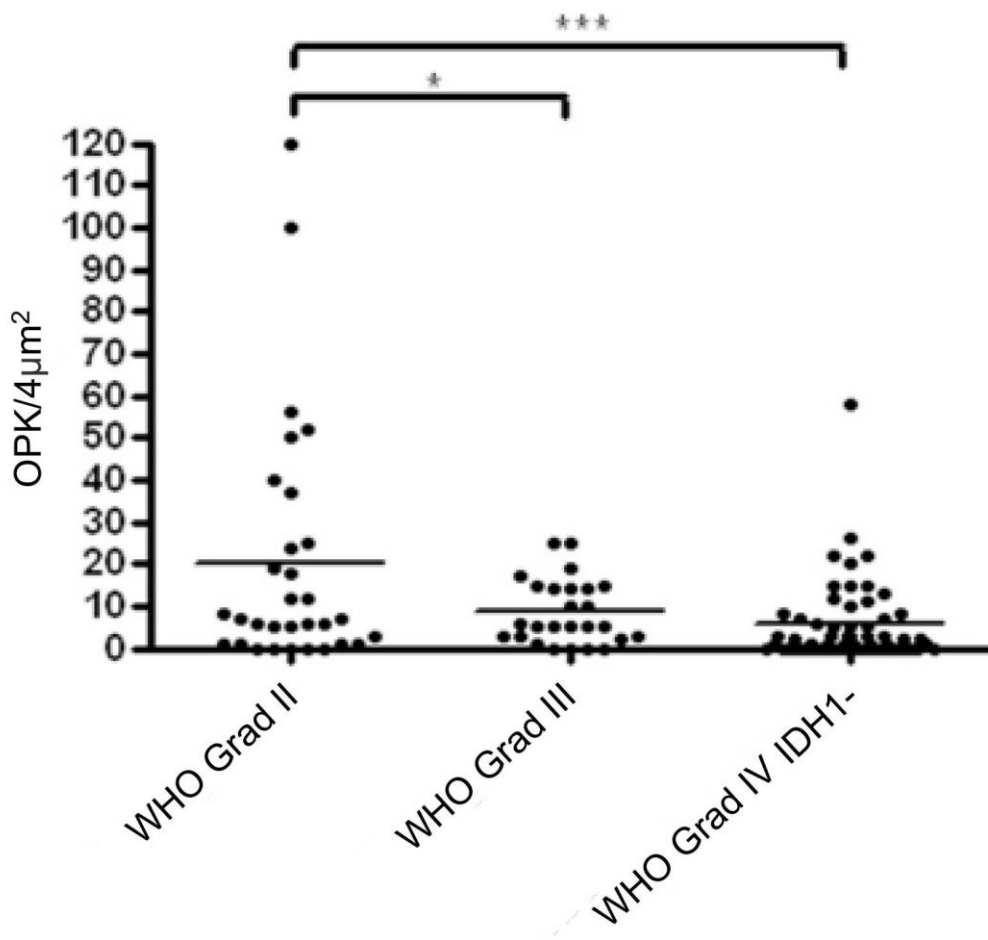


Abbildung 7: OPK-Dichte in Abhängigkeit von der Tumormalignität (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016): Graphische Darstellung der auf den Fotografien der Gefrierbrüche ausgezählten OPKs/4µm² bei Tumorproben unterschiedlicher Malignität

-ein Stern *: $p \leq 0,05$ (die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Korrelation liegt bei unter 5 %)

-drei Sterne ***: $p \leq 0,001$ (die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Korrelation liegt bei unter 1 %)

Es zeigte sich, dass Astrozytome vom WHO-Grad II signifikant größere OPK-Dichten aufweisen als Astrozytome vom WHO-Grad III ($p=0,028$) und Glioblastome (WHO-Grad IV) ($p=0,0006$). Diese Ergebnisse deuten auf eine negative Korrelation zwischen der Fähigkeit zur OPK-Bildung und der Malignität bei glialen Tumoren des menschlichen Gehirns hin.

3.2 BESTIMMUNG VON AQP4-M1 UND AQP4-M23 MRNA IN ASTROZYTOMEN UNTERSCHIEDLICHER MALIGNITÄT

Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass Zellen, die mit der Aquaporin-Isoform M23 transfiziert wurden, große OPK-Gitter bilden, während mit der Isoform M1 transfizierte Zellen keine oder lediglich kleine OPKs ausbilden (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2012); (Neely, Christensen et al. 1999). Die Überlegung war daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Expression der beiden Isoformen und der Ausbildung von unterschiedlichen Qualitäten von OPKs in Astrozytomen verschiedener Malignitätsstufen zu untersuchen. Unter der Vorstellung, dass in den Astrozytomen höherer Malignität die mangelnde Ausbildung typischer orthogonaler Partikelkomplexe mit einer Erhöhung des M1/M23-Verhältnisses einhergeht, führten wir quantitative real time-PCR (qRT-PCR) durch.

Dabei fanden sich in allen Astrozytomen unabhängig von der Malignität eine erhöhte M1-Expression. Als Maß für die Expression dient der sogenannte *fold change*, der die relative Änderung der Expression in den betrachteten Proben beschreibt; hierbei bedeutet beispielsweise ein *fold change* von 10 eine 10fache Erhöhung. Der durchschnittliche *fold change* von AQP4-M1 war 12,41 im Vergleich mit normalem Hirngewebe.

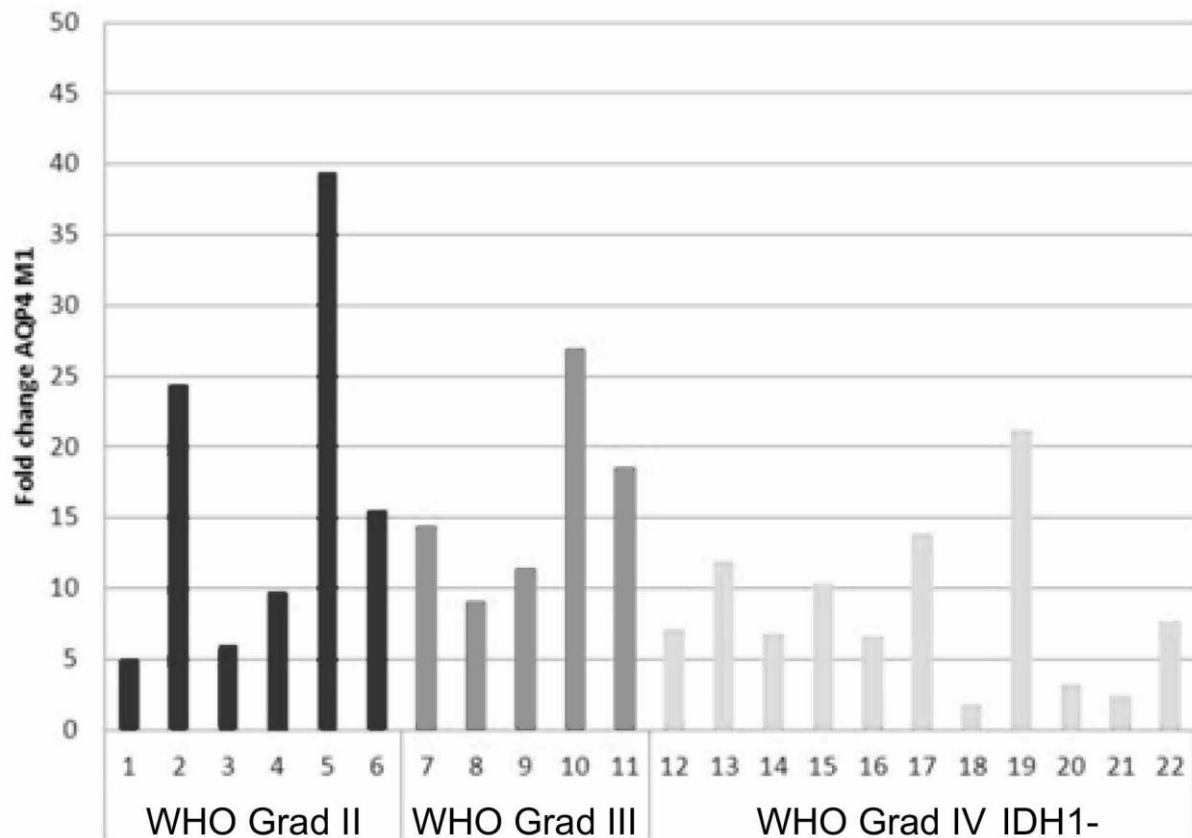


Abbildung 8: Relative Expressionsänderung von AQP4 M1, Tumorproben 1 bis 22 (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016) (Balkenhöhe entspricht der x-fachen Erhöhung der detektierten RNA im Vergleich zu normalem Hirngewebe)

Allerdings war überraschenderweise die Expression der Isoform M23 noch stärker erhöht mit einem durchschnittlichen *fold change* von 17,93, wiederum ohne signifikante Unterschiede bei verschiedenen WHO-Graden.

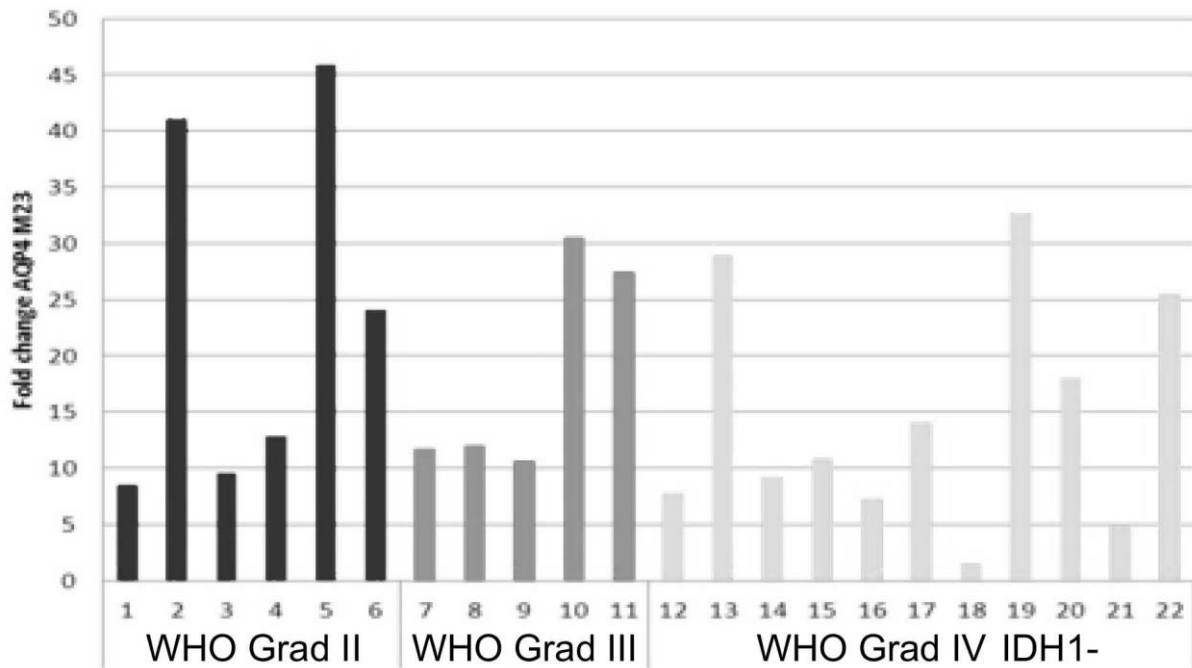


Abbildung 9: Relative Expressionsänderung von AQP4 M23, Tumorproben 1 bis 22 (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016) (Balkenhöhe entspricht der x-fachen Erhöhung der detektierten RNA im Vergleich zu normalem Hirngewebe)

3.3 BESTIMMUNG DER AQP4-M23-UND AQP4-M1-RNA IN KULTUREN VON GESUNDEN ASTROZYTEN UND VON GLIOMZELLEN

Zellkulturen von Astrozyten aus gesunden Maushirnen und humane Gliomzellen (TuGlio 25 und U373) wurden mittels qRT-PCR untersucht, um ihre Expression der AQP4-Isoformen zu vergleichen mit derjenigen in den humanen Tumorgeweben. Die kultivierten Mausastrozyten zeigten eine weit geringfügigere Hochregulation von sowohl AQP4-M1 (*fold change* 4,35) und AQP4-M23X (*fold change* 4,66) im Vergleich zu normalem Maushirngewebe.

Gefrierbruchreplicae dieser Mausastrozyten zeigten mehrere kleinere OPKs:

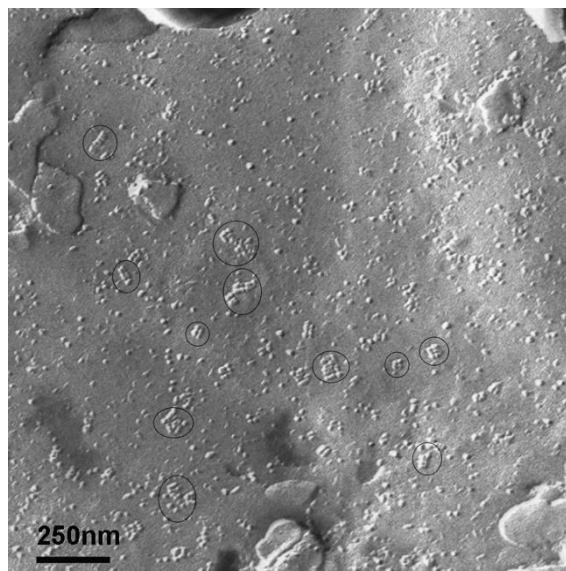


Abbildung 10: Astrozyt murin (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016)
(Gefrierbruchreplica, Balken entspricht 250nm)

In TuGlio25-Tumorzellen wiederum waren beide Isoformen nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert (durchschnittlicher AQP-M1- Schnittpunkt (CP)-Werte von 32,04 und 34,54 für Tuglio25 und U373, und durchschnittliche AQP-M23-CP-Werte von 35 und 32,89). Dies weist darauf hin, dass AQP4 in diesen humanen Zellkulturen nicht exprimiert wird. Dementsprechend waren in den Gefrierbruchreplicae auch keine OPKs auffindbar.

4 DISKUSSION

Da die Fähigkeit zur Regulation der Flüssigkeitsbewegungen innerhalb des ZNS wegen der Rigidität des Schädels von entscheidender Bedeutung ist und die Ausbildung von Ödemen wesentlich zur Morbidität von Hirntumorpatienten beiträgt, sind die Vorgänge von besonderem Interesse, die zur Veränderung der Flüssigkeitsverteilung im Gehirn führen. Ein fein abgestimmtes Zusammenspiel vieler Komponenten ist nötig, um die Integrität der Blut-Hirn-Schranke, die geregelte Flüssigkeitsverteilung auf die zerebralen Kompartimente sowie den Abtransport überschüssiger Volumina zu gewährleisten.

Weiterhin ist die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration verantwortlich für die bisher unaufhaltsame Progression anfangs niedrig maligner, dennoch aber bereits diffus infiltrierender Astrozytome vom WHO-Grad II bis hin zum hoch malignen Glioblastom.

Beide Problematiken stehen im engen Zusammenhang mit AQP4 und seiner speziellen, polarisierten Verteilung im Astrozyten, so dass die Bedingungen der Bildung und Aufrechterhaltung dieser Polarität von besonderem Interesse sind. In dieser Arbeit wurde versucht, die Zusammenhänge zwischen Malignität und Polaritätsverlust näher zu beleuchten.

4.1 DISKUSSION DER OPK-ABNAHME

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dichte an OPKs in Astrozytomen des menschlichen Gehirns mit zunehmender Malignität abnimmt. Entgegen den Ergebnissen von Hatton und Sang, die 1990 in Glioblastomen keine OPKs gefunden hatten und dies als Entdifferenzierung interpretierten (Hatton and Sang 1990), fanden wir zwar auch in dieser hochmalignen Astrozytomform OPKs, aber signifikant weniger als in den weniger malignen Astrozytomen vom WHO-Grad II und III, welche wiederum deutlich ärmer mit OPKs ausgestattet waren als normale Astrozyten. Für die möglichen Implikationen eröffnet sich ein weites Feld an Spekulationen. Da die Rolle der OPKs nach wie vor unklar ist und hier bestätigt wird, was schon 2012 von

Noell et al. (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2012) gefunden wurde, nämlich dass AQP4 auch außerhalb von OPKs existieren kann, stellt sich die Frage nach der Funktion von nicht in OPKs organisiertem AQP4 bzw. den Vorteilen einer Organisation in OPKs. Die „typischen“ orthogonalen Partikelkomplexe bestehen aus 10-100 Tetrameren und können in Astrozytenendfüßen in einer Dichte von bis zu $300 - 500 \mu\text{m}^{-2}$ vorliegen (Wolburg 1995, Rash, Yasumura et al. 1998). Auf den Gefrierbruchreplicae stellen sie sich dar als rechteckige Anordnungen verschiedener Form und Größe, die gebildet werden von 4-6 nm messenden Intramembranpartikeln, welche jeweils einzelnen AQP4-Tetrameren entsprechen (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003).

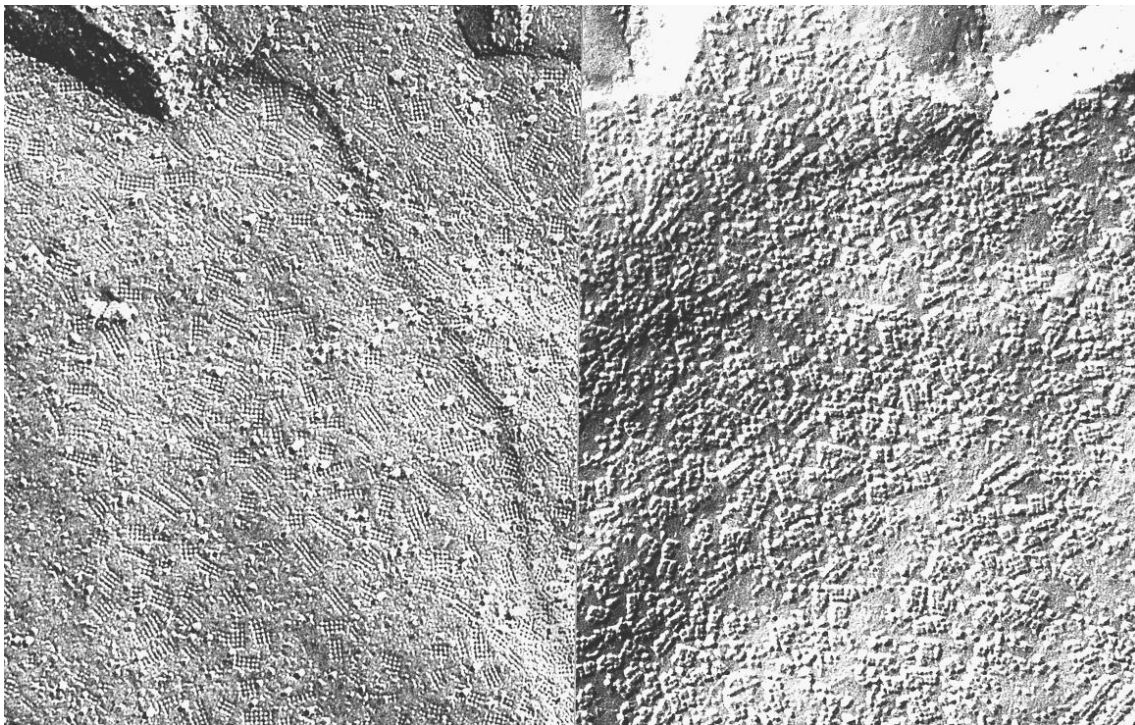


Abbildung 11: Orthogonale Partikelkomplexe an einem astrozytären Endfuß, links E-Face, rechts P-Face der komplementären Gefrierbruchreplica (verändert aus (Wolburg 1995))

Zur Aufklärung der Frage, welche Faktoren die Zusammenlagerung der AQP4-Tetramere zu orthogonalen Partikelkomplexen beeinflussen, wurden im Lauf der Jahre zahlreiche intra- und extrazelluläre Einflüsse untersucht. Es konnte zwar eine Temperaturabhängigkeit der OPK-Formation gezeigt werden (Crane and Verkman 2009), es ist aber nicht davon auszugehen, dass die Bildung von OPKs eine rein

thermodynamische Zufälligkeit darstellt. Es konnte aber gezeigt werden, dass bei der Fusion von AQP4-haltigen Golgi-Vesikeln mit Plasmamembranen OPKs entstehen, so dass Rossi et al (2012) zu dem Schluss kamen, dass die OPK-Bildung ein auch von Membranfaktoren abhängiger Post-Golgi-Prozess sein müsse. Zudem wurde ein Zusammenhang mit der Membrankurvatur gefunden in dem Sinne, dass eine starke Krümmung der Membran zum Auseinanderreißen der OPKs führt (Rossi, Baumgart et al. 2012).

Bei der Untersuchung der Beteiligung verschiedener Komponenten der Extrazellulärmatrix konnte für Agrin (Noell, Fallier-Becker et al. 2009);(Fallier-Becker, Sperveslage et al. 2011) und Dystroglycan (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2011) ein wesentlicher Einfluss auf die Bildung von OPKs und ihre Verankerung in den Endfüßen der Astrozyten gefunden werden. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass sowohl das intrazelluläre Alpha-Syntrophin (Neely, Amiry-Moghaddam et al. 2001), als auch interzelluläre Kontakte von Astrozyten mit endothelialen und pialen Zellen (Saadoun, Papadopoulos et al. 2002) eine Rolle spielen, zumindest bei der Polarisierung von AQP4 im Astrozyten. Dabei wurde zwar die OPK-Bildung selbst nicht untersucht, diese scheint aber eine Voraussetzung für die Polarisierung zu sein oder zumindest eine Erleichterung: So könnte etwa bezüglich der Interaktion mit Alpha-Syntrophin von Bedeutung sein, dass bei der Verankerung eines OPKs am Zytoskelett sehr viel mehr AQP4 gebunden werden kann, als wenn einzelne Monomere jeweils ein eigenes Ankerprotein benötigen (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003)

Schließlich scheint, wie oben bereits erwähnt, unabdingbar für die OPK-Bildung ein gewisser Anteil der Isoform M23 an der Aquaporin 4-Gesamtmenge zu sein, da Homotetramere aus AQP4-M1 sich nicht zu OPKs zusammenlagern (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003).

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass die hier gezeigte Korrelation zwischen Malignität und OPK-Dichte nicht mit einer Kausalität gleichzusetzen ist, lassen sich für den Zusammenhang zwischen Polaritätsverlust und Tumorprogression verschiedene Szenarien entwerfen:

Möglicherweise ist die Aufhebung der Polarität lediglich eine Art Kollateralschaden im Rahmen der malignen Transformation des Tumorgebietes.

Ebenso gut denkbar wäre aber auch, dass im Zusammenhang mit dem Polaritätsverlust Bedingungen geschaffen werden, die einen Nutzen für die Astrozytomzelle darstellen. Dieser könnte dazu führen, dass sich im Laufe der Evolution gezielt ein Mechanismus der Tumorentstehung entwickeln konnte.

Ein interessanter Aspekt ist hier die mögliche Rolle von AQP4 bei der Zellmigration. Ein entscheidendes Merkmal der diffusen Astrozytome, nämlich ihre Invasivität, beruht vermutlich auf der Fähigkeit der Tumorzellen, die gliovaskulären Kontakte aktiv zu modifizieren und durch volumetrische Änderungen ihre Zellgestalt den engen Interzellularspalten anzupassen, was ihnen die Migration entlang der abluminalen Seite von Blutgefäßen ermöglicht. Im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren dringen Gliome nämlich nur sehr selten über den Blutstrom in gesundes Gewebe vor (Muller, Holtschmidt et al. 2014). Schon 1938 beobachtete der Neuropathologe Hans-Joachim Scherer, dass sie bevorzugt entlang der Außenseite von Gefäßen oder an Trakten der weißen Substanz wandern (Scherer 1938). Er war der erste, der diese Invasionswege beschrieb, weshalb sie heute noch oft als Scherer-Strukturen bezeichnet werden (Thompson and Sontheimer 2016).

Eine solche Form der hydrodynamischen Zellwanderung ist nur möglich durch eine reiche Ausstattung mit Wasserkanälen, die im Zusammenspiel mit Ionenkanälen die Umverteilung zytoplasmatischer Flüssigkeit als Folge von transmembranösen Ionenverschiebungen bewirken kann (Thompson and Sontheimer 2016). Tatsächlich haben mehrere Studien eine verringerte Migrationsfähigkeit bei Gliomzellen beobachtet, deren Aquaporinexpression behindert wurde (McCoy and Sontheimer 2007);(Ding, Ma et al. 2011).

Obwohl noch keine Klarheit darüber herrscht, welche genaue Rolle die nachweisliche Hochregulation von AQP4 in malignen Gliomen spielt, gibt es unzweifelhaft einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Hirnödemen und Veränderungen in der AQP4-Ausstattung der Astrozyten bei diesen Krankheitsbildern. Die Komplexität der räumlichen und zeitlichen AQP4-Expression macht es allerdings schwer, eine Aussage darüber zu treffen, ob eine Erhöhung die Bildung von Ödemen exazerbiert

oder eher deren Abbau erleichtert. Sowohl Entstehung als auch Beseitigung des beim malignen Gliom im Vordergrund stehenden vasogenen Ödems, das auf einer Störung der Blut-Hirn-Schranke beruht, konnten mit vermehrtem AQP4-Gehalt in Verbindung gebracht werden (Nico, Mangieri et al. 2009). Zusätzlich konnte eine Korrelation gefunden werden zwischen der AQP4-Expression in neoplastischen Astrozyten und der in computertomographischen Untersuchungen der betroffenen Patienten detektierbaren Ausprägung zerebraler Ödeme (Saadoun, Papadopoulos et al. 2002). Demgegenüber ist aber beim niedriggradigen pilozytischen Astrozytom vom WHO-Grad I, das eine ähnlich hohe AQP4-Expression zeigt wie das hochmaligne Glioblastom, nur eine sehr geringe Neigung zur peritumoralen Ödembildung zu beobachten (Warth, Simon et al. 2007).

Somit wird die Bedeutung von AQP4 für die Ödembildung und -beseitigung nach wie vor kontrovers diskutiert und scheint davon abzuhängen, ob es sich um ein Versagen der Energieversorgung der Zelle mit konsekutiver Elektrolytverschiebung und Zellschwellung im Sinne eines zytotoxischen Ödems oder aber um einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke mit der Folge eines vasogenen Ödems mit Flüssigkeitsansammlung im Interstitium handelt: Einerseits wurde bei AQP4-Null-Mäusen eine geringere Hirnschwellung nach Wasserintoxikation und fokaler zerebraler Ischämie beobachtet, was auf eine Rolle von AQP4 bei der Entstehung des zytotoxischen Ödems hinweist. Im Gegensatz dazu war die Hirnschwellung in Modellen des vasogenen Ödems, welches bei Hirntumoren im Vordergrund steht, bei diesen Mäusen verstärkt. Hier ist ein möglicher Grund der verschlechterte Wasserabtransport bei fehlendem AQP4 (Manley, Binder et al. 2004). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der potentielle Nutzen einer gezielten AQP4-Erhöhung als präventive oder therapeutische Option bei vasogenen Hirnödemen diskutiert (Manley, Binder et al. 2004, Papadopoulos, Manley et al. 2004), allerdings fanden Warth et al. (2007) bei Gliompatienten keinen Überlebensvorteil bei erhöhter AQP4-Expression.

Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise erklären durch den in malignen Gliomen trotz vermehrter Aquaporinmenge auch in dieser Arbeit beobachteten OPK-Verlust: Diese Organisationsform scheint einen effektiveren Wassertransport zu ermöglichen (Silberstein, Bouley et al. 2004, Fenton, Moeller et al. 2010), so dass für

die schnelle Entsorgung größerer Wassermengen die reine Hochregulation von Aquaporin 4 nicht ausreicht, sondern auch dessen Organisation in OPKs sowie die regelrechte Lokalisierung in den astrozytären Endfüßen erforderlich sind.

Die Hochregulation ist also womöglich zunächst ein Versuch der Zelle, der vasogenen Ödembildung entgegenzuwirken. Was diese wird aber zunächst gemacht durch Veränderungen in der Mikroumgebung des Tumors. Zu diesen gehören der Abbau der Basalmembrankomponente Agrin und des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes (DDC) durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die die polarisierte Organisation in OPK gebundener Aquaporinkanäle zerstören.

4.2 DISKUSSION DER M23/M1-RELATION

OPK-Verlust und Zunahme der Menge im Tumor produzierten AQP4s (Warth, Simon et al. 2007) führten uns zu der Hypothese, dass es einen Zusammenhang mit den Ergebnissen von Furman et al (2003) geben könnte. Diese Autoren hatten gefunden, dass nach Transfektion von AQP4-M1 entweder keine oder nur sehr kleine OPKs erschienen. Nach Transfektion mit AQP4-23 entstanden riesige Cluster aus mehr als 100 Intramembranpartikeln, so wie sie auch unter hypoxischen Bedingungen entstehen (s.o., Neuhaus et al. 1990). Bei Zellen, die beide Isoformen enthielten, war die OPK-Größe der in gesunden Astrozytenendfüßen ähnlich: in diesen liegt der überwiegende Anteil von Partikeln in einer Organisation als OPKs vor, von denen die meisten aus einer Anzahl von 13-30 Intramembranpartikeln bestehen (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003).

Jin et al. (2011) untersuchten dann mit Hilfe eines mathematischen Modells den Einfluss verschiedener M23/M1-Verhältnisse und kamen zu dem Schluss, dass niedrige M23/M1-Verhältnisse zu kleinen und hohe M23/M1-Verhältnisse zu großen OPKs führen müssten (Jin, Rossi et al. 2011). Bei der OPK-Bildung können sich Aquaporinmoleküle der Isoformen AQP4-M1 und AQP4-M23 zusammenlagern. Mit Hilfe der hochauflösenden Methoden der Mikroskopie PALM (photoactivation localization photography) und dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) konnte diesbezüglich beobachtet werden, dass sich M1 und M23 in

einer Weise zusammenlagern, die eine M1-reiche Außenzone einen M23-reichen Kernbereich umschließen lässt (Rossi, Moritz et al. 2012). Auf der molekularen Ebene kann man dieses Verhalten ebenso wie die Unfähigkeit von M1 zur OPK-Bildung möglicherweise dadurch erklären, dass Verbindungen zu Nachbarmolekülen bei AQP4-M23 durch eine N-terminale Interaktion der AQP4- M23-Moleküle unterstützt wird, welche bei AQP4-M1 durch Reste oberhalb von Met-23 blockiert ist (Crane and Verkman 2009).

Im gesunden Astrozyten liegt die Isoform M23 in mindestens dreifach höherer Menge vor, als das längere M1 (Neely, Christensen et al. 1999); (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003). Somit lag der Schluss nahe, eine Änderung des Verhältnisses der Isoformen M1 und M23, das für die Bildung „typischer“ orthogonaler Partikelkomplexe notwendig ist, könne verantwortlich sein für die mangelnde Ausbildung von OPKs und den damit verbundenen astrozytären Polaritätsverlust in malignen Hirntumoren. Wir wollten also überprüfen, ob bei der von uns gefundenen Minderung der Bildung von OPKs in Gliomen eine relative Überexpression der AQP4-Isoform M1 eine Rolle spielt. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, so dass weiterhin davon ausgegangen werden kann, dass Einflüsse wie die Wirkung der Basalmembran auf die Bildung und Clusterung von OPKs entscheidender sind als ein Überwiegen der Isoform M1: Das Mikromilieu in Hirntumoren unterscheidet sich nämlich deutlich von der Situation im gesunden Gehirn und zahlreiche *in vivo* und *in vitro* durchgeführte Untersuchungen zeigen umfangreiche intra- und extrazelluläre Veränderungen, die hier zu berücksichtigen sind (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2012). Die für Glioblastome und Agrin-Knock-Out-Mäuse gezeigte Abhängigkeit der OPK-Formation von der Gegenwart von Agrin (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2012); (Noell, Fallier-Becker et al. 2009) legt den Schluss nahe, dass das Fehlen von Agrin auch bei Astrozytomen niedrigerer Malignität für den OPK-Verlust von Bedeutung sein könnte. Zusätzlich zu Agrin ist auch das Glykoprotein Dystroglykan wesentlich an der Bildung und polarisierten Verteilung von OPKs beteiligt (Noell, Wolburg-Buchholz et al. 2011). Es hat eine Alpha- und eine Beta-Untereinheit und bildet zusammen mit Dystrophin den Dystrophin-Dystroglykan-Komplex (DDC), der im Astrozyten AQP4 über das intrazelluläre Alpha-Syntrophin mit dem die Zellmembran überbrückenden Beta-Dystroglykan verbindet. Dieses ist wiederum über Alpha-Dystroglykan an Agrin gebunden und sorgt damit für eine

Verankerung in der Extrazellulärmatrix. Eine entscheidende Rolle in diesen Zusammenhängen spielen auch die Matrix-Metalloproteinasen MMP 2, 3 und 9: Wenn Agrin von der Matrix-Metalloproteinase MMP3 gespalten wird, was in Glioblastomen der Fall ist (Sole, Petegnief et al. 2004), können keine typischen OPKs gebildet werden. Den gleichen Effekt kann die Anwesenheit von MMP2 und MMP9 bewirken, die Dystroglykan spalten (Agrawal, Anderson et al. 2006) und ebenfalls in Glioblastomen vermehrt nachgewiesen werden konnten (Gong, Zhu et al. 2014, Wang, Zhang et al. 2018). Starke Hinweise bezüglich der progressionsbegünstigenden Einflüsse einer veränderten Aquaporin- 4- Expression geben Zellkulturexperimente von Simone et al. (2019): Hier konnte durch Transfektionsexperimente mit Gliomzelllinien, die entweder AQP 4 in der OPK-bildenden Form M23, oder aber in der lediglich Tetramere hervorbringenden Isoform M1 exprimieren, gezeigt werden, dass die Isoform M1 die Invasionsfähigkeit deutlich steigert. Gleichzeitig war in diesen Zelllinien eine signifikant höhere Aktivität von MMP9 nachweisbar (Simone, Pisani et al. 2019).

Ungeklärt bleibt allerdings, ob die in den Gefrierbruchreplicae sichtbaren Intramembranpartikel aus Aquaporin-4 der Isoform M1 oder M23 oder jeweils einer Mischung daraus bestehen und welche Verteilung der Isoformen in den sogenannten „Hypoxieclustern“ vorliegt: Dies sind große Gebiete zusammengelagerter, aus Aquaporin 4 bestehender Intramembranpartikel, die sich in Hirngebieten mit kompromittierter Sauerstoffversorgung finden (Neuhaus et al., 1990), aber auch in den von uns untersuchten Astrozytom-Gefrierbrüchen reichlich vorhanden waren. In den oben bereits erwähnten Transfektionsexperimenten von Furman et al. (Furman, Gorelick-Feldman et al. 2003) und Jin et al. (Jin, Rossi et al. 2011) hat man zwar eine von den M1/M23-Expressionsverhältnissen abhängige OPK-Bildung gefunden, aber nur indirekte Hinweise auf die tatsächliche Verteilung von M23 und M1 in den gebildeten supramolekularen Strukturen bekommen.

Da sich die beiden Isoformen nur dadurch unterscheiden, dass M23 im Vergleich zu M1 23 aminoterminalen Aminosäuren fehlen, erscheint der Versuch, die Isoformen mit Hilfe von Immunogold-Methoden in Gefrierbrüchen zu markieren und somit diese Fragen zu klären und einen definitiven Beweis für das Überwiegen der kürzeren M23-Variante in den OPKs zu bekommen, wenig aussichtsreich: Es ist zwar

problemlos möglich, gegen die 23 aminoterminalen Aminosäuren Antikörper herzustellen und somit M1 zu markieren, aber eine diskriminierende Markierung der nicht vorhandenen Aminosäuren bei M23 ist auf diesem Wege nicht durchführbar.

Zur Frage nach der Bedeutung der im Tumor veränderten Aquaporin-Expression sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen. Es gibt zwar Hinweise darauf, dass die Langzeitregulation der beiden Isoformen über die Umgebung reguliert ist, indem die Expression einer gewebespezifischen Kontrolle durch unterschiedliche Promoter unterliegt (Alikina, Illarionova et al. 2012) und man könnte spekulieren, dass die Tumorzelle über derartige Steuerungsmechanismen Einfluss auf die Aquaporinexpression nimmt.

Die vermehrte Bildung von AQP4 könnte aber auch eine zunächst sinnvolle Zellantwort auf vermehrte Wassereinlagerung im Tumorgebiet sein mit dem Ziel, durch reichere Ausstattung der Zellmembranen mit Wasserkanälen den Abbau der Ödeme zu erleichtern.

Für die Tumorzelle ist der Überfluss an AQP4 dann möglicherweise ein Vorteil: Es wurden nämlich, wie in der Einleitung bereits erwähnt, bei der Untersuchung des Einflusses von Aquaporin 4 auf die Migrationsfähigkeit und damit die Invasivität von Hirntumoren zunächst widersprüchliche Beobachtungen gemacht (Saadoun, Papadopoulos et al. 2005, McCoy and Sontheimer 2007), inzwischen hat sich aber gezeigt, dass die Isoformen M23 und M1 unterschiedliche Rollen in diesem Szenario haben: Insbesondere die Isoform M1 kann sich in Lamellipodien anreichern (Rossi, Baumgart et al. 2012) und dort möglicherweise die Zellmigration erleichtern. Dies könnte, im Sinne der oben bereits erwähnten Hypothese einer Unterstützung der hydrodynamischen Wanderung durch AQP4-Wasserkanäle, zu einer erhöhten Invasivität des Tumors führen. Zudem wäre es wegen der möglichen Bedeutung der Organisation in OPKs für die Zell-Zell-Adhäsion (Hiroaki, Tani et al. 2006, Smith, Jin et al. 2014) denkbar, dass das Vorherrschen der Isoform M1 durch Behinderung der OPK-Bildung die Adhäsion aufhebt und somit den Tumorzellen erlaubt, ihren Zellverband zu verlassen als Voraussetzung für die Infiltrationsfähigkeit des Astrozytoms. Wesentlich untermauert wird diese These durch aktuelle Zellkulturexperimente von Simone et al., die eine erhöhte Invasivität bei

Gliomzelllinien, welche nur die Isoform M1 exprimieren und somit lediglich AQP4-Tetramere bilden, nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu fanden sie bei OPK-bildenden, mit der Isoform M23 transfizierten Gliomzellen eine über Interaktionen mit dem Zytoskelett vermittelte erhöhte Neigung zur Apoptose (Simone, Pisani et al. 2019). Somit ergeben sich für die Tumorzelle deutliche Vorteile durch ein Überwiegen von nicht in OPKs organisiertem Aquaporin 4.

Trotzdem deuten unsere Ergebnisse, nämlich die Korrelation von OPK-Abnahme und zunehmender Malignität bei erhöhter Expression beider Isoformen von Aquaporin-4 darauf hin, dass die fehlende Organisation von Aquaporin-4 in OPKs für die Tumorzelle kein „beabsichtigter“ Vorteil ist, was eher bei einer selektiven Hochregulation von M1 der Fall wäre, da diese Isoform die Migration zu erleichtern scheint (Amiry-Moghaddam 2019), sondern tatsächlich eher einer Entdifferenzierung respektive einem Rückschritt in „embryologische Zustände“ entspricht.

Insgesamt wird aber unabhängig von der Frage nach Ursache und Wirkung immer deutlicher, dass die mangelnde Aggregation von Aquaporin 4 in Form von orthogonalen Partikelkomplexen ein entscheidender Faktor bei der Invasivität von Hirntumoren ist (Amiry-Moghaddam 2019).

4.3 DISKUSSION DER ZELLKULTUREXPERIMENTE

Da auch in Zellkulturen sowohl von gesunden Astrozyten als auch von Tumorzellen die Bildung von AQP4 verändert und die OPK-Bildung beeinträchtigt ist, interessierte uns, ob hier ähnliche Verhältnisse bezüglich der relativen Expression der Isoformen M1 und M23 vorliegen, wie in den Patientengeweben.

Die Bestimmung der AQP4-M1 und M23- mRNA mittels qRT-PCR zeigte sowohl bei Zellkulturen von primären Tumorzellen (TuGlio 25) als auch bei der Tumorzelllinie U373 ein sehr niedriges Expressionsniveau von beiden Isoformen. Dieses Ergebnis passt zur Beobachtung, dass Gliomzellkulturen in immunhistologischen Untersuchungen keine Anfärbung bezüglich Aquaporin 4 zeigen (Jin, Rossi et al. 2011).

Folgerichtig fanden sich in den Gefrierbruchreplicae der Membranen bei diesen Zellkulturen keine OPKs.

Im Gegensatz dazu war in der Zellkultur von gesunden murinen Astrozyten eine im Vergleich zu gesundem Maushirngewebe etwa vierfach erhöhte Expression der mRNA von M23 und M1 nachweisbar. Diese Steigerung ist zwar gering im Vergleich zu den weitaus höheren Vervielfachungen der mRNA bei den untersuchten Patientengeweben, aber das Verhältnis der Erhöhung in der Expression der jeweiligen Isoformen ist ähnlich wie bei den Astrozytomen vom WHO-Grad III.

Die Gefrierbrüche zeigten hier die Bildung einiger kleiner OPKs, die Verringerung von Anzahl und Größe im Vergleich zum gesunden Astrozyten kann aber wie bei den Tumorgeweben nicht durch Veränderungen im M23/M1-Verhältnis begründet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit lag der Fokus zunächst auf der Fragestellung, ob der in Astrozytomen beobachtete Verlust der Polarisierung bezüglich der AQP4-Verteilung mit der Malignität korreliert. Diese Polarisierung ist nach heutigem Kenntnisstand untrennbar verbunden mit der Organisation von AQP4 in OPKs.

Bei der Untersuchung der OPK-Bildung in malignen Gliomen der WHO-Grade II-IV zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation des Vorkommens von OPKs mit zunehmender Malignität.

Weiterhin sollte beleuchtet werden, ob diese Korrelation erklärbar ist durch einen im Vergleich zu gesundem Gehirn zunehmenden Anteil der zur OPK- Bildung ungeeigneten Isoform M1 an der Gesamtmenge von Aquaporin 4. Es konnte zwar eine erhöhte Expression von M1 gefunden werden, da aber M23 noch stärker hochreguliert war, bleibt auch in den von uns untersuchten Gliomen weiterhin M23 die überwiegende Aquaporin-Isoform, so dass das Verschwinden der orthogonalen Partikelkomplexe auf anderen Mechanismen beruhen muss.

Es ist bis heute nicht vollständig verstanden, welche Bedingungen dazu führen, dass Aquaporin-4 orthogonale Partikelkomplexe bildet und welche Bedeutung diese supramolekulare Anordnung für dessen Funktion hat. Es wurden verschiedene mögliche Auswirkungen der Organisation in OPKs diskutiert wie schnellere Regulierbarkeit, größere Wassertransportkapazität oder Unterstützung der Zell-Zell-Adhäsion. Von großer Bedeutung scheinen Vorteile bei der Verankerung in der Zellmembran zu sein, die im Zusammenspiel mit zahlreichen intra- und extrazellulären Komponenten die Polarisierung der Astrozyten im Hinblick auf die Lokalisation von Aquaporin 4 in den perivaskulären und subpialen Endfüßen der Astrozyten wesentlich unterstützen und somit das regelrechte Funktionieren dieses Zelltyps erst möglich machen. Entscheidend ist aber, dass der Aggregationszustand von Aquaporin 4 einen bedeutenden Wandel im Laufe der Tumorprogression erfährt und mögliche Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome bietet.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal, S., P. Anderson, M. Durbeej, N. van Rooijen, F. Ivars, G. Opdenakker and L. M. Sorokin (2006). "Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **203**(4): 1007-1019.

Alikina, T. Y., N. B. Illarionova, S. M. Zelenin and A. A. Bondar (2012). "Identification of new M23A mRNA of mouse aquaporin-4 expressed in brain, liver, and kidney." Biochemistry (Mosc) **77**(5): 425-434.

Amiry-Moghaddam, M. (2019). "AQP4 and the Fate of Gliomas." Cancer Res **79**(11): 2810-2811.

Amiry-Moghaddam, M. and O. P. Ottersen (2003). "The molecular basis of water transport in the brain." Nat Rev Neurosci **4**(12): 991-1001.

Anders, J. J. and M. W. Brightman (1986). "Freeze-fracture studies of plasma membranes of astrocytes in freezing lesions." Adv Neurol **44**: 765-774.

Anderson, M. A., J. E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B. S. Khakh, T. J. Deming and M. V. Sofroniew (2016). "Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration." Nature **532**(7598): 195-200.

Assentoft, M., S. Kaptan, H. P. Schneider, J. W. Deitmer, B. L. de Groot and N. MacAulay (2016). "Aquaporin 4 as a NH₃ Channel." J Biol Chem **291**(36): 19184-19195.

Atwell, D., A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. Macvicar and E. A. Newman (2010). "Glial and neuronal control of brain blood flow." Nature **468**(7321): 232-243.

Auguste, K. I., S. Jin, K. Uchida, D. Yan, G. T. Manley, M. C. Papadopoulos and A. S. Verkman (2007). "Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury." Faseb j **21**(1): 108-116.

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**(7): 10-19.

Binabaj, M. M., A. Bahrami, S. ShahidSales, M. Joodi, M. Joudi Mashhad, S. M. Hassanian, K. Anvari and A. Avan (2018). "The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials." J Cell Physiol **233**(1): 378-386.

Binder, D. K., X. Yao, Z. Zador, T. J. Sick, A. S. Verkman and G. T. Manley (2006). "Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels." Glia **53**(6): 631-636.

Bleeker, F. E., N. A. Atai, S. Lamba, A. Jonker, D. Rijkeboer, K. S. Bosch, W. Tigchelaar, D. Troost, W. P. Vandertop, A. Bardelli and C. J. Van Noorden (2010). "The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma." Acta Neuropathol **119**(4): 487-494.

-
- Branton, D. (1966). "Fracture faces of frozen membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **55**(5): 1048-1056.
- Brown, D. (2017). "The Discovery of Water Channels (Aquaporins)." Ann Nutr Metab **70 Suppl 1**: 37-42.
- Brown, T. J., M. C. Brennan, M. Li, E. W. Church, N. J. Brandmeir, K. L. Rakszawski, A. S. Patel, E. B. Rizk, D. Suki, R. Sawaya and M. Glantz (2016). "Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis." JAMA Oncol **2**(11): 1460-1469.
- Crane, J. M., C. Lam, A. Rossi, T. Gupta, J. L. Bennett and A. S. Verkman (2011). "Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays." J Biol Chem **286**(18): 16516-16524.
- Crane, J. M., M. Tajima and A. S. Verkman (2010). "Live-cell imaging of aquaporin-4 diffusion and interactions in orthogonal arrays of particles." Neuroscience **168**(4): 892-902.
- Crane, J. M. and A. S. Verkman (2009). "Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging." J Cell Sci **122**(Pt 6): 813-821.
- Crane, J. M. and A. S. Verkman (2009). "Reversible, temperature-dependent supramolecular assembly of aquaporin-4 orthogonal arrays in live cell membranes." Biophys J **97**(11): 3010-3018.
- Criniere, E., G. Kaloshi, F. Laigle-Donadey, J. Lejeune, N. Auger, A. Benouaich-Amiel, S. Everhard, K. Mokhtari, M. Polivka, J. Y. Delattre, K. Hoang-Xuan, J. Thillet and M. Sanson (2007). "MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities." J Neurooncol **83**(2): 173-179.
- Crocetti, E., A. Trama, C. Stiller, A. Caldarella, R. Soffiatti, J. Jaal, D. C. Weber, U. Ricardi, J. Slowinski and A. Brandes (2012). "Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe." Eur J Cancer **48**(10): 1532-1542.
- Dallerac, G., O. Chever and N. Rouach (2013). "How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology." Front Cell Neurosci **7**: 159.
- Ding, T., Y. Ma, W. Li, X. Liu, G. Ying, L. Fu and F. Gu (2011). "Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells." Int J Oncol **38**(6): 1521-1531.
- Ding, Y., S. Yu, Z. Bao, Y. Liu and T. Liang (2017). "CDC20 with malignant progression and poor prognosis of astrocytoma revealed by analysis on gene expression." J Neurooncol **133**(1): 87-95.
- Fallier-Becker, P., M. Nieser, U. Wenzel, R. Ritz and S. Noell (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**(8).
- Fallier-Becker, P., J. Sperveslage, H. Wolburg and S. Noell (2011). "The impact of agrin on the formation of orthogonal arrays of particles in cultured astrocytes from wild-type and agrin-null mice." Brain Res **1367**: 2-12.
- Fenton, R. A., H. B. Moeller, M. Zelenina, M. T. Snaebjornsson, T. Holen and N. MacAulay (2010). "Differential water permeability and regulation of three aquaporin 4 isoforms." Cell Mol Life Sci **67**(5): 829-840.

-
- Frigeri, A., M. A. Gropper, C. W. Turck and A. S. Verkman (1995). "Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4328-4331.
- Furman, C. S., D. A. Gorelick-Feldman, K. G. Davidson, T. Yasumura, J. D. Neely, P. Agre and J. E. Rash (2003). "Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13609-13614.
- Gong, J., S. Zhu, Y. Zhang and J. Wang (2014). "Interplay of VEGFa and MMP2 regulates invasion of glioblastoma." Tumour Biol **35**(12): 11879-11885.
- Graber, D. J., M. Levy, D. Kerr and W. F. Wade (2008). "Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4." J Neuroinflammation **5**: 22.
- Hansen, A., C. B. Pedersen, L. R. Minet, D. Beier, J. O. Jarden and K. Sogaard (2019). "Hemispheric tumor location and the impact on health-related quality of life, symptomatology, and functional performance outcomes in patients with glioma: an exploratory cross-sectional study." Disabil Rehabil: 1-7.
- Hatton, J. D. and U. H. Sang (1990). "Orthogonal arrays are absent from the membranes of human glioblastomatous tissues." Acta Anat (Basel) **137**(4): 363-366.
- Henneberger, C., T. Papouin, S. H. Oliet and D. A. Rusakov (2010). "Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes." Nature **463**(7278): 232-236.
- Hinson, S. R., V. A. Lennon and S. J. Pittock (2016). "Autoimmune AQP4 channelopathies and neuromyelitis optica spectrum disorders." Handb Clin Neurol **133**: 377-403.
- Hinson, S. R., M. F. Romero, B. F. Popescu, C. F. Lucchinetti, J. P. Fryer, H. Wolburg, P. Fallier-Becker, S. Noell and V. A. Lennon (2012). "Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(4): 1245-1250.
- Hiroaki, Y., K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi (2006). "Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion." J Mol Biol **355**(4): 628-639.
- Ho, J. D., R. Yeh, A. Sandstrom, I. Chorny, W. E. Harries, R. A. Robbins, L. J. Miercke and R. M. Stroud (2009). "Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7437-7442.
- Iliff, J. J. and M. Nedergaard (2013). "Is there a cerebral lymphatic system?" Stroke **44**(6 Suppl 1): S93-95.
- Iliff, J. J., M. Wang, Y. Liao, B. A. Plogg, W. Peng, G. A. Gundersen, H. Benveniste, G. E. Vates, R. Deane, S. A. Goldman, E. A. Nagelhus and M. Nedergaard (2012). "A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta." Sci Transl Med **4**(147): 147ra111.
- Iorio, R., J. P. Fryer, S. R. Hinson, P. Fallier-Becker, H. Wolburg, S. J. Pittock and V. A. Lennon (2013). "Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds

to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays." J Autoimmun **40**: 21-27.

Jarius, S., F. Aboul-Enein, P. Waters, B. Kuenz, A. Hauser, T. Berger, W. Lang, M. Reindl, A. Vincent and W. Kristoferitsch (2008). "Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica." Brain **131**(Pt 11): 3072-3080.

Jessen, N. A., A. S. Munk, I. Lundgaard and M. Nedergaard (2015). "The Glymphatic System: A Beginner's Guide." Neurochem Res **40**(12): 2583-2599.

Jin, B. J., A. Rossi and A. S. Verkman (2011). "Model of aquaporin-4 supramolecular assembly in orthogonal arrays based on heterotetrameric association of M1-M23 isoforms." Biophys J **100**(12): 2936-2945.

Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban and P. Agre (1994). "Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 13052-13056.

Katoozi, S., N. Skauli, S. Rahmani, L. M. A. Camassa, H. B. Boldt, O. P. Ottersen and M. Amiry-Moghaddam (2017). "Targeted deletion of Aqp4 promotes the formation of astrocytic gap junctions." Brain Struct Funct **222**(9): 3959-3972.

Kofuji, P. and N. C. Connors (2003). "Molecular substrates of potassium spatial buffering in glial cells." Mol Neurobiol **28**(2): 195-208.

Lafrenaye, A. D. and J. M. Simard (2019). "Bursting at the Seams: Molecular Mechanisms Mediating Astrocyte Swelling." Int J Mol Sci **20**(2).

Landis, D. M. and T. S. Reese (1974). "Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes." J Cell Biol **60**(1): 316-320.

Landis, D. M. and T. S. Reese (1981). "Membrane structure in mammalian astrocytes: a review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes." J Exp Biol **95**: 35-48.

Lathia, J. D., S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. Valentim and J. N. Rich (2015). "Cancer stem cells in glioblastoma." Genes Dev **29**(12): 1203-1217.

Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman and S. R. Hinson (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel." J Exp Med **202**(4): 473-477.

Li, C. and W. Wang (2017). "Molecular Biology of Aquaporins." Adv Exp Med Biol **969**: 1-34.

Li, J. and A. S. Verkman (2001). "Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels." J Biol Chem **276**(33): 31233-31237.

Li, L., H. Zhang, M. Varrin-Doyer, S. S. Zamvil and A. S. Verkman (2011). "Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation." Faseb j **25**(5): 1556-1566.

Lisjak, M., M. Potokar, B. Rituper, J. Jorgacevski and R. Zorec (2017). "AQP4e-Based Orthogonal Arrays Regulate Rapid Cell Volume Changes in Astrocytes." J Neurosci **37**(44): 10748-10756.

Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The 2016

World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.

Lu, D. C., H. Zhang, Z. Zador and A. S. Verkman (2008). "Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels." Faseb j **22**(9): 3216-3223.

Lu, M., M. D. Lee, B. L. Smith, J. S. Jung, P. Agre, M. A. Verdijk, G. Merckx, J. P. Rijss and P. M. Deen (1996). "The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10908-10912.

Manley, G. T., D. K. Binder, M. C. Papadopoulos and A. S. Verkman (2004). "New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice." Neuroscience **129**(4): 983-991.

Manley, G. T., M. Fujimura, T. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A. W. Bollen, P. Chan and A. S. Verkman (2000). "Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke." Nat Med **6**(2): 159-163.

McCoy, E. and H. Sontheimer (2007). "Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes." Glia **55**(10): 1034-1043.

Moe, S. E., J. G. Sorbo, R. Sogaard, T. Zeuthen, O. Petter Ottersen and T. Holen (2008). "New isoforms of rat Aquaporin-4." Genomics **91**(4): 367-377.

Muller, C., J. Holtschmidt, M. Auer, E. Heitzer, K. Lamszus, A. Schulte, J. Matschke, S. Langer-Freitag, C. Gasch, M. Stoupiet, O. Mauermann, S. Peine, M. Glatzel, M. R. Speicher, J. B. Geigl, M. Westphal, K. Pantel and S. Riethdorf (2014). "Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme." Sci Transl Med **6**(247): 247ra101.

Musa-Aziz, R., L. M. Chen, M. F. Pelletier and W. F. Boron (2009). "Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5406-5411.

Neely, J. D., M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre and M. E. Adams (2001). "Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 14108-14113.

Neely, J. D., B. M. Christensen, S. Nielsen and P. Agre (1999). "Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels." Biochemistry **38**(34): 11156-11163.

Newman, E. A. (1986). "Regional specialization of the membrane of retinal glial cells and its importance to K⁺ spatial buffering." Ann N Y Acad Sci **481**: 273-286.

Nicchia, G. P., M. Mastrototaro, A. Rossi, F. Pisani, C. Tortorella, M. Ruggieri, A. Lia, M. Trojano, A. Frigeri and M. Svelto (2009). "Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies." Glia **57**(13): 1363-1373.

Nicchia, G. P., F. Pisani, L. Simone, A. Cibelli, M. G. Mola, M. Dal Monte, A. Frigeri, P. Bagnoli and M. Svelto (2016). "Glio-vascular modifications caused by Aquaporin-4 deletion in the mouse retina." Exp Eye Res **146**: 259-268.

Nico, B., D. Mangieri, R. Tamma, V. Longo, T. Annese, E. Crivellato, B. Pollo, E. Maderna, D. Ribatti and A. Salmaggi (2009). "Aquaporin-4 contributes to the resolution of peritumoural brain oedema in human glioblastoma multiforme after combined chemotherapy and radiotherapy." Eur J Cancer **45**(18): 3315-3325.

-
- Noell, S., P. Fallier-Becker, U. Deutsch, A. F. Mack and H. Wolburg (2009). "Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes." Cell Tissue Res **337**(2): 185-195.
- Noell, S., K. Wolburg-Buchholz, A. F. Mack, A. M. Beedle, J. S. Satz, K. P. Campbell, H. Wolburg and P. Fallier-Becker (2011). "Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet." Eur J Neurosci **33**(12): 2179-2186.
- Noell, S., K. Wolburg-Buchholz, A. F. Mack, R. Ritz, M. Tatagiba, R. Beschorner, H. Wolburg and P. Fallier-Becker (2012). "Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma." Cell Tissue Res **347**(2): 429-441.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." Clin Cancer Res **19**(4): 764-772.
- Oliveira, J. F., V. M. Sardinha, S. Guerra-Gomes, A. Araque and N. Sousa (2015). "Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior." Trends Neurosci **38**(9): 535-549.
- Padmawar, P., X. Yao, O. Bloch, G. T. Manley and A. S. Verkman (2005). "K⁺ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K⁺-sensing fluorescent indicator." Nat Methods **2**(11): 825-827.
- Papadopoulos, M. C., G. T. Manley, S. Krishna and A. S. Verkman (2004). "Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema." Faseb j **18**(11): 1291-1293.
- Pisani, F., L. Simone, C. D. Gargano, M. De Bellis, A. Cibelli, M. G. Mola, G. Catacchio, A. Frigeri, M. Svelto and G. P. Nicchia (2017). "Role of the H-bond between L53 and T56 for Aquaporin-4 epitope in Neuromyelitis Optica." Biochim Biophys Acta **1859**(3): 368-376.
- Pisani, F., L. Simone, M. G. Mola, M. De Bellis, M. Mastrapasqua, M. Ruggieri, M. Trojano, G. P. Nicchia, M. Svelto and A. Frigeri (2019). "Host-Cell Type Dependent Features of Recombinant Human Aquaporin-4 Orthogonal Arrays of Particles-New Insights for Structural and Functional Studies." Cells **8**(2).
- Politi, M. T., F. Ochoa, V. Netti, R. Ferreyra, G. Bortman, N. Sanjuan, C. Morales, A. Piazza and C. Capurro (2019). "Changes in cardiac Aquaporin expression during aortic valve replacement surgery with cardiopulmonary bypass." Eur J Cardiothorac Surg.
- Pollen, A. A., T. J. Nowakowski, J. Chen, H. Retallack, C. Sandoval-Espinosa, C. R. Nicholas, J. Shuga, S. J. Liu, M. C. Oldham, A. Diaz, D. A. Lim, A. A. Leyrat, J. A. West and A. R. Kriegstein (2015). "Molecular identity of human outer radial glia during cortical development." Cell **163**(1): 55-67.
- Rascher, G., A. Fischmann, S. Kroger, F. Duffner, E. H. Grote and H. Wolburg (2002). "Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin." Acta Neuropathol **104**(1): 85-91.
- Rash, J. E., K. G. Davidson, T. Yasumura and C. S. Furman (2004). "Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly." Neuroscience **129**(4): 915-934.

-
- Rash, J. E. and F. D. Giddings (1989). "Counting and measuring IMPs and pits: why accurate counts are exceedingly rare." J Electron Microsc Tech **13**(3): 204-215.
- Rash, J. E., T. Yasumura, C. S. Hudson, P. Agre and S. Nielsen (1998). "Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11981-11986.
- Reichenbach, A. and H. Wolburg (2009). Structural association of astrocytes with neurons and vasculature: defining territorial boundaries. Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system, Springer: 251-286.
- Rodriguez-Grande, B., J. P. Konsman and J. Badaut (2017). Role of Aquaporins in the Formation and Resolution of Brain Edema: 163-181.
- Rosito, S., G. P. Nicchia, C. Palazzo, A. Lia, C. Buccoliero, F. Pisani, M. Svelto, M. Trojano and A. Frigeri (2018). "Supramolecular aggregation of aquaporin-4 is different in muscle and brain: correlation with tissue susceptibility in neuromyelitis optica." J Cell Mol Med **22**(2): 1236-1246.
- Rossi, A., F. Baumgart, A. N. van Hoek and A. S. Verkman (2012). "Post-Golgi supramolecular assembly of aquaporin-4 in orthogonal arrays." Traffic **13**(1): 43-53.
- Rossi, A., T. J. Moritz, J. Ratelade and A. S. Verkman (2012). "Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes." J Cell Sci **125**(Pt 18): 4405-4412.
- Rossi, A., J. Ratelade, M. C. Papadopoulos, J. L. Bennett and A. S. Verkman (2012). "Consequences of NMO-IgG binding to aquaporin-4 in neuromyelitis optica." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): E1511; author reply E1512.
- Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, D. C. Davies, S. Krishna and B. A. Bell (2002). "Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours." J Neurol Neurosurg Psychiatry **72**(2): 262-265.
- Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, H. Watanabe, D. Yan, G. T. Manley and A. S. Verkman (2005). "Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5691-5698.
- Scherer, H. (1938). "Structural development in gliomas." The American Journal of Cancer **34**(3): 333-351.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
- Schulz-Schaeffer, W. J. (2017). "[Alterations in the WHO classification of brain tumors from 2016]." Radiologe **57**(9): 701-706.
- Severs, N. J. (2007). "Freeze-fracture electron microscopy." Nat Protoc **2**(3): 547-576.
- Shi, L. B. and A. S. Verkman (1996). "Selected cysteine point mutations confer mercurial sensitivity to the mercurial-insensitive water channel MIWC/AQP-4." Biochemistry **35**(2): 538-544.
- Silberstein, C., R. Bouley, Y. Huang, P. Fang, N. Pastor-Soler, D. Brown and A. N. Van Hoek (2004). "Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **287**(3): F501-511.

-
- Simone, L., F. Pisani, M. G. Mola, M. De Bellis, G. Merla, L. Micale, A. Frigeri, A. L. Vescovi, M. Svelto and G. P. Nicchia (2019). "AQP4 Aggregation State Is a Determinant for Glioma Cell Fate." Cancer Res **79**(9): 2182-2194.
- Smith, A. J., B. J. Jin, J. Ratelade and A. S. Verkman (2014). "Aggregation state determines the localization and function of M1- and M23-aquaporin-4 in astrocytes." J Cell Biol **204**(4): 559-573.
- Smith, A. J. and A. S. Verkman (2015). "Superresolution Imaging of Aquaporin-4 Cluster Size in Antibody-Stained Paraffin Brain Sections." Biophys J **109**(12): 2511-2522.
- Sole, S., V. Petegnief, R. Gorina, A. Chamorro and A. M. Planas (2004). "Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion." J Neuropathol Exp Neurol **63**(4): 338-349.
- Sosunov, A. A., X. Wu, N. M. Tsankova, E. Guilfoyle, G. M. McKhann, 2nd and J. E. Goldman (2014). "Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain." J Neurosci **34**(6): 2285-2298.
- Stupp, R. and F. Roila (2009). "Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **20 Suppl 4**: 126-128.
- Tabata, H. (2015). "Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis." Front Neurosci **9**: 114.
- Tani, K., T. Mitsuma, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Nishikawa, Y. Tanimura and Y. Fujiyoshi (2009). "Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion." J Mol Biol **389**(4): 694-706.
- Tanimura, Y., Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi (2009). "Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4." J Struct Biol **166**(1): 16-21.
- Thompson, E. G. and H. Sontheimer (2016). "A role for ion channels in perivascular glioma invasion." Eur Biophys J **45**(7): 635-648.
- Trujillo-Estrada, L., A. Gomez-Arboledas, S. Forner, A. C. Martini, A. Gutierrez, D. Baglietto-Vargas and F. M. La Ferla (2019). "Astrocytes: From the Physiology to the Disease." Curr Alzheimer Res.
- Umenishi, F. and A. S. Verkman (1998). "Isolation and functional analysis of alternative promoters in the human aquaporin-4 water channel gene." Genomics **50**(3): 373-377.
- Urhie, O., R. Turner, B. Lucke-Wold, W. Radwan, J. Ahn, K. Gyure and S. Bhatia (2018). "Glioblastoma Survival Outcomes at a Tertiary Hospital in Appalachia: Factors Impacting the Survival of Patients Following Implementation of the Stupp Protocol." World Neurosurg **115**: e59-e66.
- Verkman, A. S., A. Rossi and J. M. Crane (2012). "Live-cell imaging of aquaporin-4 supramolecular assembly and diffusion." Methods Enzymol **504**: 341-354.
- Vizzaccaro, E., C. Terracciano, E. Rastelli and R. Massa (2018). "Aquaporin 4 expression in human skeletal muscle fiber types." Muscle Nerve **57**(5): 856-858.
- Wang, R., S. Zhang, X. Chen, N. Li, J. Li, R. Jia, Y. Pan and H. Liang (2018). "EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis." Mol Cancer **17**(1): 166.

-
- Warth, A., S. Kroger and H. Wolburg (2004). "Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae." Acta Neuropathol **107**(4): 311-318.
- Warth, A., P. Simon, D. Capper, B. Goepfert, G. Tabatabai, H. Herzog, K. Dietz, F. Stubenvoll, R. Ajaaj, R. Becker, M. Weller, R. Meyermann, H. Wolburg and M. Mittelbronn (2007). "Expression pattern of the water channel aquaporin-4 in human gliomas is associated with blood-brain barrier disturbance but not with patient survival." J Neurosci Res **85**(6): 1336-1346.
- Wesseling, P. and D. Capper (2018). "WHO 2016 Classification of gliomas." Neuropathol Appl Neurobiol **44**(2): 139-150.
- Wolburg-Buchholz, K., A. F. Mack, E. Steiner, F. Pfeiffer, B. Engelhardt and H. Wolburg (2009). "Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis." Acta Neuropathol **118**(2): 219-233.
- Wolburg, H. (1995). "Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes." J Hirnforsch **36**(2): 239-258.
- Wolburg, H., S. Noell, P. Fallier-Becker, A. F. Mack and K. Wolburg-Buchholz (2012). "The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma." Mol Aspects Med **33**(5-6): 579-589.
- Wolburg, H., S. Noell, K. Wolburg-Buchholz, A. Mack and P. Fallier-Becker (2009). "Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier." Neuroscientist **15**(2): 180-193.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, P. Fallier-Becker, S. Noell and A. F. Mack (2011). "Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles." Int Rev Cell Mol Biol **287**: 1-41.
- Wu, X., J. T. Zhang, D. Li, J. Zhou, J. Yang, H. L. Zheng, J. G. Chen and F. Wang (2017). "Aquaporin-4 deficiency facilitates fear memory extinction in the hippocampus through excessive activation of extrasynaptic GluN2B-containing NMDA receptors." Neuropharmacology **112**(Pt A): 124-134.
- Yang, B., T. Ma and A. S. Verkman (1995). "cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units." J Biol Chem **270**(39): 22907-22913.
- Yukutake, Y. and M. Yasui (2010). "Regulation of water permeability through aquaporin-4." Neuroscience **168**(4): 885-891.
- Zelenin, S., E. Gunnarson, T. Alikina, A. Bondar and A. Aperia (2000). "Identification of a new form of AQP4 mRNA that is developmentally expressed in mouse brain." Pediatr Res **48**(3): 335-339.
- Zhang, H. and A. S. Verkman (2008). "Evidence against involvement of aquaporin-4 in cell-cell adhesion." J Mol Biol **382**(5): 1136-1143.
- Zhang, Y., K. Xu, Y. Liu, B. O. Erokwu, P. Zhao, C. A. Flask, C. Ramos-Estebanez, G. W. Farr, J. C. LaManna, W. F. Boron and X. Yu (2019). "Increased cerebral vascularization and decreased water exchange across the blood-brain barrier in aquaporin-4 knockout mice." PLoS One **14**(6): e0218415.

Zhou, Z., Y. Ikegaya and R. Koyama (2019). "The Astrocytic cAMP Pathway in Health and Disease." Int J Mol Sci **20**(3).

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Aus Ergebnissen dieser Dissertationsschrift ist folgende Veröffentlichung hervorgegangen:

Petra Fallier-Becker, Maike Nieser, Ulrike Wenzel, Rainer Ritz, Susan Noell
„Is upregulation of Aquaporin 4-Isoform M1 responsible for the loss of typical orthogonal arrays of particles in astrocytomas?“ (Fallier-Becker, Nieser et al. 2016),
International Journal of Molecular Sciences; 2016, 17: 1230

8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie in der Abteilung Elektronenmikroskopie unter Betreuung von Prof. Dr. Falko Fend, PD Dr. Petra Fallier-Becker und Prof. Dr. Hartwig Wolburg durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Petra Fallier-Becker und PD Dr. Susan Noell.

Die Gefrierbrüche wurden von Ria Knittel angefertigt.

Die Auswertung der Gefrierbruchexperimente habe ich nach Einarbeitung durch PD Dr. Petra Fallier-Becker selbständig durchgeführt.

Die Zellkulturexperimente wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Petra Fallier-Becker von mir selbständig durchgeführt.

Die qRT-PCR wurde durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Maike Nieser.

Die statistische Auswertung und Interpretation der qRT-PCR habe ich in Zusammenarbeit mit Dr. Maike Nieser durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen habe ich unter Anleitung von Ria Knittel und Gabi Frommer- Kästle durchgeführt und in Zusammenarbeit mit PD Dr. Petra Fallier-Becker und Dr. Andreas Mack ausgewertet.

Die U373-Zellen wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Naumann, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen,

Für die murine Zellkultur wurden Astrozyten aus dem Cortex von fünf Tage alten Mäusen von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Friederike Pfeiffer isoliert.

Dr. Rainer Ritz hat die Tumorproben zur Verfügung gestellt.

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

Tübingen, den 9.4.2020

Ulrike Wenzel

9 DANKSAGUNG

Zahlreiche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Pathologie und anderer universitärer Einrichtungen haben durch wissenschaftliche, technische oder administratorische Unterstützung, wertvolle Ratschläge, spannende Diskussionen und die Schaffung einer angenehmen Atmosphäre zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Mein herzlicher Dank gilt zunächst Prof. Dr. Falko Fend, dessen konsequente Unterstützung die Voraussetzung für die Erstellung der Arbeit war. Ganz besonders hervorzuheben ist die großartige Betreuung durch PD Dr. Petra Fallier-Becker, die mir das spannende Thema nahegebracht hat und jederzeit ansprechbar war, um ihre Scharfsichtigkeit am Elektronenmikroskop, Hingabe an die Zellkultur und Leidenschaft für wissenschaftliche Dispute mit mir zu teilen. Es war eine Freude, unter ihrer Führung in die geheimnisvolle Welt der Elektronenmikroskopie einzutauchen und zahllose Stunden begeisternder Zusammenarbeit zu erleben. Nachdem sie krankheitsbedingt eine längere Pause einlegen musste, bin ich Professor Dr. Hartwig Wolburg sehr dankbar für seine spontane Bereitschaft, die Betreuung zu übernehmen. Dadurch ergab sich nicht nur die Möglichkeit, die Arbeit überhaupt fertigzustellen, sondern auch die Chance, mit einem exzellenten Experten und Pionier der OPK-Forschung zusammenarbeiten zu dürfen. Weiterhin wäre ohne die Laborfertigkeiten von Ria Knittel und Gabi Frommer-Kästle, den kunstvollen Umgang von Ria Knittel mit der Gefrierbruchapparatur, Dr. Maike Niesers Erfahrung mit PCR und Statistikprogrammen, Dr. Andreas Macks geduldige Unterstützung am Lasermikroskop sowie die durch Yeliz Donat, Dr. Rainer Ritz, Dr. Friederike Pfeiffer und Prof. Dr. Ulrike Naumann aufbereiteten und zur Verfügung gestellten Gewebeproben und Zellen die Durchführung unmöglich gewesen. PD Dr. Susan Noell war wesentlich an der Konzeption der Arbeit beteiligt und hat in zahlreichen Gesprächen zur Entwicklung der Fragestellung beigetragen.