

**Die Expression des Wasserkanalproteins Aquaporin 4  
in der Gehirnentwicklung der Maus**

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

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

**vorgelegt von**

**Vollmer, Jörg-Peter**

**2015**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Hirt

Für Christina, Lilith und Tilda

Y especialmente  
para  
Ana Luisa Mujica de Rios

Tus bendiciones se transformaron en este trabajo.

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
1.1 Blut-Hirn-Schranke	9
1.2. Astrozyten	11
1.3. Das Wasserkanalprotein Aquaporin 4	12
1.4 Das Auftreten von AQP4 in Form Orthogonaler Partikelkomplexe	17
1.5 Fragestellung	20
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>21</b>
2.1 Material	21
2.1.1 Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente	21
2.1.2 Material und Puffer für die Immunzytochemie	22
2.1.3 Antikörper für die Immunzytochemie	24
<b>2.2. METHODEN</b>	<b>24</b>
2.2.1 Präparation und Gewinnung von Gehirngewebe	24
2.2.2 Gefrierbruchexperimente	25
2.2.3. Immunzytochemie	26
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1. Gefrierbruchexperimente	28
3.1.1 E16	28
3.1.2 E17	28
3.1.3 E18	28
3.1.4 P1	29

<b>3.1.5 P2</b>	<b>29</b>
<b>3.1.6. P3</b>	<b>30</b>
<b>3.1.7. Statistische Auswertung der Gefrierbruchexperimente</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Immunzytochemie</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1. E16</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2 E17</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3. E18</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4 P1</b>	<b>37</b>
<b>3.2.5 P2</b>	<b>37</b>
<b>3.2.6 P3</b>	<b>37</b>
<b>3.2.7 GFAP/AQP4-Doppelfärbung</b>	<b>44</b>
<b>3.2.8 ZO1/beta-Dystroglycan-Doppelfärbung</b>	<b>45</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>55</b>
<b>7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AQP	Aquaporin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cy	Cyanin
DDC	Dystrophin/Dystroglycan-Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Pränatal
EC(s)	Endothelzelle(n)
ECM	Extrazelluläre Matrix
E-Face	Extrazelluläre Membranfrakturschicht
et al.	und andere
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
HCL	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid
HHP	Hepes-Hanks-Puffer
HMSS	Hanks modified salt solution

K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
Kir4.1	„Inward rectifier“ Kaliumkanal
L	Liter
Lsg.	Lösung
LSM	Laser Scanning-Mikroskop
mbar	Millibar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mmol	Millimol
mRNA	„Messenger“RNA
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NSG	Normal serum goat
PBS	Phoshat buffered saline
OPK(s)	Orthogonale Partikelkomplex(e)
P	Postnatal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	Post synaptic density-95 / discs large / zonula occludens-1
P-Face	Protoplasmatische (innere) Membranfrakturschicht
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RM	Rückenmark

RNA	Riboukleinsäure
RT-PCR	PCR mit vorausgegangener reverser Transkriptase
SDS	Natriumdodecylat
siRNA	Small interfering RNA
SVZ	Subventrikuläre Zone
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TJ	Tight Junction
U	Unit(s)
Vol	Volumen
VZ	Ventrikuläre Zone
ZO-1	Zonula occludens Protein 1
ZO-2	Zonula occludens Protein 2
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. Einleitung

## 1.1 Blut-Hirn-Schranke

Wo immer das vaskuläre Gefäßsystem im Körper von Landwirbeltieren in unmittelbarem Kontakt zu anderen Kompartimenten steht, definiert die Dichte der Endothelzellen zueinander anatomische und physiologische Barrieren zu diesen Räumen und Organen. Diese endothelialen Grenzen werden auch als Schranken bezeichnet und finden sich so zum Beispiel in der Lunge (Blut-Luft-Schranke), der Niere (Blut-Harn-Schranke) oder im Gehirn als Blut-Hirn-Schranke (BHS). Letztere wurde 1885 vom Chemiker Paul Ehrlich entdeckt. Die Injektion wasserlöslicher, saurer Vitalfarbstoffe in den Blutkreislauf von Ratten färbte alle Organe mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks (Ehrlich, 1885). Edwin Goldmann, ein Mitarbeiter Ehrlichs, injizierte 1913 den von Ehrlich entwickelten Di-Azofarbstoff Trypanblau in den Zentralkanal des Rückenmarks von Hunden und Hasen und stellte hier eine Anfärbung des Gehirns und Rückenmarks fest, ohne Anfärbung der restlichen, mit dem Blutkreislauf in Verbindung stehenden Organe (Goldmann, 1913). Das Konzept einer biologischen Barriere zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem entstand. Jedoch erst 54 Jahre später gelang durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mäusegehirnen die Darstellung dieser Barriere (Reese und Karnovsky, 1967). Intravenös injizierte Meerrettichperoxidase ließ sich hier lediglich im Lumen von Hirnkapillaren, nicht jedoch im Gehirn detektieren. Als ein morphologisches Korrelat der BHS wurden schließlich feste Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen (EC) untereinander, sogenannte Tight Junctions (TJ) gefunden (Brightman und Reese, 1969). Viele Jahre später, erst 1993 bzw. 1998, wurden Occludin und die Claudine als membranständige Proteine der TJs erkannt, nachdem in den 1980er Jahren sogenannte Adapterproteine, Mediatoren zwischen Membran und Zytoskelett, gefunden worden waren, nämlich die Zonula occludens-Proteine 1 (ZO-1) und 2 (ZO-2) (Hawkins und Davis, 2005).

In der Gehirnentwicklung entstehen endotheliale TJs zum ersten Mal pränatal am Tag E10 in der Maus und am Tag E11 in der Ratte zu einem Zeitpunkt, an

dem erstmals Blutgefäße in das Gehirn einsprossen (Saunders *et al.*, 2000). Nach heutigem Verständnis wird die endotheliale Komponente der BHS ferner durch ihre 40-50 nm dicke Basallamina sowie zwei weitere Zelltypen ergänzt. Zum einen sind dies die Perizyten, die in hoher Dichte vollständig in die perivaskuläre Basallamina eingebettet sind und den Stoffwechsel der EC beeinflussen (Dore Duffy, 2008). Sie haben kontraktile, d.h. den Gefäßdurchmesser regulierende Eigenschaften und tragen als perivaskuläre Makrophagen immunmodulatorisch durch Antigen-Präsentation und Phagozytose zur Stabilisierung des Mikromilieus des ZNS bei (Rucker *et al.*, 2000). Zum anderen werden die EC zum neuralen Parenchym hin nahezu vollständig von astrozytären Zellfortsätzen, den sogenannten Endfüßen, bedeckt. Da auf dieser Komponente der BHS das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt, wird sie im Kapitel 1.2 separat und ausführlicher besprochen. Die Einheit aus EC, Perizyten und Astrozyten wird auch als gliovaskulärer Komplex bezeichnet und stellt somit das anatomisch-morphologische Korrelat der BHS dar. Zusätzlich soll an dieser Stelle ein Begriff eingeführt werden, der historisch sehr alt ist, aber funktionell seine Bedeutung bis heute bewahrt hat und in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielt: die *Membrana gliae perivascularis*. Er besagt, dass es eine Grenzstruktur gibt, eben die perivaskuläre Basallamina, die das vaskuläre Kompartiment (Mesoderm) vom neuralen Kompartiment (Neuroektoderm) abtrennt. Analog gibt es eine Abgrenzung an der Hirnoberfläche zwischen neuralem Parenchym und dem Subarachnoidalraum, die wie im Falle der *Membrana gliae perivascularis* ebenfalls von astroglialen Endfüßen gebildet wird, hier aber *Membrana gliae superficialis* genannt wird. Auch diese Struktur wird in dieser Arbeit eine bedeutsame Rolle spielen.

Die physiologische Barrierefunktion der BHS lässt sich am besten mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Aminosäuren, Proteinen und Elektrolyten in Blutplasma und Liquor belegen. So beträgt beispielsweise die Kaliumkonzentration im Blutplasma von Säugern durchschnittlich 4,5 mmol/l während sie im Liquor streng zwischen 2,5-2,9 mmol/l gehalten wird (Bradbury *et al.*, 1963). Des Weiteren begrenzt die BHS zum einen schädliche Auswirkungen peripherer Makromoleküle im Blut, wie z.B. Albumin und

Prothrombin oder peripherer Neurotransmitter auf das ZNS und bedient zum anderen über hochselektive Transportprozesse gleichzeitig den hohen Nährstoffbedarf und Stoffwechselumsatz von Gehirn und Rückenmark. Diese als Homöostase bezeichnete Stabilisierung und Absicherung des zentralnervösen Milieus durch die BHS gewährleistet erst die Aufrechterhaltung neuronaler Funktionen (Abbott et al., 2010).

## **1.2. Astrozyten**

Der Pathologe Rudolf Virchow formulierte 1856 den Begriff der Neuroglia oder Nerven kitt für all jene Zellen, die den extrazellulären Raum um die Neurone herum auffüllen und wies ihnen somit lediglich eine reine Stütz- und Haltefunktion zu (Virchow, 1856). Neben Oligodendrozyten und Mikroglia bilden die Astrozyten die Mehrheit der Neurogliazellen im ZNS. Mangels des Nachweises einer elektrischen Erregbarkeit hielt sich die Sichtweise der Astrozyten als passive und lediglich ernährende Zellen hartnäckig bis in die 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts (Steinhauser *et al.*, 1992). Innerhalb der letzten 25 Jahre wurde diese Ansicht einem grundlegenden Wandel unterzogen. Das breite Spektrum astrozytärer Funktionen mit Aufrechterhaltung der neuronalen Versorgung über Aufnahme und Abgabe von Metaboliten, der Kontrolle des lokalen Blutflusses (Wang und Bordey, 2008) und der Einflussnahme im Bereich von Synapsen auf die neuronale Reizleitung durch wellenartige Anstiege zytosolischen Calciums und somit modulierender Wirkung auf die Erregungsausbreitung (Parpura *et al.*, 1994) trug zunehmend zur Aufhebung der Ansicht bei, Astrozyten seien lediglich die „Ammenzellen“ der Neurone. Eine der wichtigsten Erkenntnisse zur Rolle der Astrozyten ist ihre Bedeutung für die Neurogenese. Neuroepitheliale Zellen, die den astrozytären Marker GFAP (glial fibrillary acid protein) exprimierten und in neurogenen Stammzellnischen lokalisiert waren, konnten nicht nur als astrozytäre Vorläuferzellen, sondern in ihrer Funktion auch als neuronale Stammzellen identifiziert werden (Levison *et al.*, 1993). Diese als Radialglia bezeichneten Zellen haben ihren Ursprung in der ventrikulären (VZ) und subventrikulären Zone (SVZ) des Gehirns und dienen mit ihren langen Fortsätzen jungen Neuronen als radiäre Leitstruktur bei ihrer Wanderung zur Cortex-Oberfläche

während der Gehirnentwicklung. Zusätzlich weisen sie die Fähigkeit auf, durch asymmetrische mitotische Teilung neuronale Progenitorzellen zu generieren, die sich später in Neurone umwandeln (Noctor *et al.*, 2001; Campbell und Götz, 2002). Es konnte in der Folge sogar gezeigt werden, dass die meisten Neurone im Gehirn direkt oder indirekt von der Radialglia abstammen (Anthony *et al.*, 2004; Malatesta *et al.*, 2003). Die Expression astrozytenspezifischer Marker wie des Glutamat-Transporters GLAST, von GFAP, S100, oder von Vimentin beginnt embryonal in der VZ parallel zur Neurogenese (Kriegstein und Götz, 2003; Götz 2003). In Mäusen beginnt diese Expression zwischen E10 und E12. Zu diesem Zeitpunkt weisen die meisten Vorläuferzellen im ZNS oben genannte astrozytenspezifische Merkmale auf (Hartfuss *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002). Neben einem Maximum der neuronalen Entwicklung am Tag E14 erreicht die Astrozytogenese ihren Höhepunkt erst nach der Geburt um P2 (Wang und Bordey, 2008). Da die Radialglia in verschiedenen Vorläufer-Zelllinien aus unterschiedlichen zentralen Gehirnregionen entstammt und in ihrer Differenzierung zusätzlich zeitversetzte Entwicklungsmuster aufweist, liegt im ZNS eine enorme Vielfalt an Astrozyten unterschiedlicher Herkunft vor (Liu und Rao, 2004). Während beispielsweise die protoplasmatischen Astrozyten der grauen Substanz aus embryonaler Radialglia des VZ entstammen, entspringen die fibrillären Astrozyten der weißen Substanz dem neonatalen SVZ. Der im Vergleich zur neuronalen Differenzierung spätere Zeitpunkt der astrozytären Entwicklung hängt auch damit zusammen, dass diese Entwicklung erst nach Erreichen der Neurone in der kortikalen Ebene eintritt. Neben ihrer Verbindung zu jungen Neuronen treten die astrozytären Endfüße zusätzlich in Kontakt zu bereits eingewachsenen Gefäßen, wo sie maßgeblich an der Induktion der BHS beteiligt sind. Der fließende Prozess der Reifung und Polarisierung der Astrozyten zwischen Neuropil und Gefäßsystem geht einher mit zunehmender Dichtigkeit der BHS (Risau und Wolburg, 1990; Engelhardt, 2003).

### **1.3. Das Wasserkanalprotein Aquaporin 4**

Der maximal genutzte Volumenbedarf des adulten Gehirns mit seiner gleichzeitig rigiden knöchernen Begrenzung durch den Schädel stellt besondere Anforderungen an die Kontrolle und Balance des Wasserhaushaltes zwischen

intrazellulären, interstitiellen, vaskulären und ventrikulären Kompartimenten des ZNS und ist über osmotische und hydrostatische Druckgradienten streng reguliert (Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003; Nicchia *et al.*, 2004). Bis zur Entdeckung des Wasserkanalproteins Aquaporin 1 durch die voneinander unabhängigen Forschergruppen um Gheorge Benga. 1986 und Peter Agre, 1988 waren jedoch die genauen Mechanismen eines transmembranösen Wassertransportes über Zellwände hinweg oder zwischen unterschiedlichen Kompartimenten weitgehend unbekannt (Benga *et al.*, 1986; Denker *et al.*, 1988). Inzwischen sind bei Säugern 13 verschiedene Typen der später als Aquaporine benannten Transmembranproteine bekannt mit unterschiedlicher Organverteilung und unterschiedlichen Permeabilitäten für Wasser (Tabelle 1.1.). Ausnahmen bilden die Aquaglyceroproteine AQP3, AQP7 und AQP9, die neben Wasser noch für Harnstoff und Glycerol permeabel sind. Die im Gehirn vorherrschende Variante ist das Aquaporin 4 (AQP4), das im Bereich der astrozytären Endfußmembran in hoher Dichte lokalisiert ist und hier die funktionale Komponente des gliovaskulären Komplexes bezüglich Wassertransport zwischen neuroglialem und vaskulärem Kompartiment darstellt (Nielsen *et al.*, 1997; Solenov *et al.*, 2003). AQP4 kommt in Form von Heterotetrameren in zwei Isoformen vor, der AQP4-M1-Isoform und der AQP4-M23-Isoform. Im Vergleich weist die AQP4-M23-Isoform gegenüber der am N-Terminus um 22 Aminosäuren längeren AQP4-M1-Isoform die höhere Wasserdurchlaufrate auf (Jung *et al.*, 1994; Silberstein *et al.*, 2004). Die Bedeutung von AQP4 für die Homöostase des zentralnervösen Wasserhaushaltes konnte beispielhaft durch Studien an AQP4-Knockout-Mäusen belegt werden. Diese zeigten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen nach künstlich induzierten ischämischen Hirninfarkten oder beigebrachter Wasserintoxikation in der Folge deutlich weniger Hirnödeme (Manley *et al.*, 2000). Untermauert werden konnte diese Beobachtung durch weitere Studien an Knockout-Mäusen, bei denen die Gene der Adapterproteine  $\alpha$ -Syntrophin und Dystrophin deaktiviert wurden. Beide Proteine sind Bestandteile eines Gerüstkomplexes, der das astrozytäre Cytoskelett im Bereich der Endfußmembran mit der Extrazellulärmatrix der Basallamina verbindet. Die

Interaktion und Verankerung von AQP4 mit diesem Komplex funktioniert über eine PDZ (PSD 99/Dlg/ZO-1)-Domäne in Verbindung mit  $\alpha$ -Syntrophin und darüber indirekt mit Dystrophin (DP-71) und stellt somit eine der Grundlagen für das polarisierte Auftreten von AQP4 im Bereich der astrozytären Endfußmembran dar (Neely *et al.*, 2001; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003). Die  $\alpha$ -Syntrophin- und die Dystrophin-Knockout-Maus zeigen, wie die AQP4-Knockout-Maus, ein verzögert eintretendes Hirnödem nach künstlich induziertem Hirnschaden im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp, aber auch eine ausgeprägte Änderung der Verteilung von AQP4, welches nicht mehr nur an der Endfußmembran, sondern auch an parenchymalen Membranen lokalisiert ist (Vajda *et al.*, 2002; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003). Aus morphologischer Sicht zeigten die Untersuchungen an AQP4- und Dystrophin-Knockout-Mäusen eine Formveränderung der astrozytären Endfussmembranen mit deutlicher Schwellung und intrazellulären Ablagerungen und in der Konsequenz somit zusätzliche Funktionseinbußen bezüglich des Wassertransportes über die Membran (Frigeri *et al.*, 2001; Nico *et al.*, 2003). Ein weiterer Erklärungsansatz für die normalerweise hohe Dichte von AQP4-Molekülen an der Endfussmembran liefert der ebenfalls in diesem Bereich lokalisierte transmembranöse Fluss von Kaliumionen, in den im besonderen Maße der Kalium-Kanal Kir4.1 eingebunden ist (Takumi *et al.*, 2001). Eine der wichtigsten Funktionen der Astrozyten ist die räumliche Kaliumpufferung („spatial buffering“) des extrazellulären Raumes und die damit verbundene Kaliumaufnahme in die Gliazelle im Bereich hoher synaptischer Aktivität. Diese Kaliumaufnahme ist mit einer Depolarisierung der Gliazelle verbunden. Wieder abgegeben wird das Kalium dort, wo die Gliazelle nicht depolarisiert wurde, d.h. am perivaskulären oder superfiziellen Endfuß (Horio, 2001). Da das Phänomen eines gliavermittelten Kaliumabflusses zuerst an der Retina des Auges beschrieben wurde, konnte auch an dem dort vorkommenden Haupttyp der Gliazellen, den Müller-Zellen, die Korrelation zwischen einer Kir4.1 abhängigen  $K^+$ -Clearance und einem von AQP4 vermittelten Wassertransport hergestellt werden (Nagelhus *et al.*, 1999). Unterstützt werden konnte diese Annahme durch Untersuchungen mit AQP4-defizienten Mäusen, bei denen sich als Folge des

unzureichend drainierten Kaliums eine leichte Einschränkung der retinalen Funktion bei fehlendem AQP4 in den Müller-Zellen zeigte (Li *et al.*, 2002). Trotz einer hohen Dichte an Kir4.1-Kanälen in Astrozyten überwiegt die Dichte des AQP4 jedoch deutlich. Erklärt werden kann dies mit der notwendigen Aufrechterhaltung eines osmotischen Gradienten über die astrozytäre Endfusssmembran hinweg, für den bei einem passiv transportiertem Kaliumion im Gegenzug mindestens 350 Wassermoleküle transportiert werden müssen (Rash, 2010). Eine verminderte  $K^+$ -Clearance der  $\alpha$ -Syntrophin-Knockout-Maus kann durch die Verbindung der  $\alpha$ 1-Syntrophin-Untereinheit des Syntrophins nicht nur mit AQP4, sondern auch mit Kir4.1 erklärt werden (Neely *et al.*, 2001; Connors *et al.*, 2004). Als Bestandteile des Dystrophin-Dystroglycan-Komplexes konnten die Expression sowohl von AQP4 als auch von Kir4.1 in kultivierten Astrozyten durch Laminin induziert werden (Guadagno und Moukhles, 2004). Jedoch zeigte sich in der AQP4-Knockout-Maus an Müller-Zellen keine Einschränkung der Expression und Funktion von Kir4.1, was zu erwarten gewesen wäre, wenn die Kollokalisierung beider Moleküle von funktioneller Bedeutung gewesen wäre. So wurde das Ergebnis als Zeichen funktionaler Unabhängigkeit der beiden Kanäle gewertet (Ruiz-Ederra *et al.*, 2007). Da ein Ausschalten von AQP4 durch siRNA jedoch auch eine Einschränkung der Regulierung Volumen-kontrollierter Anionen-Kanäle hervorruft (Benfenati *et al.*, 2007), belegt dies ebenfalls eindrücklich die zentrale Bedeutung von AQP4 für einen effizienten Wassertransport zwischen den Kompartimenten und somit für die Aufrechterhaltung einer intakten Homöostase im ZNS.

<b>Aquaporin</b>	<b>Permeabilität</b>	<b>Organverteilung</b>	<b>Zelluläre Lokalisation</b>
<b>AQP0</b>	Wasser (niedrig)	Linse des Auges	Plasmamembran
<b>AQP1</b>	Wasser (hoch)	Erythrozyten, Niere, Lunge, Gefäßendothel, Gehirn, Auge	Plasmamembran
<b>AQP2</b>	Wasser (hoch)	Niere im Vas deferens	Apikale Plasmamembran, intrazelluläre Vesikel
<b>AQP3</b>	Wasser (hoch), Glycerol (hoch), Harnstoff (moderat)	Niere, Haut, Lunge, Auge, Kolon	Basolaterale Plasmamembran
<b>AQP4</b>	Wasser (hoch)	Gehirn, Muskel, Niere, Lunge, Magen, Dünndarm	Basolaterale Plasmamembran
<b>AQP5</b>	Wasser (hoch)	Speicheldrüsen, Tränendrüse, Schweißdrüsen, Lunge, Hornhaut des Auges	Apikale Plasmamembran
<b>AQP6</b>	Wasser (niedrig), Anionen ( $\text{NO}^{-3} > \text{Cl}^{-}$ )	Niere	Intrazelluläre Vesikel
<b>AQP7</b>	Wasser (hoch), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch), Arsenite	Fettgewebe, Niere, Hoden	Plasmamembran
<b>AQP8*</b>	Wasser (hoch)	Hoden, Niere, Leber, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Kolon	Intrazelluläre Vesikel, Plasmamembran
<b>AQP9</b>	Wasser (niedrig), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch), Arsenite	Leber, Leukozyten, Gehirn, Hoden	Plasmamembran
<b>AQP10</b>	Wasser (niedrig), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch)	Dünndarm	Intrazelluläre Vesikel
<b>AQP11</b>	Wasser (unklar)	Niere, Leber, Hoden, Gehirn	Intrazelluläre Vesikel, Plasmamembran
<b>AQP12</b>	Substrat noch unklar	Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse	Intrazelluläre Vesikel

Tabelle 1.1.: Formen von Aquaporinen bei Säugern, ihre charakteristische Permeabilität und Vorkommen in Organen und Zellen. \* AQP8 ist eventuell zusätzlich für Harnstoff permeabel. Modifiziert nach King und Agre, 2004; Ohta *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2014



## 1.4 Das Auftreten von AQP4 in Form Orthogonaler Partikelkomplexe

Neben einer Darstellung mittels Immunfluoreszenz oder ultrastrukturell mittels Goldmarkierung lassen sich AQP0 und AQP4 als einzige der 13 Wasserkanalproteine noch in Form der sogenannten orthogonalen Partikelkomplexe (OPKs) in der Gefrierbruchtechnik darstellen. Diese Technik wurde in den Sechziger Jahren entwickelt und trug entscheidend zur Etablierung und zur Akzeptanz des Flüssig-Mosaik-Modells biologischer Membranen bei. Durch schnelles Gefrieren organischen Gewebes und Auseinanderbrechen wird die Lipiddoppelschicht in ihrer inneren Ebene gespalten. Die daraufhin vorliegenden zwei Oberflächen repräsentieren somit einerseits die der Zelle zugewandte protoplasmatische Seite (P-Face) und andererseits eine dem Extrazellulärraum zugewandte Seite (E-Face). Die Struktur der OPKs ist in der P-Face lokalisiert und hinterlässt in der E-Face Abdrücke, die auch Pits genannt werden (siehe Abb. 1.1).

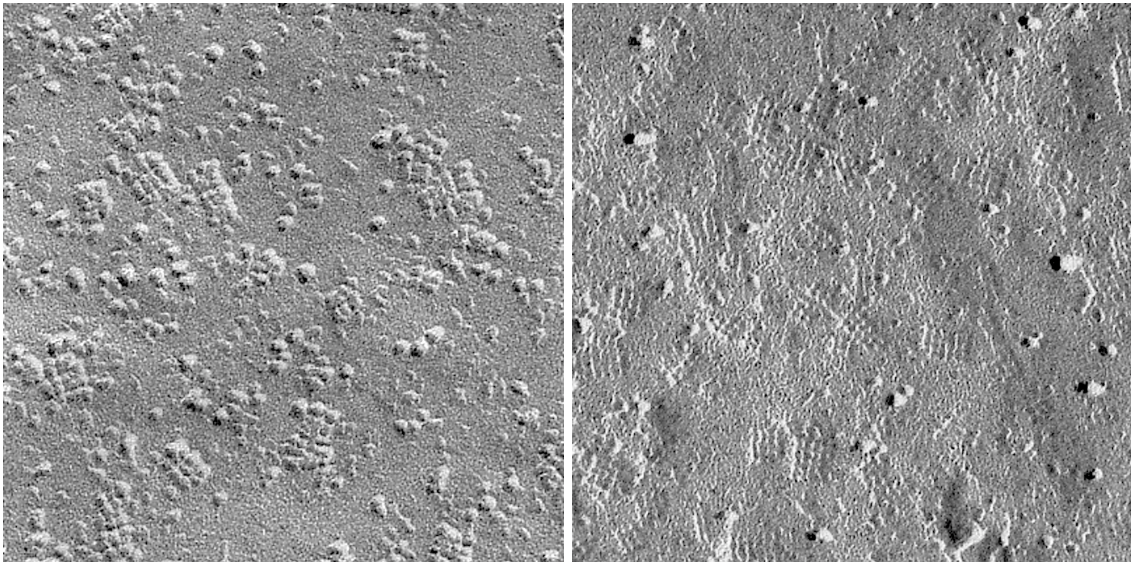


Abb.1.1: Gefrierbruchreplikas: Links P-Face, Rechts E-Face

OPKs wurden zuerst in der Leber beschrieben (Kreutziger, 1968), dann irrtümlich als neue Art von Gap Junctions fehlinterpretiert (Staehein, 1972) und schließlich als eigenständige Struktur charakterisiert (Rash *et al.*, 1974). OPKs konnten im Rahmen zahlreicher Studien in verschiedensten Geweben und

Organen nachgewiesen werden, so beispielsweise im Muskel sowie den Epithelzellen von Niere, Magen, Dünndarm, und vor allem im ZNS. Hier fanden sie sich überwiegend an Gliazellen wie Astrozyten, Müllerzellen in der Retina, Ependymzellen und Tanzyten. Erstbeschrieben wurden OPKs an Astrozyten durch Dermietzel (1973, 1974) und Landis und Reese (1974). Der Beweis, dass OPKs das morphologische Äquivalent des AQP4-Proteins darstellt, wurde jedoch erst 24 Jahre später durch Versuche an AQP4-Knockout-Mäusen erbracht. Diese wiesen an der Oberfläche ihrer astrozytären Endfußmembranen keine OPKs auf (Verbavatz *et al.*, 1997). Diese Erkenntnis wurde durch weitere Studien belegt. So traten OPKs auch nach Transfektion von AQP4 in Ovarzellen (CHO) von Hamstern auf (Yang *et al.*, 1996) und mittels Immunogold-Markierungen konnte AQP4 schließlich eindeutig als Bestandteil der Partikelkomplexe definiert werden (Rash *et al.*, 1998). Die Beschränkung der Komplexe auf gliale Membranen und die Korrelation der Verteilung der AQP4-Expression mit der Verteilung der OPKs in Müllerzellen konnte ebenfalls anhand Markierungen mit Immunogold gezeigt werden (Nielsen *et al.*, 1997). Ohne Einbeziehungen der Isoformen AQP4-M1 und AQP4-M23 erscheint AQP4 auf molekularer Ebene in Form eines Tetramers. Jedes seiner vier Monomere entspricht einem singulären Wasserkanal. Die kleinste Einheit eines OPKs misst 7x7nm und entspricht einem Tetramer. Durch elektronenkristallografische Untersuchungen konnten die Isoformen und ihre Auswirkungen auf die Permeabilität des Proteins für Wasser ermittelt werden (Hiroaki *et al.*, 2006; Tani *et al.*, 2009). Denn neben ihren unterschiedlichen Wassertransportkapazitäten zeigen die Isoformen AQP4-M1 und AQP-M23 auch verschiedene morphologische Erscheinungsformen als OPKs. CHO-K1-Zellen, die mit AQP4-M1 transfiziert wurden, zeigten im Gefrierbruch keine oder nur sehr kleine Partikelkomplexe, wohingegen eine Transfektion mit AQP4-M23 die Ausbildung großflächiger OPKs zur Folge hatte. Wurden beide Isoformen transfiziert, zeigten die OPKs eine Morphologie, wie sie auch an Astrozyten *in vivo* beobachtet werden kann (Furman *et al.*, 2003). Inwieweit die unterschiedliche Länge der Aminosäuren am N-Terminus beider Isoformen mit den Größenunterschieden der OPKs korreliert, ist noch nicht hinreichend

geklärt. Da jedoch das Verhältnis beider Varianten zueinander die Morphologie und Größe der OPKs zu beeinflussen scheint wurde angenommen, dass auch beide Formen in den Partikelkomplexen vorliegen müssen (Nicchia *et al.*, 2010). Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich der Form und des Auftretens von OPKs wird durch die Kontaktaufnahme astrozytärer Endfußmembranen mit der Basallamina bestimmt. Wo immer dieser Kontakt abbricht, kommt es zu einem dramatischen Abfall der Partikeldichte auf Werte auf unter  $20/\mu\text{m}^2$  (Anders und Brightman, 1979; Gotow und Hashimoto, 1988; Rohlmann *et al.*, 1992). Untertützt werden konnte diese Beobachtung durch die komplett unterschiedliche Morphologie von Astrozyten *in vivo* und *in vitro*. Astrozyten in Kultur zeigen eine komplette Aufhebung des polarisierten Auftretens der OPKs an Endfußmembranen mit diffuser Verteilung von Partikeln über die gesamte astrozytäre Zelloberfläche (Landis und Weinstein, 1983). In weiteren Studien an kultivierten Astrozyten konnte gezeigt werden, dass die hierbei fehlende Basallamina eine zentrale Rolle für das polarisierte Auftreten von OPKs darstellt. Die Extrazelluläre Matrix, in die die Basallamina eingebettet ist, besteht aus zahlreichen Komponenten. Die Basallamina im speziellen besteht vor allem aus Kollagen vom Typ IV, Laminin, Fibronectin und verschiedensten Proteoglykanen (Del Zoppo *et al.*, 2006). Eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen durch Ko-Kultivierung mit Bestandteilen der Extrazellulären Matrix wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Wolburg *et al.*, 1986), Laminin (Neuhaus, 1990) oder Agrin (Fallier-Becker *et al.*, 2007; Noell *et al.*, 2007) hatte vor allem einen Einfluss auf die Dichte, nicht jedoch auf die Polarität der OPKs. Gerade dem Heparansulfat-Proteoglykan Agrin kommt jedoch eine besondere Bedeutung in der Ausbildung der OPKs zu. Ursprünglich als wesentlicher Bestandteil für das Clustering von Acetylcholin-Rezeptoren im Bereich der motorischen Endplatte entdeckt (Bezakova und Ruegg, 2003; McMahan, 1990) konnte Agrin im ZNS mit der Aufrechterhaltung der BHS in Verbindung gebracht werden (Barber und Lieth, 1997; Berzin *et al.*, 2000; Smith und Hilgenberg, 2002). Im Vergleich mit dem Wildtyp zeigten Agrin-Knockout-Mäuse einen drastischen Verlust an OPKs, ohne dass sich dieser Verlust jedoch in der Immunoreaktivität für AQP4 bemerkbar machte. Diese zeigte in

beiden Fällen keine Unterschiede (Noell *et al.*, 2009). Agrin kommt somit eine wichtige Rolle für die Ausbildung von OPKs zu, während die bloße Präsenz von AQP4 wohl nicht ausreicht, ein Clustering des Proteins im Gefrierbruch hervorzurufen. Paradoxe Weise brachten aber gerade die Arbeiten von Furman (2003) und Silberstein (2004) OPKs durch Transfektion von AQP4 hervor, ohne Anwesenheit von Agrin. Agrin bindet aber auch an die  $\alpha$ -Dystroglycan-Untereinheit des Dystrophin/Dystroglykan-Komplexes der über Syntrophin somit auch mit AQP4 verbunden ist (Gee *et al.*, 1994; Neely *et al.*, 2001). Ein Verlust der Polarität von OPKs konnte ferner auch unter pathologischen Bedingungen an reaktiven Astrozyten, in glialen Narben (Anders und Brightman, 1979), in Glioblastomen (Hatton und Sang, 1990; Neuhaus *et al.*, 1990) und im Rahmen entzündlicher Prozesse beobachtet werden (Wolburg-Buchholz *et al.*, 2009). Eine Zusammenfassung der Daten über OPKs bzw. AQP4 findet sich bei Wolburg *et al.* (2011).

## 1.5 Fragestellung

Ein zentrales Thema der Arbeitsgruppe von Wolburg und Mitarbeitern stellt die Erforschung der BHS und der sie beeinflussenden Komponenten dar. Vor allem das Wasserkanalprotein AQP4 und seine Erscheinungsform als orthogonale Partikelkomplexe in der Gefrierbruchtechnik prägten die Forschungsarbeiten der Gruppe seit der Entdeckung, dass es sich bei AQP4 um das molekulare Äquivalent der OPK-Struktur handelt. Da in Gefrierbrüchen von Maus-Astrozyten zu perinatalen und postnatalen Zeitpunkten immer wieder eine beeindruckend hohe Dichte an OPKs beobachtet wurde, stellte sich zunehmend die Frage nach dem genauen Zeitpunkt der Expression von AQP4 und eben auch des ersten Auftretens ihrer Erscheinungsform als OPKs. Diese Fragestellung ergab sich vor allem unter dem Aspekt, der Beziehung zwischen der Reifung der Endfußstruktur und der Qualität der BHS. Trotz unzähliger Arbeiten zu AQP4 und den OPKs und ihrer Rolle und ihrem Verhalten unter *in vivo*-, *in vitro*- und unter pathologischen Bedingungen, findet sich in der Literatur bisher keine Arbeit, die sich mit der parallelen Entwicklung von Molekül und Struktur im Rahmen der Gehirnentwicklung der Maus befasst hat. Nachdem anti-AQP4 gefärbte Testschnitte von Hirngewebe aus

unterschiedlichen Cortex-Regionen unterschiedliche Intensitäten der Anfärbbarkeit gezeigt hatten, entschieden wir uns, im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit durch eine coronare Schnitfführung, möglichst das gesamte Gehirn in der Frontalebene abzubilden. Bezüglich des Gefrierbruches stellte sich die Problematik der geringen Wahrscheinlichkeit dar, in den Replikas überhaupt die tiefer gelegenen perivaskuläre Endfüsse antreffen zu können, da diese im Verhältnis zum umgebenden Neuropil in der elektronenmikroskopischen Darstellung einen verschwindend geringen Anteil ausmachen. Ferner hätte die beobachtete Menge angetroffener Membranen und der darauf exprimierten OPKs für eine quantitative Analyse wohl nicht ausgereicht. Um trotzdem eine Beziehung zwischen Endfußstruktur und molekularer Ausstattung mit AQP4-Proteinen definieren zu können, wurde der Unterschied zwischen perivaskulärem und superfiziellmembranem Endfuß hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion vernachlässigt und wurden ausschließlich superfizielle Endfußstrukturen berücksichtigt. Durch die vergleichsweise leichtere Präparation der an der Gehirnoberfläche lokalisierten superfiziellen Endfußmembranen konnte so eine deutlich höhere Zahl an Membranen und OPKs beobachtet und ausgezählt werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material und Puffer für die Gefrierbruchexperimente

Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg v.d.H
1,2-Dichloäthan	Fa. Merck Darmstadt
Glutaraldehyd 2,5%	Fa. Merck Darmstadt
Glycerol 30%	Fa. Merck Darmstadt
HCL 0,1 N	Fa. Merck Darmstadt
Kupfernetzchen	Fa. Stork Veko, Eerbeek, Niederlande
Na-Cacodylat	Fa. Merck Darmstadt

Natriumhypochlorit 12%	Fa. Merck Darmstadt
------------------------	---------------------

### 2.1.2 Material und Puffer für die Immunzytochemie

Ampuwa	Fa.Fresenius, Bad Homburg v.d.H.
CaCl <sub>2</sub>	Fa. Merck Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fa . Fluka Biochemika
D-Glucose Monohydrat	Fa. Fluka Biochemika
HCL 1N	Fa. Merck, Darmstadt
Hepes	Fa. Serva, Heidelberg
KCL	Fa. Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem, Fa. Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
NSG (Normal Serum Goat)	Fa. Dako Hamburg
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck, Darmstadt
PBS <sup>+</sup>	Fa. Lonza, Verviers, Belgien
Phenolrot	Fa. Merck, Darmstadt
Triton-X- 100	Fa. Serva, Heidelberg
Paraformaldehydfixierlsg. 4%, 500ml	440ml Ampuwa 20g Paraformaldehyd 10 Tropfen 1N NaOH erhitzen und über Nacht auf 4°C abkühlen lassen 50ml HMSS Puffer

	<p>5ml 100 mM CaCl<sub>2</sub></p> <p>5ml MgCl<sub>2</sub> Stocklösung</p> <p>10 Tropfen 1N HCL</p> <p>Lagern bei 4°C</p>
MgCl <sub>2</sub> -Stocklösung	<p>2,03g 100mM MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O</p> <p>100ml Ampuwa</p> <p>Lagern bei 4°C</p>
HMSS-Puffer 100ml (Hanks modified salt solution)	<p>8g HCL</p> <p>0,4g KCL</p> <p>1g Glucose</p> <p>0,016g Phenolrot</p> <p>23,83g Hepes-Puffer Pulver</p> <p>Lagern bei 4°C</p>
Präparationspuffer, 500ml	<p>500ml 0,9% sterile NaCl-Lsg.</p> <p>1,19g Hepes-Puffer Pulver</p> <p>1,12g Glucose</p> <p>0,5g BSA</p> <p>Lagern bei 4°C</p>
Stammlösung für Erst-und Zweitantikörper	<p>100µl DMSO</p> <p>25µl Triton-X-100</p> <p>8,75ml PBS<sup>+</sup></p> <p>Lagern bei 4°C</p>

### 2.1.3 Antikörper für die Immunzytochemie

Erstantikörper: Anti-AQP4 (rabbit polyklonal), 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Erstantikörper: Anti-ZO 1 (mouse monoklonal) 1:100	Fa. Zymed, Darmstadt
Erstantikörper: Anti-GFAP (rabbit, polyklonal) 1:500	Fa. Dako, Hamburg
Erstantikörper: Anti-GFAP in Kombination mit Anti-AQP4 (mouse, monoklonal) 1:400	Fa. Millipore, Schwalbach
Erstantikörper: Anti-beta-Dystroglycan (mouse monoklonal) 1:100	Fa. Novocastra, Newcastle, England
Zweitantikörper: Cy3 markierter Antikörper (goat anti rabbit), 1:200	Fa. Dianova, Hamburg
Zweitantikörper: Cy2 markierter Antikörper (goat anti rabbit), 1:200	Fa. Dianova, Hamburg

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Präparation und Gewinnung von Gehirngewebe

Für diese Arbeit wurden Mäuse vom NMRI-Wildtyp (Herkunft: Organismische Biologie, AG Entwicklungsbiologie, Universität Salzburg, Prof. Dr. Hans Christian Bauer) verwendet, da trächtige Weibchen dieses Mausstammes nach erfolgreicher Befruchtung einen sogenannten Vaginal-Plug ausbilden, der Doppelbefruchtungen verhindert und dessen Auftreten als Startpunkt der Tragzeit angesehen wird. Die Tragzeit bei Mäusen vom NMRI-Wildtyp beträgt 18 Tage. Ferner wurden mit diesem Mausstamm bereits mehrere Studien zur Entwicklung der Bluthirnschranke im durchgeführt (Bauer et. al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurden pränatale Stadien (E) der Zeitpunkte E16, E17, E18 und postnatale Stadien (P) der Tage P1, P2 und P3 verwendet. Pro Stadium wurden mindestens sechs Mäuse benötigt. Alle getroffenen



Maßnahmen fanden in Übereinstimmung mit den österreichischen Leitlinien für Tierhaltung statt, die entsprechend der Europäischen Tierschutzverordnung ausgerichtet sind. Zur Präparation pränataler Mäuse wurde die Mutter gezielt per Genickbruch getötet und die abdominale Bauchwand mit einem medianen bis zum Thorax reichenden Längsschnitt eröffnet. Der Uterus wurde aufgesucht, kranial und kaudal abgesetzt, entnommen und in eine Schale mit Präparationspuffer auf Eis gelagert. Die durch Hypothermie anästhesierten Embryonen wurden aus ihrer jeweiligen Fruchtblase präpariert und durch Dekapitation getötet. Postnatale Mäuse wurden ebenfalls durch Hypothermie auf Eis anästhesiert und anschließend dekapitiert. Zur Entnahme des Gehirns wurde allen Mäusen erst die Kopfhaut entfernt und dann die Kalotte in sagittaler Richtung eröffnet. Unter größtmöglicher Wahrung der meningealen Oberfläche wurden die basal liegenden Hirnnerven durchtrennt und das Gehirn Richtung dorsal angehoben. Im Bereich des unteren Hirnstamms wurde das Gehirn vom Rückenmark durchtrennt und entnommen.

### **2.2.2 Gefrierbruchexperimente**

Die präparierten Gehirne (pro Stadium mindestens drei Gehirne) wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur in 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert und anschließend in 0,1M Cacodylatpuffer bei 4°C gelagert. Die morphologische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen des AQP4-Proteins in Form von OPKs, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit an superfiziellen Endfußstrukturen von Astrozyten der Gehirnoberfläche. Um eine Vergleichbarkeit der Morphologie verschiedener Entwicklungsstadien zu gewährleisten, wurde, um den Ort der Gewebeentnahme einheitlich zu gestalten, der Plexus choroideus des dritten Ventrikels als Fixstruktur für alle Gehirne gewählt. Auf Höhe der Commissura anterior wurden mittels in Vibration versetzter Rasierklingen tangentielle Flachschnitte der ventralen, lateralen und dorsalen Gehirnoberfläche entnommen. Zum Gefrierschutz wurde das Gewebe vor dem Brechen für 30 Minuten in 30% Glycerol inkubiert. Zwischen zwei Goldplättchen (Durchmesser 3mm) fixiert wurden die Schnitte im nächsten

Arbeitsschritt in festem Stickstoff (-210°C) schockgefroren, um einen schnellstmöglichen Wärme-Kälte-Austausch zu gewährleisten. Dann erfolgte die Einschleusung in die Balzers Gefrierbruch Apparatur (BAF 400D; Balzers Liechtenstein). Bei -150° und  $5 \times 10^{-6}$  mbar erfolgte der Bruch durch Auseinanderklappen der Goldplättchen. Das so auseinander gebrochene Gewebe wurde aus einem Winkel von 45° zuerst mit Platin (2nm Schichtdicke) und dann aus einem Winkel von 90° mit Kohle (20nm Schichtdicke) bedampft. Die so entstandenen Replikas wurden anschließend mit 12%igem Natriumhypochlorit von organischen Bestandteilen gereinigt und in mehrmaligen Waschschrinen in Aqua dest. gespült. Danach wurden die Replikas auf Pioloform beschichtete Kupfernetzchen aufgezogen. Die Auswertung erfolgte am Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen). Die Auszählung und Bestimmung der Dichte an OPKs pro  $100 \mu\text{m}^2$  erfolgte bei einer Vergrößerung von 40 000:1. Für die grafische Darstellung dieser Ergebnisse mittels eines Streudiagramms wurde als Software *GraphPad Prism*® verwendet. Um einen signifikanten Unterschied in der OPK-Dichte zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten und zwischen den drei untersuchten Hirnarealen statistisch nachzuweisen, erfolgte abschließend ein Mann-Whitney-Test.

### **2.2.3. Immunzytochemie**

Die präparierten Gehirne (pro Stadium mindestens drei Gehirne) wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert. Nach Paraffineinbettung der Gehirne wurden in coronarer Schnitfführung auf Höhe des Plexus choroideus des dritten Ventrikels Leerschnitte auf angefertigt. Zum Nachweis von AQP4 wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet (rabbit, polyclonal 1:100). Für den alleinigen Nachweis von GFAP wurde ein polyklonaler Antikörper benutzt (rabbit, polyclonal 1:500). Für GFAP in Kombination mit AQP4 kam ein monoklonaler Antikörper zur Anwendung (mouse monoclonal 1:400). ZO-1 (mouse monoclonal 1:100) und beta-Dystroglycan (rabbit monoclonal 1:100) wurden jeweils mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Als

Zweitantikörper zur Darstellung mittels Immunfluoreszenz dienten ein Cy 2 und Cy3 markierter Antikörper (goat anti rabbit 1:200). Quellennachweis siehe Tabelle 2.1.2. Zur Kontrolle zwecks unspezifischer Anfärbbarkeit wurde pro Stadium ein Präparat nur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 4%igem NSG und 1% BSA in PBS<sup>+</sup> (Stammlösung) verdünnt. Nach Entparaffinieren der Leerschnitte wurden die Objektträger für mindestens 24 Stunden mit der Erstantikörperlösung bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate dreimal für je 10 Min. mit PBS<sup>+</sup> gespült. Danach erfolgte bei RT und unter Lichtabschluß für 60 Min. die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:200 verdünnt in Stammlösung). Nach drei weiteren Waschschritten für je 10 Min. mit PBS wurden die Objektträger anschließend mit Mowiol eingedeckt. Mit dem HeNE-Laser (Excitation bei 488, 543 und 633nm) wurde mit dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss LSM 510 META, Oberkochen, Deutschland) die Fluoreszenz dargestellt.

### **3. Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im August 2014 im International Journal of Developing Neuroscience in Form eines Artikels unter folgendem Titel veröffentlicht :

#### **Onset of aquaporin-4 expression in the developing mouse brain.**

Fallier-Becker P, Vollmer JP, Bauer HC, Noell S, Wolburg H, Mack AF

Int J Dev Neurosci. 36:81-89, 2014

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an prä- und postnatalen Stadien der NMRI-Wildtypmaus die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke untersucht. Schwerpunkt der Untersuchung war das Wasserkanalprotein AQP4 und sein zeitliches und quantitatives Auftreten in Form orthogonaler Partikelkomplexe im Gefrierbruchexperiment und in Form einer Fluoreszenz in der Immunzytochemie. Caudal der Commissura anterior auf Höhe des dritten Ventrikels wurden ventrale, laterale und dorsale Vorderhirnareale der Stadien E16, E17, E18, P1, P2 und P3 mit beiden Methoden direkt miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.1)

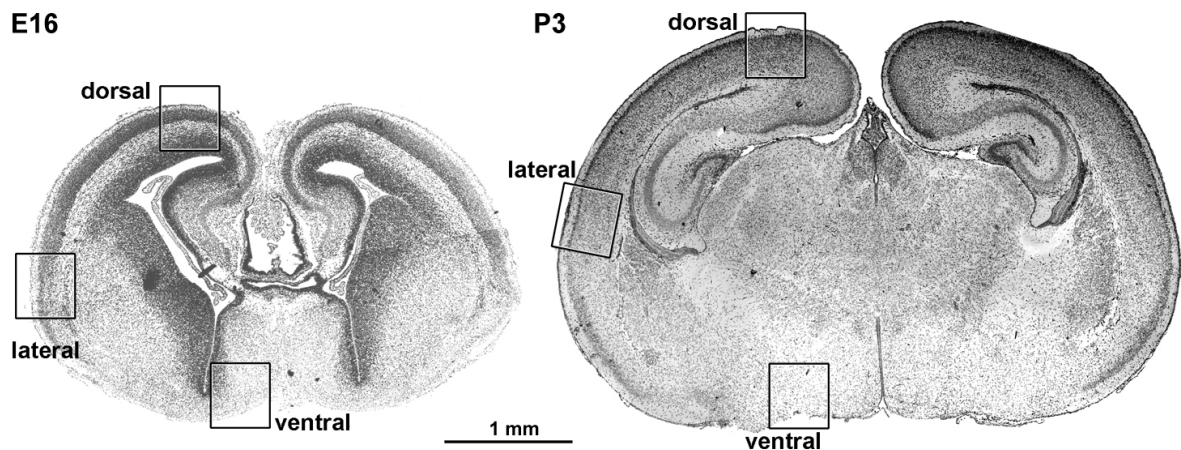


Abb. 3.1: Methylenblau gefärbte Übersichts-Schnitte der Gehirne der NMRI-Maus am Tag E16 (links) und P3 (rechts). Die Kästchen markieren angenähert die in dieser Arbeit untersuchten Cortexregionen.

### 3.1. Gefrierbruchexperimente

#### 3.1.1 E16

Die für dieses Stadium untersuchten Gehirnregionen weisen nur im Bereich ventral gelegener Astrozytenendfüße sehr wenige einzeln stehende OPKs auf. Auf  $1 \mu\text{m}^2$  finden sich durchschnittlich 2 P-Face-assoziierte Cluster. Laterale und dorsale Astrozytenendfüße zeigen in diesem Stadium keine OPKs. (siehe Abb. 3.2-3.4)

#### 3.1.2 E17

Auch in diesem Stadium finden sich lediglich in der ventralen Region wenige einzelne, noch unförmige Cluster an Partikeln mit einer dem Stadium E16 vergleichbaren durchschnittlichen Dichte von  $2/\mu\text{m}^2$ . Dorsale und ventrale Membranen zeigten weiterhin keine OPKs.

(siehe Abb. 3.2-3.4)

#### 3.1.3 E18

Im Vergleich zu E16 und E17 weisen ventrale Astrozytenendfüße im Stadium E18 eine deutliche Zunahme der Dichte an OPKs mit durchschnittlich 8 E-Face-assoziierten OPKs pro  $1 \mu\text{m}^2$  auf. Die Partikel liegen teilweise dicht beieinander,

konfluieren jedoch nicht. In diesem Stadium treten auch zum ersten Mal im Bereich lateraler Membranen einzeln stehende OPKs mit einer Dichte von 4 OPKs für E-Face- und 3 OPKs für P-Face-assoziierte Membranen pro  $1\mu\text{m}^2$  auf. Im Bereich dorsaler Membranen konnten weiterhin keine OPKs detektiert werden (siehe Abb. 3.2-3.4).

### **3.1.4 P1**

Ventral kommt es hier zur ersten Ausbildung von Verbänden an OPKs sogenannten Lattices. Die ausgezählten Partikel pro  $1\mu\text{m}^2$  zeigen jedoch gleichzeitig eine ausgeprägte Streuung zwischen 1 - 66 OPKs pro  $1\mu\text{m}^2$  (Durchschnittswert: 20 P-Face -assoziierte OPKs/ $\mu\text{m}^2$ ). Die OPK-Dichte im Bereich lateraler Membranen ist höher als im Bereich ventraler Membranen mit einer durchschnittlichen Dichte von 46 OPKs pro  $1\mu\text{m}^2$ . Hierbei ist zu beachten, dass bei allen hergestellten Gefrierbrüchen lateral insgesamt nur im Bereich dreier Membranen OPKs detektiert werden konnten, während im Bereich ventraler Gefrierbrüche 25 Membranen gefunden und weit mehr OPKs ausgezählt wurden. Da die lateral gefundenen OPKs ebenfalls eine Tendenz zur Ausbildung von Lattices zeigen, muss die Auszählung in diesem Bereich und zu diesem Zeitpunkt in Zweifel gezogen werden. Am ehesten könnte es sich hierbei um einen Fehler in der Präparation gehandelt haben, bei dem die tangentielle Schnittführung zu weit ventral angesetzt wurde. Dorsale Astrozytenendfüße zeigen zum ersten Mal E-Face assoziierte OPK-pits mit einer Dichte von  $6/\mu\text{m}^2$  (siehe Abb. 3.2-3.4).

### **3.1.5 P2**

Auch zu diesem Zeitpunkt ließen sich ventral insgesamt nur drei Membranen mit OPKs auszählen. Diese weisen mit 28 P- und E-Face-assoziierten OPKs/ $\mu\text{m}^2$  im Vergleich zum Stadium P1 jedoch weiterhin eine Zunahme der Partikeldichte der astrozytären Oberflächen auf. Zu diesem Zeitpunkt weist die ausgezählte Verteilung, sowie die Morphologie der ventralen und lateralen Membranen kaum Unterschiede auf. Neben einer geringfügigen Zunahme der Dichte erscheinen die dorsalen OPKs insgesamt etwas großflächiger als in P1 (siehe Abb. 3.2-3.4).

### **3.1.6. P3**

Gegenüber P1 hat sich die Dichte an ventralen OPKs verdoppelt mit bis zu 42 OPKs/100  $\mu\text{m}^2$ . Laterale und dorsale Membranen zeigen in der Streubreite eine Annäherung der Dichte an Partikeln vor allem im Bereich P-Face-assoziierter Astrozytenendfüße. Auch im Bereich dorsaler Membranen kommt es inzwischen zur Ausbildung kleinerer Lattices. Insgesamt muss festgehalten werden dass sich die Morphologie der OPKs zwischen den Zeitpunkten P2 und P3, vor allem an ventralen Membranen kaum noch unterscheidet. Einen Unterschied zeigt sich lediglich in der Dichte an OPKs (siehe Abb. 3.2-3.4).

### **3.1.7. Statistische Auswertung der Gefrierbruchexperimente**

Die Ergebnisse der im Gefrierbruch ausgezählten OPKs und ihrer Dichte auf  $1\mu\text{m}^2$  wurden zusätzlich in einem Streudiagramm dargestellt. Unter Zuhilfenahme eines Mann-Whitney-Tests wurden die Unterschiede in der OPK-Dichte zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten auf Signifikanz hin untersucht. Für die ventralen und dorsalen Hirnregionen konnte ein signifikanter Unterschied in der OPK-Dichte gemessen werden ( $p = 0,0011$ ) (siehe Abb. 3.5). Tabelle 1.2. zeigt neben den Durchschnittswerten der OPK-Dichte in Zahlenform weiterhin das Verhältnis des Auftretens der Partikelkomplexe im Bereich der E-Face und der P-Face (siehe Tabelle 3.1).

	<b>Ventral</b>	<b>Lateral</b>	<b>Dorsal</b>
<b>E16</b>	2 / P	<b>x</b>	<b>x</b>
<b>E17</b>	2 / P	<b>x</b>	<b>x</b>
<b>E18</b>	8 / E	3 / P > E	<b>x</b>
<b>P1</b>	20 / P	46* / P	6 / E
<b>P2</b>	28 / P > E	29 / E	8 / E
<b>P3</b>	42 / E	21 / P	12 / P > E

Tabelle 3.1.: Durchschnittlich ausgezählte OPKs pro  $1\mu\text{m}^2$ . Die mit \* markierte Auszählung P1 / Lateral weist eventuell einen Präparationsfehler auf. Weiterhin zeigt die Übersicht die ersten Zeitpunkte zu denen OPKs im Gefrierbruch detektiert werden konnten (**x** = zu diesem Zeitpunkt konnten keine OPKs gefunden) und deren jeweiliges Auftreten im Bereich E-Face- oder P-Face-assoziierter Membranen (P = P-Face, E= E-Face). Im Verhältnis wurden häufiger P-Face-gebundene OPKs gefunden.

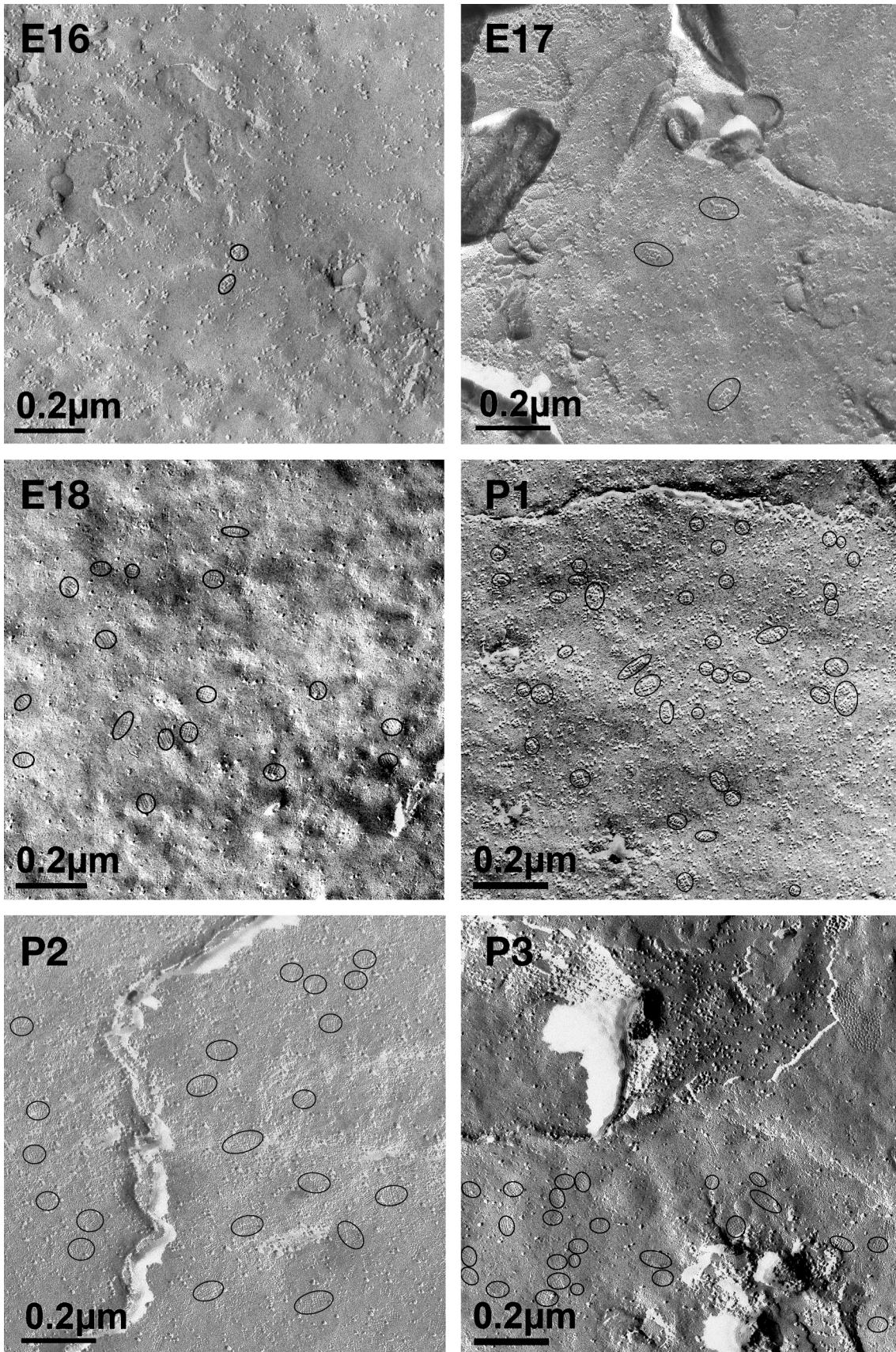


Abb. 3.2: Gefrierbruch-Replika der ventralen subpialen Region der NMRI-Maus. Alle Entwicklungszeitpunkte zeigen teils E-Face-, teils P-Face assoziierte OPKs (Kreise).



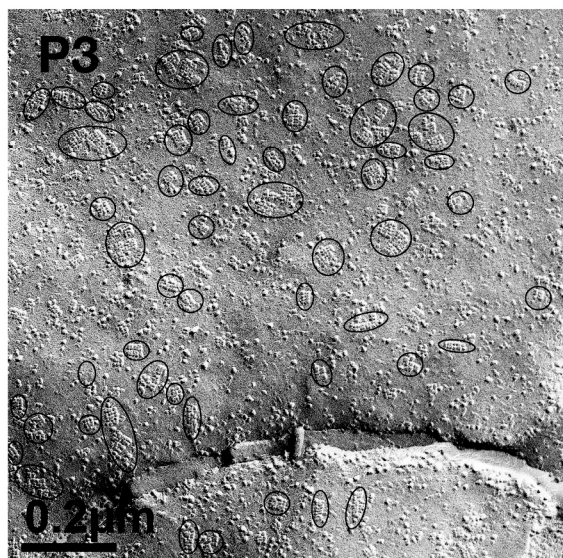
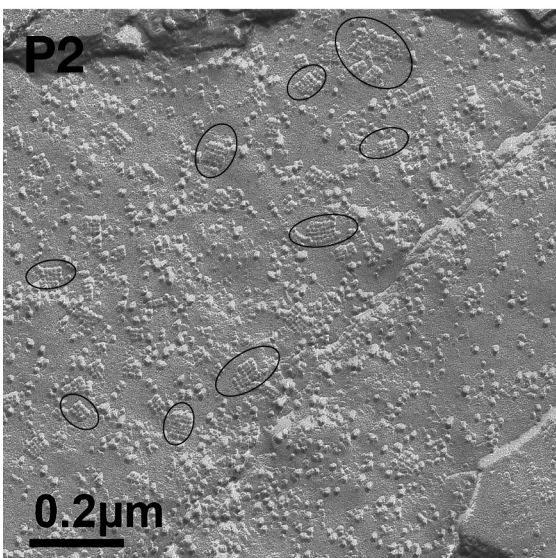
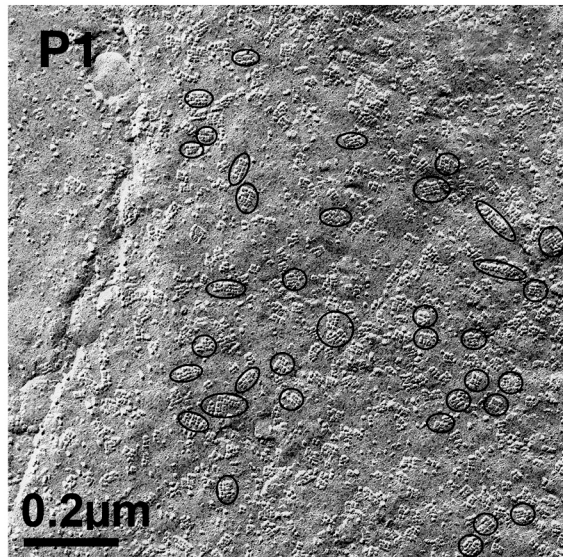
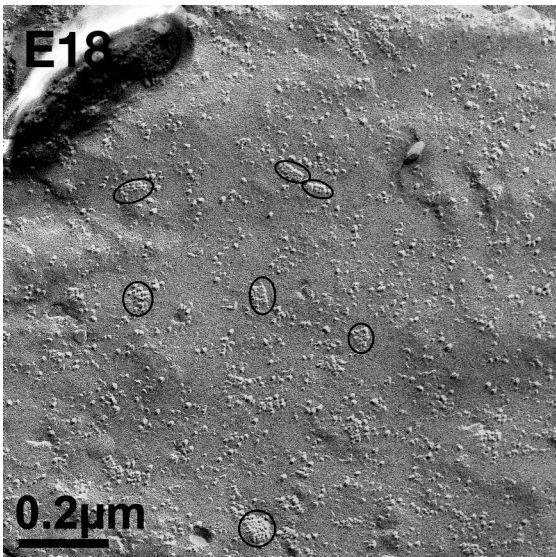
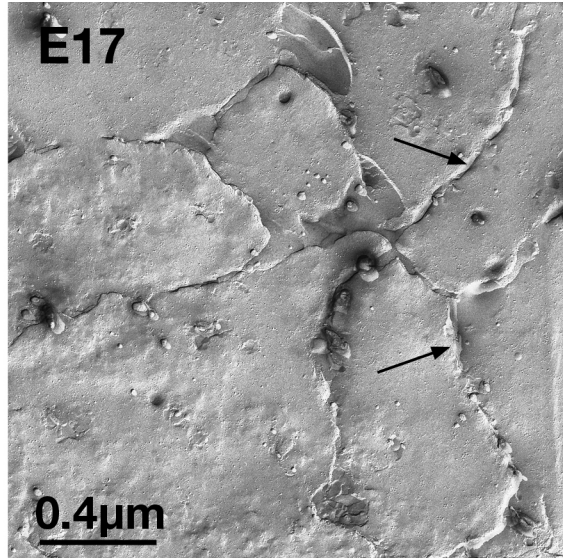
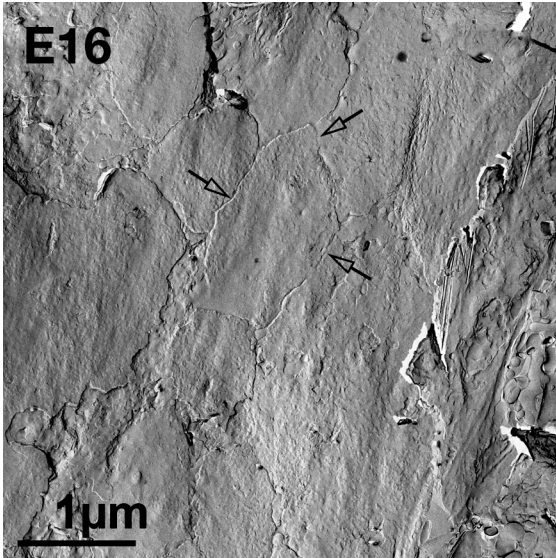


Abb. 3.3: Gefrierbruch-Replika der lateralen subpialen Region der NMRI-Maus. Die Membranen der Stadien E16 und E17 weisen keine OPKs auf. (Kreise = OPKs; Pfeile = Endfeßmembran)

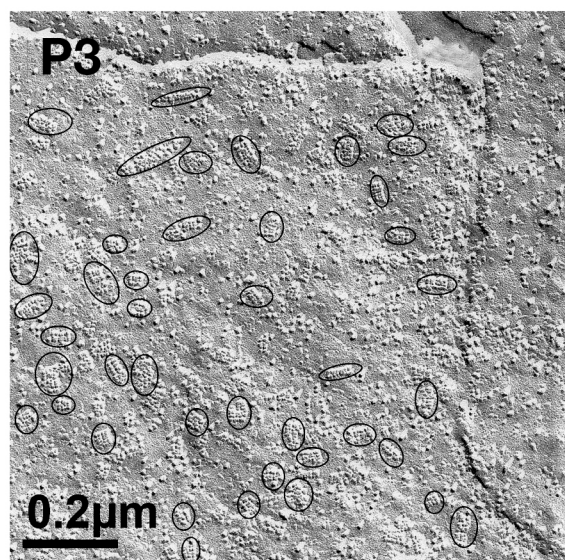
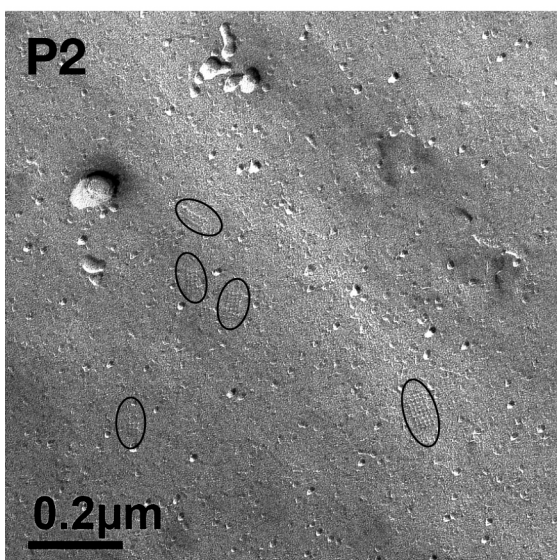
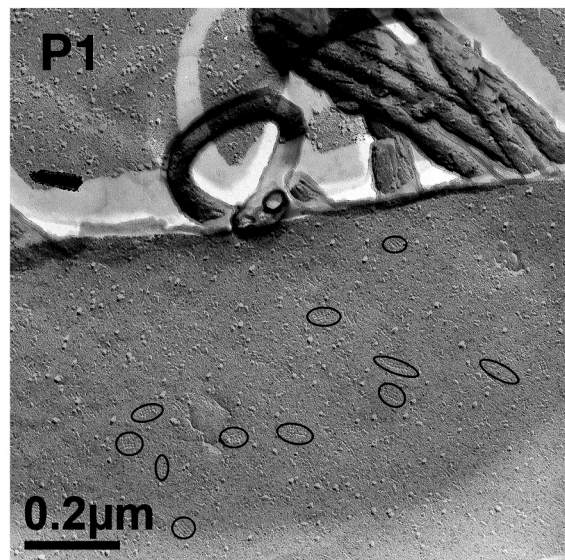
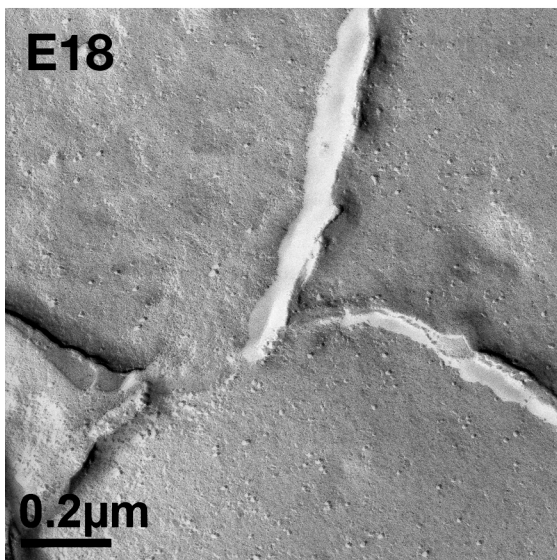
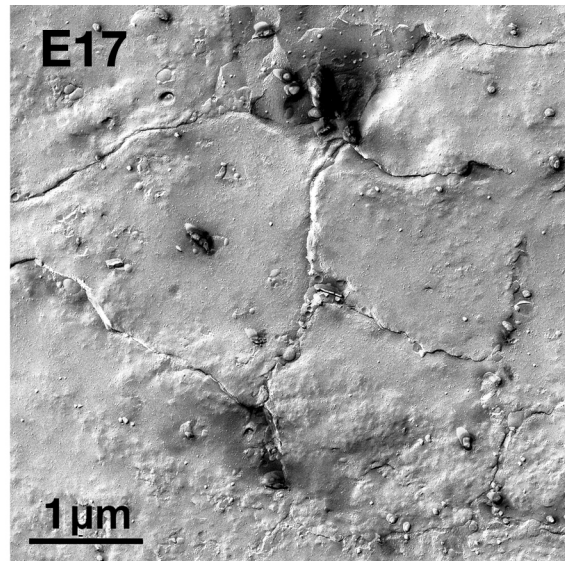
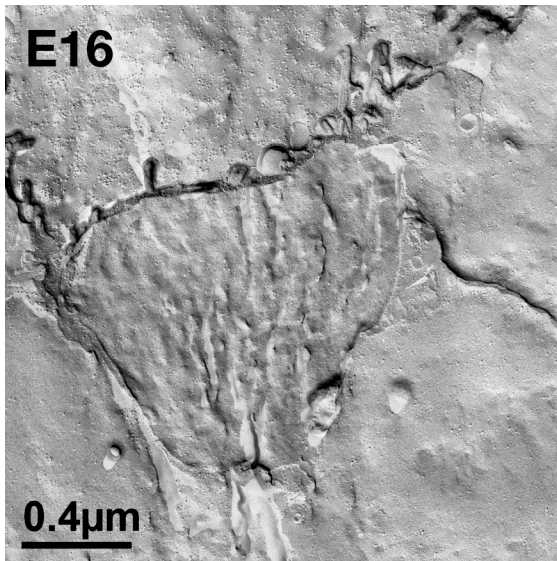


Abb. 3.3: Gefrierbruch-Replika der dorsalen, subpialen Region der NMRI-Maus. Die Membranen der Stadien E16 - E18 weisen in dieser Region keine OPKs auf. (Kreise = OPKs).

# OPK Dichte

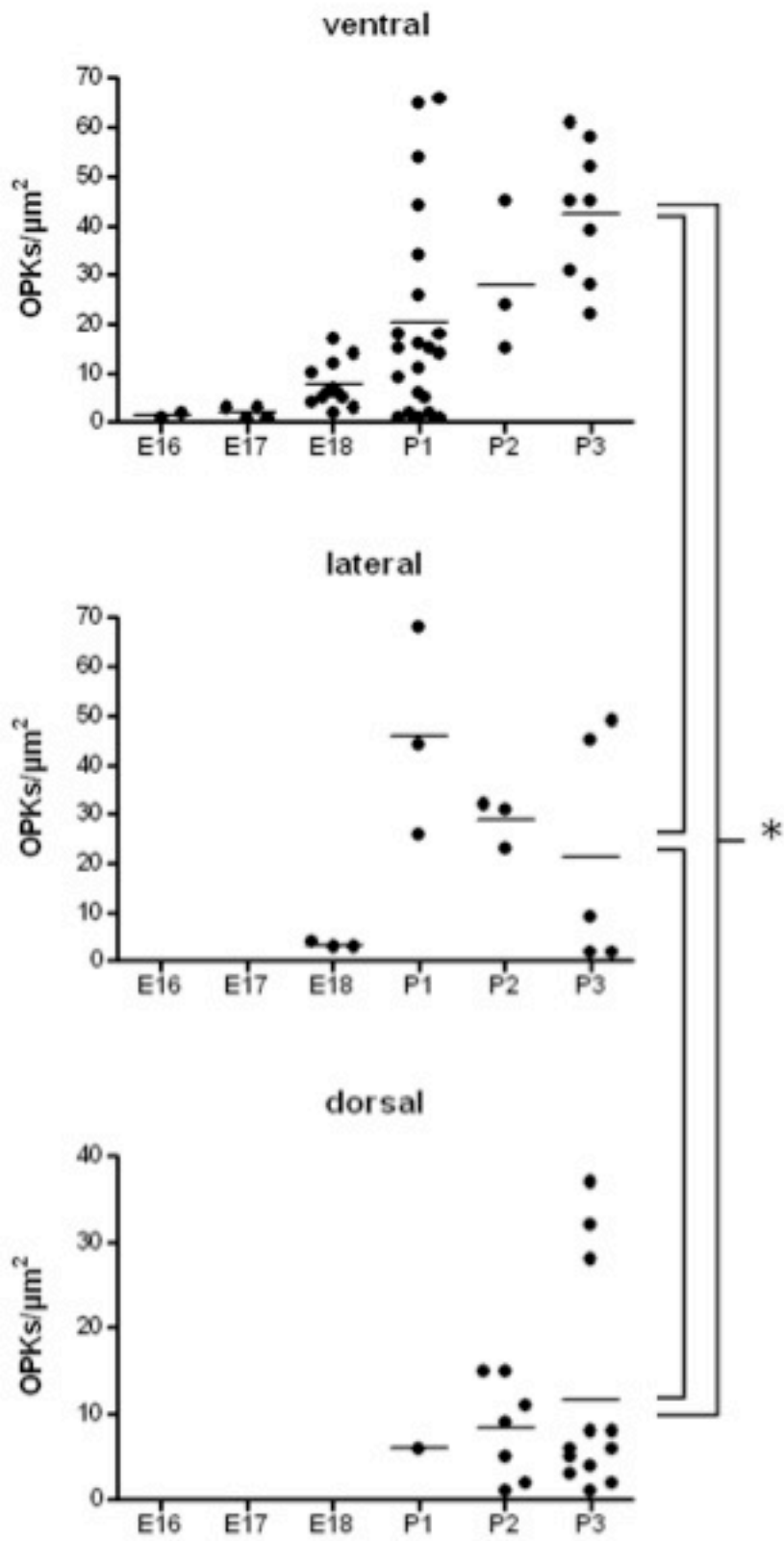


Abb. 3.5: Streudiagramm (Software: *GraphPad Prism*<sup>®</sup>) zur Bestimmung der OPK-Dichte zu den sechs untersuchten Entwicklungszeitpunkten und in Bezug auf die jeweilige Hirnregion. Der Medianwert ist als Balken aufgetragen. Mithilfe des Mann-Whitney U-Test konnte eine signifikante Differenz (\*) zwischen ventraler und dorsaler OPK-Dichte zum Zeitpunkt P3 gemessen werden ( $p=0.0011$ ). Zwischen dorsal und lateral sowie lateral und ventral zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

## **3.2. Immunzytochemie**

### **3.2.1. E16**

Nur im Bereich ventraler Areale zeigt sich subpial an wenigen Zellfortsätzen lokalisiert eine dünne bandförmige und diskontinuierliche Anfärbarkeit für den AQP4-Antikörper. Tiefergelegene kortikale Areale bleiben negativ. (siehe Abb. 3.8-3.10). Im Rahmen der Vorbereitung auf diese Arbeit wurden bereits an je einem Tier der Stadien E14 und E15 versucht Nachweise einer Immunfluoreszenz für AQP4 zu erbringen, welche jedoch negativ ausfielen. Interessanterweise färbten sich Teile der mit angeschnittenen Nasenschleimhaut deutlich AQP4-positiv (siehe Abb.3.6).

### **3.2.2 E17**

Die Fluoreszenz der subpialen, ventralen Region zeigt sich im Vergleich zu E16 deutlich kontinuierlicher angefärbt. In der Tiefe des Telencephalons kommen erste, spärlich AQP4-positive Zellfortsätze und Zellkörper vor. Lateral zeigt sich punktuell im Bereich subpialer Membranen ein erstes Auftreten von Fluoreszenz. Dorsal zeigt sich keine Anfärbarkeit. Auch hier konnte jedoch in einem cortexfernen, zentral gelegenen Anteil des Hippocampus eine deutlich ausgeprägtere Positivität für AQP4 detektiert werden (siehe Abb. 3.7 und siehe Abb. 3.8-3.10)

### **3.2.3. E18**

Im Vergleich zu E16 und E17 zeigen die ventralen telencephalen Areale in diesem Stadium eine ausgeprägte diffuse und netzartige Verdichtung der AQP4-positiven Areale von bis zu 100µm Dicke. Diese Dichte nimmt von der Oberfläche zur Tiefe hin ab. Im Bereich des lateralen Cortex ist die

Anfärbarkeit nun eher bandförmig und diskontinuierlich nur auf einzelne Zellfortsätze beschränkt während dorsal eine Fluoreszenz weiterhin nicht eindeutig detektiert werden kann (siehe Abb. 3.8-3.10).

### **3.2.4 P1**

In tiefergelegenen Cortexarealen zeigt sich in diesem Stadium zum ersten Mal eine deutliche Anfärbung um Gefäßstrukturen. Weiterhin verdichten sich die subpialen Areale in Bezug auf ihre Fluoreszenz. Für laterale und dorsale tiefe Anteile zeigt sich weiterhin ein ausgeprägtes radiäres Muster der angefärbten Zellfortsätze. Dorsal zeigt die Oberfläche auch zum ersten Mal eine kontinuierliche bandförmige Anfärbarkeit (siehe Abb. 3.8-3.10).

### **3.2.5 P2**

Zunehmend kommt es zu einer Beschränkung der Fluoreszenz auf perivaskuläre und subpiale Areale in der ventralen und lateralen Region. Die dorsale Region zeigt sich weiterhin diskontinuierlich bezüglich ihrer Anfärbarkeit (siehe Abb. 3.6-3.8).

### **3.2.6 P3**

Das Muster der Anfärbarkeit ähnelt stark dem von P1 mit prominenter bandförmiger und kontinuierlicher Anfärbarkeit der Oberfläche und weiter radiär imponierenden angefärbten Strukturen in der Tiefe des Gewebes mit morphologisch eindeutig als Astrozyten zu vermutenden Zellkörpern und ihren sternförmig auslaufenden Fortsätzen. Weiterhin zugenommen und verdichtet zeigt sich die Fluoreszenz deutlich im Bereich von Gefäßen (siehe Abb. 3.8-3.10). Der Verlauf der AQP4-Expression im Zeitraum der untersuchten Entwicklungszeitpunkte wurde abschließend zur übersichtlicheren Darstellung in einer Tabelle zusammen gefasst (siehe Tabelle 3.2)

	<b>Ventral</b>	<b>Lateral</b>	<b>Dorsal</b>
<b>E16</b>	+	-	-
<b>E17</b>	+	+	-
<b>E18</b>	+	+	+
<b>P1</b>	+	+	+
<b>P2</b>	+	+	+
<b>P3</b>	+	+	+

Tabelle 3.2: Zeitpunkte der ersten darstellbaren AQP4-Expression in der Immunfluoreszenz (+ = positive Fluoreszenz, - = negative Fluoreszenz)

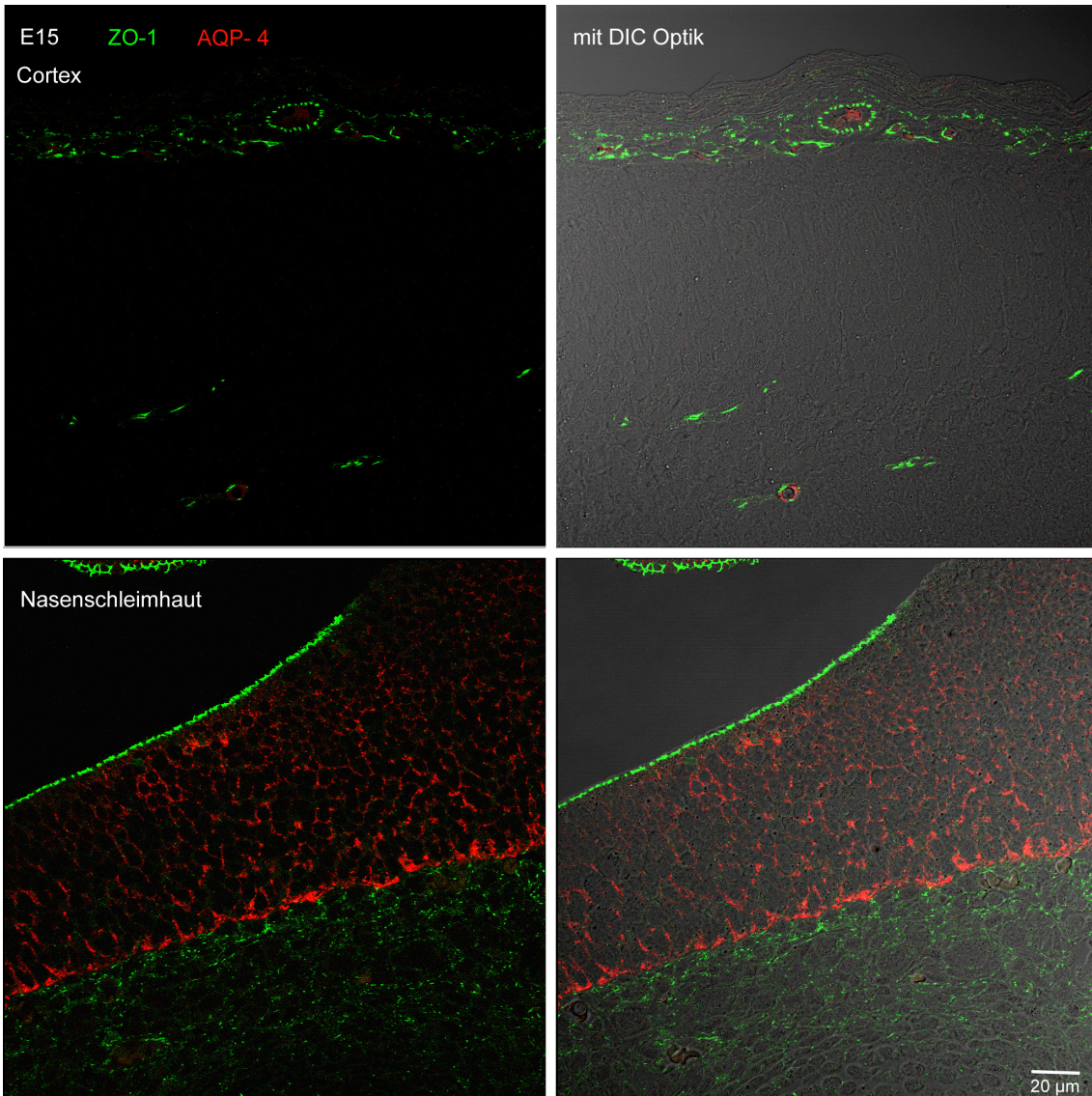


Abb.3.6: Doppelfärbung für AQP4 (rot) und ZO1 (grün) im Bereich des Cortex und der Nasenschleimhaut zum Zeitpunkt E15. Die im Schnitt in der Frontalebene ebenfalls angefärbte Schleimhaut weist eine dem AQP4-negativen Cortex gegenüber starke Expression des Wasserkanals auf.

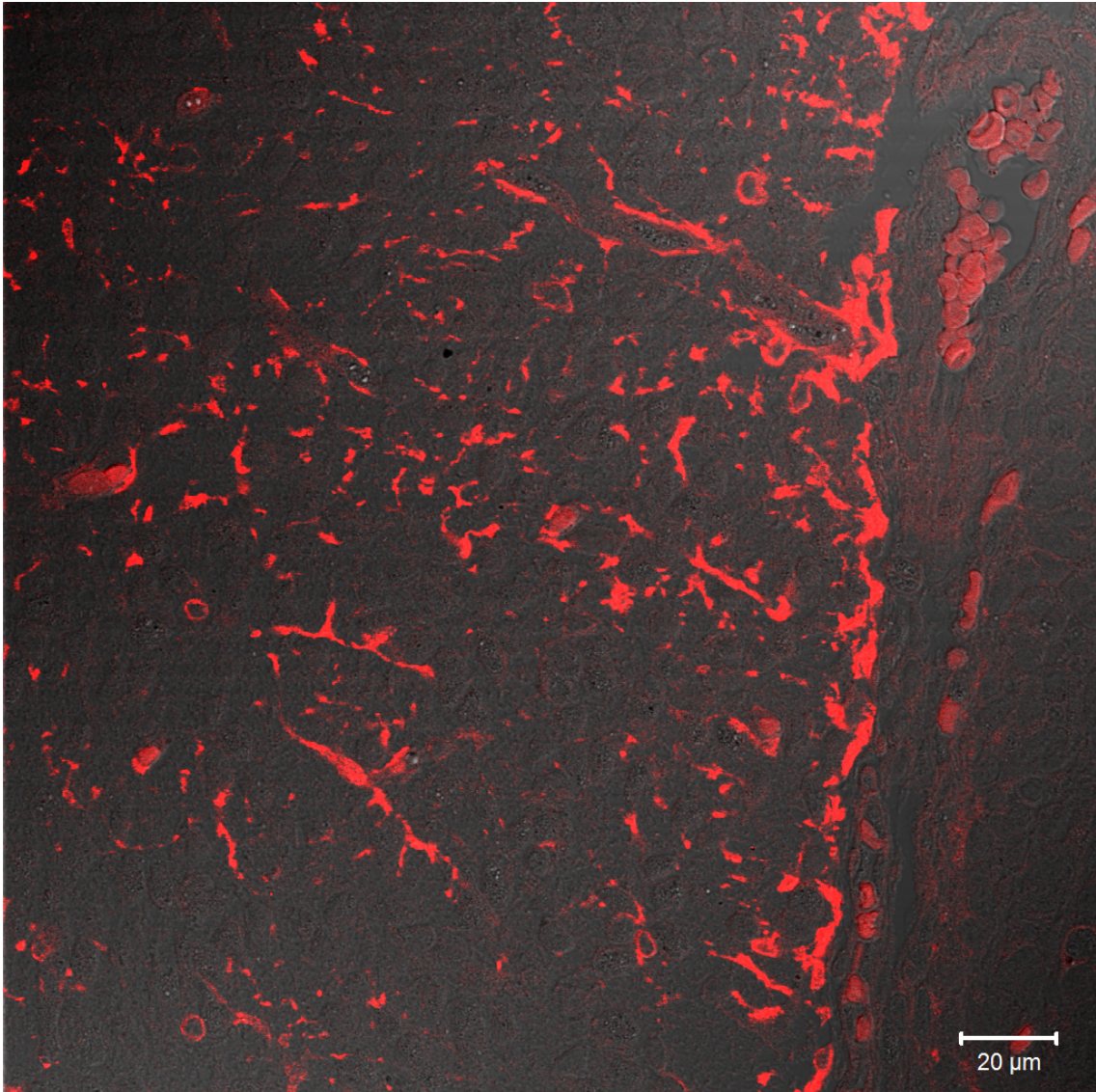


Abb. 3.7: Färbung für AQP4 zum Zeitpunkt E17 im Bereich des Hippocampus. Bei nur schwacher Anfärbbarkeit des ventralen und des lateralen Cortex zeigt sich die Hippocampusregion mit einer kräftigen Expression von AQP4.

zu Abb. 3.8: Zum Zeitpunkt E16 (a) sind nur wenige Fortsätze in subpialer Lokalisation AQP4-positiv. Ab E17 (b) zeigt sich eine deutliche Zunahme der Expression. Ab P1(c) und P3(e) konzentriert sich die Anfärbbarkeit zunehmend subpial, sowie im Bereich perivaskulärer Endfüsse (Pfeile). Anmerkung: Erythrozyten erscheinen durch eine unspezifische Autofluoreszenz gelblich.

zu Abb.3.9: Die Anfärbbarkeit für AQP4 beginnt hier erst zwischen E17(b) und E18(c). Bei noch schwacher perivaskulärer Positivität (Pfeile, lang) des Antikörpers zeigt sich in P1(d) und P2(e) vor allem eine für Radialglia typische Morphologie (Dreiecke). Ferner zeigt sich in P3(f) erstmals in dieser Region die typische astrozytäre Morphologie von Sternzellen (Pfeile, kurz).

zu Abb. 3.10: Eine Fluoreszenz für AQP4 tritt hier erstmals am Tag E18(c) und konzentriert sich ab P1(d) an radiären Fortsätzen (Dreiecke) mit Zunahme in P2(e) und P3(f). In P3(f) zeigen sich wie in der lateralen Region (Abb.3.9) wieder sternartig verzweigte Zellen (Pfeile, kurz).



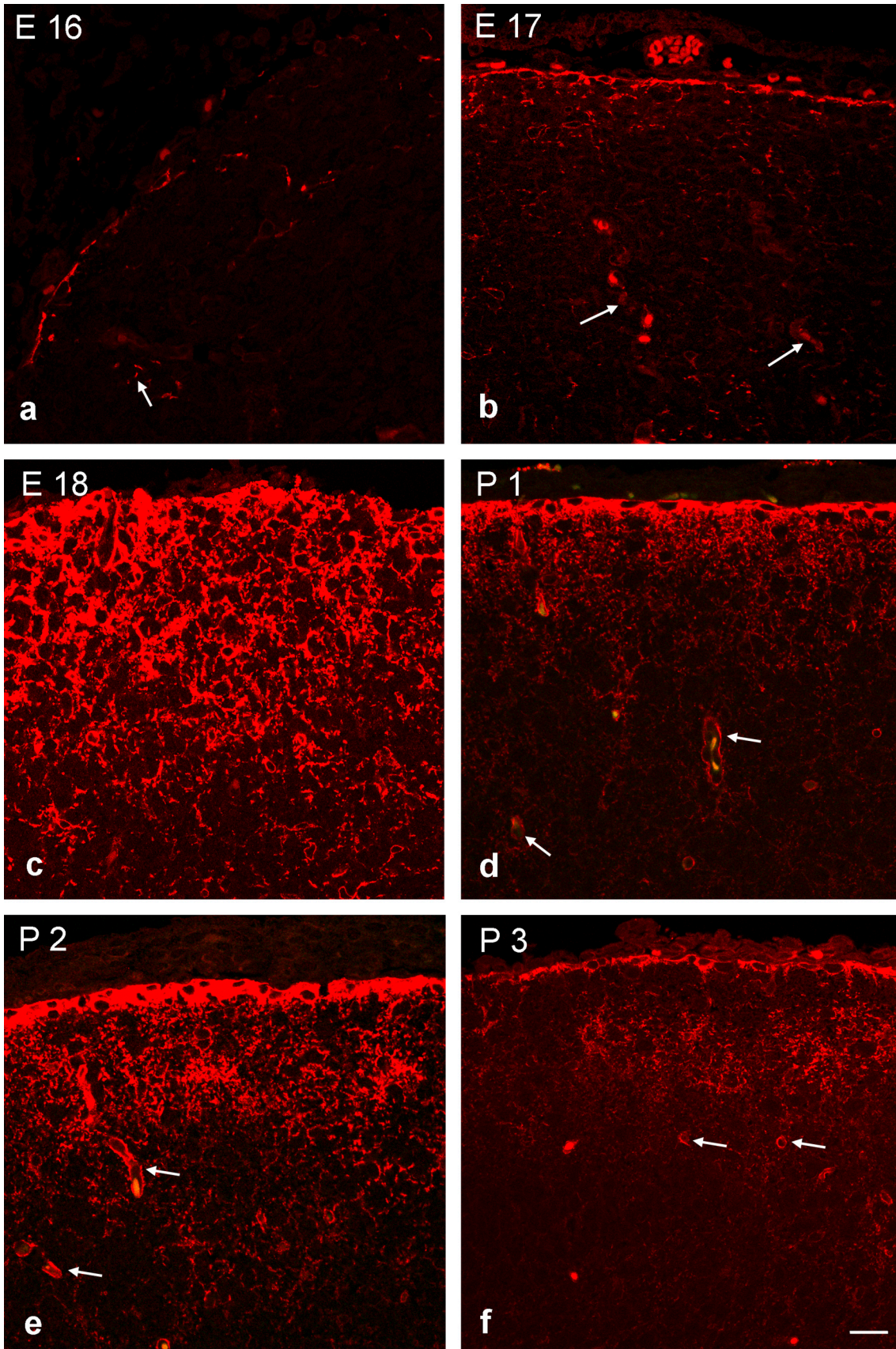


Abb. 3.8: Immunfluoreszenz für den AQP4-Antikörper in der ventralen subpialen Region der NMRI-Maus in coronarer Schnitfführung. Erklärungen siehe S.41; Maßstab: 20µm

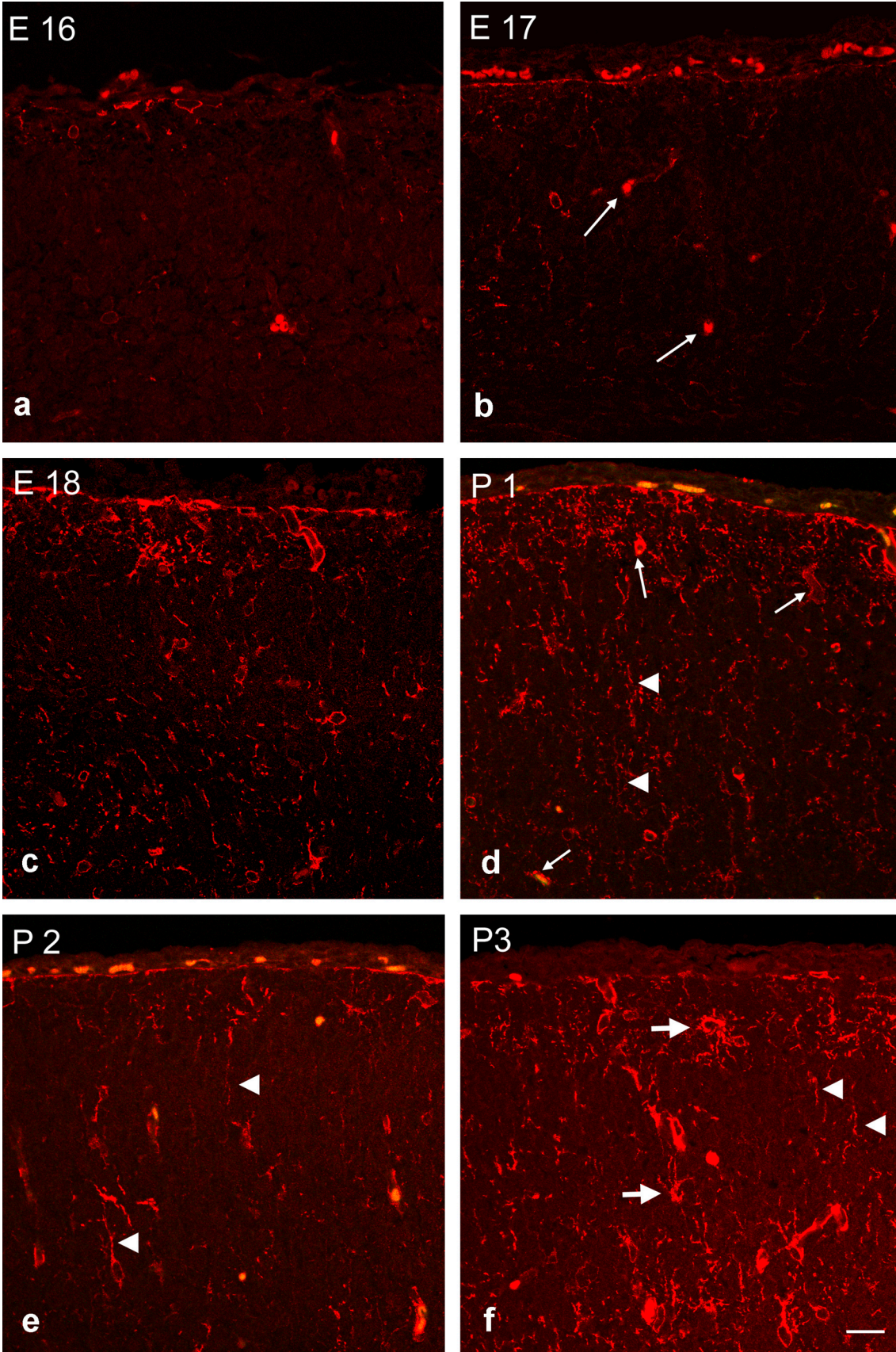


Abb. 3.9: Immunfluoreszenz für den AQP4-Antikörper in der lateralen subpialen Region der NMRI-Maus in coronarer Schnitfführung, Erklärungen siehe S.41; Maßstab: 20µm

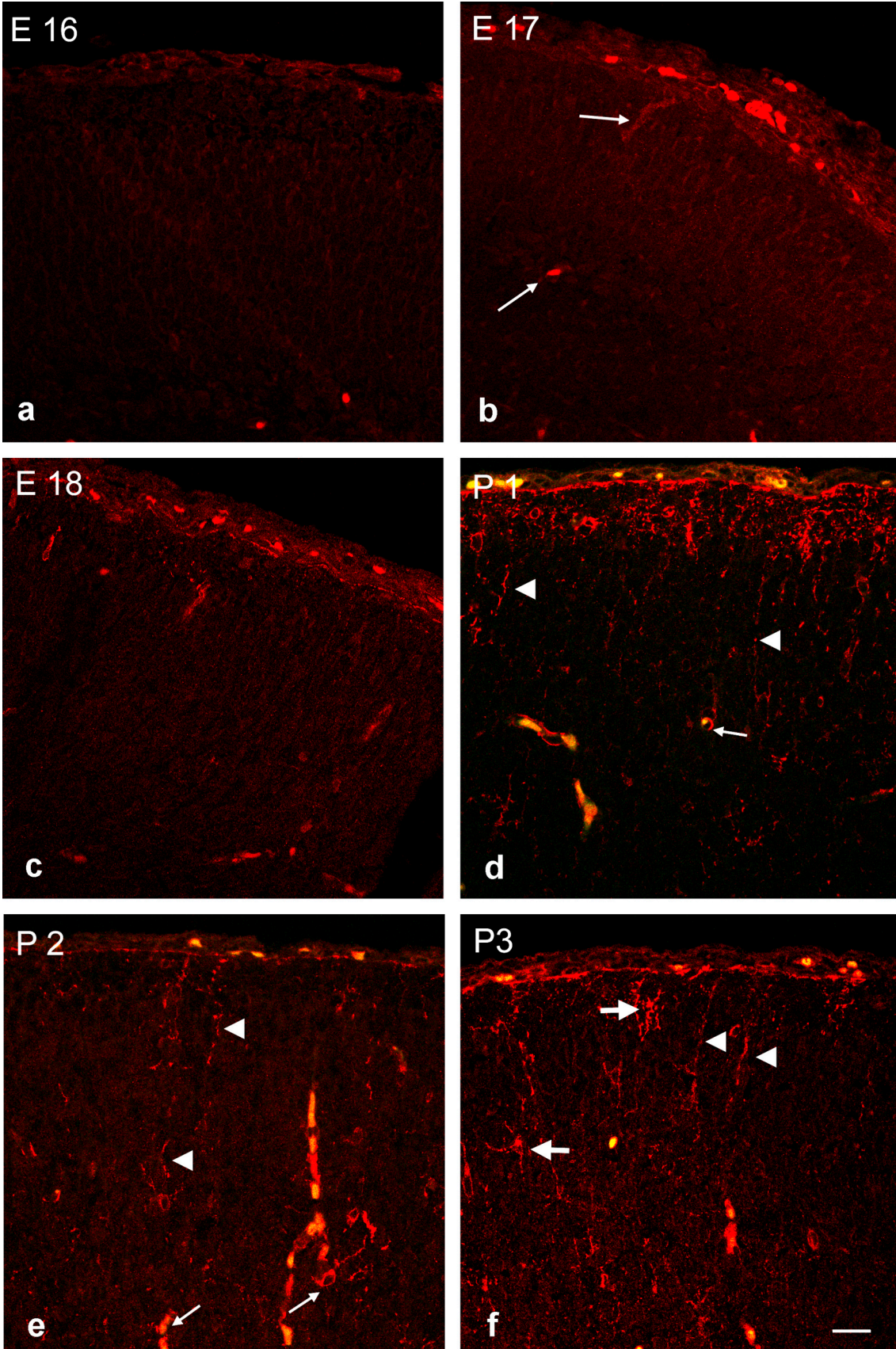


Abb. 3.10: Immunfluoreszenz für den AQP4-Antikörper in der dorsalen subpialen Region der NMRI-Maus in coronarer Schnitfführung. Erklärungen siehe S.41; Maßstab: 20µm

### 3.2.7 GFAP/AQP4-Doppelfärbung

Um sicher zu stellen, dass die AQP4-positiven Zellkörper und Zellfortsätze auch wirklich astrozytären Ursprungs sind, wurden zusätzlich Doppelfärbungen mit dem Astrozyten-Marker GFAP zur Kontrolle angefertigt. Interessanterweise zeigte sich die Fluoreszenz für GFAP erst postnatal zum Tag P1 positiv. Hier und deutlicher in P3 korrelierten die angefärbten radiären Fasern und die dazugehörigen Zellkörper deutlich mit der AQP4-Färbung, was diese Zellen somit als Astrozyten charakterisiert (siehe Abb. 3.9).

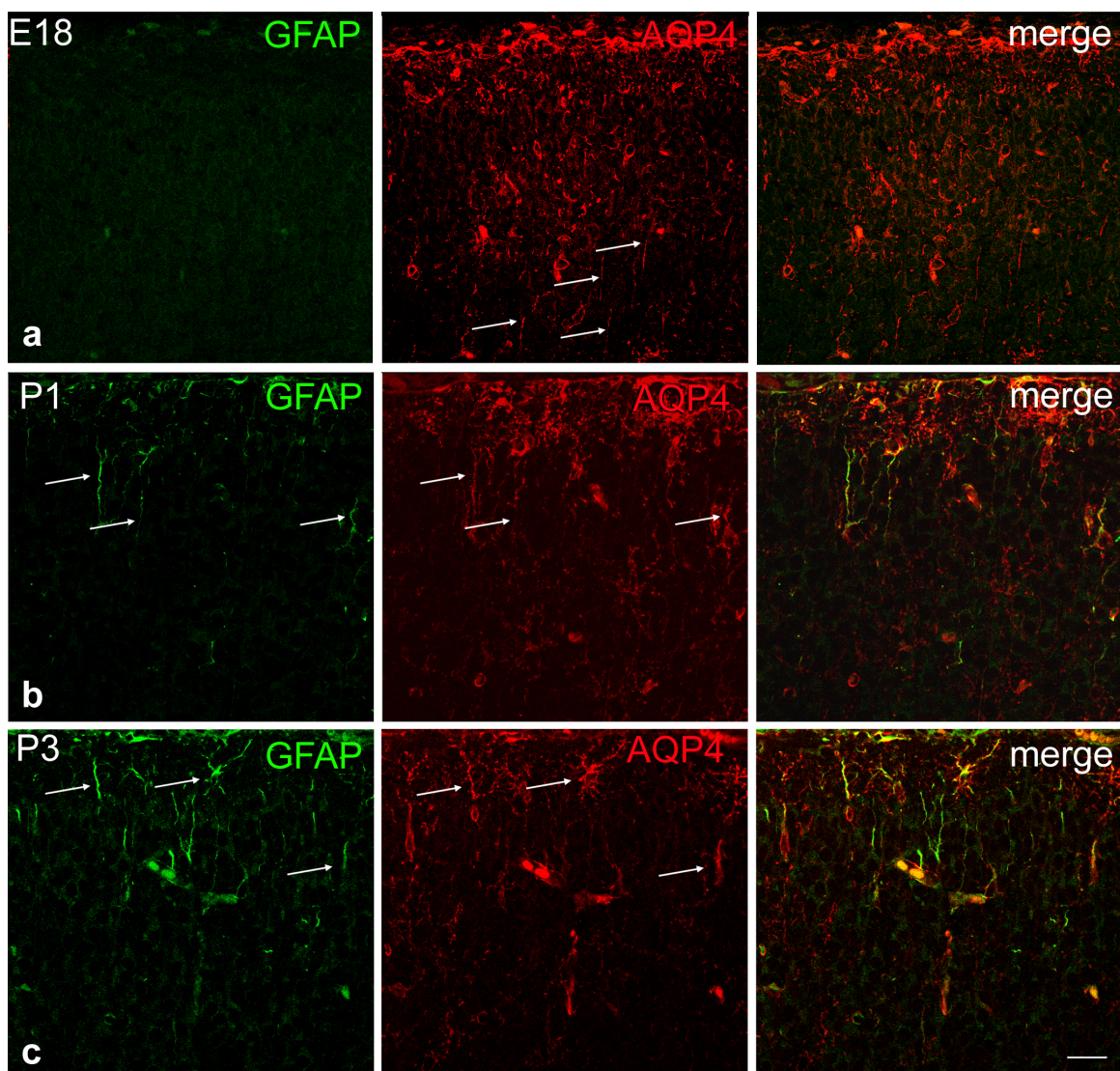


Abb. 3.10: Doppelfärbung für GFAP (grün) und APQ4 (rot) des lateralen Cortex zu den Entwicklungszeitpunkten E18 (a), P1 (b) und P3 (c). Die Doppelfärbung bestätigt dass AQP4 exprimierende radiäre Zellfortsätze und Zellkörper (Pfeile) auch positiv für den astrozytären Marker GFAP sind, es sich bei den angefärbten Zellen somit eindeutig um Astrozyten handelt. Bei Positivität für AQP4 zeigt sich eine gemeinsame Anfärbbarkeit mit GFAP erst ab P1. Maßstab: 20µm

### 3.2.8 ZO1/beta-Dystroglycan-Doppelfärbung

Als ECM-Protein übernimmt beta-Dystroglycan eine zentrale Rolle in der Verankerung von AQP4 und der Ausbildung von OPKs über der astrozytären Endfußmembran. Somit beeinflusst es maßgeblich die Polarisierung von Molekül und Struktur in diesem Bereich. Daher wurden ergänzend zu den AQP4-Färbungen Doppelfärbungen von beta-Dystroglycan und dem Tight Junction-Protein ZO1 durchgeführt. Diese konnte zu pränatalen Zeitpunkten zeigen, dass beta-Dystroglycan noch vor einer AQP4-Expression bereits perivaskulär exprimiert wird und somit die Grundlage einer wasservermittelten Homöostase via AQP4 maßgeblich mit beeinflusst (siehe Abb. 3.10)

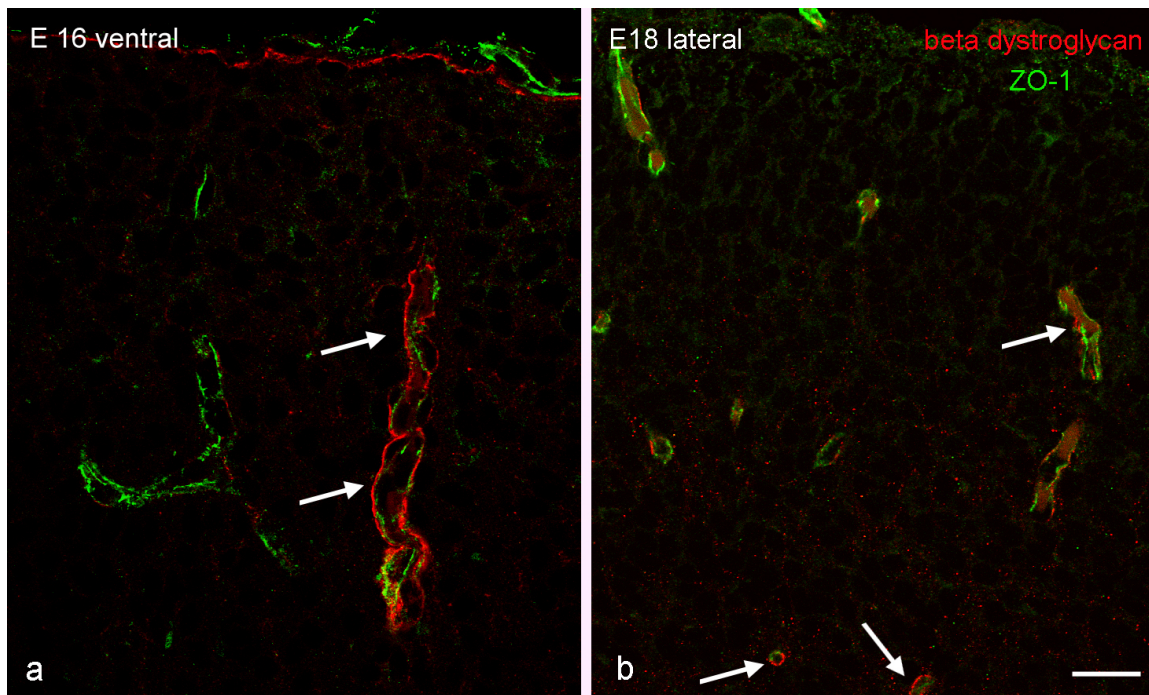


Abb. 3.11: Doppelfärbung für ZO-1 (grün) und beta-Dystroglykan (rot) zu den Entwicklungszeitpunkten E16 (a) und E18 (b) der lateralen Cortexregion. In diesem Areal zeigt sich noch vor Auftreten einer signifikanten Positivität für AQP4 um Gefäße herum bereits eine Expression der ZO1-positiven Tight Junctions von EC, die parallel auch von beta-Dystroglykan als ECM-Protein umschlossen werden. Maßstab = 20µm

## 4. Diskussion

An den untersuchten prä- und postnatalen Gehirnen der NMRI-Maus ließ sich in der Immunocytochemie wie auch im Gefrierbruchexperiment ein erstmaliges Auftreten von AQP4 / OPKs für den pränatalen Tag E16 datieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in beiden Methoden ein erstmaliges Auftreten im Bereich der ventralen / präoptischen Hirnoberfläche stattfand und sich diese Expression von hier aus im weiteren Verlauf der Hirnentwicklung in ventrodorsaler Richtung graduell ausbreitete und zunehmend differenzierte. Die gefundene Fluoreszenz für AQP4, wie auch die detektierten OPKs zum Tag E16 zeigten zu diesem Zeitpunkt natürlich keine dem adulten Zustand vergleichbare Morphologie. Diese fand sich in beiden Methoden erst postnatal ab dem Tag P1. Die zarte Anfärbbarkeit in tiefer gelegenen Hirnarealen ab E18 sowie der fehlende Kontakt AQP4-positiver Zellfortsätze mit Blutgefäßen kann einerseits als Merkmal einer sich entwickelnden Bluthirnschranke interpretiert werden. Andererseits scheint diese frühe, morphologisch unpolare Form einer AQP4-Expression auch unabhängig von der Gefäßentwicklung abzulaufen, was die voneinander getrennte Anfärbbarkeit für AQP4 und das Tight-Junction-Protein ZO-1 zeigt. Dies bestätigt die Annahme eines schrittweise verlaufenden Entwicklungsprozesses der Blut-Hirn-Schranke (Engelhardt, 2003, Siegenthaler *et al.*, 2013) ausgehend von initial losen und undichten Tight Junctions zwischen Endothelzellen (Obermaier *et al.*, 2013) mit benachbarten radiären oder astrozytären Zellfortsätzen. Aufgrund der radiären Ausrichtung der angefärbten Zellfortsätze gerade im Stadium E18 und P1 muß auch davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei eher um Radialglia als um schon vollständig ausgereifte Astrozyten handelt. In Gehirnen von Knochenfischen überwiegt jedoch genau dieses gliale Verteilungsmuster mit radiär ausgezogenen Gliafortsätzen (Kálmán, 1998) und einer ebenfalls unpolaren AQP4-Expression in der Immunfluoreszenz (Grupp *et al.*, 2010; Mack und Wolburg, 2012). Aufgrund der systematischen Stellung dieser Spezies in der Evolution wird angenommen, dass es sich hierbei um das phylogenetisch

ursprüngliche und ältere Verteilungsmuster handelt (Bundgaard und Abbott, 2008).

Bezüglich des zeitlichen Auftretens von AQP4 beziehungsweise OPKs in der Entwicklung im Säugergehirn finden sich in der Literatur insgesamt nur wenige Arbeiten. Nichtsdestotrotz war die Datierung des Auftretens sowie die Beobachtung im zeitlichen Kontext häufig Thema durchgeführter Studien. Ohne das Wissen um die Korrelation zwischen OPKs und AQP4, ja um die Existenz von AQP4, beschrieben und quantifizierten schon Anders und Brightman 1979 das prä- und postnatale Auftreten von OPKs am sich entwickelnden Gehirn von Ratten. Das erste Auftreten von OPKs wurde in dieser Arbeit zwischen dem pränatalen Tag E19 und E20 datiert. Die gemessene Partikel-Dichte am Tag E20 betrug  $9/\mu\text{m}^2$ . Innerhalb der ersten zwei Lebenswochen verzehnfachte sich dieser Wert auf  $150\text{-}200/\mu\text{m}^2$  und betrug in der sechsten Lebenswoche 85% der Partikeldichte adulter Gehirne (Anders und Brightman, 1979).

Die untersuchten Hirnareale in dieser Arbeit waren der basale und dorsale Cortex sowie die Medulla. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigte der Vergleich der perinatalen mit adulten Stadien sowie das Verteilungsmuster der OPKs in beiden Arealen jedoch keinen signifikanten Unterschied. Ein ventrodorsaler Gradient wurde ferner nicht beschrieben. Landis und Reese konnten 1981 an postnatalen Mäusen eine Zunahme der OPK-Dichte mit Erreichen adulter Werte bis zum Tag P14 nachweisen. An Gliazellen der Netzhaut, den Müllerzellen, konnte im Rahmen einer anderen Studie (Bolz und Wolburg, 1992) ein interessanter Zusammenhang zwischen Auftreten von OPKs und der funktionellen Ausreifung der Netzhaut aufgezeigt werden. Hier wurden Nesthocker (Taube) und Nestflüchter (Huhn) miteinander verglichen. Bei Hühnern ließen sich OPKs bereits vor dem Schlupf am Tag E18 nachweisen, einem Zeitpunkt, zu dem die Netzhaut histologisch bereits vollständig ausgereift ist und sich mittels Elektroretinogramm bereits elektrische Potentiale ableiten lassen. Bei jungen Tauben zeigten sich OPKs erst deutlich verzögert am fünften Tag nach dem Schlupf und am Tage des erstmaligen Öffnens der Augen. Dieses Phänomen konnte ferner am Beispiel von

Kaninchen (Nesthocker) bestätigt werden (Richter *et al.*, 1990). Hier stieg die Partikeldichte erst deutlich nach Öffnen der Augen an.

Eine sehr ausführliche Arbeit auf diesem Gebiet stammt von Nico *et al.* (2001). In der prä- und perinatalen Entwicklung des optischen Tectums des Telencephalons und des Cerebellums am Huhn wurde hier die Expression von AQP4 der Ausbildung von OPKs im zeitlichen Verlauf gegenüber gestellt. Untersucht wurden die Vorschlupf-Stadien E3, E9, E14 und E20, sowie das Nachschlupf-Stadium P2. Der Western Blot zeigte das erste Auftreten von AQP4 zum Tag E9 und in den Folgetagen einen signifikanten Anstieg und mit Erreichen eines Maximums der Expression am Tag E20. Die Spezifität der Ergebnisse wurde durch den Einsatz immundepletierter Antikörper verifiziert und ergab 7% der adulten AQP4-Expression für E9 mit Erreichen eines dem adulten Stadium vergleichbaren Level zum Tag E20. In der RT-PCR konnte jedoch für E9 bereits ein mRNA-Gehalt von 75% der adulten Werte für AQP4 gemessen werden. Morphologisch gelang ein Nachweis erst zum Tag E14. In allen drei untersuchten Hirnregionen zeigte sich eine zarte und überwiegend diskontinuierliche Positivität für AQP4 in der Immunzytochemie der oberflächlich gelegenen Glia limitans sowie tiefer gelegenen Schichten, in etwa vergleichbar mit unseren Ergebnissen zum Tag E18. In den Gefrierbruchuntersuchungen von Nico *et al.*, 2001 zeigten sich nur wenige, kleine und unregelmäßig geformte OPKs unterschiedlicher Größe. Auf Ultradünnschnitten zeigten sich teils einzeln, teils in Clustern vorliegende Goldpartikel an Plasmamembranen von astrozytären Zellkörpern und ihren Fortsätzen. Zum Tag E 20 zeigten sich Tectum, Telencephalon und Cerebellum wie auch das Gefäßsystem in einer dem adulten Zustand vergleichbaren Ausreifung. Neben größeren OPKs im Gefrierbruch fanden sich die Goldpartikel zu diesem Zeitpunkt im Bereich der den Gefäßen zugewandten astrozytären Plasmamembran. Zu P2 hin gab es schließlich keine signifikanten Unterschiede in der weiteren Differenzierung und Reifung der drei Areale. Somit bestätigte diese Arbeit von Nico *et al.* (2001) am Beispiel der AQP4-Expression die notwendige Frühreife der Nestflüchter. Neben der gezeigten parallelen Ausbildung von OPKs und der Expression von AQP4 interpretierten die Autoren



die frühe Aktivierung des AQP4-Gens bei noch fehlendem morphologischen Nachweis ferner als eine Ausrichtung des Protein-Expressionsmusters an der glialen Reifung. Der Zeitpunkt E20 mit der stärksten Fluoreszenz für AQP4 repräsentierte die abgeschlossene gliale Kontaktaufnahme mit Gefäßen und deren Umschließen durch astrozytäre Endfüsse und somit einer dichten und ausgereiften BHS.

Die Arbeiten und Erkenntnisse von Wolburg und Mitarbeitern konnten an Mäusen des Stammes BALB/c bereits ein Auftreten von OPKs um den Zeitpunkt der Geburt und eine Zunahme der Dichte postnatal konstatieren und stellten somit die Grundlage für diese Arbeit dar, OPKs in pränatalen Stadien zu suchen. Im Vergleich zur vorhandenen Literatur zum erstmaligen Auftreten von OPKs stellt das Auftreten am Tag E16 somit eine Erstbeschreibung bei Mäusen vor. Es muss aber auch davon ausgegangen werden, dass eventuell vorhandene OPKs im Rahmen früherer Gefrierbruch-Studien zu diesem Zeitpunkt aufgrund ihres spärlichen Verteilungsmusters schlichtweg übersehen wurden.

Nicht unerwähnt sollten daher zwei „unübersehbarere“ Nebenfunde dieser Arbeit bezüglich der Immunfluoreszenz bleiben. Verglichen mit einem AQP4-negativen bis schwach angefärbtem Cortex, zeigte die Nasenschleimhaut zum Zeitpunkt E15 und der Hippocampus an E17 im Gegensatz eine sehr kräftige Fluoreszenz (siehe Abb 3.6 und 3.7). Zur Hippocampusregion finden sich zum Vergleich in der Literatur lediglich zwei Arbeiten an postnatalen Stadien von Ratten (Kim et al., 2009) sowie an Mäusen des Stammes CD1 (Hsu et al., 2011). In letzterer Arbeit wurde als frühester Zeitpunkt der Tag P9 untersucht und eine Fluoreszenz für AQP4 im Bereich des Stratum lacunosum moleculare sowie an Blutgefäßen festgestellt.

Eine weitere wichtige Arbeit zur Entwicklung von Nagern stammt von Wen und Mitarbeitern (1999). Kleinhirne von prä- und postnatalen Ratten wurden mit verschiedenen Methoden im Verlauf der Entwicklung untersucht. Obwohl der Fokus auf der Kleinhirn-Entwicklung lag, wurde, wohl aus methodischen Gründen, das gesamte Gehirn in die Untersuchungen einbezogen. Der

deutlichste Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit wie auch zur Arbeit von Nico (2001) war bei Wen *et al.* (1999), dass sich selbst mit der sehr sensitiven Methode des Immunoblottings an pränatalen Stadien (hier E14-21) weder im Kleinhirn noch im übrigen Gehirn ein signifikanter Nachweis für AQP4 darstellen ließ. Erst ab P1 ließ sich das Molekül in Form einer schwachen Bande darstellen, und eine signifikante Zunahme der AQP4-Expression konnte erst ab der zweiten Woche (hier P7) festgestellt werden. Da die zur Immunfluoreszenz benutzten Schnitte das gesamte Gehirn abbildeten, konnte im Kleinhirn ein gegenüber dem Hirnstamm und dem Vorderhirn verzögertes zeitliches Auftreten der AQP4-Expression beobachtet werden. Auch hier wurde der Startpunkt einer signifikanten Anti-AQP4-Fluoreszenz jedoch erst für den Tag P7 bestimmt. In dieser Arbeit von Wen *et al.* (1999) wurden auch elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Immunogold-Markierungen angefertigt. Subpial und perivaskulär zeigten sich auch die Goldpartikel erstmals ab P7 im Bereich astrozytärer Endfußmembranen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Arbeit war allerdings, dass die elektronenmikroskopischen Beobachtungen gegenüber den Fluoreszenz-Beobachtungen zeitlich leicht verzögert waren. Weiterhin vergleichbar zeigte sich das Verteilungsmuster der Fluoreszenz für AQP4 erst an tiefer gelegenen radiären Zellfortsätzen (hier entsprechend der weißen Substanz und der Purkinje-Zellschicht) und erst im späteren Verlauf zunehmend auf den Bereich subpialer und perivaskulärer Kleinhirnareale ausgedehnt. Ebenfalls wurde ein ventro-dorsaler Gradient der Anfärbbarkeit beschrieben. Dieser wurde jedoch in der Arbeit von Wen *et al.* (1999) nur für das Kleinhirn erwähnt. Der erst postnatale Nachweis einer Fluoreszenz für GFAP ab P1, sowie die erst am Tag P3 eindeutig astrozytäre Morphologie der AQP4-Expression von Zellen mit sternförmig ausgezogenen Fortsätzen (siehe Abb. 3.7-3.9) und der im Vergleich zum adulten Zustand nur moderate Anteil an großflächigen Lattices (P3) in unserer Arbeit bestätigen die allgemeine Annahme einer erst postnatalen ausgereiften Astrozytogenese (Nico *et al.*, 1994; Wang und Bordey, 2008) und somit auch indirekt die Arbeit von Wen *et al.* (1999).

Im Gegensatz hierzu steht jedoch der von uns beobachtete embryonale Beginn eines Auftretens von OPKs und der AQP4-Expression am Tag E16. Unterstützt wird diese embryonale Datierung in der Literatur lediglich durch eine Arbeit von Huang *et al.* (2002). Diese Autoren detektierten die erste AQP4-Expression im Innenohr der Maus zum Zeitpunkt E14 (2002). Zwar beschreibt Saunders (2000) ebenfalls zu einem sehr frühen embryonalen Zeitpunkt (E10) einen Vorsprung in der TJ-Entwicklung der Maus gegenüber der Ratte. Die zeitliche Differenz beträgt hier jedoch nur einen Tag. Unsere Ergebnisse stehen eindeutig in Einklang mit der Hypothese einer verzögerten Entwicklung der Nesthocker gegenüber den Nestflüchter (Nico *et al.*, 2001). Es muss jedoch angenommen werden, dass in dem sehr dynamischen Prozess der perinatalen Entwicklung erhebliche Unterschiede innerhalb der Familie der Nager vorliegen. Die zum Start-Zeitpunkt E16 vorliegenden Ergebnisse mit durchschnittlich zwei OPK-Clustern pro  $\mu\text{m}^2$  und einer zwar diffusen und nur auf wenige subpial gelegene Zellfortsätze beschränkten Anfärbarkeit für AQP4 lassen jedoch die Schlussfolgerung zu, dass sich das Wasserkanalprotein noch vor Auftreten als OPK bereits in einer sich organisierenden Vorläuferform in der Zellmembran befinden muss. Das im Gegensatz zu einer spärlichen membranösen Morphologie innerhalb der Zelle ein gänzlich entgegengesetztes Bild mit einer stark hochregulierten Genexpression für AQP4 vorherrschen kann, konnte durch die Arbeit von Nico *et al.* (2001) am Huhn bereits eindrücklich belegt werden.

Untermuert werden kann diese Annahme ferner durch die Bedeutung der extrazellulären Matrix auf die Ausbildung der OPK-Struktur und das polarisierte Auftreten von AQP4. Ein wichtiger Bestandteil dieser Matrix ist der sogenannte Dystrophin-Dystroglycan-Komplex. Dieser ist in der astrozytären Endfußmembran im Bereich der Basallamina verankert. Ein Verlust oder Defekt seiner Untereinheiten führt zur Aufhebung der Polarität der astrozytären Oberfläche und letztlich zu Funktionseinbußen der Permeabilität und Dichtigkeit der Bluthirnschranke (Nico *et al.*, 2004; Wolburg-Buchholz *et al.*, 2009). So stellte sich die Frage, wie sich dieser Komplex bzw. seine Untereinheiten in der Entwicklung verhalten würden. Daher wurden von E16/ventral und E18/lateral

Färbungen für eine Untereinheit des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes, das beta-Dystroglycan angefertigt (siehe Abb. 3.10). Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich ein im Vergleich zur noch fehlenden oder spärlichen Fluoreszenz für AQP4 eine deutlich ausgeprägte perivaskuläre Expression von beta-Dystroglycan. Bei gleichzeitig fehlenden OPKs im Gefrierbruch zu beiden Regionen und Zeitpunkten bestätigen die Färbungen für beta-Dystroglycan eindrücklich das Bild einer noch sich gerade differenzierenden Astroglia. Nur mit Vorsicht lässt sich dieses Bild auf die Entwicklung der Blut-Hirnschranke übertragen, da ja wegen der Schwierigkeit, perivaskuläre Endfußstrukturen zu finden, superfizielle Endfußstrukturen an Stelle der perivaskulären ausgewertet wurden. Zum einen bedarf es zur Aufrechterhaltung einer intakten Homöostase einer hohen Dichte an polarisiert ausgerichteten Wasserkanälen im Bereich von Gefäßen einhergehend mit einer ähnlich hohen Dichte an ebenfalls polarisiert lokalisierten Kaliumkanälen entlang von Neuronen und Synapsen (Rash, 2010; Nagelhus et al., 2004). Korrelierend mit der synaptischen Aktivität kommt es zum Anstieg der extrazellulären Kalium-Konzentration. Die Folge hiervon ist ein erhöhter Wassertransport über Wasserkanäle. Am schnellsten und effizientesten geschieht dies im Bereich astrozytärer Endfußmembranen aufgrund des hier stark polarisierten Vorkommens von AQP4 (Wolburg, 1995, Noell et al., 2007). Zum anderen verändert sich die Homöostase im Laufe der Gehirnentwicklung. Während der extrazelluläre Raum in der frühen Entwicklung einen Großteil des zur Verfügung stehenden Raumes einnimmt und einhergehend damit eine noch freie Diffusion von Wasser und Kalium erlaubt, nimmt dieser dann reziprok zur neuronalen Proliferation von Zellen im Laufe der weiteren Entwicklung ab (Lehmenkühler et al., 1993). Wen *et al.* (1999) leiteten in Bezug auf ihre Ergebnisse am Kleinhirn von Ratten hieraus die Vermutung ab, die Größenabnahme des extrazellulären Raumes und die Expression von AQP4 seien voneinander abhängig. Da eine polarisierte AQP4-Expression den Wassertransport entlang von Gefäßen bedingt (Ilyff et al., 2012) und damit einhergehend erst der Abtransport neuronaler Abbauprodukte möglich wird (Nedergaard, 2013), kann somit der Nachweis der AQP4-Expression zu einem definierten Zeitpunkt auch als zeitlicher Übergang einer bis dato passiven und

diffusionsabhängigen hin zu einer aktiven und kanalvermittelten Homöostase interpretiert werden. Neben der Expression in Form einer Fluoreszenz für AQP4 und des Auftreten von OPKs im Gefrierbruch lässt sich diese funktionelle Ausreifung der Astrozyten im prä- und postnatalen Beobachtungszeitraum so auch am Übergang von einer radiären hin zu einer reifen astrozytären Morphologie deuten wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

## **5. Zusammenfassung**

Die Blut-Hirn-Schranke des Säugergehirns ist durch einen hochspezialisierten glio-vaskulären Komplex charakterisiert, der aus Tight Junction verbundenen Endothelzellen, einer subendothelialen Basallamina, Perizyten und Astrozyten besteht. Gerade auf die Astrozyten konzentriert sich seit Jahren das Interesse der Blut-Hirn-Schranken-Forschung. Deren wichtigste Kontaktstelle mit den zerebralen Kapillaren stellt der sogenannte Endfuß dar, dessen Oberfläche mit einer Vielzahl von Transportern und Ionenkanälen überzogen ist. Von besonderem Interesse für diese Arbeit war das Aquaporin-4, da es das einzige Wasserkanalprotein ist, dessen morphologische Struktur sich auch in der Gefrierbruchtechnik nachweisen lässt. Da es zwischen der Reifung der Endfußstruktur und der Qualität der Blut-Hirn-Schranke eine Beziehung gibt, war es das Ziel dieser Arbeit, den Beginn der AQP4-Expression am sich entwickelnden Gehirn der NMRI-Maus mit zwei unterschiedlichen morphologischen Methoden zur Darstellung zu bringen, zu vergleichen und somit für diesen Mausstamm zu definieren. Dies wurde zum einen mittels Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen AQP4 bestimmt. Zum anderen wurde dessen elektronenmikroskopisches Korrelat in der Gefrierbruchtechnik in Form sogenannter orthogonaler Partikelkomplexe – kurz OPKs, dargestellt. Um eine gute Vergleichbarkeit beider Methoden zu gewährleisten, wurden äquivalente Hirnareale der ventralen, lateralen und dorsalen Cortex-Oberfläche präpariert beziehungsweise dargestellt. Untersucht wurden jeweils zwei pränatale (E16 und E18) und zwei postnatale (P1 und P3) Zeitpunkte. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass ein erstes Auftreten für AQP4 und OPKs für den

Tag E16 festgelegt werden kann, wobei die Partikelkomplexe im Gefrierbruch gegenüber der Fluoreszenz mit leichter zeitlicher Verzögerung in Erscheinung treten. Bezüglich der Lokalisation konnte der Beginn des Auftretens zuerst an den ventralen Oberflächen mit einem Fortschreiten Richtung dorsal in beiden Methoden gezeigt werden. Bei anfänglich zarter Anfärbbarkeit der noch radiär imponierenden Zellfortsätze zeigte sich im Laufe der weiteren Entwicklung eine zunehmende Konzentration der Fluoreszenz an subpial gelegenen Zellfortsätzen und im Bereich von Gefäßen. Parallel hierzu zeigten die OPKs im Gefrierbruch eine Zunahme der Dichte und Größe mit Ausbildung sogenannter Cluster. Dieses als Polarisierung bezeichnete morphologische Ausreifen der Astrozyten kann mit einer zunehmenden Funktionalisierung der Blut-Hirn-Schranke in Verbindung gebracht werden. Auch wenn sich eine funktionale Aussage durch den bloßen Vergleich zweier rein morphologischer Marker ohne Zuhilfenahme weiterer physiologischer Messmethoden nur unzureichend getroffen werden kann, muss als weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit festgehalten werden, dass sich die Reifung graduell von ventral nach dorsal ausgebreitet hat. Somit sollten bei Gewebeentnahmen gerade am sich entwickelnden Gehirn immer lokale Unterschiede bedacht und im zeitlichen Verlauf berücksichtigt werden. Ferner sollten zukünftige Arbeiten zu diesem Thema zusätzlich weiterführende molekularbiologische Methoden miteinbeziehen, um der Komplexität der sich entwickelnden Blut-Hirn-Schranke gerecht zu werden. Denn gerade die Beobachtung des sich entwickelnde Gehirns zeigt für das Verständnis vieler Erkrankungen des zentralen Nervensystems Modellcharakter. Von daher wird die Arbeit am komplexen Netzwerk der Astrozyten mit ihren gliovaskulären Beziehungen weiterhin von großem Interesse für die Blut-Hirn-Schranken-Forschung bleiben.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbott NJ**, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain-barrier. *Neurobiol Dis* 37: 13-25
- Amiry-Moghaddam M**, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A. (2003) An  $\alpha$ -Syntrophin dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bi-directional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2106-2111
- Amiry-Moghaddam M**, Ottersen OP (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Rev Neurosci* 4:991-1001
- Anders JJ**, Brightman MW (1979) Assemblies of particles in the cell membranes of developing, mature and reactive astrocytes. *J Neurocytol* 8:777-795
- Anthony TE**, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890
- Bauer H**, Sonnleitner U, Lametschwandtner A, Steiner M, Adam H, Bauer HC (1995) Ontogenic expression of the erythroid-type glucose transporter (Glut 1) in the telencephalon of the mouse: correlation to the tightening of the blood-brain barrier. *Dev. Brain Res.* 86:317-325.
- Barber AJ**, Lieth E (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn* 208:62-74
- Benfenati V**, Nicchia GP, Svelto M, Rapisarda C, Frigeri A, Ferroni S (2007) Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 100:87-104
- Benga G**, Popescu O, Borza V, Pop VI, Muresan A, Mocsy I, Brain A, Wrigglesworth JM (1986) Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport. *Eur J Cell Biol* 41:252-262
- Berzin TM**, Zipser BD, Rafii MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa EG (2000) Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:349-55
- Bezakova G**, Ruegg MA. (2003) New insights into the roles of agrin. *Rev Mol Cell Biol* 4:295-308
- Bolz S**, Wolburg H (1992) First appearance of orthogonal arrays of particles in Müller cell membranes depends on retina maturation. *Dev Neurosci* 14: 203-214
- Bradbury MW**, Stubbs J, Hughes IE, Parker P (1963) The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar cerebrospinal fluid and blood serum in human subjects. *Clin Sci* 25:97-105
- Brightman MW**, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677
- Bundgaard M**, Abbott NJ All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. (2008) *Glia* 56:699-708
- Campbell K**, Götz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25:235-238

- Connors NC**, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P (2004) The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 279:28387-28392
- Del Zoppo GJ**, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA (2006) Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans* 34:1261-1266
- Denker BM**, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 263: 15634-15642
- Dermietzel R** (1973) Visualization by freeze-fracturing of regular structures in glial cell membranes. *Naturwissenschaften* 60:208
- Dermietzel R** (1974) Junctions in the central nervous system of the cat. 3. Gap junctions and membrane-associated orthogonal particle complexes (MOPC) in astrocytic membranes. *Cell Tissue Res* 149:121-315
- Dore-Duffy P** (2008) Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 16:1581-1593
- Ehrlich P** (1885) Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Habilitationsschrift, Universität Berlin
- Engelhardt B** (2003) Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 314: 119-129
- Fallier-Becker P**, Sperveslage J, Wolburg H, Noell S (2007) 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
- Fallier-Becker P**, Vollmer JP, Bauer HC, Noell S, Wolburg H, Mack AF (2014) Onset of aquaporin-4 expression in the developing mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 36:81-89
- Frigeri A**, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, Svelto M (2001) Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB J* 15:90-98
- Furman CS**, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, Agre P, Rash JE (2003) Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13609-13614
- Gee SH**, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S (1994) Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 77:675-86
- Goldmann EE** (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Abh. K. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Med. 1:1-60
- Gotow T**, Hashimoto PH (1988) Deep-etch structure of astrocytes at the superficial glia limitans, with special emphasis on the internal and external organization of their plasma membranes. *J Neurocytol* 17:399-413
- Götz M** (2003) Glial cells generate neurons - master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist* 9:379-397
- Götz M**, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788
- Grupp L**, Wolburg H, Mack AF, (2010). Astroglial structures in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 518:4277-4287



**Guadagno E**, Moukhles H (2004) Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* 47:138-49

**Hartfuss E**, Galli R, Heins N, Götz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15-30

**Hatton JD**, Sang UH (1990) Orthogonal arrays are absent from the membranes of human glioblastomatous tissues. *Acta Anat (Basel)* 137:363-6

**Hawkins BT**, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57: 173-185

**Hiroaki Y**, **Tani K**, Kamegawa A, Gyobu N, Nishikawa K, Suzuki H, Walz T, Sasaki S, Mitsuoka K, Kimura K, Mizoguchi A, Fujiyoshi Y (2006) Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol. Jan* 355:628-639

**Horio Y** (2001) Potassium channels of glial cells: distribution and function. *Jpn J Pharmacol* 87:1-6

**Hsu MS**, Seldin M, Lee DJ, Seifert G, Steinhäuser C, Binder DK (2011) Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 178:21-32

**Huang D**, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim DJ, Lin X (2002) Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res* 165:85-95.

**Iliff JJ**, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med.* 4: 147ra111

**Jung JS**, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13052-13056

**Kálmán M** (1998). Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat Embryol* 198:409-433

**Kim JE**, Ryu HJ, Yeo SI, Seo CH, Lee BC, Choi IG, Kim DS, Kang TC (2009) Differential expressions of aquaporin subtypes in astroglia in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Neuroscience* 163: 781-9

**King LS**, Kozono D, Agre P (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 687-698

**Kriegstein AR**, Götz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43

**Kreutziger GO** (1968) Freeze-etching of inter- cellular junction& of mouse liver. Proceedings of the 26th Meeting of the Electron Microscope Society of America, Claitor's Publishing Division, Baton Rouge, La. 234. Pp. 234-235

**Landis DM**, Reese TS (1974) Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J Cell Biol* 60:316-320

**Landis DM**, Weinstein LA (1983) Membrane structure in cultured astrocytes. *Brain Res* 276:31-41

**Lehmenkühler A**, Syková E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C (1993) Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55:339-351

**Levison SW**, Goldman JE (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10:201-212

**Li J**, Patil RV, Verkman AS (2002) Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:573-579

**Liu H**, Wintour EM (2005) Aquaporins in development – a review. *Reprod Biol Endocrinol* 3:18

**Liu Y**, Rao MS (2004) Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell* 96:279-90

**Mack AF**, Wolburg H, (2013) A novel look at astrocytes: aquaporins, ionic homeo- stasis, and the role of the microenvironment for regeneration in the CNS. *Neuroscientist* 19:195–207.

**Malatesta P**, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Götz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764

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

**McMahan UJ** (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:407-18

**Nagelhus EA**, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26: 47-54

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

**Nedergaard M** (2013) Garbage truck of the brain. *Science* 340:1529-1530.

**Neely JD**, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14108-14113

**Neuhaus J** (1990) Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size, and correlation with intramembranous particles. *Glia*. 3:241-51

**Neuhaus J**, Schmid EM, Wolburg H (1990) Stability of orthogonal arrays of particles in murine skeletal muscle and astrocytes after circulatory arrest, and human gliomas. *Neurosci Lett* 109:163-8

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

- Nicchia GP**, Rossi A, Mola MG, Pisani F, Stigliano C, Basco D, Mastrototaro M, Svelto M, Frigeri A (2010) Higher order structure of aquaporin-4. *Neuroscience* 168:903-914
- Nico B**, Cantino D, Sassoé Pognetto M, Bertossi M, Ribatti D, Roncali L (1994) Orthogonal arrays of particles (OAPs) in perivascular astrocytes and tight junctions in endothelial cells. A comparative study in developing and adult brain microvessels. *J Submicrosc Cytol Pathol* 26:103-109
- Nico B**, Frigeri A, Nicchia GP, Quondamatteo F, Herken R, Errede M, Ribatti D, Svelto M, Roncali L (2001) Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci.* 14:1297-307
- Nico B**, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L (2003) Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42:235-251
- Nico B**, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L (2004) Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience.* 125:921-935
- Nielsen S**, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 17:171-180.
- Noctor SC**, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720
- Noctor SC**, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.
- Noell S**, Fallier-Becker P, Beyer C, Kröger S, Mack AF, Wolburg H. (2007) Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.* 26:2109-2118
- Noell S**, Fallier-Becker P, Deutsch U, Mack AF, Wolburg H (2009) Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes. *Cell Tissue Res.* 337:185-195
- Obermeier B**, Daneman R, Ransohoff RM, (2013) Development, maintenance and disruption of the blood–brain barrier. *Nat. Med.* 19, 1584–1596
- Ohta E**, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T (2009) Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297:C1368-1378
- Parpura V**, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) *Nature* 369:744-747
- Rash JE**, Staehelin LA, Ellisman MH (1974) Rectangular arrays of particles on freeze-cleaved plasma membranes are not gap junctions. *Exp Cell Res* 86:187-90
- Rash JE**, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and

ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11981-11986

**Rash JE** (2010) Molecular disruptions of the pial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168:982-1008

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

**Richter W**, Reichenbach A, Reichelt W (1990) Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cell and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *J Neurocytol.* 19:127-139

**Risau W**, Wolburg H (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13:174-178.

**Rohlmann A**, Gocht A, Wolburg H (1992) Reactive astrocytes in myelin-deficient rat optic nerve reveal an altered distribution of orthogonal arrays of particles (OAP). *Glia* 5:259-268

**Rucker HK**, Wynder HJ, Thomas WE (2000) Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 51:363-369

**Ruiz-Ederra J**, Zhang H, Verkman AS (2007) Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Müller cells. *J Biol Chem* 282:21866-21872

**Saunders NR**, Knott GW, Dziegielewska KM (2000) Barriers in the immature brain. *Cell Mol Neurobiol* 20:29-40

**Siegenthaler JA**, Sohet F, Daneman R, (2013) 'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barrierogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1057-1064.

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

**Smith MA**, Hilgenberg LG (2002) Agrin in the CNS: a protein in search of a function? *Neuroreport* 13:1485-95

**Solenov E**, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C426-432

**Staehein LA** (1972) Three types of gap junctions interconnecting intestinal epithelial cells visualized by freeze-etching. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:1318-1321

**Steinhäuser C**, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H (1992) Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci* 4:472-484

**Takahashi S**, Muta K, Sonoda H, Kato A, Abdeen A, Ikeda M (2014) The role of Cysteine 227 in subcellular localization, water permeability, and multimerization of aquaporin-11. *FEBS Open Bio* 18:315-320

**Takumi T**, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S (1995) A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270:16339-16346

**Tani K**, Mitsuma T, Hiroaki Y, Kamegawa A, Nishikawa K, Tanimura Y, Fujiyoshi Y (2009) Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *J Mol Biol* 389:694-706

**Vajda Z**, Pedersen M, Füchtbauer EM, Wertz K, Stødkilde-Jørgensen H, Sulyok E, Dóczy T, Neely JD, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S (2002) Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13131-13136

**Verbavatz JM**, Ma T, Gobin R, Verkman (1997) Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *AS Cell Sci* 110:2855-2860

**Virchow R** (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur Medicin*, Frankfurt a. M. S.1024pp

**Wang DD**, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367

**Wen H**, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Agre P, Ottersen OP, Nielsen S (1999) Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci* 11:935-945

**Wolburg H**, Neuhaus J, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M (1986) Decrease in the density of orthogonal arrays of particles in membranes of cultured rat astroglial cells by the brain fibroblast growth factor. *Neurosci Lett* 72:25-30

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

**Wolburg H**, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF (2011) Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 287:1-41

**Wolburg-Buchholz K**, Mack AF, Steiner E, Pfeiffer F, Engelhardt B, Wolburg H (2009) Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 118:219-233

**Yang B**, Brown D, Verkman AS (1996) The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271:4577-4580

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Im Rahmen der in Kapitel 3 erwähnten Veröffentlichung, erfolgt in diesem Kapitel die Aufschlüsselung der Beiträge der aufgeführten Autoren sowie aller an der Durchführung dieser Arbeit beteiligten Mitarbeiter.

### **Jörg-Peter Vollmer (Doktorand, Koautor):**

- Präparation und Fixierung der Maushirne
- Anfertigung von Tangentialschnitten der Maushirne für den Gefrierbruch
  - Einbettung der fixierten Maushirne in Paraffin
- Planung und Durchführung der Färbungen für AQP4, AQP4+GFAP, ZO1
  - Auswertung und Fotodokumentation der Gefrierbrüche am Elektronenmikroskop
- Entwicklung der Negative, Herstellen von Abzügen und Einscannen der Negative
  - Auszählen der OPKS und tabellarische Erfassung
    - Auswertung der Fluoreszenz am LSM
    - Literaturrecherche
  - Selbstständige Verfassung des Manuskripts

### **Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Wolburg (Betreuer / Koautor, AG Elektronenmikroskopie):**

- Konzeption und Betreuung der Arbeit bezüglich Elektronenmikroskopie
  - Korrektur Manuskript

### **Dr. rer. nat. Andreas Mack (Erstautor der Veröffentlichung, Anatomisches Institut):**

- Betreuung der Arbeit bezüglich Immunfluoreszenz
  - Technische Betreuung am LSM

### **Dr. rer. nat. Petra Fallier-Becker (Koautorin, AG Elektronenmikroskopie):**

- Konzeption der Arbeit

**Dr. med. Susan Noell (Koautorin,AG Elektronenmikroskopie):**

- Konzeption der Arbeit

**Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Bauer (Koautor/ Institut für Organismische Biologie der Universität Salzburg):**

- Bereitstellung und Liquidation der Mäuse

**Dr. rer. nat. Jan Sperveslage (Biologe, Institut für Pathologie):**

- Erstellung des Streudiagramms und statistische Auswertung

**Maika Hoffmeister (Biologin, Institut für Pathologie):**

- Erstellung des Streudiagramms und statistische Auswertung

**Ria Knittel (MTA, AG Elektronenmikroskopie):**

- Durchführung der Gefrierbrüche

•

**Wenzel Vogel (MTA, Immunhistochemie):**

- Durchführung der Leerschnitte an Paraffinblöcken für Immunfluoreszenz

**Dr. rer. nat. Karen Wolburg-Buchholz (AG Elektronenmikroskopie):**

- Durchführung der Färbungen für beta-Dystroglycan