

Aus der Klinik für Kleintierchirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Schmidt

**AQP4 im kaninen Gehirn**  
**Etablierung einer Immunfluoreszenz und**  
**Beobachtungen zur Verteilung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Karim Montasser  
Tierarzt aus Kairo, Ägypten

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Schmidt  
Dr. Christoph Rummel  
Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 24. August 2017

*„There is nothing in this universe that can't be explained. Eventually.”*

- House MD

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aquaporine .....	2
1.1.1	Aquaporinklassen .....	3
1.1.2	Aquaporinstruktur.....	4
1.1.3	Aquaporine im Gehirn .....	5
1.2	AQP4.....	6
1.2.1	Lokalisation von AQP4 im Gehirn .....	7
1.2.2	Astrozyten .....	7
1.2.3	Ependym.....	11
1.3	Hirnödeme.....	12
1.3.1	Zytotoxische Ödeme .....	12
1.3.2	Vasogene Ödeme .....	13
1.3.3	AQP Regulation im Gehirn.....	13
1.3.4	Beeinflussung von AQP4 im Gehirn.....	14
1.3.5	Hydrozephalische Ödeme.....	16
1.4	Der Hund als Hydrozephalus Modell .....	17
1.5	Ziel der Arbeit .....	19
2	Grundlagen der genutzten Labortechniken .....	20
2.1	Grundlagen der Polymerase Kettenreaktion.....	20
2.2	Grundlagen der Immunfluoreszenz .....	22
2.3	Grundlagen des Konfokalen Mikroskops .....	26
3	Material und Methoden.....	28
3.1	Gehirnmaterial.....	28
3.1.1	Geräte- und Materialliste Probenmaterial .....	28
3.1.2	Probenmaterial.....	28

3.1.3	In Formalin fixierte Gehirne.....	30
3.1.4	Direkt gefrorene Gehirne.....	32
3.1.5	Bearbeitung der Proben am Kryostaten.....	32
3.2	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	33
3.2.1	Geräte- und Materialliste PCR.....	33
3.2.2	PCR Protokoll.....	34
3.3	Immunfluoreszenz.....	35
3.3.1	Geräte- und Materialliste Immunfluoreszenz.....	35
3.3.2	Versuchsprotokoll 1: Lagerzustand und Schichtdicke.....	37
3.3.3	Versuchsprotokoll 2: Verdünnungsreihe AQP4.....	39
3.3.4	Versuchsprotokoll 3: AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X.....	39
3.3.5	Versuchsprotokoll 4: Konfokales Mikroskop.....	41
3.3.6	Finales Immunfluoreszenz Protokoll.....	41
3.3.7	Bildbearbeitung und -auswertung.....	42
4	Ergebnisse.....	44
4.1	Probenmaterial.....	44
4.2	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	46
4.3	Immunfluoreszenz.....	47
4.3.1	Versuchsprotokoll 1: Lagerzustand und Schichtdicke.....	47
4.3.2	Versuchsprotokoll 2: Verdünnungsreihe AQP4.....	51
4.3.3	Versuchsprotokoll 3: AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X.....	52
4.3.4	Versuchsprotokoll 4: Konfokales Mikroskop.....	54
4.3.5	Finales Immunfluoreszenz Protokoll.....	55
4.3.6	Vergleich subjektive Einordnung gegen semiquantitative Messung der Leuchtkraft.....	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Etablierung des Protokolls.....	68
5.1.1	Heterogenität des Probenmaterials.....	68

5.1.2	Nachweis der AQP4 Spezifität .....	69
5.1.3	Direkt gefrorene Proben besser geeignet als in Formalin fixierte Proben .....	70
5.1.4	Schichtdicke mit 20µm optimal.....	73
5.1.5	AQP4 Antikörper maximal 1:250 verdünnen.....	73
5.1.6	Keine Zugabe von Triton-X .....	73
5.1.7	Semiquantitative Messung der Leuchtkraft ist essentiell.....	74
5.1.8	Fazit der Vorversuche .....	75
5.2	Verteilung von AQP4 .....	76
5.2.1	Netzmuster.....	76
5.2.2	Lipofuszinartefakte .....	77
5.2.3	AQP4 positive kanine Purkinjezellen .....	78
5.2.4	AQP4 ist im Ependym verringert.....	80
5.2.5	AQP4 ist im Cortex erhöht .....	81
5.2.6	Unterschiedliche Verteilungen von AQP4 auf Astrozyten .....	82
5.3	Fazit.....	85
6	Zusammenfassung.....	VII
7	Summary .....	IX
8	Immunfluoreszenzprotokoll.....	XI
9	Literaturverzeichnis .....	XII
10	Abkürzungsverzeichnis.....	XVIII
11	Erklärung .....	XX

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von AQP4.....	4
Abbildung 2: Blut-Hirn-Schranke. ....	9
Abbildung 3: Weg des Wassers aus dem Ventrikel in das Hirngewebe. ....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Antikörpers.....	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Immunfluoreszenz.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Vorversuche.....	26
Abbildung 7: Teilungsachsen der Probengehirne. ....	30
Abbildung 8: Teilstück aus dem Dach des III. Ventrikels eines Hundes mit erweitertem Ventrikel (links) und mit normalem Ventrikel (rechts) zur weiteren Verarbeitung.....	31
Abbildung 9: Genexpression AQP4.....	46
Abbildung 10: Auswirkung des Lagerzustands auf 20µm dicke Schnitte.....	48
Abbildung 11: Auswirkung des Lagerzustands auf 10µm dicke Schnitte.....	50
Abbildung 12: Verdünnungsreihe AQP4.....	51
Abbildung 13: Kolokalisation AQP4 und von Willebrand Faktor.. ....	52
Abbildung 14: Verdünnungsreihe Triton-X und Negativkontrolle AQP4.....	53
Abbildung 15: Kolokalisation AQP4 und GFAP im Konfokalen Mikroskop.....	54
Abbildung 16: 45° Sicht auf einen einzelnen Astrozyten im Konfokalmikroskop.....	55
Abbildung 17: Vergleich der Ventrikel drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.....	56
Abbildung 18: Einzelne Astrozyten von Hunden mit und ohne erweitertem Ventrikel.. .....	58
Abbildung 19: Vergleich der Cortices drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.....	59
Abbildung 20: Vergleich der Kleinhirne drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel. ....	60
Abbildung 21: Undifferenziert angefärbte Probe.....	61
Abbildung 22: Vergleich der Ventrikel drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel. ....	62

Abbildung 23: Vergleich der Cortices drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel .....	63
Abbildung 24: Vergleich der Kleinhirne drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.....	64
Abbildung 25: Vergrößerung sternförmiger Strukturen zwei verschiedener Hunde..	65
Abbildung 26: In Formalin fixierte und frisch gefrorene Probe. ....	71
Abbildung 27: Überlappender Bereich .....	72
Abbildung 28: Thresholdfehler .....	75
Abbildung 29: Netzmuster .....	76
Abbildung 30: Lipofuszinartefakte.....	78
Abbildung 31: Vergleich sternförmige Zelle in Zerebellum und Schema Purkinjezelle. ....	79
Abbildung 32: Ependymschäden. ....	80
Abbildung 33: Expressionsmuster AQP4 auf Astrozyten.....	82

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Fluorochrome mit Anregungs- und Emissionswellenlängen. 25	
Tabelle 2: Schema Versuchsprotokoll 1 (Lagerzustand und Schichtdicke). ....	37
Tabelle 3: Schema Versuchsprotokoll 3 (AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X).....	40
Tabelle 4: Probenhunde nach Ventrikelzustand und Hirnentnahme aufgeteilt .....	45
Tabelle 5: Probenhunde nach Signalement und Erkrankung aufgeteilt. ....	45
Tabelle 6: Vergleich der subjektiven Einordnung gegenüber der semiquantitativen Messung der Leuchtkraft. ....	67

## 1 Einleitung

Wasser spielt im Gehirn von Säugetieren eine herausragende Rolle. 80% der Gesamtmasse des Gehirns besteht aus Wasser, das sich auf den Liquor cerebrospinalis, das Blut und die intrazelluläre Flüssigkeit verteilt (Iacovetta, Rudloff, & Kirby, 2012). Trotz der Relevanz von Wasser für alle Prozesse des Gehirns und damit des gesamten Lebewesens herrschte lange Zeit Unklarheit darüber, wie sich Wasser im Gehirn bewegt. Allein durch physiologische Prozesse entstehen im Gehirn bei jeder Verteilung von Nährstoffen (Pasantés-Morales & Cruz-Rangel, 2010), bei neuronaler Aktivität oder bei Umbauten des Zytoskeletts (Iacovetta et al., 2012) osmotische Gradienten, die Wasser in unterschiedliche Kompartimente verschieben. Ohne einen Ausgleich dieser Wasserverschiebungen würde es zu Schäden am Gehirn durch eine Schwellung oder ein Schrumpfen einzelner Neurone in funktionellen Abschnitten, oder sogar des gesamten Gehirns kommen, je nachdem ob zu viel oder zu wenig Wasser in den Zellen ist (Tait, Saadoun, Bell, & Papadopoulos, 2008). Daher sind ständig zahlreiche Mechanismen in Gang, die diese physiologischen Änderungen ausgleichen und regulieren. Der bekannteste dieser Mechanismen ist die Osmose, die jedoch energieabhängig ist und Wasser nur langsam transportiert. Das Gehirn von Säugetieren verfügt über einen effektiven Weg, der in der Lage ist Wasser auch in größerer Menge zu bewegen. Kanalproteine, die so genannten Aquaporine („AQPs“) ermöglichen den hocheffizienten und selektiven Massen-Fluss („bulk flow“) von Wasser im Gehirn.

Während physiologische Abläufe im Wasserhaushalt des Gehirns langsame Änderungen verursachen, können pathologische Prozesse zu schnellen und größeren Veränderungen des Wasserhaushalts mit schwerwiegenden funktionellen und strukturellen Folgen führen (Tait et al., 2008). Hier sorgen die AQPs für eine Wiederherstellung der Wasserhomöostase. Aber auch umgekehrt beeinflussen pathologische Änderungen des Gehirns die AQPs. Durch Ischämien, mechanische Verletzungen, Imbalancen der Elektrolyte und insbesondere durch Tumorerkrankungen kommt es zu einer Überexpression von AQPs (Owler et al., 2010). Die Folge ist die Ausbildung eines zytotoxischen Ödems. Es ist bisher nicht

## Einleitung

endgültig geklärt, ob erst die Überexpression von AQP4 der auslösende Faktor ist, oder ob dieses Ereignis einen Kompensationsmechanismus darstellt. Weiterhin bestehen Hinweise, dass AQP4 bei anderen Erkrankungen des Gehirns eine Rolle spielen (Owler et al., 2010). Bei einer pathologischen Erweiterung der Hirnventrikel durch Anstau der Hirnflüssigkeit (Hydrozephalus internus) wurde bei Labornagern eine vermehrte Expression von AQP4 gemessen, was eine kompensatorische Wirkung aufgrund der Volumenüberlastung nahelegt (Skjolding et al., 2010). Dieses Ergebnis wurde 2012 von Aghayev et al. relativiert. Aghayev et al. (2012) kommen zu dem Schluss, dass die Rolle von AQP4 nicht ausreichend verstanden ist um einen direkten kausalen Zusammenhang zu belegen. Es bedarf also aktuell intensiver Forschung im Verständnis von Aquaporinen.

Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathologischen Effekte im Zusammenhang mit AQP4 sind diese wasserleitenden Kanalproteine äußerst interessant für das Verständnis der Pathologie von tiermedizinischen Gehirnerkrankungen und sollten bei der Spezies Hund genauer untersucht werden.

### 1.1 Aquaporine

Bereits 1957 fiel Sidel und Solomon auf, dass rote Blutkörperchen Wasser über ihre Zellmembran transportieren konnten ohne auf die energieaufwändige Diffusion zurückgreifen zu müssen. Sie postulierten daraufhin, dass es ein Molekül geben muss, das den roten Blutkörperchen als Wasserpore dient (Badaut et al., 2007). Ende der 1980er erkannten Preston und Agre, dass es sich bei dem von ihnen bereits entdeckten Channel Forming Integral Protein 28 („CHIP28“) um genau dieses gesuchte Molekül handelte. 1991 konnten sie CHIP28 schließlich vollständig charakterisieren (Preston & Agre, 1991). CHIP28 zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu dem Major Integral Protein („MIP“) in der menschlichen Augenlinse. Wird MIP in Oocyten implantiert, ist es in der Lage, den Wasserfluss durch die Membran der Oocyten drastisch zu steigern (Preston et al., 1992). Durch MIP und das sehr ähnliche CHIP28 konnte also die Eigenschaft der roten Blutkörperchen, die Sidel und Solomon bereits 30 Jahre zuvor beobachtet hatten, reproduziert werden. Beide Teilchen transportieren Wasser über eine Pore. Die Autoren nannten die Klasse dieser Wassertransporter deshalb Aquaporin. Das MIP wurde umbenannt in AQP0 und CHIP28 wurde AQP1.

## Einleitung

Die Entdeckung der Aquaporine war bahnbrechend für das Verständnis des Wasserhaushalts in Organismen. Konnte man sich vorher noch nicht erklären, wie ein Wasserausgleich besonders in pathologischen Situationen möglich ist, füllten die Aquaporine diese Wissenslücke. Während die Diffusion in seiner Wassertransportkapazität sehr limitiert ist und Energie kostet, können Aquaporine sehr viel mehr Wasser transportieren und das ohne den Aufwand metabolischer Energie (Papadopoulos & Verkman, 2013). 2003 erhielt Peter Agre den Nobelpreis in Chemie für die Entdeckung der Aquaporine. Damit wurde die herausragende Bedeutung dieser Wasserkanäle untermauert. Im Folgenden wird der heutige Wissensstand über AQPs abgebildet, von den verschiedenen Klassen bis hin zu AQP4, das Gegenstand dieser Arbeit ist.

### 1.1.1 Aquaporinklassen

Seit den 1990ern wurden 13 verschiedene AQPs in Säugetieren und viele weitere in Nonvertebraten und Pflanzen klassifiziert (Iacovetta et al., 2012), die sich in zwei Kategorien unterteilen lassen. Da diese Arbeit sich mit AQPs in Gehirnen von Säugetieren beschäftigt, liegt der Fokus auf den Klassen, die in Säugetieren vorkommen. Die AQPs von Säugetieren werden laut offizieller Nomenklatur durchnummeriert, beginnend mit dem genannten AQP0.

**Aquaporine**, gleich benannt wie die übergeordnete Gruppe, transportieren ausschließlich Wasser bidirektional. Zu dieser Klasse gehören AQP1, AQP2, AQP 4, AQP 5 und AQP 8.

Die zweite Klasse transportiert neben Wasser auch Glycerol und andere kleine Moleküle bidirektional, man nennt sie **Aquaglyceroporine**. Zu ihnen gehören die AQP3, AQP 7, AQP 9 und AQP 10.

Das AQP6 ist ein Sonderfall, da es unter bestimmten Bedingungen als einziges AQP die Passage von Chloridionen erlaubt. Die Permeabilitäten von AQP0, AQP11 und AQP12 sind hingegen noch nicht geklärt, obwohl AQP0 zu den ersten entdeckten AQPs gehört (Iacovetta et al., 2012).

## Einleitung

### 1.1.2 Aquaporinstruktur

Alle AQPs bestehen aus drei  $\alpha$ -Helices, welche die Zellmembran sechs Mal durchqueren und auf der zytoplasmatischen Seite in Carboxyl- und Aminogruppen enden, siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Die Wasserdurchlässigkeit der AQPs wird über ein doppeltes Aminosäuremotiv, bestehend aus Asparagin, Prolin und Alanin (NPA Motiv) gesteuert. Entsprechend der Anfangsbuchstaben der Abkürzungen der Aminosäuren nennt es sich NPA Motiv. Das NPA Motiv bildet eine wasserdurchlässige Pore, die in ihrem Zentrum enger ist als am periplasmatischen und zytoplasmatischen Ende (Badaut et al., 2002). Diese Pore ist in Abbildung 1 als orange Verengung in Form einer Sanduhr zu sehen. Durch sie hindurch fließt Wasser, das in der Abbildung durch blaue Punkte dargestellt ist.

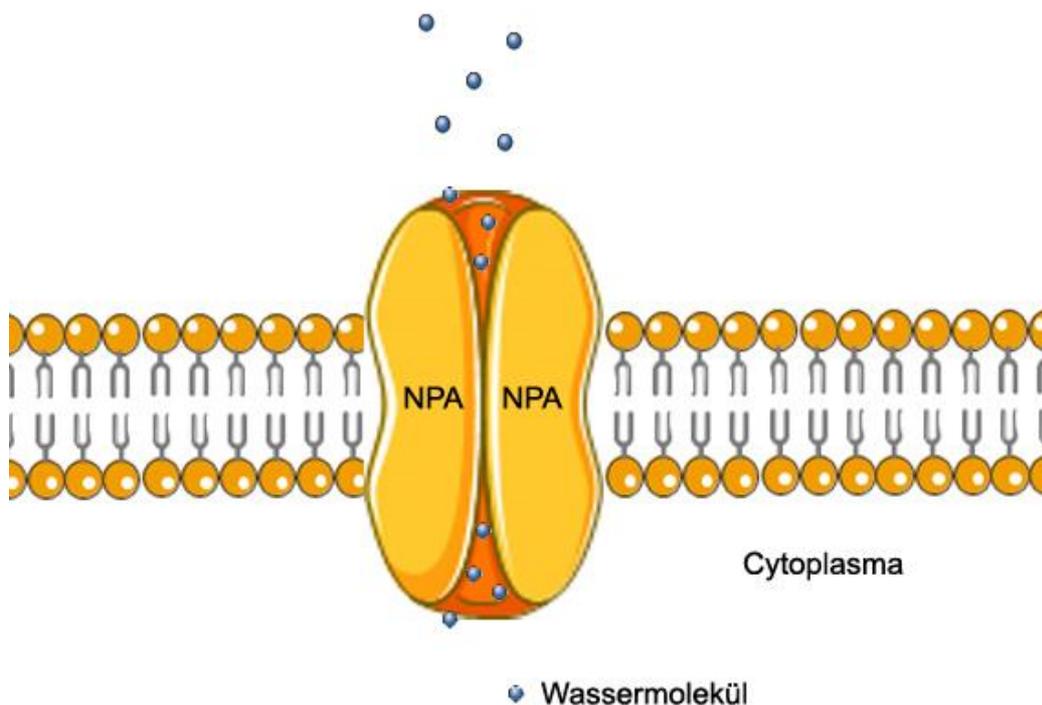


Abbildung 1: Schematische Darstellung von AQP4.

In der Mitte ist in rot eine wasserdurchlässige Pore abgebildet, die durch zwei NPA Motive gebildet wird.

Eigene Abbildung.

## Einleitung

In der zugrunde liegende Aminosäurestruktur befindet sich das die Pore bildende NPA Motiv in den Aminosäureloops M3 und M7. Der Wasserfluss durch die Pore geschieht passiv und bidirektional, gesteuert durch osmotische Gradienten (Iacovetta et al., 2012).

Aquaglyceroporine besitzen ebenfalls eine aus dem NPA Motiv gebildete Pore, die jedoch mehr als nur Wasser transportieren kann. Glycerol kann nur Aquaglyceroporine passieren (Badaut et al., 2002; Wang et al., 2005). Aquaglyceroporine unterscheiden sich von AQPs nicht nur in ihrer Durchlässigkeit sondern auch im Durchmesser ihrer Pore. Lange ging man daher davon aus, dass allein der Durchmesser der Pore die Selektivität des AQP bestimmt und auch verantwortlich für den Ausschluss von Glycerol bei den AQPs ist (Badaut et al., 2002).

Wang et al. (2005) zeigten an zwei Kanälen aus dem Bakterium *E. Coli*, AQPZ und GlpF, dass Aquaglyceroporine tatsächlich eine engere Pore haben, dies aber alleine die Selektivität nicht erklären kann. Aquaglyceroporine sind zusätzlich zur engeren Pore mit einer asymmetrischen Stelle ausgestattet. Dort herrscht eine negative Energiebarriere von  $-4$  kcal/mol, die entscheidend für den Transport von Glycerol verantwortlich ist (Wang et al., 2005). Wang et al. (2005) waren in der Lage durch die Betrachtung einer anderen Spezies, in diesem Fall einem Bakterium, einen Sachverhalt aufzuklären, der auf alle Aquaporine übertragbar ist. Dies unterstreicht die Relevanz von Untersuchungen an AQPs jenseits der üblichen Mäuse und Ratten und unterstützt die These dieser Arbeit, dass weitere Modelltiere für die Untersuchung von AQPs nötig sind.

### 1.1.3 Aquaporine im Gehirn

In Mäusen, Ratten und beim Menschen ist die Verteilung von AQPs in verschiedenen Organsystemen bekannt. Bisher wurden sie beispielsweise im Darm, der Niere, im Pankreas, in Speicheldrüsen, den Testikeln, im Auge und im Gehirn nachgewiesen (Iacovetta et al., 2012). Ein Hauptaugenmerk der AQP Forschung liegt auf dem Gehirn. Das liegt daran, dass Wasser dort an den meisten Prozessen beteiligt ist und aufgrund der rigiden Umhüllung des Gehirns durch den Schädel Druckschwankungen im Gehirn besonders gefährlich sind.

## Einleitung

Von den verschiedenen AQPs wurden bisher im Gehirn die AQP1, AQP4 und AQP9 nachgewiesen (Iacovetta et al., 2012; Papadopoulos & Verkman, 2013; Tait et al., 2008).

AQP1 wird im Choroidplexus exprimiert. Dort ist der Wasserkanal wahrscheinlich an der Bildung von Liquor cerebrospinalis beteiligt (Iacovetta et al., 2012; Papadopoulos & Verkman, 2013). AQP9 wurde in Neuronen und in Astrozyten nachgewiesen. Dort ist es wahrscheinlich am Energiemetabolismus dieser Zellen beteiligt (Iacovetta et al., 2012; Papadopoulos & Verkman, 2013).

Bei weitem häufiger als AQP1 und AQP9 ist das dritte zerebelläre AQP: **AQP4** (Iacovetta et al., 2012; Papadopoulos & Verkman, 2013). Die Menge an AQP4 im Gehirn alleine macht es sehr attraktiv für die Forschung, da man sich von einer Beeinflussung eines breit vertretenen Moleküls auch eine breite Wirkung erhofft (Iacovetta et al., 2012). Gleichzeitig bietet sich AQP4 aber auch aufgrund seiner bisher bekannten Funktionen als Forschungsziel an. Diese Funktionen werden im Folgenden beschrieben.

### 1.2 AQP4

AQP4 wird im Organismus von Säugetieren nicht in erregbaren, sondern in unterstützenden Zellen gefunden (Tait et al., 2008). Im Auge ist dies die Müller Glia, im Ohr die Sulcus Zellen und im Gehirn Astrozyten und Ependymzellen (Iacovetta et al., 2012; Tait et al., 2008). Die Ausnahme von dieser Regel sind bestimmte Neurone im Hypothalamus (Iacovetta et al., 2012).

AQP4 bildet eine Population aus zwei verschiedenen Isoformen, die nach den jeweils ersten Aminosäuren des Proteins, Methionin 1 und Methionin 23, benannt sind: M1 und M23. Beide Isoformen sind funktionell gleich (Furman et al., 2003). M23 ist jedoch kürzer und macht 75% der AQP4 Population aus (Iacovetta et al., 2012). Andere Arbeitsgruppen sprechen eine dritte Isoform AQP4 Mz mit zusätzlichen 41 Aminosäuren an (Zelenina, 2010), dies wird aber in Reviews nicht übernommen, da AQP4 Mz nur bei Ratten und nicht bei Menschen oder Mäusen vorkommt (Rossi et al., 2011).

Die beiden Hauptisoformen M1 und M23 bilden Tetramere aus vier eigenständig funktionierenden AQPs mit jeweils einem Kanal. Im Zentrum der vier

## Einleitung

AQPs entsteht durch die symmetrische Anordnung ein weiterer Kanal, dessen Funktion bisher ungeklärt ist (Gonen & Walz, 2006).

Die Tetramere von M23 finden sich in sogenannten Orthogonal Arrays of Particles („OAPs“) zusammen, die nur geringe Anteile von M1 enthalten (Furman et al., 2003). Bei diesen OAPs handelt es sich um rechteckige Anordnungen von mehreren M23 AQP4 Tetrameren. Die Tetramere binden über hydrophobe Gruppen aneinander (Papadopoulos & Verkman, 2013). Elektronenmikroskopische Aufnahmen an Gefrierbrüchen von OAPs zeigen die exakte Anordnung von AQP4 in Rechtecken. Der funktionelle Nutzen dieser Strukturen bleibt unklar (Furman et al., 2003; Gonen & Walz, 2006).

### 1.2.1 Lokalisation von AQP4 im Gehirn

Im Gehirn wird AQP4 in Astrozyten und Ependymzellen exprimiert, die direkten Kontakt mit Flüssigkeitskompartimenten haben. Besonders stark ist das Vorkommen

- an den Endfüßen von Astrozytenfortsätzen, die Blutgefäße umschließen,
- an Ependymzellen der Ventrikel,
- in subependymalen Astrozyten
- und der Glia limitans (Tait et al., 2008).

AQP4 wird also zu einem überwiegenden Teil in Astrozyten und dem Ependym exprimiert. Im Folgenden werden die Astrozyten und das Ependym genauer beschrieben und erläutert, welche Funktionen AQP4 für diese Zellpopulationen und das Gehirn als Ganzes übernimmt.

### 1.2.2 Astrozyten

Astrozyten sind eine heterogene Gruppe Zellen des Gehirns und fünfmal so zahlreich wie die Neuronen (Iacovetta et al., 2012). Zu den Astrozyten werden unterschiedliche Zellen gezählt, die drei Dinge gemein haben:

- Sie verfügen über die namensgebenden sternförmigen Ausläufer
- sie treten mit Endothelzellen in Kontakt und
- sie exprimieren das Intermediärfilament Glial Fibrillary Acidic Protein („GFAP“).

Die Heterogenität der Astrozyten geht so weit, dass nicht alle heute zu den Astrozyten gezählten Zellen diese drei Merkmale zeigen müssen. Manche

## Einleitung

exprimieren kein GFAP. Da es sich hierbei jedoch um Sonderformen in geringen Mengen handelt (Iacovetta et al., 2012), spielen die nicht GFAP exprimierenden Astrozyten für diese Arbeit keine Rolle. Alle zu den Astrozyten gezählten Zellen haben gemein, dass sie ein dichtes Netzwerk zwischen den übrigen Zellen des Gehirns bilden. Über zahlreiche Ausläufer nehmen die Astrozyten außerdem Kontakt zu Blutgefäßen und ependymalen Oberflächen der Liquorräume auf und vernetzen so alle Anteile des Gehirns mit den flüssigkeitsleitenden Strukturen (Tait et al., 2008).

Besonders an den perivaskulären Kontaktflächen wird vermehrt AQP4 exprimiert (Siehe Abbildung 2). Entstehen Änderungen im Wasserhaushalt des Gehirns sorgen die Astrozyten über die AQPs auf ihrer Oberfläche für eine Wiederherstellung des physiologischen Zustands (Iacovetta et al., 2012). Dank der starken Wassertransportkapazität von AQP4 ist dies auch bei schnell eintretenden Zuständen möglich.

Astrozyten spielen nicht nur für den Wasserhaushalt eine entscheidende Rolle. Das Gehirn verfügt über kein lymphatisches System (Nedergaard, 2013). Daher ist es auf andere Wege angewiesen um überschüssige Stoffe abzutransportieren. Mit der Wortneuschöpfung des glymphatischen Systems, zusammengesetzt aus Glia und lymphatisch, wurde von Nedergaard (2013) die Fähigkeit des Gehirns benannt die Funktionen des lymphatischen Systems durch AQP4 auf Astrozyten zu übernehmen. Damit sind Astrozyten und AQP4 maßgeblich an dem Abtransport von schädlichen Stoffen aus dem Gehirn beteiligt.

Astrozyten sind weiterhin bei der Aufnahme von überschüssigem Glutamat beteiligt. Glutamat ist der wichtigste Neurotransmitter bei Säugetieren, in hohen Mengen aber neurotoxisch. Astrozyten sind in der Lage Glutamat in Glutamin umzuwandeln. Das Glutamin wird Neuronen wieder zur Verfügung gestellt, damit diese bei Bedarf erneut Glutamat daraus bilden können.

## Einleitung

Für die neuronale Aktivität des Gehirns sind nicht nur Neurotransmitter erforderlich, sondern auch extrazelluläres Kalium. Da durch jede neuronale Aktivität das extrazelluläre Kalium steigt und in der Folge weitere Aktivitäten stören würde, besitzen Astrozyten zwei Mechanismen, den extrazellulären Kaliumpegel zu regulieren. Sie können über eine Natrium-Kalium-ATPase Kalium aktiv und über das sogenannte „spatial buffering“ auch passiv aufnehmen und über andere Astrozyten dorthin im Gehirn transportieren, wo ein Kaliummangel herrscht (Iacovetta et al., 2012).

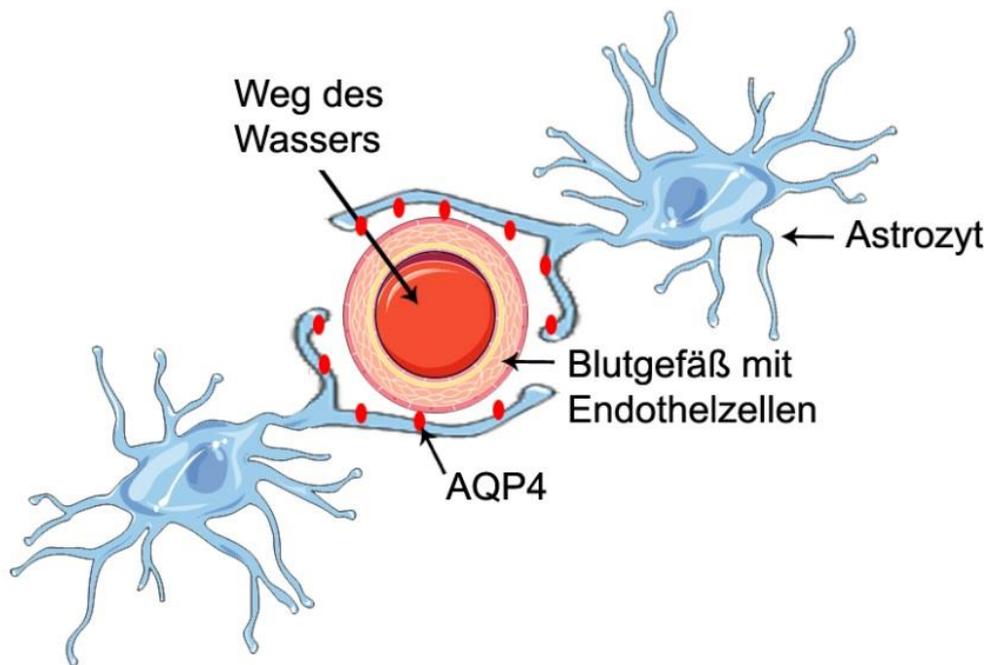


Abbildung 2: Blut-Hirn-Schranke.

AQP4 (rote Ovale) vermittelt den Abfluss von überschüssigem Wasser durch Astrozytenfortsätze und Endothelzellen in das Lumen von Gefäßen.

Eigene Abbildung.

Astrozyten wirken weiterhin entscheidend bei der synaptischen Vermittlung, der Nährstoffversorgung von Neuronen und der Narbenbildung im Gehirn mit (Iacovetta et al., 2012). Gerade die Beteiligung von AQP4 an der Narbenbildung wurde unerwartet entdeckt. Papadopoulos et al. (2008) fanden heraus, dass AQP4 Knockout Mäuse nach einer Stichverletzung des Gehirns mit einer verzögerten

## Einleitung

Narbenbildung durch Astrozyten reagierten. Dieser Umstand wird darauf zurückgeführt, dass AQP4 an der für die Bildung der Narbe nötigen Zellmigration von Astrozyten beteiligt ist. Bewegt sich ein Astrozyt so entstehen an der Seite der Bewegungsrichtung rasch aufeinander folgende Osmolalitätsgradienten durch Umbau des Zytoskeletts. Diese Gradienten werden durch AQP4 vermittelt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass AQP4 in der Membran von migrierenden Astrozyten verstärkt in Bewegungsrichtung polarisiert. Somit können die Astrozyten von AQP4 Knockoutmäusen nur sehr eingeschränkt migrieren (Papadopoulos et al., 2008). Diese Befunde belegen die Relevanz von AQP4 für die Astrozytenfunktion. Da Glianarben oft einen Funktionsverlust bedeuten (Papadopoulos et al., 2008) ist die lokale Limitierung von Astrozytenmigration erstrebenswert. Ein AQP4 Inhibitor wäre ein erfolgversprechender Ansatz. Bisher ist jedoch kein AQP4 Inhibitor bekannt, der selektiv und nicht toxisch ist.

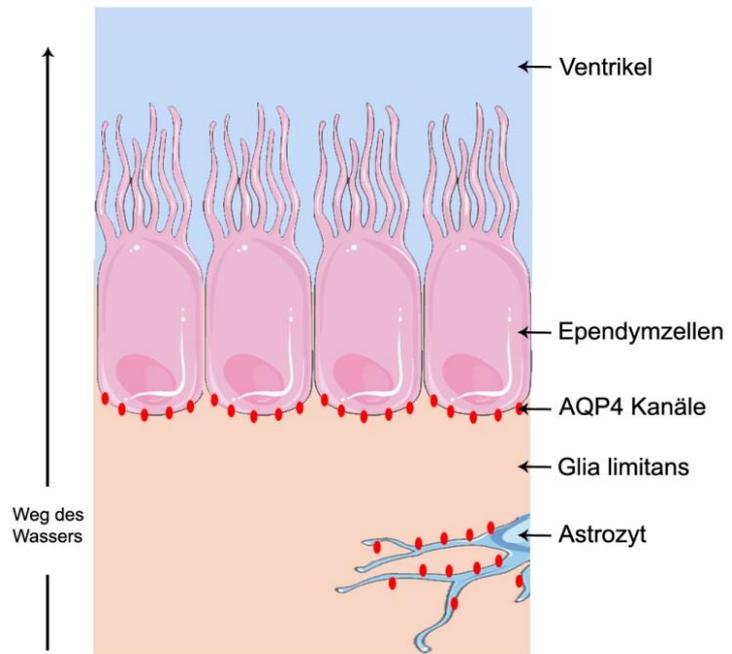
Ein solcher AQP4 Inhibitor würde Potenzial über die Limitierung von Glianarben hinaus bieten. Tumormetastasierung im Gehirn ist ein weiterer Prozess, der auf rasche Zellumbauprozesse angewiesen ist. So postulieren Papadopoulos et al. (2008), dass ein AQP4 Inhibitor die Ausbreitung von Gliomen einschränken könnte.

## Einleitung

### 1.2.3 Ependym

Nicht nur in den Astrozyten, auch im Ependym kommt AQP4 zahlreich vor und auch dort vermittelt es entscheidende Funktionen.

Das Ependym besteht aus Gliazellen, die eine Barriere zwischen dem Liquor cerebrospinalis und dem Hirngewebe bilden. Diese Barriere wird unterstützt durch die Glia limitans unterhalb des Ependyms, in der Astrozyten mit ihren Ausläufern die Passage von Molekülen regulieren. Wie in Abbildung 3 dargestellt, kann überschüssiges Wasser aus dem Hirngewebe durch AQP4 in den zahlreichen Astrozytenausläufern der Glia limitans und durch die AQP4 auf Ependymzellen in die Ventrikel abtransportiert werden (Tait et



**Abbildung 3: Weg des Wassers aus dem Ventrikel in das Hirngewebe.** Überschüssiges Wasser kann aus dem Hirngewebe in die Ventrikel transportiert werden. Daran beteiligt sind Astrozytenausläufer und Ependymzellen, die zahlreiche AQP4 (rote Ovale) auf ihrer Oberfläche tragen.

Eigene Abbildung.

al., 2008; Verkman et al., 2006). Im Ventrikel geht das überschüssige Wasser in den Liquor über und kann in den Blutkreislauf entsorgt werden. Das Ependym von Mäusen degeneriert jedoch bei erhöhtem Druck im Ventrikel, angefangen mit einer Rückbildung der Mikrovilli bis hin zu einem kompletten Verlust des Ependyms und damit geht auch eine große Menge an AQP4 verloren (Skjolding, Rowland & Søgaaard, 2010). Hierunter leidet die Fähigkeit des Gehirns überschüssiges Wasser aus dem Hirngewebe ableiten zu können (Skjolding et al., 2010). Der für die Degeneration verantwortliche erhöhte Druck tritt zum Beispiel dann auf wenn überschüssiges Wasser nicht schnell genug abtransportiert werden kann. Es entwickelt sich ein Hirnödem.

### 1.3 Hirnödeme

AQP4 ermöglicht den bidirektionalen Fluss von Wasser. Das Wasser fließt entlang des Gradientengefälles, weshalb die Kanäle sowohl an der Bildung von Hirnödemen als auch an deren Auflösung beteiligt sein können. Dieser Effekt wurde zuerst in Astrozytenkulturen gezeigt (Solenov, Watanabe, Manley & Verkman, 2004) um anschließend im Tiermodell an AQP4 Knockout Mäusen belegt zu werden. AQP4 kann also einen positiven oder einen negativen Einfluss auf das Gehirn haben (Nesic et al., 2010). Für ein genaues Verständnis der ambivalenten Beziehung zwischen AQPs und Hirnödemen ist zuerst ein genaues Verständnis über die verschiedenen Ödemarten nötig. Im Hirn unterscheidet man drei unterschiedliche Ödemarten: Zytotoxisch, vasogen und hydrozephalisch (Tait et al., 2008). Während die Funktion von AQP4 bei zytotoxischen und die vasogenen Ödemen gut untersucht ist gibt es eine Forschungslücke bei dem Verhältnis von AQP4 und hydrozephalischen Ödemen. Hier mangelt es an einem Tiermodell, dass eine akkurate Beobachtung von AQP4 bei hydrozephalischen Ödemen erlaubt. Um die Forschungslücke einordnen zu können werden zuerst die detaillierter untersuchten Ödemarten und der Einfluss von AQP4 auf diese beschrieben.

#### 1.3.1 Zytotoxische Ödeme

Zytotoxische Ödeme entstehen, wenn Hirnzellen nach einem hypoxischen oder ischämischen Zustand geschädigt werden, und ihr Volumen nicht mehr ausgleichen können. Durch den Zellschaden werden Protonenpumpen in der Membran von Astrozyten geschädigt. Es kommt zu einer erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration und Wasser sammelt sich in Astrozyten. Das Resultat ist ein Anschwellen der Astrozyten (Tait et al., 2008). Zytotoxische Ödeme betreffen die weiße und die graue Substanz gleich stark, es ist also das gesamte Gehirn gleichmäßig betroffen. Die Blut-Hirn-Schranke bleibt bei dieser Art Ödem intakt, es erfolgt kein zusätzlicher Einstrom von Wasser aus den Gefäßen. Der Großteil an Wassereinstrom in die ödematösen Zellen nach Ausfall der Protonenpumpen erfolgt über AQP4 (Papadopoulos & Verkman, 2007). Bei AQP4 Knockout Mäusen führt das Fehlen von AQP4 zu einem verringerten Einstrom von Wasser bei einem zytotoxischen Ödem durch Ischämie oder Wasserintoxikation. Es entstehen

## Einleitung

geringere Mengen an zytotoxischem Ödem als bei Mäusen mit AQP4 (Papadopoulos & Verkman, 2005; 2007; Verkman et al., 2006). Mit der geringeren Menge Ödem geht eine deutlich gesenkte Mortalität einher, was einen selektiven AQP4 Inhibitor zur Behandlung von zytotoxischen Ödemen sehr attraktiv macht.

### 1.3.2 Vasogene Ödeme

Bei einem vasogenen Ödem strömt das Wasser immer durch eine gestörte Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (Tait et al., 2008). Wasser und Zellen fließen zum Beispiel aus geschädigten Gefäßen in den Extrazellularraum und dehnen diesen. Die graue Substanz widersteht dem Einstrom eher als die weiße Substanz, daher sammelt sich das überschüssige Wasser zuerst in der weißen Substanz. Die Verteilungsmuster von zytotoxischen und vasogenen Ödemen sind also unterschiedlich. Mit einem MRT lässt sich über Analyse des Verteilungsmusters von Wasser eine Aussage über die Art des Hirnödems tätigen und dies mittlerweile sogar semiautomatisch (Xie et al., 2005). AQP4 vermittelt bei vasogenen Ödemen primär den Abfluss von überschüssigem Wasser, da der hydrostatische Druck im Parenchym höher ist als außerhalb (Papadopoulos & Verkman, 2007). AQP4 Knockout Mäuse können diesen Abtransport nur unzureichend leisten und bilden deshalb größere Mengen an vasogenem Ödem (Bloch et al., 2005; Papadopoulos & Verkman, 2007; Verkman et al., 2006). Ein Mangel an AQP4 ist bei einem vasogenen Ödem also schädlich. Daher ist ein AQP4 Inhibitor für diese Art Ödem nicht sinnvoll. Vielmehr wird ein Medikament, das die AQP4 Expression hochreguliert benötigt. Dieses ist zurzeit aber ebenso wenig verfügbar wie ein AQP4 Inhibitor. Wenn ein AQP4 modulierendes Medikament in Zukunft verfügbar sein sollte, hängt die Entscheidung ob man die AQP4 Expression vermindern oder erhöhen möchte also davon ab, was für eine Art Ödem vorliegt. Unter realen klinischen Bedingungen gibt es jedoch meistens Mischformen, was die Suche nach einer wirkungsvollen medikamentösen Therapie zusätzlich erschwert.

### 1.3.3 AQP Regulation im Gehirn

Wie bereits erwähnt werden medikamentöse Therapieoptionen zur Behandlung von Hirnödemen untersucht. Dies liegt daran, dass die bisherigen Therapieoptionen gegen Hirnödeme unzureichend sind. Die Möglichkeiten der

## Einleitung

Intervention sind sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin begrenzt. Der Einsatz von Diuretika oder Glucocorticoiden bringt über Verschiebung der Osmolalitätsgradienten nur sehr kurzfristige und vor Allem schnell reversible Erleichterung (Biel et al., 2013; Tait et al., 2008). Bei länger bestehenden Zuständen muss deshalb chirurgisch interveniert werden. Dies kann eine Kraniotomie bei einem akuten Hochdruckzustand nach stumpfem Schädeltrauma (Tait et al., 2008) oder die Implantation eines ventrikulo-peritonealen Shunts zur kontinuierlichen Druckregulation bei einem Hydrozephalus sein (Biel et al., 2013). Obwohl die Implantation eines ventrikulo-peritonealen Shunts als Therapie eines kongenitalen Hydrozephalus beim Hund schon lange existiert und kürzlich in einer retrospektiven Multicenterstudie von Biel et al. (2013) als wirkungsvoll bestätigt wurde, ist die Rate an Komplikationen, besonders in den ersten drei Monaten, zu beachten.

Die Regulation von AQP4 im Gehirn wird ständig an den aktuellen Bedarf angepasst. **In vivo** geschieht dies reversibel über Palmitoylierung oder Phosphorylierung. Dabei werden Palmsäure- beziehungsweise Phosphatgruppen an Aminosäuren angehängt, um die Eigenschaften des Proteins zu ändern. Die bereits erwähnten OAPs werden über eine Palmitoylierung der Aminosäuren Cistein 13 und Cystein 17 beeinflusst (Yukutake & Yasui, 2010). Die Wasserdurchlässigkeit von AQP4 lässt sich über eine Phosphorylierung regulieren. Wird die Aminosäure Serin 111 phosphoryliert steigt die Wasserdurchlässigkeit (Gunnarson et al., 2008), die Phosphorylierung von Serin 180 verringert die Wasserdurchlässigkeit (Yang & Verkman, 1997). Arginin Vasopressin vermittelt beide Effekte (Yukutake & Yasui, 2010).

Wie die Expression von AQP4 im Gehirn herunter reguliert wird ist bisher unbekannt. Da AQP1 jedoch im gesamten Körper und AQP4 zumindest im Auge über Ubiquitinierung beeinflusst werden (Iacovetta et al., 2012), liegt die Vermutung nahe, dass dieser Mechanismus auch für AQP4 im Gehirn gilt. Bisher konnte eine Ubiquitin vermittelte Regulation für AQP4 im Gehirn jedoch nicht nachgewiesen werden.

### 1.3.4 Beeinflussung von AQP4 im Gehirn

**In vitro** wird versucht die physiologische Palmitoylierung oder Phosphorylierung durch extern zugegebene Substanzen zu ersetzen. Die Regulation von AQP4 lässt sich über verschiedene Metallionen effektiv beeinflussen. Heute ist

## Einleitung

bekannt, dass fast alle AQPs von  $\text{HgCl}_2$  inhibiert werden, auch wenn der genaue Mechanismus dahinter ungeklärt bleibt (Amiry-Moghaddam & Ottersen, 2003). Die Aminosäuretargets hierfür sind Cystein 178 sowie Cystein 253. Erst vor wenigen Jahren konnten Yukutake et al. (2010) zeigen, dass auch AQP4 hierüber inhibiert wird. An Cystein 178 kann die Wasserdurchlässigkeit über Zink und Kupfer inhibiert werden (Yukutake & Yasui, 2010).

Metallionen, wie das genannte  $\text{HgCl}_2$ , beeinflussen AQP4 zuverlässig, sind jedoch hoch toxisch für das Gehirn eines Säugetiers (Owler et al., 2010). Zur Regulation am Lebewesen wird deshalb ein nicht toxischer aber spezifischer Wirkstoff mit ähnlichen Eigenschaften gesucht (Iacovetta et al., 2012; Owler et al., 2010). Das Ziel ist ein Wirkstoff, der bei akut auftretenden oder chronischen Hirnödemen verabreicht werden kann und der selektiv nur mit AQP4 interagiert. Ein AQP4 Inhibitor würde bei zytotoxischen Ödemen zum Einsatz kommen. Zusätzlich könnte ein solcher Inhibitor auch die Bildung von Gliazellen nach Gehirntraumata verhindern. Ein AQP4 Aktivator käme bei vasogenen Hirnödemen zum Einsatz.

Die Suche nach einem passenden Wirkstoff begann bei bereits zugelassenen Medikamenten. Es zeigte sich jedoch, dass die häufig eingesetzten Corticosteroide keinen Einfluss auf AQP4 haben (Owler et al., 2010). Carboanhydrasehemmer, wie Acetazolamid, standen im Verdacht die Wasserdurchlässigkeit von AQP4 in Oocyten zu verringern in dem sie extrazellulär an AQP4 binden (Huber, Tsujita, Yamazaki, Sakimura & Nakada, 2007). Nachfolgende Untersuchungen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren (Papadopoulos et al., 2008; Yang, Zhang & Verkman, 2008). Die Diskussion, welche Ergebnisse korrekt sind dauert an. In einem Review urteilen Yukutake und Yasui, dass Acetazolamid zumindest eine vielversprechende Basis für einen AQP4 Inhibitor bietet (Yukutake & Yasui, 2010). Ein Derivat von Bumetanid, einem Schleifendiuretikum, steht ebenfalls in der Diskussion AQP4 zu inhibieren (Migliati et al., 2009). Auch hier ist das Urteil eines Reviews, dass Bumetanidderivate eine vielversprechende Basis für einen AQP4 Inhibitor bieten (Owler et al., 2010). Auch pflanzliche Wirkstoffe wurden auf ihre Wirksamkeit zur Regulation von AQP4 hin untersucht. Sulphoraphan, ein Isothiocyanat aus dem Brokkoli, konnte die AQP4 Expression in Ratten nach einem Hirntrauma verabreicht erhöhen (Zhao et al., 2005). Die Beeinflussung der

## Einleitung

Expression geschieht auf dem Genlevel, vermutlich durch Transkriptionsfaktoren vermittelt (del Carmen Martinez Ballesta et al., 2014).

Für den veterinärmedizinischen Einsatz ist zu beachten, dass Sulphoraphan für Hunde toxisch ist. So wurde gezeigt, dass Sulphoraphan in kaninen Tubuluszellen der Niere eine Apoptose auslöst (Shieh et al., 2010). Es bedarf also nicht nur weitergehender Untersuchungen bezüglich möglicher Medikamente zur AQP4 Regulation sondern es muss auch beachtet werden, dass für den humanen Markt entworfene Medikamente nicht weniger wirksam oder sogar toxisch für kanine Patienten sein können. Der Ausbau dieser Ansätze hin zu einem anwendungsbereiten Medikament dauert an.

Neben der direkten medikamentösen Beeinflussung gibt es auch andere Ansätze zur Regulation von AQP4. Gegen AQPs gerichtete Antikörper oder durch Lentiviren übermittelte small interfering RNA, die AQPs inhibiert, stehen in der Diskussion (Owler et al., 2010). Diese Ansätze sind bisher rein hypothetisch und noch weiter von einer Marktreife entfernt, als die genannten Medikamentenansätze. Die Grundlagenforschung im Bereich der AQPs ist daher von größter Relevanz, um in naher Zukunft ein anwendbares Medikament herstellen zu können.

Bisher gibt es noch große Lücken im Verständnis des Verhältnisses zwischen AQP4 und Hirnödemen. Diese Lücken erschweren die Suche nach einem geeigneten Medikament zur Beeinflussung von Hirnödemen durch AQP4. Eine dieser Lücken ist das Verständnis darüber, wie AQP4 hydrozephalische Ödeme beeinflusst.

### 1.3.5 Hydrozephalische Ödeme

Beim hydrozephalischen Ödem ist das Verhältnis zwischen Bildung und Resorption von Liquor gestört (Przyborowska et al., 2013). Es kommt zu einer Umverteilung von Liquor aus dem Ventrikelsystem in den Extrazellularraum. Damit ist es ein Symptomkomplex und keine Erkrankung. Wie beim zytotoxischen Ödem sind die graue und die weiße Substanz gleich stark betroffen.

Das Missverhältnis im Wasserhaushalt entsteht meist als Folge einer verminderten Resorption und nicht durch gesteigerte Bildung (Przyborowska et al., 2013), außer bei seltenen Choroidplexustumoren (Biel et al., 2013; Przyborowska et al., 2013). Die verminderte Resorption kann aufgrund eines obstruktiven, auch bekannt als nicht kommunizierender Hydrozephalus entstehen. Dabei kommt es zu

## Einleitung

Abflussstörungen, wenn beispielsweise eine Entzündung oder ein Tumor den Weg des Liquors in den Subarachnoidalraum verhindert, wo der Liquor normalerweise resorbiert werden würde (Przyborowska et al., 2013).

Beim kommunizierenden Hydrozephalus ist die verminderte Resorption meist die Folge eines entzündlichen Prozesses (Przyborowska et al., 2013). Eine Meningitis beispielsweise ist in der Lage den Resorptionsraum des Liquors, den Subarachnoidalraum, zu schädigen. Weiterhin wird ein Hydrozephalus in kongenitale und erworbene Formen unterteilt. Die Hauptrolle von AQP4 bei einem hydrozephalischen Ödem scheint kompensatorisch zu sein, über die genauen Mechanismen herrscht aber Uneinigkeit (Owler et al., 2010).

### 1.4 Der Hund als Hydrozephalus Modell

Diese Uneinigkeit entsteht durch Limitationen der bisherigen Grundlagenforschung im Bereich der hydrozephalischen Ödeme. Eine Limitation sind die vorhandenen Modelle. Die meisten Studien bedienen sich für Studien an AQP4 Knockout Mäusen als Tiermodell. Die erste AQP4 Knockout Maus wurde von Verkman et al. in San Francisco gezüchtet, es folgten Mäuse aus Nanjing und Oslo (Papadopoulos & Verkman, 2013). Die verschiedenen Stämme bringen allerdings uneinheitliche Resultate. Die Nanjing Mäuse zeigen zum Beispiel als einzige Knockout Maus Variante Störungen der Blut Hirn Schranke (Papadopoulos & Verkman, 2013). Außerdem erleiden manche AQP4 Knockout Mäuse einen congenitalen obstruktiven Hydrozephalus andere jedoch nicht (Filippidis et al., 2011). Die Aussagekraft von Studien an Knockout Mäusen ist somit limitiert (Filippidis et al., 2011).

Erschwert wird diese Problematik für die Untersuchung von hydrozephalischen Ödemen. Ein Hydrozephalus bei Mäusen wird über eine Injektion von Kaolin oder L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholine Stearyl in den Subarachnoidalraum ausgelöst. Dadurch wird die Resorption des Liquors verhindert, es kommt zu einem Liquorstau und folgend zu einem Hochdruckzustand. Diese Art von Hydrozephalus ist immer artifiziell. Möchte man Beobachtungen an einem congenitalen Hydrozephalus durchführen, ist dies zwar an den sogenannten Ht-x Ratten möglich, die einen solchen congenitalen Hydrozephalus präsentieren. Sowohl die Ratten, als auch die Mäuse zeigen jedoch einen nicht kommunizierenden Hydrozephalus. Der

## Einleitung

kommunizierende Hydrozephalus kommt bei Menschen (Papadopoulos & Verkman, 2007) und bei Hunden (Schmidt et al., 2016) jedoch häufig vor. Maus und Ratte bilden hier also nur einen kleinen Teil des relevanten Krankheitsbildes ab. Um ein umfassendes Bild über die Rolle von AQP4 bei hydrozephalischen Ödemen zu bekommen bedarf es neuer Modelle. Der **Hund** eignet sich aus folgenden Gründen gut als Modell für eine große Bandbreite von hydrozephalischen Ödemen.

- Der obstruktive Hydrozephalus ist die häufigste kongenitale Erkrankung des Nervensystems bei Hunden und tritt am häufigsten bei kleinen Hunden und sogenannten Toyrassen auf (Biel et al., 2013).
- Der angesprochene kommunizierende Hydrozephalus kommt beim Hund häufig vor (Schmidt et al., 2016). Diese Hunde sind oft Patienten von spezialisierten Kliniken und somit Patienten von Forschungseinrichtungen, die sich mit der AQP4 Grundlagenforschung beschäftigen.
- Die derzeitige Operation der Wahl zur Behandlung eines Hydrozephalus ist ein peritonealer Shunt. Eine Operation die mit Komplikationen verbunden ist (Biel et al., 2013) und häufig tödlich endet. Mit Einverständnis der Besitzer können diese an ihrer Erkrankung verstorbenen Patienten als Spender für Probenmaterial dienen, an dem wertvolle Erkenntnisse über das Zusammenspiel von AQP4 und hydrozephalischen Ödemen unter verschiedenen Bedingungen erlangt werden können. Die Menge an Tierversuchen würde so minimiert werden, da keine Mäuse oder Ratten als Versuchstiere nötig sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden großen Nutzen für Veterinärmedizin und Humanmedizin bringen. Obwohl es Bestrebungen gibt manche der angesprochenen Toyrassen über Rückzüchtungen von ihrem Hydrozephalus zu befreien, würden die Hunde maßgeblich von einer medikamentöse Therapieoption anstatt eines operativen Eingriffes profitieren. Voraussetzung hierfür ist jedoch zuerst die Etablierung einer Methode zur Darstellung von AQPs im Hirn von Hunden. Bisher wurde AQPs noch nicht im Gehirn von Hunden untersucht (Iacovetta et al., 2012).

Eine Arbeit von Schmidt et al. hat kürzlich erstmals AQP1 und AQP4 im Liquor von Hunden mit idiopathischem, kommunizierendem Hydrozephalus nachweisen können (Schmidt et al., 2016). Sie fanden heraus, dass AQP4 im Liquor von Hunden mit Hydrozephalus gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war.

## Einleitung

Interessanterweise sank die Menge an AQP4 im Liquor nach einer chirurgischen Drucksenkung mittels ventrikulo-peritonealen Shunts wieder. Schmidt et al. kamen zu dem Schluss, dass im Anschluss an ihre Arbeit die Verteilung von AQP4 im Gehirn von Hunden untersucht werden sollte.

Zur Darstellung der Verteilung von AQP4 im Gehirn hat sich bei Mäusen und Ratten die Immunfluoreszenz als Methode der Wahl etabliert. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten ist deshalb das Ziel die Immunfluoreszenz auch beim Hund zu etablieren. Anders als bei Labornagern kann das Gehirnmaterial von in einer Klinik verstorbenen Hunden nur unzureichend standardisiert werden. Trotzdem müssen die gewonnenen Ergebnisse untereinander vergleichbar sein. Daher muss das angestrebte Immunfluoreszenzprotokoll robust gegenüber externen Faktoren, wie Rasse, Alter, Vorerkrankung, Vorbehandlung und Fixationsmethode sein.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit verfolgt das Ziel einen Grundstein für die Forschung im Bereich der kaninen Aquaporine zu legen. **Primär soll über eine Immunfluoreszenz eine zuverlässige Darstellung von AQP4 im kaninen Gehirn aus unterschiedlichem Probenmaterial ermöglicht werden.**

Dadurch wird es möglich sein auf ein Modell für den kongenitalen Hydrozephalus zurückzugreifen. Dies ist mit den bisherigen Maus- und Rattenmodellen nicht durchführbar. Weiterhin können neue Erkenntnisse über die Entstehung und den Verlauf von hydrozephalischen Ödemen beim Hund gewonnen werden. Die vorliegende Arbeit ist auf die Etablierung einer Immunfluoreszenz ausgelegt, **sekundär sollen zusätzlich Beobachtungen zur Verteilung von AQP4 im kaninen Gehirn dokumentiert und eingeordnet werden.**

## 2 Grundlagen der genutzten Labortechniken

### 2.1 Grundlagen der Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion („PCR“ nach dem englischen Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter Gensequenzen. Dabei kann sowohl ein- als auch doppelsträngige DNA vervielfältigt werden. Mittels eines Primers, der den Startpunkt der zu vervielfältigenden DNA markiert, Nukleotiden als Bausteine der neuen DNA und DNA-Polymerase als Katalysator der Reaktion verläuft die PCR in Zyklen und läuft heute vollautomatisch in einem sogenannten Cycler ab. Jeder Zyklus dauert einige Minuten und es werden insgesamt 30 bis 40 Zyklen durchgeführt. Dabei dienen die Produkte des letzten Zyklus als Ausgangsstoff des neuen Zyklus. Die Menge an DNA steigt somit exponentiell.

Während eines Zyklus wird die Probe auf 94°-96° Celsius erhitzt, deshalb musste in den ersten Jahren nach Etablierung der Technik nach jedem Zyklus die thermoinstabile DNA-Polymerase nachgefüllt werden. Erst mit dem Einsatz der taq-Polymerase konnte dieser Schritt entfallen und die PCR so deutlich beschleunigt werden. Die taq oder thermus aquaticus Polymerase entstammt einem in Geysiren lebenden Bakterium und ist sehr hitzestabil. Damit kann es für mehrere Zyklen einer PCR genutzt werden.

Ein PCR Zyklus verläuft in drei Schritten. Zuerst wird die DNA in der Phase der Denaturierung auf die angesprochene Temperatur von 94°-96° Celsius erhitzt. Dabei trennt sich doppelsträngige DNA auf. Eine rasche Abkühlung auf 65° Celsius verhindert, dass sich die Stränge wieder in einer Doppelhelix aneinander legen. Anschließend wird in der Phase der Primer Bindung der Primer an die Einzelstränge gebracht. Eine für den Primer spezifische Temperatur ist bei diesem Schritt wichtig um zu verhindern, dass der Primer sich an ungewollte Sequenzen der Einzelstränge anlagert.

Zuletzt werden in der Phase der Elongation, ausgehend vom Primer die Stränge wieder mit den zur Verfügung gestellten Nukleotiden aufgefüllt. Dabei entstehen neben den Strängen in gewollter Länge auch solche, die zu kurz oder zu lang sind. In einer klassischen PCR wurden die entstandenen Stränge nach Abschluss des letzten Zyklus auf ein Agarosegel aufgetragen, dort elektrophoretisch getrennt und die Banden betrachtet. Bei einer modernen Real-Time PCR („rtPCR“),

## Grundlagen der genutzten Labortechniken

wird die Menge an entstehenden Strängen schon während der Zyklen gemessen. Dies geschieht über einen Fluoreszenzmarker, der erst bei entstehen der DNA fluoresziert. In Echtzeit kann nun gemessen werden, wie viel DNA vervielfältigt wurde. Dabei entsteht ein Graph, der in drei Abschnitte unterschieden werden kann.

1. Die exponentielle Phase, bei der genügend Nukleotide vorhanden sind, so dass sich die DNA Menge in jedem Zyklus verdoppeln kann.
2. Die lineare Phase, bei der die Reaktion sich verlangsamt.
3. Die Plateau Phase, bei der die Ausgangsstoffe aufgebraucht sind und die Vervielfältigung zum Erliegen kommt.

Bei der rtPCR ist gegenüber einer herkömmlichen PCR die Sensitivität höher, die Quantifizierbarkeit in Echtzeit messbar und es entfällt der zeitaufwändige und mit toxischen Substanzen verbundene Schritt der Gelelektrophorese.

Während aller Zyklen wird bei der rtPCR über die Fluoreszenz die Menge an neu gebildeter DNA gemessen. Zu jeder Zeit besteht jedoch eine Fluoreszenzhintergrundstrahlung. Um diese nicht in Messungen einfließen zu lassen, wird der Zyklus gemessen, in dem die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Dieser Zyklus wird Cycle threshold („Ct“) genannt.

Über den Vergleich mit sogenannten housekeeping Genen lassen sich Variationen zwischen verschiedenen Proben ausgleichen. Dies sind Gene, die immer und in gleichmäßig verteilter Menge produziert werden und von denen somit bekannt ist, wie viel DNA in einer definierten Probe zu erwarten ist. Die Differenz zwischen dem Zielgen und dem housekeeping Gen wird als  $\Delta\text{Ct}$ -Wert bezeichnet. In dieser Arbeit wurden die housekeeping Gene  $\beta$ -Actin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase („GAPDH“) eingesetzt.

Die rtPCR wurde in dieser Arbeit als Nachweis von AQP4 auf Genlevel genutzt. Zusammen mit den anderen genutzten Nachweismethoden für AQP4 kann so ein genaues Bild über die Darstellungsleistung des Immunfluoreszenz Protokolls gezeichnet werden.

### 2.2 Grundlagen der Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz werden gesuchte Antigene für das menschliche Auge sichtbar gemacht. Antigene können Proteine, Lipide, Kohlenhydrate oder Nucleinsäuren sein. Jedes Bakterium, jedes Virus, aber auch jede Körperzelle besitzen spezifische Antigene, die von Organismen erkannt werden können. Dies ist möglich durch Bindungsstellen für Antikörper nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip, genannt Epitope.

Im Falle dieser Arbeit war die Darstellung von AQP4 im Hirngewebe das Ziel. Dafür wurden vorgefertigte Primärantikörper genutzt, die laut Hersteller ausschließlich an Antigene von AQP4 binden. Der Schlüssel ist speziell für das Schloss hergestellt worden um bei dem genutzten Bild zu bleiben. Die Spezifität des genutzten Antikörpers wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals überprüft. Die Verbindung von Schlüssel und Schloss, von Antikörper und Epitop, wird über Sekundärantikörper sichtbar gemacht, die über einen fluoreszierenden Zusatz leuchten können.

Antikörper sind Proteine der Klasse der Globuline und werden von B-Lymphozyten gebildet. Zur Bildung von Antikörpern werden Lymphozyten, genauer deren Unterform die B-Lymphozyten, durch den Kontakt mit Antigenen im Rahmen der Immunantwort angeregt. Antikörper dienen Organismen unter anderem dazu unbekannte Antigene, z.B. von Krankheitserregern, von bekannten Antigenen, z.B. körpereigene Zellen, zu unterscheiden.

Es gibt verschiedene Klassen von Antikörpern. Bei Säugetieren unterscheidet man: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Alle Klassen bestehen aus zwei schweren Ketten, den heavy-chains, und zwei leichten Ketten, den light-chains, die durch kovalente Disulfidbrücken aneinander binden. Zusammen ergeben die Ketten eine Ypsilonform, siehe Abbildung 4. Das untere Ende des Ypsilon ist das Fc-Fragment. Hiermit binden Antikörper spezifisch an das Epitop von Antigenen. Die oberen beiden Enden werden Fab-Fragment genannt.

Durch gesteuerte Rekombinationsprozesse kann ein Organismus die Antigenbindungsstellen hoch variabel bilden. Dadurch ist eine sehr spezifische Anpassung an das Epitop möglich.

## Grundlagen der genutzten Labortechniken

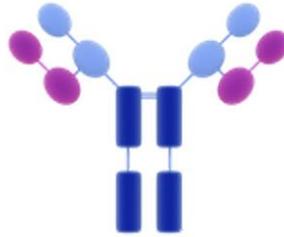


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Antikörpers.

Die blauen Abschnitte stellen die heavy-chains dar, die roten die light-chains. Die Fab-Fragmente sind rund dargestellt, die Fc-Fragmente eckig.

Eigene Abbildung.

Trotz dieser Spezifität kommt es vor, dass Antikörper nicht nur an ihren Antigenen binden, wenn man sie im Labor auf eine Probe aufbringt. Durch Ladungen oder Proteinstrukturen leidet die Antigenspezifität sonst sehr spezifischer Antikörper, es entstehen Artefakte. Daher müssen vor dem Aufbringen von Antikörpern auf eine Probe diese unerwünschten Stellen geblockt werden. Hierfür wurde die Probe mit Normalserum des Esels inkubiert. Wird anschließend der Antikörper aufgebracht bindet er nur an die für ihn spezifischen Epitope.

In dieser Arbeit wurde ein AQP4 Primärantikörper der Firma Santa Cruz mit der Bezeichnung **AQP4 (H-80 )**: **sc-20812** (LOT#B1315) verwendet (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 2016). Dieser Antikörper bindet an die Aminosäuren 244-323 im C-Terminus von humanem AQP4. Durch Computermodelle wurde eine Passung auf die identische Stelle in der Maus, der Ratte, equinem, bovinem, porcinem und kaninem AQP4 bestimmt. Diese Arbeit diente unter anderem dazu, die vorhergesagte Spezifität auf kanines AQP4 zu verifizieren, da dies vorher noch nicht praktisch durchgeführt wurde.

Im nächsten Schritt werden die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein sekundärer Antikörper, der an den primären Antikörper bindet verwendet. Der Primärantikörper hat die Aufgabe spezifisch an AQP4 zu binden. Der

## Grundlagen der genutzten Labortechniken

Sekundärantikörper ist jedoch nicht gegen den Primärantikörper gerichtet, sondern gegen alle Antikörper einer bestimmten Tierart.

Der in dieser Arbeit verwendete AQP4 Primärantikörper ist aus dem Kaninchen gewonnen. Das heißt er wurde in einem Kaninchen als Wirtstier gezüchtet. Als Sekundärantikörper wird also ein anti-Kaninchen Antikörper genutzt. Benutzt man Primärantikörper aus verschiedenen Tierarten und kombiniert diese mit passenden Sekundärantikörpern, kann man eine Doppel- oder Dreifachfärbung erzielen.

Der Sekundärantikörper besitzt gekoppelt an sein Fc-Fragment ein Fluorochrom, in diesem Fall Cy3, siehe Abbildung 5. Dieses emittiert, wenn es mit spezifischen Wellenlängen in einem Fluoreszenzmikroskop bestrahlt wird, rotes Licht im für das menschliche Auge sichtbaren Spektrum. Das rote Licht kann im gleichen Mikroskop über eine Kamera aufgefangen und digital als Bild dargestellt werden.

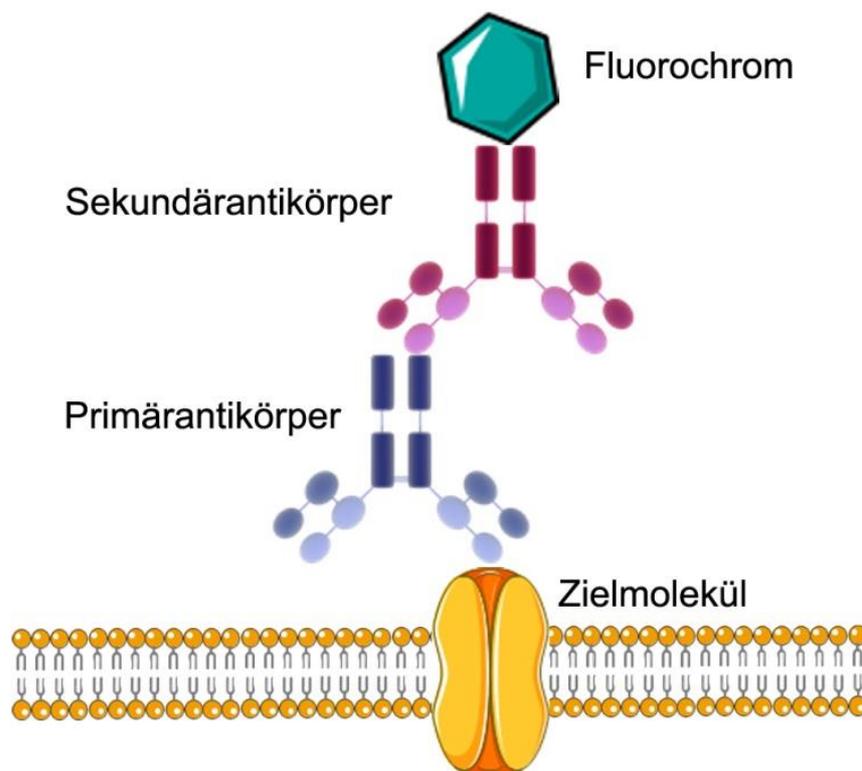


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Immunfluoreszenz.

Der Primärantikörper bindet mit seinem Fab-Fragment an sein Zielmolekül. Der Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Das Fluorochrom ist an den Sekundärantikörper gekoppelt und emittiert bei Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen sichtbares Licht.

Eigene Abbildung.

## Grundlagen der genutzten Labortechniken

Um eine Aussage über die Verteilung von AQP4 im Hirngewebe treffen zu können, wurde parallel zum AQP4 Primärantikörper ein weiterer Primärantikörper gegen Glial fibrillary acidic protein („GFAP“) eingesetzt. Dieses Protein ist Hauptbestandteil des Zytoplasmas von Astrozyten, und dient damit als Astrozytenmarker.

Wie beschrieben richten sich Sekundärantikörper ausschließlich gegen eine Spezies. Würde man die Primärantikörper für AQP4 und GFAP beide aus dem Kaninchen gewinnen, bände der eingesetzte Anti-Kaninchen Sekundärantikörper aus der Maus unspezifisch an beide Primärantikörper und beide würden rot leuchten. Für GFAP wurde deshalb ein Primärantikörper aus der Maus und ein Anti-Maus Sekundärantikörper aus dem Kaninchen mit Alexa488 gewählt. Alexa488 leuchtet grün, so ist eine Unterscheidung zwischen rotem AQP4 und grünem GFAP möglich.

Zusätzlich wurden die Zellkerne mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid („DAPI“) dargestellt. DAPI ist in der Lage sich an adeninreiche Regionen in DNA anzulagern. Es emittiert bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht blaues sichtbares Licht. Die dafür benötigte ultraviolette Strahlung bleicht die anderen Fluorochrome aus, weshalb DAPI bei der mikroskopischen Auswertung stets zuletzt und nur kurz beleuchtet wird.

In Tabelle 1 sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen von Cy3, Alexa488 und DAPI aufgeführt.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge in nm	Emissionswellenlänge in nm
Alexa488	495	510-540 grün
Cy3	550	360-660 rot
DAPI	358	641 blau

Tabelle 1: Verwendete Fluorochrome mit Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Ziel dieser Arbeit ist es ein Immunfluoreszenzprotokoll zu definieren, dass

- für verschieden aufbereitete Proben einheitlich anwendbar ist und
- sicher die gesuchten Zielstrukturen anfärbt.

## Grundlagen der genutzten Labortechniken

Um das finale Immunfluoreszenzprotokoll definieren zu können bedurfte es einer Reihe Vortests, wie in Abbildung 6 dargestellt.

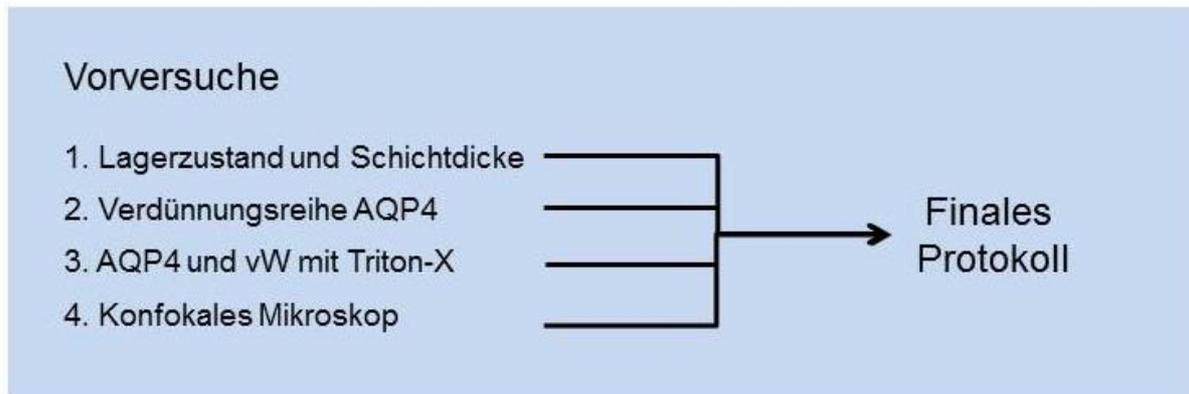


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Vorversuche.

### 2.3 Grundlagen des Konfokalen Mikroskops

Ein Konfokales Mikroskop erlaubt es Licht aus einem einzelnen Fokuspunkt zu sammeln. Anschließend werden alle Fokuspunkte einer Ebene digital zu einem Bild zusammengefügt. Mittels eines Lasers wurde ein Fokuspunkt beleuchtet. Anders, als bei einem Durchlichtmikroskop wurde also nur ein einzelner Punkt beleuchtet und nicht die gesamte Probe. Zur Anregung der Fluorochrome wurden ein Argonlaser und ein Helium Neon Laser benutzt. Diese Laser regten gleichzeitig die Fluorochrome, wie bei dem bisher verwendeten Fluoreszenzmikroskop, und die Probe an sich, wie bei einem gewöhnlichen Durchlichtmikroskop ohne Fluoreszenz, an. Es entstand ein Anregungslicht und ein Fluoreszenzlicht.

Mittels der Optik des Mikroskops wurde das aus dem Fokuspunkt emittierte Licht in den Konfokalfokus geleitet. Hier sorgte eine Lochblende dafür, das anfallende Streulicht herauszufiltern und so den Fokuspunkt weiter zu schärfen. Gleichzeitig wurde über einen dichroischen Spiegel das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt. Zur Auswertung der Lichtsignale der Fluorochrome wurde lediglich das Fluoreszenzlicht weiter verarbeitet.

Das jetzt stark fokussierte Fluoreszenzlicht beleuchtete einen Punktdetektor, der das Lichtsignal in ein elektronisches Signal zur digitalen Weiterverarbeitung umwandelte. Anschließend wurde mittels der beam-scanning Methode der Fokuspunkt verschoben. Dies bedeutet, dass über Scanspiegel der Laser einen

## **Grundlagen der genutzten Labortechniken**

Bildpunkt weiter gelenkt wird. Ist dieser beleuchtet wandert der Laser weiter bis die gesamte Ebene beleuchtet wurde. Dieser Prozess dauerte je nach Größe der Probe bis zu 30 Minuten.

Mittels des Computerprogramms Leica Confocal Software wurden die einzelnen Bildpunkte zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Dieses Bild bietet den Vorteil, dass es eine definierte Ebene abbildet und alle anderen Ebenen der Probe ignoriert. So ist eine zuverlässige Aussage über die Kolokalisation von Signalen möglich. Konfokalmikroskopie ist vor allem im subzellulären Bereich notwendig, um Kolokalisationen sichtbar zu machen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Gehirnmaterial

Für diese Arbeit wurden die Gehirne von Hunden genutzt, die aufgrund einer Erkrankung euthanasiert werden mussten und deren Besitzer der weiteren Verwendung durch die Kleintierklinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen zugestimmt haben.

##### 3.1.1 Geräte- und Materialliste Probenmaterial

- EasyVet, IFS Informationssysteme GmbH, Hannover, Deutschland
- Deckgläschen, 24x60mm, Stärke 1, Menzel GmbH, Braunschweig
- Formalin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
- Kryostat Typ HM 500, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
- Objektträger 26x76mm, Menzel GmbH
- Parafilm, Roth Laborbedarf, Karlsruhe, Deutschland
- Pentobarbital-Natrium, Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
- Tissue-Freezing Medium, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
- Trockeneis, Balser, Lich, Deutschland
- Sucrose, Sigma-Aldrich, LOT#SZBA3080V

##### 3.1.2 Probenmaterial

Um in die Studie aufgenommen zu werden mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein:

- Der Hund ist älter als ein halbes Jahr.
- Der Hund muss primär in der Kleintierklinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen behandelt worden sein.
- Der Hund muss dort mittels Pentobarbital als letzte Maßnahme der Behandlung euthanasiert worden sein.
- Das Gehirn muss nach Euthanasie des Hundes zügig entnommen und fixiert worden sein.
- Eine vollständige Akte der Erkrankung, die zur Euthanasie geführt hat, muss vorliegen.
- Eine Ventrikelvergrößerung musste mittels MRT an der Kleintierklinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen belegt worden sein. Lag keine

## Material und Methoden

Ventrikelvergrößerung vor, musste dies am geteilten Gehirn durch den Autor und durch den Chefarzt der Neurologie bestätigt werden.

- Die Besitzer des Hundes müssen ihr Tier der Kleintierklinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung stellen.

Außerdem durften folgende Ausschlusskriterien nicht erfüllt sein:

- Der Hund erlitt ein Schädel-Hirn Trauma (ausgenommen dokumentierte chirurgische Intervention an der Kleintierklinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen).

Die Gehirne wurden auf drei unterschiedliche Arten fixiert. So konnte überprüft werden, ob die zu etablierende Methode bei unterschiedlich verarbeitetem Probenmaterial vergleichbare Ergebnisse bringt. Bei einer zukünftigen Anwendung im normalen Klinikalltag ist zu erwarten, dass Probenmaterial unterschiedlich fixiert werden wird. Die folgenden drei Arten stellen die üblichsten Fixationsmethoden dar:

- Nach chirurgischer Entnahme aus dem Schädel direkt gefroren.
- Nach chirurgischer Entnahme aus dem Schädel in Formalin fixiert.
- Ohne chirurgische Entnahme aus dem Schädel in Formalin fixiert.

Wurde das Gehirn nach Eintreten des Todes chirurgisch entnommen und direkt gefroren, so wurde zuerst der Kopf vom restlichen Tierkörper getrennt. Von ventral wurden dafür im Atlanto-Okzipitalgelenk die Ligamenta lateralis atlantis durchtrennt, das Gelenk exartikuliert und nachfolgend die Temporalismuskulatur entfernt.

Um an das Gehirn zu gelangen, wurde der Schädel eröffnet. Mittels einer Säge wurde ein Querschnitt hinter dem lateralen Augenwinkel und ein Längsschnitt vom Foramen occipitale bis zum Endpunkt des ersten Schnittes gesetzt. Die nun lose Schädeldecke wurde entfernt und die Hirnhäute, sowie die Hirnnerven mit einem Skalpell durchtrennt. Anschließend konnte das Gehirn entnommen und in zwei Hemisphären getrennt werden.

Eine Hemisphäre wurde mit Parafilm umwickelt und in luftdicht verschlossenen Plastiktüten verpackt. Anschließend wurde sie bei  $-80^{\circ}$  Celsius gefroren. Die andere Hemisphäre wurde in 10-%igem Formalin bei Raumtemperatur gelagert. So ist ein direkter Vergleich am selben Gehirn zwischen frisch gefrorener und in Formalin fixierter Probe möglich. Alternativ wurde das Gehirn, wie

## Material und Methoden

beschrieben, entnommen und beide Hemisphären in 10-%igem Formalin bei Raumtemperatur gelagert. Als letzte Option wurden die Köpfe abgetrennt und im Ganzen in 10-%igem Formalin bei Raumtemperatur gelagert. Durch das offene gelegte Foramen Magnum konnte Formalin in das Neurocranium eindringen. Nach 12 Monaten wurden die Gehirne, wie bei den anderen Fixierungsmethoden entnommen und in 10-%igem Formalin gelagert, bis sie verarbeitet wurden.

### 3.1.3 In Formalin fixierte Gehirne

Die in Formalin fixierten Gehirne wurden aus dem Formalinbad entfernt und entlang der Achsen in Abbildung 7 geteilt, so dass der dritte Ventrikel in einer etwa 3 cm breiten Tranche zugänglich wurde. Anschließend wurde aus der Tranche ein Teilstück des Dachs des III. Ventrikels geschnitten. Für Gehirne von Hunden mit erweiterten Ventrikel, wie in Abbildung 8 links und für Hunde mit normalem Ventrikel, wie in Abbildung 8 rechts dargestellt. Zusätzlich wurde eine Probe aus dem Zentrum des Kleinhirns gewonnen. Alle Teilstücke sind in ihrer Größe an Objektträger angepasst.

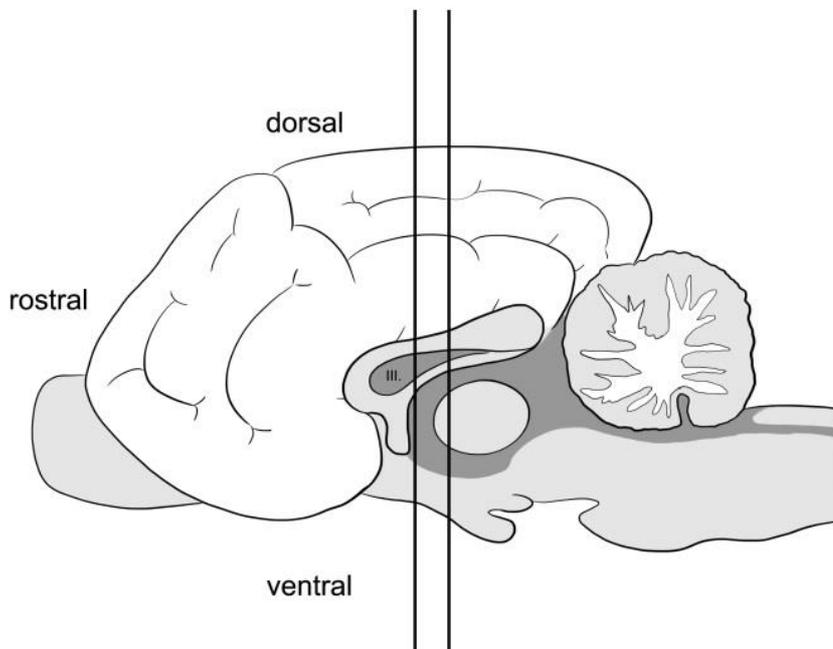
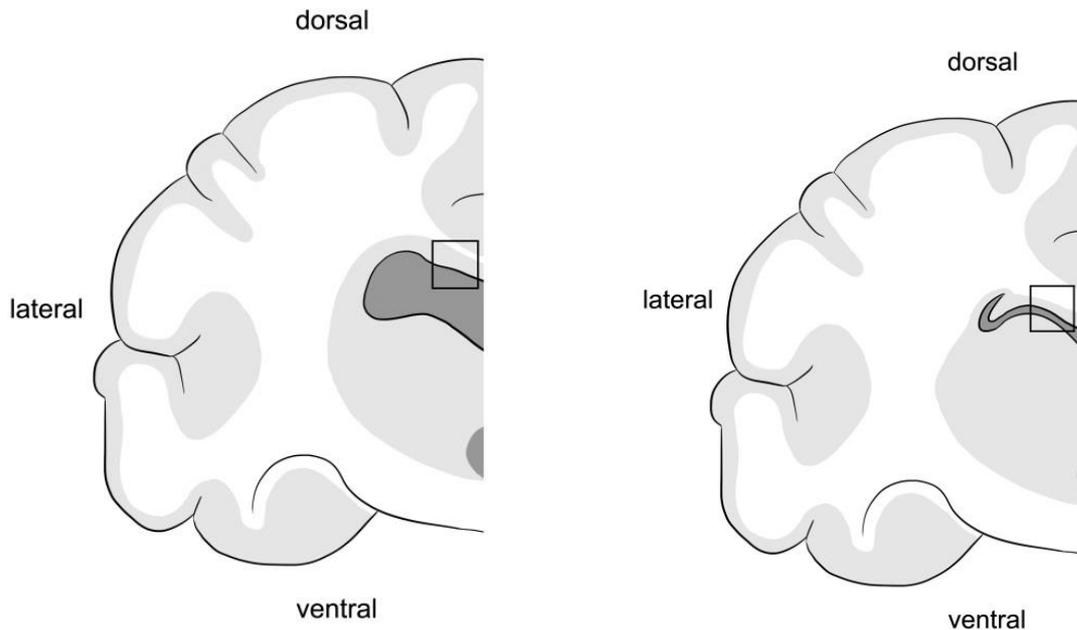


Abbildung 7: Teilungsachsen der Probengehirne.

Entlang der eingezeichneten Achsen wurden die Probengehirne geschnitten, so dass eine Tranche entstand.

Eigene Abbildung.

## Material und Methoden



**Abbildung 8:** Teilstück aus dem Dach des III. Ventrikels eines Hundes mit erweitertem Ventrikel (links) und mit normalem Ventrikel (rechts) zur weiteren Verarbeitung.

Eigene Abbildung.

Nach der Teilung wurden die Proben in 20%ige, in PBS angesetzte Sucroslösung eingelegt, um das Wasser in den Proben durch Sucrose zu ersetzen. Im Gegensatz zu Wasser friert Sucrose nicht in Kristallen sondern in einer homogenen Matrix. Diese erhält die Integrität der einzelnen Zellen sowie den Zusammenhalt zwischen den Zellen. Außerdem hat die Sucrosematrix gegenüber Kristallen von wässrigen Lösungen den Vorteil, dass sie sich leichter schneiden lässt und so Schneideartefakten bei der späteren Bearbeitung im Kryostaten vorbeugt. Nach 24 Stunden wurde die Lösung erneuert und nach weiteren 24 Stunden waren alle Proben abgesunken, was einen abgeschlossenen Austausch von Wasser durch Sucrose anzeigt. Nach dem vollständigen Austausch wurden die Proben der Sucroslösung entnommen und in einem Gefäß gleichmäßig von allen Seiten mit Trockeneis bedeckt, bis sie schockgefroren waren. Anschließend wurden die Proben, die nicht zur direkten Weiterverarbeitung gedacht waren in Parafilm und Alufolie eingewickelt und in luftdicht verschlossenen Plastiktüten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.1.4 Direkt gefrorene Gehirne

Um sie für das Schneiden vorzubereiten wurden die direkt gefrorenen Gehirne für 30 Minuten bei  $-45^{\circ}$  Celsius aufgewärmt. Anschließend erfolgte eine weitere Temperaturangleichung für weitere 30 Minuten im Kryostaten bei einer Kammertemperatur von  $-23^{\circ}\text{C}$  und einer Blocktemperatur von  $-13^{\circ}\text{C}$ . Mit einem gekühlten Messer erfolgte dann analog zu den in Formalin fixierten Gehirnen eine Teilung in eine Tranche und schließlich in einzelne Proben des Ventrikelbereichs sowie in eine Probe aus dem Kleinhirn.

Die nicht zur weiteren Verarbeitung benötigten Proben wurden in Parafilm und Alufolie eingewickelt und in luftdicht verschlossenen Plastiktüten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.1.5 Bearbeitung der Proben am Kryostaten

Die Proben wurden mittels Tissue Freezing Medium auf einem Metallstempel aufgefroren und dann mit  $10\mu\text{m}$  oder  $20\mu\text{m}$  Schichtdicke geschnitten. Alle Arbeitsschritte erfolgten innerhalb der Kühlkammer des Kryostaten, die auf  $-23^{\circ}\text{C}$  und dessen Block auf  $-13^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurde.

Jeweils mehrere Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgebracht. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin sorgt durch positive Ladung dafür, dass die negativen Ladungen des Gewebes stärker auf dem Objektträger haften und sich bei späteren Arbeitsschritten nicht ablösen. Auf diese Weise wurden jeweils 20 Objektträger von allen Proben zur Verwertung in der Immunfluoreszenz gewonnen.

Zusätzlich wurden für eine PCR auf einem einzelnen Objektträger 20 Schnitte übereinander gelegt, mittels eines gekühlten Skalpells in einen Cortex und einen Ventrikelbereich unterteilt und dann in Eppendorfgefäße überführt. Bis zur Bearbeitung mittels einer PCR lagerten sie bei  $-80^{\circ}$  Celsius.

Die für die Immunfluoreszenz bestimmten Objektträger wurden in Objektträgerboxen sortiert und diese in luftdicht verschlossenen Plastiktüten bei  $-45^{\circ}$  Celsius aufbewahrt.

### 3.2 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Zum Nachweis der Gensequenzen von AQP4 wurde eine Real-Time Polymerase Kettenreaktion durchgeführt.

#### 3.2.1 Geräte- und Materialliste PCR

- M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), 5x First-Strand Buffer, DTT 0,1M, RNaseOUT), Invitrogen, San Diego, Vereinigte Staaten (Invitrogen heißt seit 2016 Thermo Fisher Scientific, das verwendete Kit stammt aber noch von vor der Umbenennung)
- Chloroform, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
- Deoxynucleotide (dNTP) 10mM, Sigma-Aldrich
- Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich
- DEPC H<sub>2</sub>O, 0,1% DEPC in Aqua bidest., eigene Herstellung
- Ethanol absolut, Sigma-Aldrich
- Homogenisator, SONOPULS, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
- Isopropanol, Sigma-Aldrich
- MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0,1ml, Applied Biosystems, Foster City, Vereinigte Staaten
- MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1ml, Applied Biosystems
- MicroAmp® 96-Well Support Base, Applied Biosystems
- MicroAmp® 96-Well Tray for VeriFlex® Blocks, Applied Biosystems
- MicroAmp® optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems
- Mikro Küvette (45x12,5x12,5mm; Schichtdicke 10mm) aus Quarzglas, Suprail®, Helma Analytics, Mühlheim, Deutschland
- Optical Adhesive Cover, Applied Biosystems
- Optical Flat 8-Cap Strip, Applied Biosystems
- Random Hexamers (Random Primers); 50µm in 10mM Tris-HCl; pH 8,3; Applied Biosystems
- RNase ZAP®, Sigma-Aldrich
- StepOne® Real-Time PCR System, Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems
- TRIzol®, Invitrogen

## Material und Methoden

- Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Thermo Scientific Waltham, Vereinigte Staaten

### 3.2.2 PCR Protokoll

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die benutzten Gerätschaften wurden vor der PCR mit RNase ZAP® gereinigt. Das für die PCR verwendete Probenmaterial stammt, wie beschrieben, aus den Gehirnschnitten der gleichen Hunde, die für die Immunfluoreszenz genutzt wurden.

Im ersten Schritt wurde das Gewebe mittels einer Ultraschallsonde zerkleinert. Gehirngewebe ist sehr fett- und polysaccharidreich, daher wurde eine Lösung aus Phenol und TRIzol® verwendet. Hierin lösten sich DNA Fragmente, der pH-Wert wurde gesenkt und Fette, sowie Polysaccharide lagerten sich nach einer Zentrifugation am Boden ab bzw. schwimmen auf der Oberfläche.

Nach Zugabe von Chloroform und erneuter Zentrifugation entstanden zwei Phasen. Die klare Phase enthielt die RNA und wurde isoliert. Die Zugabe von Isopropanol bewirkte ein Ausfällen der RNA. Diese wurde nach mehreren Waschschritten in RNase freiem Wasser („DEPC H<sub>2</sub>O“) gelöst, das durch die Mischung von Aqua bidest. und DEPC hergestellt wurde.

Photometrisch konnte nun die Optische Dichte („OD“) mit Licht der Wellenlänge 260nm über die Formel  $RNA = OD_{260} \times 40\mu g/ml$  bestimmt werden, da bei einem Wert von 1,0 eine Konzentration von 40µg/ml vorliegt. Durch die erneute Messung bei 280nm und Bildung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  wurde die Reinheit der Probe bestimmt. Werte niedriger als 1,6 weisen auf Verunreinigungen hin.

5µl der gelösten und auf ihre Reinheit geprüften RNA wurden mit DEPC H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt und über das Photometer durch Hinzufügen von RNase freiem Wasser auf 250µg/ml verdünnt. Die so auf die gleiche Konzentration gebrachten RNA Lösungen enthielten mRNA und mussten für die Nutzung in einer rtPCR in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde eine sogenannte reverse Transkriptase genutzt, wie sie in Retroviren vorkommt. Zum Einsatz kam das M-MLV Reverse Transcriptase Kit.

## Material und Methoden

4µl jeder RNA Probe wurde mit 7µl des im Kit enthaltenen Mixes im rtCycler für 5 Minuten bei 65° Celsius denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Es folgte die Zugabe der First-Strand Buffer, des DTT und der RNaseOUT und eine weitere Inkubation, diesmal für 2 Minuten bei 37° Celsius. Anschließend wurde die M-MLV RT, sowie die random Primer hinzugegeben und erneut für 10 Minuten bei 25° Celsius inkubiert. Zuletzt wurde die Mischung für 15 Minuten bei 70° Celsius inaktiviert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20° Celsius gelagert, bis sie für die rtPCR zum Einsatz kam.

Die rtPCR wurde mit 96-Well Platten durchgeführt. 1µl jeder Probe wurde mit 9µl PCR Mix, bestehend aus autoklaviertem Wasser, Mastermix und Primer, vermischt und doppelt bestimmt. Zur Kontrolle wurden zwei Negativkontrollen angelegt. Eine dieser Negativkontrollen enthielt DEPC H<sub>2</sub>O, die andere hochreines Wasser, anstatt cDNA.

Das untersuchte Gen war AQP4, die housekeeping Gene  $\beta$ -Actin und GAPDH. Die Genexpression wurde über den  $\Delta$ Ct-Wert bestimmt. Der niedrigste  $\Delta$ Ct-Wert dient als Kalibration für den  $\Delta\Delta$ Ct-Wert, indem er von den übrigen Werten subtrahiert wurde. Die Transkription errechnete sich durch die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , allerdings nur wenn die DNA Menge sich in jedem Zyklus verdoppelt. Dies ist im exponentiellen Teil der rtPCR der Fall.

Die Proben wurden durch das rtPCR System für 2 Minuten auf 50° Celsius erhitzt und die taq-Polymerase damit aktiviert. Anschließend folgten 35 Zyklen für jeweils 10 Sekunden bei 95° Celsius zur Denaturierung gefolgt von jeweils 30 Sekunden bei 60° Celsius zur Hybridisierung des Primers.

### 3.3 Immunfluoreszenz

Die Kernmethode dieser Arbeit ist die Immunfluoreszenz zur Darstellung von AQP4 im kaninen Gehirn.

#### 3.3.1 Geräte- und Materialliste Immunfluoreszenz

- Adobe Photoshop CS2, Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Alexa 488, Fluoresceinisothiocyanat, Sigma-Aldrich, LOT#1741782

## Material und Methoden

- AQP4 Primärantikörper, AQP4 (H-80 ): sc-20812, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Vereinigte Staaten
- Citifluor®, Cityfluor LTD, London, Vereinigtes Königreich
- Cy3 Donkey Anti-Rabbit Sekundärantikörper, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, Vereinigte Staaten, LOT#125364
- DAPI, 4,6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid, Mobitec, Göttingen, Deutschland
- Digitale Schwarz-weiß Kamera, Spot Insight, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50, Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
- GFAP Antikörper, Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland, LOT#2669950
- Immersionsöl, Refraktionsindex 1,51, Olympus Optical
- Konfokalmikroskop, Confocal Scanner Leica TCS SP2, Leica
- Leica Confocal Software, Leica
- Metamorph, Visitron Systems
- Normal Donkey Serum (NDS), PAA, Pasching, Österreich
- Objektträgermappen mit Deckel, LAT-Labor und Analysen Technik GmbH, Garbsen, Deutschland
- PAP Pen, Sigma-Aldrich
- Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt, Deutschland
- pH-Indikatorpapier, Merck
- Phosphate buffered saline (PBS), eigene Herstellung
- Polyclonal Rabbit Anti-Human von Willebrand Factor Antikörper, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland, LOT#00038421
- Poly-L-Lysin, Sigma, St. Louis, Vereinigte Staaten
- Reinstwassersystem Milli-Q Biocel, Millipore, Eschborn, Deutschland
- Stocklösung A, Sigma-Aldrich, LOT#BCBQ0066V
- Stocklösung B, Sigma-Aldrich, LOT#SZBE2860V
- Triton-X, Sigma-Aldrich

## Material und Methoden

### 3.3.2 Versuchsprotokoll 1: Lagerzustand und Schichtdicke

In diesem Versuchsprotokoll wurden nur in Formalin eingelegte Gehirne benutzt.

Ziel war es einerseits zu bestimmen, wie sich veränderte Lagerbedingungen auf dieses potenziell instabilere Probenmaterial auswirken und andererseits, wie sich in verschiedenen Schichtdicken geschnittene Proben verhalten.

Zu diesem Zweck wurden die in Formalin eingelegten Gehirne wie beschrieben verarbeitet und die gewonnenen Proben auf Objektträger aufgebracht. Ein Teil der Proben wurde im Kryostaten mit einer Schichtdicke von 10µm, der andere Teil mit 20µm geschnitten. Diese Proben wurden für vier Tage bei -65°C gelagert. Die übrigen Gehirnteile wurden bei -80°C mit Parafilm und Alufolie umwickelt und luftdicht in einer Plastiktüte verschlossen gelagert.

An Tag vier wurde aus den gleichen Gehirnteilen erneut Proben in den Schichtdicken 10µm und 20µm gewonnen und auf Objektträger aufgebracht. Es wurde mit denselben Gehirnteilen wie an Tag eins weitergearbeitet um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

	Primärer Antikörper #1	Primärer Antikörper #2	Lagerdauer	Schichtdicke
Lagerstatus	AQP4 1:250	GFAP 1:1000	4 Tage	20µm
Lagerstatus	AQP4 1:250	GFAP 1:1000	0 Tage	20µm
Lagerstatus	AQP4 1:250	GFAP 1:1000	4 Tage	10µm
Lagerstatus	AQP4 1:250	GFAP 1:1000	0 Tage	10µm

Tabelle 2: Schema Versuchsprotokoll 1 (Lagerzustand und Schichtdicke).

Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 8 Minuten getrocknet und währenddessen mit einem PAP Pen umrandet, um später ein stabiles Auftragen von Flüssigkeiten auf den Objektträgern zu erleichtern. Die getrockneten Objektträger wurden in 2%iger Paraformaldehydlösung („PFA“) fixiert. Durch freie

## Material und Methoden

Aminogruppen vernetzt PFA die Zellproteine und erlaubt den Antikörpern so einen besseren Zugang zu den Antigenen, während es gleichzeitig reaktive Prozesse in den Zellen beendet.

Nach der Fixation wurden die Objektträger in einer Glasküvette drei Mal fünf Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung („PBS“ für Englisch phosphate buffered saline) gewaschen. PBS diente als isotone Waschlösung während der gesamten Immunfluoreszenz.

In diesem Versuchsprotokoll wurden Primärantikörper gegen AQP4 (Rabbit, **Santa Cruz SC 20812 LOT#B1315**) und gegen GFAP (**TEMECULA MAB3402 LOT#2669950**) eingesetzt. Der Primärantikörper gegen AQP4 wurde 1:250 verdünnt, der gegen GFAP 1:1000. In allen Versuchsprotokollen, sowie im finalen Immunfluoreszenz Protokoll wurde die gleiche Charge AQP4 Primärantikörper genutzt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

300µl der Primärantikörper wurde im Anschluss an die Waschungen auf die Objektträger innerhalb des durch den PAP Pen vorgegebenen Rahmens aufgetragen und verblieb dort für 24 Stunden bei 4° Celsius. Während der 24 Stunden wurden die beschichteten Objektträger in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer aufbewahrt.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Objektträger drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend 300µl des sekundären Antikörpers aufgetragen. Da die Sekundärantikörper an Fluorochrome gekoppelt sind und diese bei übermäßiger UV Strahlung ausbleichen fanden alle Schritte ab Auftragen des Sekundärantikörpers in einer lichtarmen Umgebung statt. Der Cy3 anti-rabbit Sekundärantikörper wurde 1:600 und der Alexa488 donkey anti-mouse Sekundärantikörper 1:500 verdünnt. In einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer wurden die Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger drei Mal fünf Minuten in PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger mittels 1:10000 verdünntem DAPI für 15 Minuten einer Kernfärbung unterzogen.

Nach dreimaliger Waschung in PBS für jeweils fünf Minuten wurden die Objektträger mit Citifluor benetzt und mit Deckgläschen für die Mikroskopie vorbereitet. Um ein vergleichbares Ergebnis zwischen allen Proben einer

## Material und Methoden

Immunfluoreszenz zu gewährleisten wurden die Objektträger bis zum nächsten Tag in einer lichtundurchlässigen Mappe bei 4° Celsius gelagert und erst dann alle zeitnah zueinander ausgewertet.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Proben erfolgte an einem speziellen Mikroskop. Lichtfilter für verschiedene Wellenlängen wurden benutzt, um die einzelnen Fluorochrome anzuregen. Rot für AQP4, grün für GFAP, blau für DAPI. Zuerst wurden die Proben, durch den Autor mittels eines Zahlencodes verblindet, in rascher Folge einem optischen Screening unterzogen und die Leuchtkraft der einzelnen Kanäle nach einer vierstufigen Skala in nicht darstellbar, +, ++ oder +++ eingeordnet. Gleichzeitig wurden Bemerkungen über eventuelle Artefakte notiert. Anschließend wurde die Verblindung aufgehoben und Fotos aller drei Farbkanäle in den Vergrößerungen 10x, 20x, 40x, 100x mit einer speziellen schwarz-weiß Kamera aufgenommen.

Da mit einem einzelnen Foto, auch in einer geringen Vergrößerung, nur ein Teil der Probe abgebildet werden kann wurden vergleichbare Bereiche ausgewählt. Ein Bereich der Großhirnproben bildete den Ventrikelrand ab, der andere den Cortex. Die Kleinhirnproben wurden so ausgerichtet, dass der granule cell layer sichtbar war. Mittels der Software Metamorph wurden die Bilder der einzelnen Kanäle digital zu einem dreifarbigen Bild zusammengefügt.

### 3.3.3 Versuchsprotokoll 2: Verdünnungsreihe AQP4

In diesem Versuchsprotokoll wurde bestimmt, wie sich eine stärkere Verdünnung des AQP4 Primärantikörpers auf die Bildqualität auswirkt. Der Antikörper wurde 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:2000 verdünnt eingesetzt. Alle anderen Parameter und Abläufe entsprechen denen aus Versuchsprotokoll 1.

### 3.3.4 Versuchsprotokoll 3: AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X

Während die ersten beiden Versuchsprotokolle sich auf die Optimierung der Darstellbarkeit konzentrieren, wurden in den Versuchsprotokollen 3 und 4 Hinweise darauf gegeben, dass der AQP4 Primärantikörper tatsächlich an AQP4 bindet. Theoretisch ist es möglich, dass der AQP4 Primärantikörper an ein anderes Antigen bindet und so nicht AQP4 dargestellt wird.

## Material und Methoden

Da bekannt ist, dass AQP4 vor allem in den Astrozytenendfüßen polarisiert und diese die Gefäßwände bilden, wurde im Versuchsprotokoll 3 der Primärantikörper gegen GFAP gegen einen gegen von Willebrand Faktor („vW“) gerichteten Primärantikörper ersetzt. Von Willebrand Faktor kommt in Endothelzellen vor und ermöglicht so die Darstellung von Gefäßwänden. vW wurde mittels eines an Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpers grün dargestellt. So kann die Lokalisierung von AQP4 in Relation zu Gefäßen beurteilt werden. Bindet der AQP4 Primärantikörper tatsächlich an AQP4 sollte das Rotsignal um Gefäße besonders stark sein. Der primäre Antikörper gegen AQP4 wurde 1:250 verdünnt, der primäre Antikörper gegen vW 1:2000.

Als Negativkontrolle wurde bei einem Objektträger der primäre AQP4 Antikörper nicht aufgetragen. Ist der Sekundärantikörper spezifisch sollte die Negativkontrolle frei von rotem Signal sein.

In diesem Versuchsprotokoll wurde die PBS mit Octoxinol 9 (Markenname Triton-X) versetzt. Triton-X erhöht die Membrandurchlässigkeit von Zellen ohne Proteine zu denaturieren. Dadurch kann die Bindung von Antikörpern, speziell an schwer zugängliche Antigene, verstärkt werden. Für manche Antikörper kann die Zugabe von Triton-X jedoch nachteilige Wirkungen haben. Die verschiedenen Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

In diesem Versuchsprotokoll wurden nur Objektträger von direkt gefrorenen Gehirnen benutzt. Alle anderen Parameter und Abläufe entsprechen denen aus Versuchsprotokoll 1.

	Primärer Antikörper #1	Primärer Antikörper #2	Triton-X
Gefäßlokalisierung	AQP4 1:250	von Willebrand Faktor 1:2000	0%
Gefäßlokalisierung	AQP4 1:250	von Willebrand Faktor 1:2000	0,01%
Gefäßlokalisierung	AQP4 1:250	von Willebrand Faktor 1:2000	0,1%
Gefäßlokalisierung	AQP4 1:250	von Willebrand Faktor 1:2000	0,3%
Gefäßlokalisierung	AQP4 1:250	von Willebrand Faktor 1:2000	0,5%
Negativkontrolle	keiner	von Willebrand Faktor 1:2000	0,3%

Tabelle 3: Schema Versuchsprotokoll 3 (AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X).

### 3.3.5 Versuchsprotokoll 4: Konfokales Mikroskop

Ein herkömmliches Durchlichtmikroskop, wie in den vorhergegangenen Versuchsprotokollen benutzt, ermöglicht eine schnelle Übersicht in kleinen Vergrößerungen und einen detaillierten Blick auf die Probe in größeren Vergrößerungen. Die gesamte Schichtdicke der Probe wird jedoch übereinander gelegt dargestellt. Lediglich über ein Fokussieren der Linse lassen sich annäherungsweise örtliche Zusammenhänge in der Z-Ebene der Probe ermitteln. Ein Durchlichtmikroskop erlaubt also keine genaue Aussage darüber, ob zwei Objekte auf der gleichen Ebene liegen oder eines sich darüber oder darunter befindet.

Um sicherzustellen, dass der benutzte Primärantikörper sicher AQP4 anfärbt, wurde die Verteilung des AQP4 Signals in Relation zum GFAP Signal betrachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich am meisten AQP4 in den Endfüßen von Astrozyten polarisiert. Es ist also nötig sicherzustellen, dass sich das AQP4 und das GFAP Signal auf exakt einer Ebene befinden und koloalisieren. Um eine solche Koloaliation darzustellen wurde ein Konfokales Mikroskop verwendet.

### 3.3.6 Finales Immunfluoreszenz Protokoll

Anhand der Ergebnisse der vorangegangenen Protokolle wurde das finale Immunfluoreszenz Protokoll definiert und die Proben aller Gehirne mit diesem bearbeitet.

Die Objektträger mit den Proben wurden der  $-45^{\circ}$  Celsius Kühlung entnommen und im Kryostaten bei  $-23^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten aufgewärmt. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur mit einem PAP Pen umrandet und für 8 Minuten getrocknet. Nach zehn Minuten Fixation mittels 2% PFA Lösung wurden die Objektträger drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen.

Mittels einer 10% NDS Lösung wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Primärantikörper aufgetragen. Der AQP4 Primärantikörper (Rabbit, **Santa Cruz SC 20812 LOT#B1315**) wurde 1:250 verdünnt und der GFAP Primärantikörper (**TEMECULA MAB3402 LOT#2669950**) 1:1000. Für 24 Stunden wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei  $4^{\circ}$  Celsius mit den Primärantikörpern inkubiert.

## Material und Methoden

Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Objektträger drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend die Sekundärantikörper aufgetragen. Der Cy-3 anti-rabbit Sekundärantikörper wurde 1:600 verdünnt, der Alexa488 donkey anti-mouse Sekundärantikörper 1:500. Die Objektträger wurden für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten erfolgte die Kernfärbung mit 1:10000 verdünntem DAPI. In einem Tauchbad bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für 15 Minuten mit DAPI inkubiert. Erneut wurden die Objektträger drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Zuletzt wurde eine dünne Schicht Citifluor aufgetragen und mit einem Deckgläschen die Probe geschützt.

Damit alle Objektträger einer Immunfluoreszenz gleichzeitig verglichen werden konnten, wurden sie bei 4° Celsius lichtgeschützt gelagert und am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet. So ist eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Bilder gewährleistet. Alle Objektträger eines Bereichs wurden mit den gleichen Verschlusszeiten belichtet um eine Vergleichbarkeit der Leuchtkraft zu gewährleisten. Eine tabellarische Zusammenfassung des Protokolls befindet sich am Ende der Diskussion.

### 3.3.7 Bildbearbeitung und -auswertung

Für die qualitative Auswertung der Bilder wurden die Bilder in Photoshop CS2 Version 9.0 in ihrer Farbbalance und ihrem Kontrast bearbeitet. Es wurden keine Bildinformationen hinzugefügt oder entfernt, sondern lediglich das Bild in seiner Leuchtkraft dem Eindruck angepasst, der sich beim Mikroskopieren ergeben hat.

Die semiquantitative Auswertung wurde mittels FIJI Version 1.51a durchgeführt. FIJI ist ein Open Source Programm, das sich aus Image-J und diversen Plugins zusammensetzt (Schindelin et al., 2012). Zuerst wurde jedes Bild wieder in seine drei Farbkanäle aufgespalten und anschließend ein Threshold definiert, ab dem ein Bildpunkt als belichtet gezählt wird. Gemäß der Publikation von Glasbey (1993) wurde die Option „mean“ zur automatischen Definition eines Threshold gewählt. So war eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Bilder gewährleistet. Nach der Umwandlung in ein binäres Bild, also Bildpunkte über dem

## **Material und Methoden**

Threshold Wert und solche darunter, folgte die Messung der Fläche der belichteten Bildpunkte. Der daraus folgende Wert ergibt die Menge an Signal für AQP4, GFAP und DAPI. Diese Werte konnten mit den Werten der vierstufigen Skala des subjektiven Eindrucks der Leuchtkraft verglichen werden.

## Ergebnisse

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Probenmaterial

Insgesamt entsprachen 15 Hunde im Zeitraum zwischen Mai 2015 und Mai 2016 den Einschlusskriterien ohne den Ausschlusskriterien zu widersprechen.

- Bei fünf der 15 Hunde wurde das Gehirn nach eintreten des Todes chirurgisch entnommen und direkt gefroren.
- Bei vier Hunden wurde das Gehirn entnommen und beide Hemisphären in 10-%igem Formalin bei Raumtemperatur gelagert.
- Von den restlichen sechs Hunden wurden die Köpfe abgetrennt und im Ganzen in 10-%igem Formalin bei Raumtemperatur gelagert.

Die 15 genutzten Probenhunde sind in Tabelle 4 aufgeführt. Da die Hunde zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Patienten vorstellig wurden, ist dort auch die Lagerzeit für jedes Gehirn angegeben. In Tabelle 5 sind die Probenhunde nach Signalement und Erkrankung, die zur Euthanasie geführt hat, aufgeteilt.

Hund	Erweiterter Ventrikel	frisch gefroren	Formalin Direkt entnommen	Formalin In Schädel gelagert	Lagerzeit in Monaten
#1	Ja	Ja	Ja	Nein	1
#2	Ja	Ja	Ja	Nein	1
#3	Nein	Ja	Ja	Nein	1
#4	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#5	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#6	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#7	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#8	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#9	Nein	Nein	Nein	Ja	12
#10	Ja	Nein	Ja	Nein	1
#11	Ja	Nein	Ja	Nein	2

## Ergebnisse

#12	Ja	Nein	Ja	Nein	1
#13	Ja	Nein	Ja	Nein	1
#14	Nein	Ja	Ja	Nein	1
#15	Ja	Ja	Ja	Nein	0

Tabelle 4: Probenhunde nach Ventrikelzustand und Gehirnentnahme aufgeteilt.

Hund	Rasse	Gewicht in kg	Alter in Jahren	Geschlecht	Vorerkrankung
#1	Engl. Bulldogge	22,0	3	weiblich	Ovarialtumor
#2	Brandlbracke	20,0	6	männlich	Hydrozephalus internus
#3	Engl. Bulldogge	15,0	9	weiblich	Akute Dyspnoe
#4	Mix	25,0	7	männlich	Osteosarkom
#5	Berner Sennenhund	40,0	8	männlich	Weichteilneoplasie der Kruppe
#6	Mix	25,0	5	weiblich	Weichteilneoplasie der Kruppe
#7	Mix	3,9	3	weiblich	Myelomalazie
#8	Pekinese	7,0	13	männlich	Osteosarkom
#9	Deutscher Pinscher	7,0	3	weiblich	Paraplegie unbekanntes Ursprungs
#10	Engl. Bulldogge	22,0	3	männlich	Lymphatische Leukämie
#11	Yorkshire Terrier	unbekannt	0,5	weiblich	Hydrozephalus
#12	West Highland White Terrier	10,0	1	männlich	Hydrozephalus
#13	Chihuahua	1,9	2	weiblich	Hydrozephalus
#14	Irischer Wolfshund	47,8	5	weiblich	Osteosarkom
#15	Franz. Bulldogge	9,8	6	männlich	Syringomyelie

Tabelle 5: Probenhunde nach Signalement und Erkrankung aufgeteilt.

Die neurologischen Vorerkrankungen sind in rot hervorgehoben.

## Ergebnisse

### 4.2 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Vier der fünf Frisch gefrorenen Hunde wurden für die PCR genutzt. Die Proben wurden in drei Teile, Ventrikel, Cortex und Kleinhirn, unterteilt und einzeln untersucht. Die Housekeeping Gene  $\beta$ -Actin und GAPDH erlauben über ihre gleichmäßige Expression einen Ausgleich der AQP4 Werte. In allen Proben konnte eine AQP4 Expression nachgewiesen werden. In Abbildung 9 ist diese dargestellt. Die AQP4 Konzentration im Ventrikel von Hund #1 dient hier als Richtwert für die anderen Proben.

Während die Expression von AQP4 in den Cortices und Kleinhirnen relativ konstant ist, schwankt die Expression innerhalb der vier Ventrikelproben deutlich.

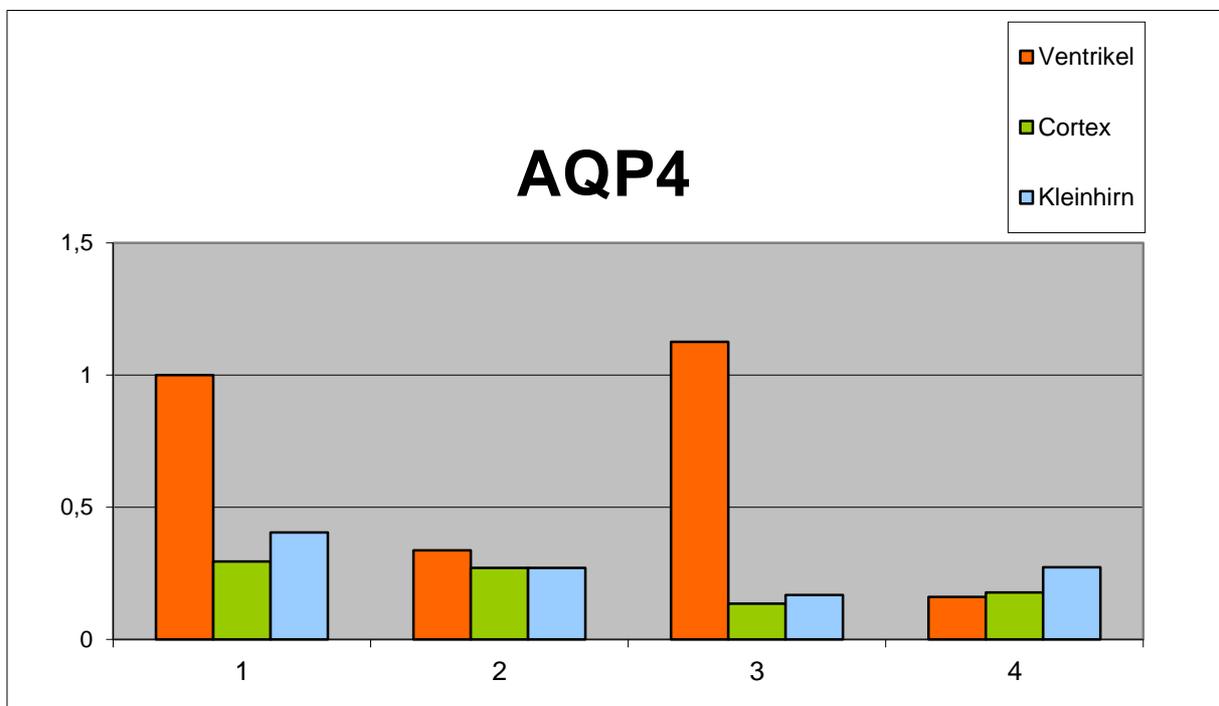


Abbildung 9: Genexpression AQP4.

Darstellung der relativen AQP4 Genexpression. Die Hunde #1 und #2 haben einen chronisch erweiterten Ventrikel, die Hunde #3 und #4 nicht.

Die AQP4 Genexpression von Hund 1 dient als Eichwert, da hier der niedrigste  $\Delta$ Ct-Wert bestimmt wurde.

### 4.3 Immunfluoreszenz

#### 4.3.1 Versuchsprotokoll 1: Lagerzustand und Schichtdicke

Um den Einfluss des Lagerzustands auf die Signalstärke der Immunfluoreszenz der in Formalin fixierten Proben zu überprüfen, wurden frisch verarbeitete Proben mit vier Tage gelagerten Proben verglichen. Zusätzlich wurden verschiedene Schichtdicken der Schnitte miteinander verglichen. In Abbildung 10 sind die Schnitte 20µm dick. Die gelagerten Proben sind in der linken Reihe (A-D), die frischen in der rechten (E-H) abgebildet.

- Im weißen Kasten in A ist ein Netzmuster der Aquaporinsignale zu erkennen. Dieses Muster fiel in mehreren der folgenden Versuchsprotokolle auf.
- Die Signale des AQP4 und GFAP Kanals sind in der gelagerten Probe schwächer als in der frischen.
- Die Anzahl der beleuchteten Bildpunkte in der frischen Probe beträgt für AQP4 754.432 Bildpunkte gegenüber 83.551 Bildpunkten in der gelagerten Probe. Dies entspricht einer Abweichung von ca. 89%.
- GFAP hat in der frischen Probe einen Wert von 87.311 Bildpunkten und in der gelagerten Probe 112.357 Bildpunkte. Die Abweichung entspricht hier ca. 32%.
- Die DAPI Kanäle sind nahezu gleich stark belichtet. Die frische Probe hat 743.667 DAPI Bildpunkte, die gefrorene Probe 770.581 Bildpunkte. Dies entspricht einer Abweichung von ca. 3,5%.

## Ergebnisse

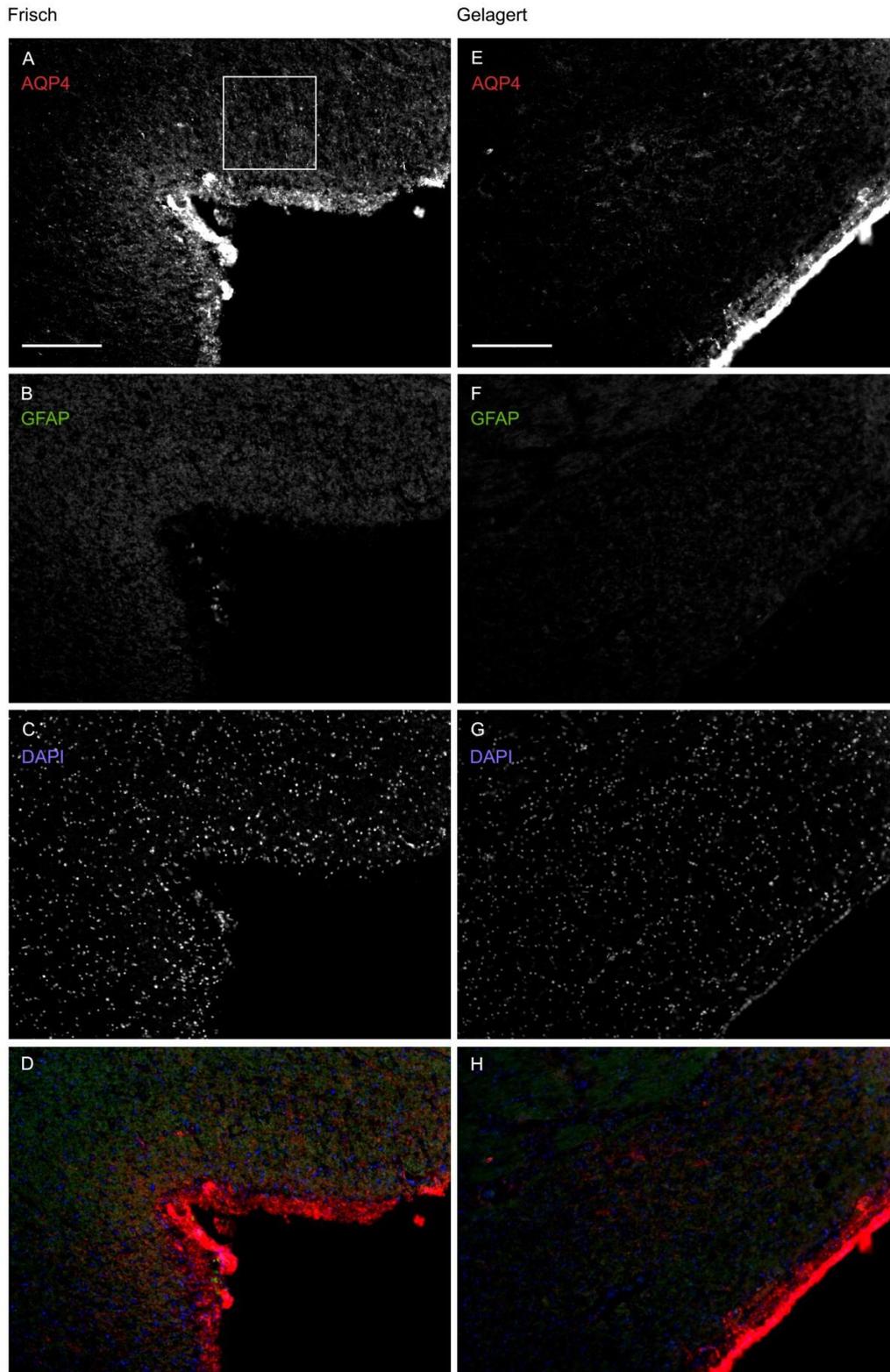


Abbildung 10: Auswirkung des Lagerzustands auf 20 $\mu$ m dicke Schnitte.

Frisch verarbeitete Proben mit 20 $\mu$ m Schichtdicke (linke Spalte) gegenüber 4 Tage bei -65 $^{\circ}$ C gelagerten Proben mit 20 $\mu$ m Schichtdicke (rechte Spalte). AQP4 (A und E), GFAP (B und F) und DAPI (C und G) sind als einzelne Farbkanäle dargestellt. D und H sind eine Überlagerung aller drei Farbkanäle. In A ist ein Netzmuster hervorgehoben. Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100  $\mu$ m.

## Ergebnisse

In Abbildung 11 sind erneut frische und gelagerte Proben gegenübergestellt. In diesem Versuch wurden die Proben allerdings mit einer Schichtdicke von 10µm geschnitten.

- Die Anzahl der beleuchteten Bildpunkte für AQP4 liegt in der frischen Probe mit 130.255 *Bildpunkten* um ca. 6% hinter der gelagerten mit 138.897 beleuchteten Bildpunkten.
- Die gelagerte Probe enthält einen Bereich in dem die Probe doppelt aufliegt, rechts oben als heller Bereich in E zu sehen. Hier ist das AQP4 Signal am Stärksten.
- Der GFAP Kanal ist in der frischen Probe in 589.340 Bildpunkten beleuchtet, in der gelagerten in 343.697 Bildpunkten. Dies entspricht einer Abweichung von ca. 42%.
- Die DAPI Kanäle weichen hier stärker ab, als in der 20µm dicken Probe.
- Die frische Probe ist in 35.767 Bildpunkten beleuchtet, die gelagerte in 52.142. Dies entspricht einer Abweichung von ca. 31%

## Ergebnisse

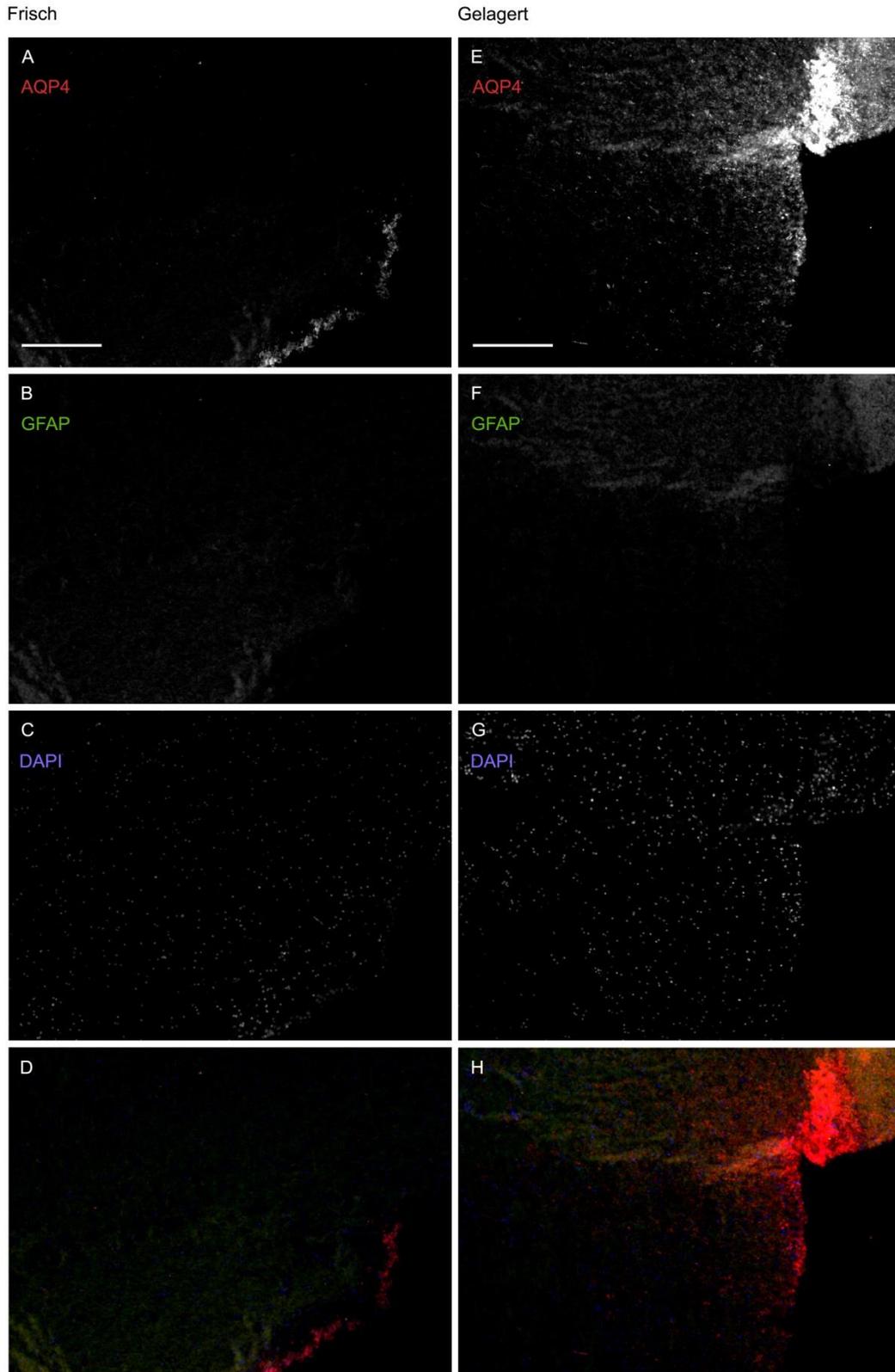


Abbildung 11: Auswirkung des Lagerzustands auf 10µm dicke Schnitte.

Frisch verarbeitete Proben mit 10µm Schichtdicke (linke Spalte) gegenüber 4 Tage bei -65°C gelagerten Proben mit 20µm Schichtdicke (rechte Spalte). AQP4 (A und E), GFAP (B und F) und DAPI C und G) sind als einzelne Farbkanäle dargestellt. D und H sind eine Überlagerung aller drei Farbkanäle.

Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100 µm.

## Ergebnisse

### 4.3.2 Versuchsprotokoll 2: Verdünnungsreihe AQP4

Um herauszufinden, wie stark der AQP4 Primärantikörper ohne Signalverlust verdünnt werden kann wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt.

- Das AQP4 Signal wird mit steigender Verdünnung schwächer. Bei einer Verdünnung von 1:250 wird AQP4 noch in 163.613 Bildpunkten beleuchtet. Dieser Wert fällt ab bis er bei einer Verdünnung von 1:2000 12.698 Bildpunkte beträgt.
- In den Verdünnungen 1:250 und 1:500 ist das in Versuchsprotokoll 1 aufgefallene Netzmuster der Aquaporine zu erkennen.

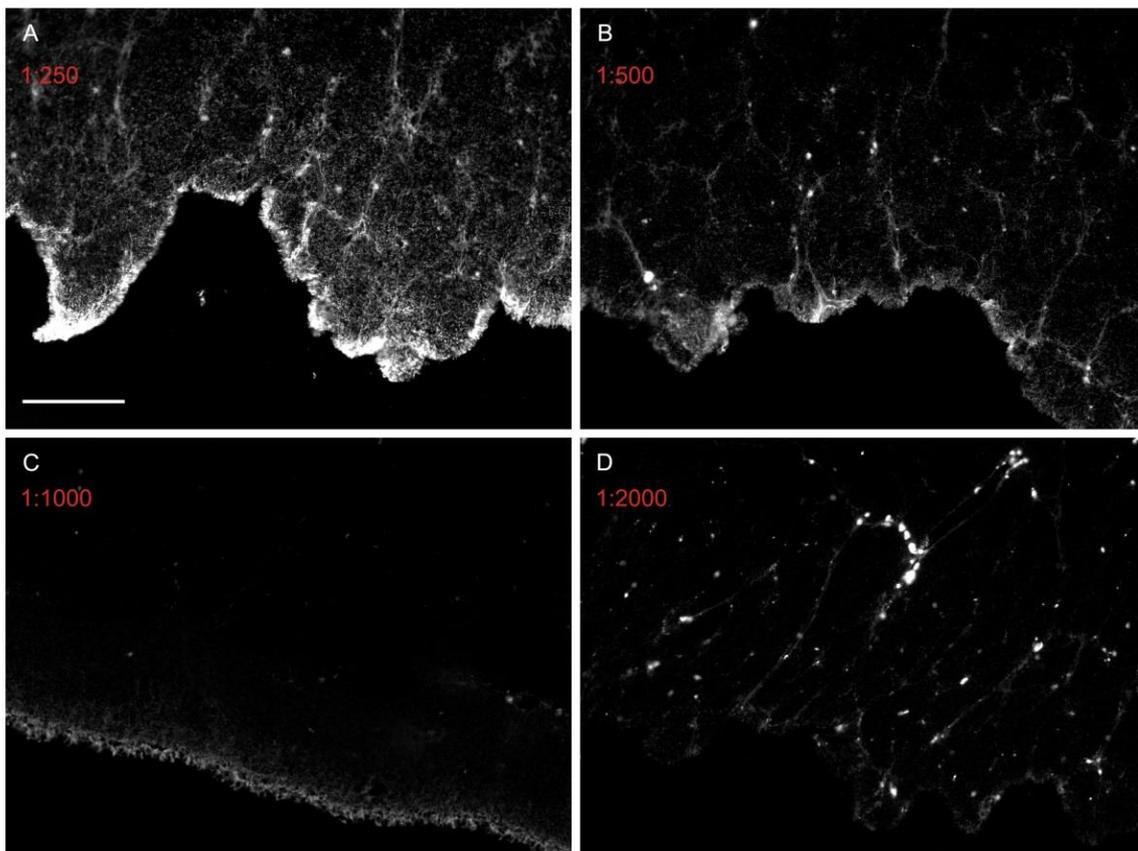


Abbildung 12: Verdünnungsreihe AQP4.

Der gleiche Gehirnteil eines Hundes mit steigender Verdünnung des AQP4 Primär Antikörpers. Abgebildet ist für jede Verdünnung der AQP4 Kanal. Die Verdünnung ist in jedem Bild links oben angegeben.

Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

## Ergebnisse

### 4.3.3 Versuchsprotokoll 3: AQP4 mit von Willebrand Faktor und Triton-X

In diesem Protokoll wurde die Kolokalisation von AQP4 und vW geprüft da bekannt ist, dass AQP4 besonders in den Endfüßen von Astrozyten polarisiert. Die Endfüße von Astrozyten umschließen häufig Gefäßwände. vW bindet an Endothelzellen in Gefäßwänden und erlaubt so die Lokalisierung von Gefäßen.

Das AQP4 Signal in Abbildung 13 ist besonders stark in direkter Nachbarschaft zu den vW-Signalen. Die weißen Pfeile in D markieren die prominentesten Gefäßstrukturen.

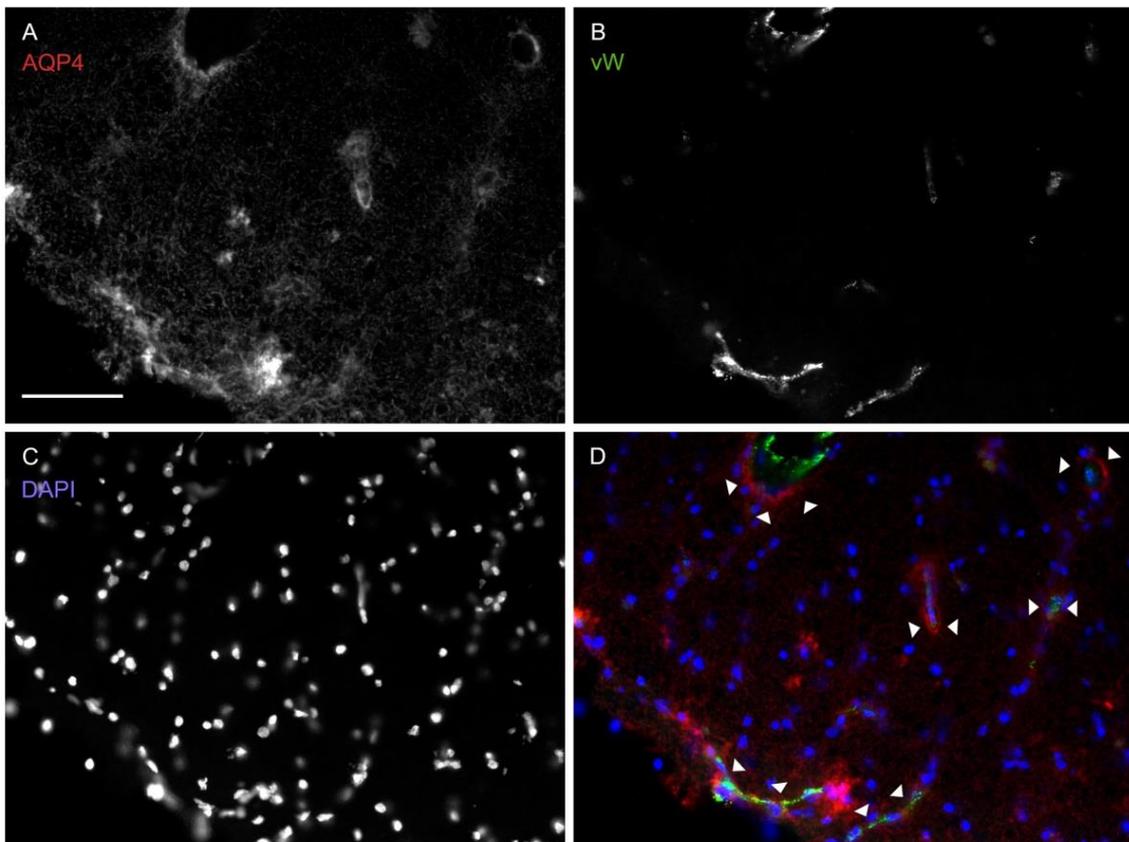


Abbildung 13: Kolokalisation AQP4 und von Willebrand Faktor.

*AQP4 (A), vW (B) und DAPI (C) einzeln sowie eine Überlagerung aller drei Farbkanäle (D). Das vW Signal markiert die Endothelzellen der Blutgefäße (Pfeilspitzen in D).*

*Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .*

## Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt eine Verdünnungsreihe Triton-X, sowie eine Negativkontrolle ohne Zugabe des AQP4 Primärantikörpers.

- Das AQP4 Signal ist ohne Triton-X am stärksten und nimmt mit steigender Konzentration ab. a-e zeigen Vergrößerungen markanter Stellen. In den Ausschnitten a, d und e sind Gefäße mit den AQP4 Signalen der anliegenden Astrozyten zu sehen. In Ausschnitt b sieht man einen einzelnen Astrozyten mit seinen markanten Ausläufern.
- In der Negativkontrolle ist mit 9963 belichteten Bildpunkten nur sehr wenig Signal sichtbar

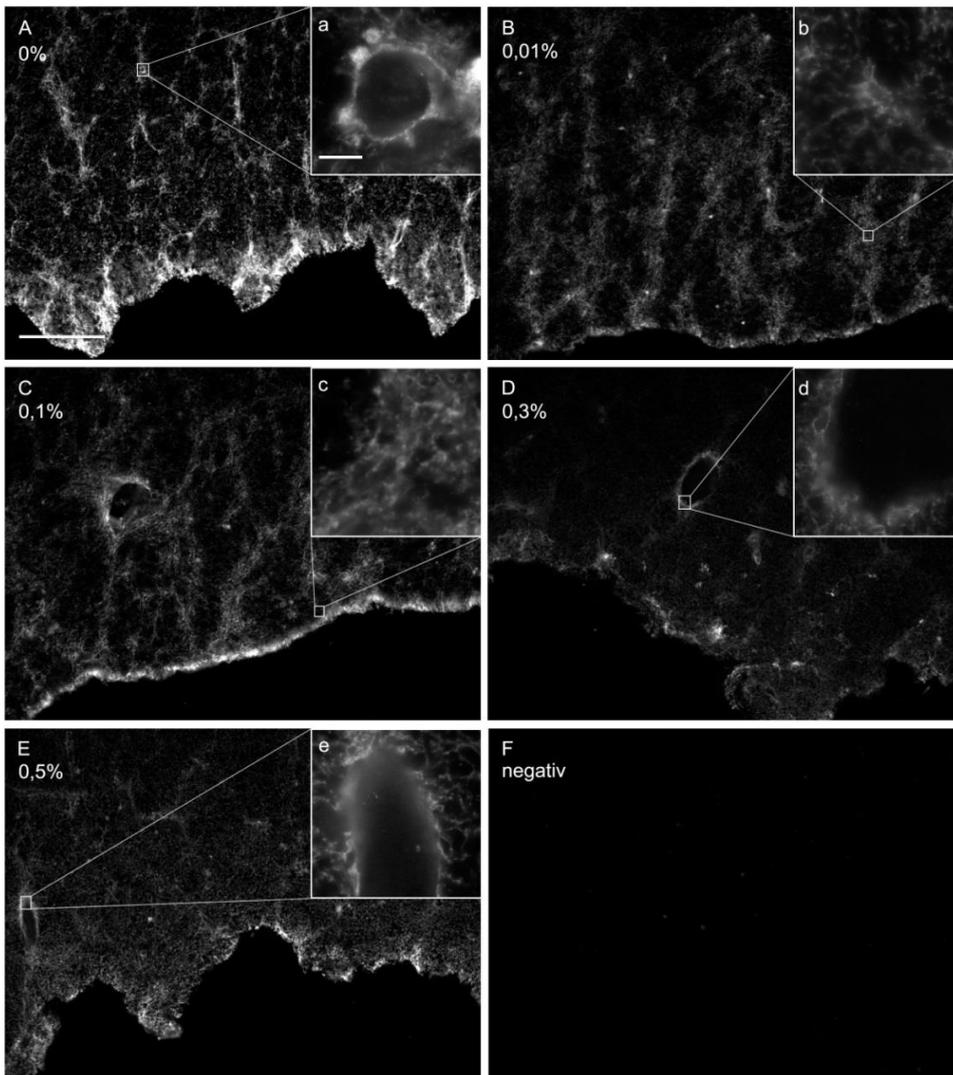


Abbildung 14: Verdünnungsreihe Triton-X und Negativkontrolle AQP4.

Die Verdünnung von Triton-X ist in den Ausschnitten A bis E angegeben. F ist die Negativkontrolle ohne AQP4

Primärantikörper. Die Vergrößerungen a bis e zeigen AQP4 intensive Stellen an Gefäßgrenzen.

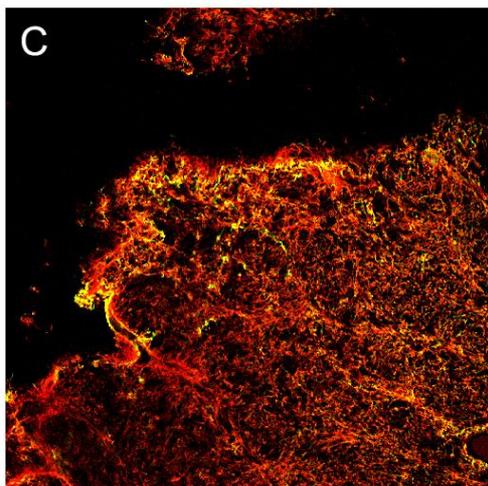
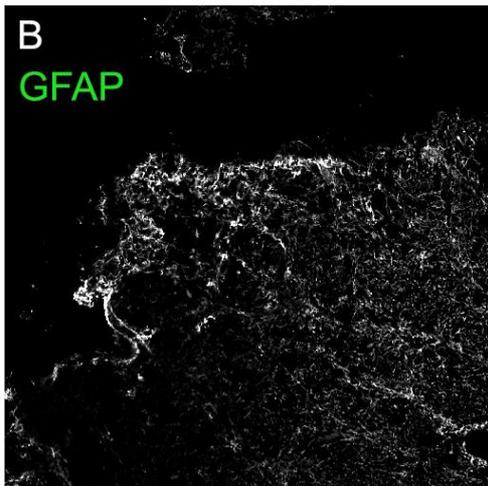
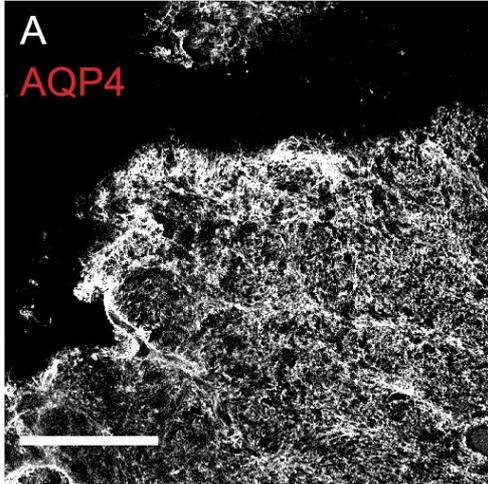
A-F wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 100µm.

a-e wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 10µm.

## Ergebnisse

### 4.3.4 Versuchsprotokoll 4: Konfokales Mikroskop

Das Konfokale Mikroskop erlaubt Bilder einer einzelnen Ebene zu erstellen. Damit ist eine exakte Kolokalisation, im Fall von Abbildung 15 zwischen AQP4 und GFAP, möglich.



Die gelben Farbsignale in C zeigen eine exakte Kolokalisation der beiden Kanäle an da das rote AQP4 Signal mit dem grünen GFAP Signal zu einem gelben Signal wird.

Außerdem erlaubt das Konfokale Mikroskop Aufnahmen aus verschiedenen Winkeln. Diese lassen sich zu einem drehbaren 3D Modell zusammen fügen.

In Abbildung 16 ist die 45° Sicht auf das AQP4 Signal eines einzelnen Astrozyten dargestellt. Die radiär vom Zentrum ausgehenden Ausläufer des Astrozyten sind deutlich zu erkennen.

**Abbildung 15: Kolokalisation AQP4 und GFAP im Konfokalen Mikroskop.**

**AQP4 (A) und GFAP (B) Signal einzeln und übereinander gelegt (C). Gelbe Bereiche sind exakte Kolokalisationen zwischen AQP4 und GFAP.**

**Die Bilder wurden in einer 10x Vergrößerung aufgenommen.**

**Maßstab 100 µm.**

## Ergebnisse

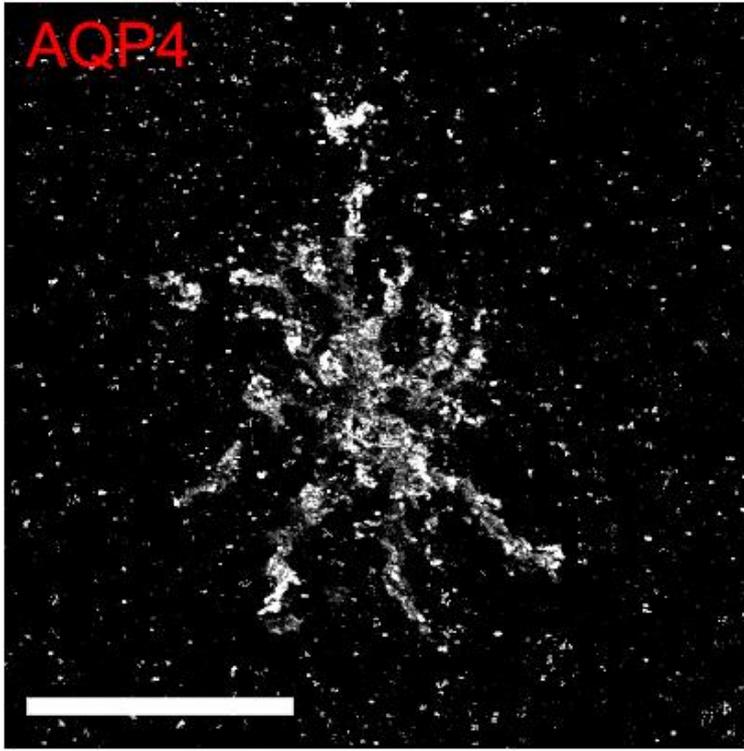


Abbildung 16: 45° Sicht auf einen einzelnen Astrozyten im Konfokalmikroskop.

Abbildung des AQP4 Signals eines einzelnen Astrozyten. Radiär vom Zentrum ausgehend sind die Astrozytenausläufer zu erkennen.

Das Bild wurde in einer 40x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 40 µm.

### 4.3.5 Finales Immunfluoreszenz Protokoll

Nach den Vorversuchen wurden in drei Durchgängen alle Proben mit dem finalen Immunfluoreszenz Protokoll bearbeitet. Im ersten Durchgang wurden alle frisch gefrorenen Proben zusammen bearbeitet.

- Abbildung 17 zeigt die Ventrikel drei verschiedener Hunde. Hund #3 hat keinen erweiterten Ventrikel, die Hunde #1 und #2 haben chronisch erweiterte Ventrikel.
- Das AQP4 und das GFAP Signal im Ventrikel auskleidenden Ependym ist bei der Probe mit normalem Ventrikel deutlich sichtbar (A, a, B und b), während es bei den anderen beiden Proben mit chronisch erweitertem Ventrikel nahezu fehlt (E, F, I und J).

## Ergebnisse

- Die AQP4 Dichte im restlichen Gewebe ist dagegen bei den Proben mit chronisch erweitertem Ventrikel höher.

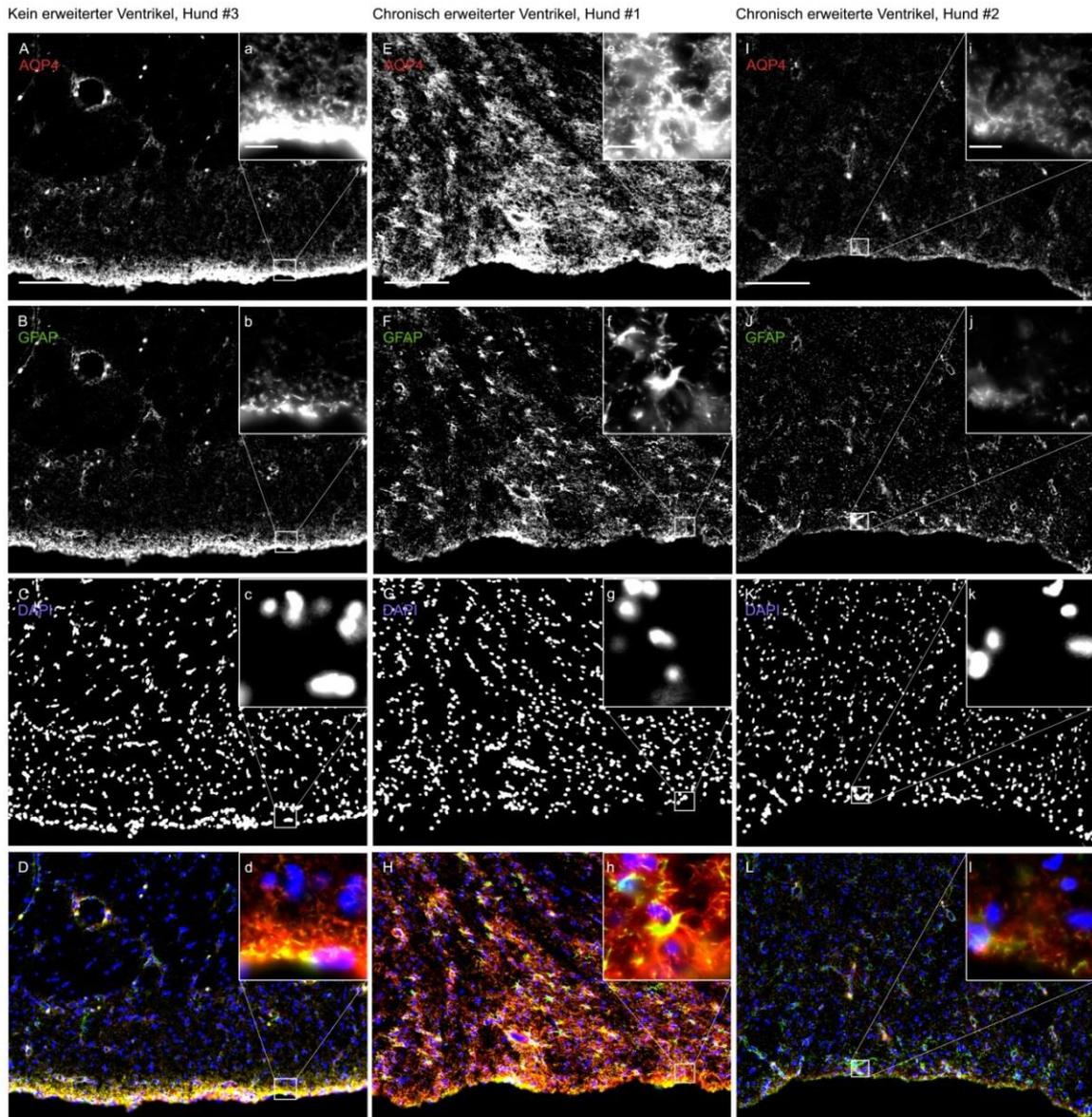


Abbildung 17: Vergleich der Ventrikel drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI (C, G und K) als einzelne Farbkanäle und übereinandergelegt (D, H und L). Die linke Spalte stammt von einem Hund ohne erweiterten Ventrikel, die mittlere und rechte Spalte jeweils von einem Hund mit erweitertem Ventrikel. Die hervorgehobenen Bereiche zeigen Vergrößerungen der Ventrikelgrenzen. Der Ventrikel befindet sich in allen Bildern ventral.

A-L wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm.  
a-l wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 10µm.

## Ergebnisse

In Abbildung 18 sind Vergrößerungen von einzelnen Astrozyten abgebildet.

- Der Kern der Astrozyten liegt bei allen drei Hunden zentral im Bild (C, K, G). Das AQP4 und das GFAP Signal sind entlang der an den Kern grenzenden Astrozytenmembran deutlich zu erkennen. Die Kollokalisierung der beiden Signale wird durch eine Gelbfärbung der Membran, sichtbar an den Pfeilspitzen in D, L und H, angezeigt.
- Bei Hund #3, ohne vergrößerten Ventrikel, ist das AQP4 Signal in der Astrozytenmembran etwa gleichstark, wie das AQP4 Signal in den Endfüßen (Pfeilspitzen in A). Bei Hund #14 überwiegt das AQP4 Signal in den Astrozytenendfüßen gegenüber dem in der Membran (I) während bei Hund #2 mit erweitertem Ventrikel das AQP4 Signal fast ausschließlich in der Astrozytenmembran zu sehen ist (Pfeilspitzen in E).

## Ergebnisse

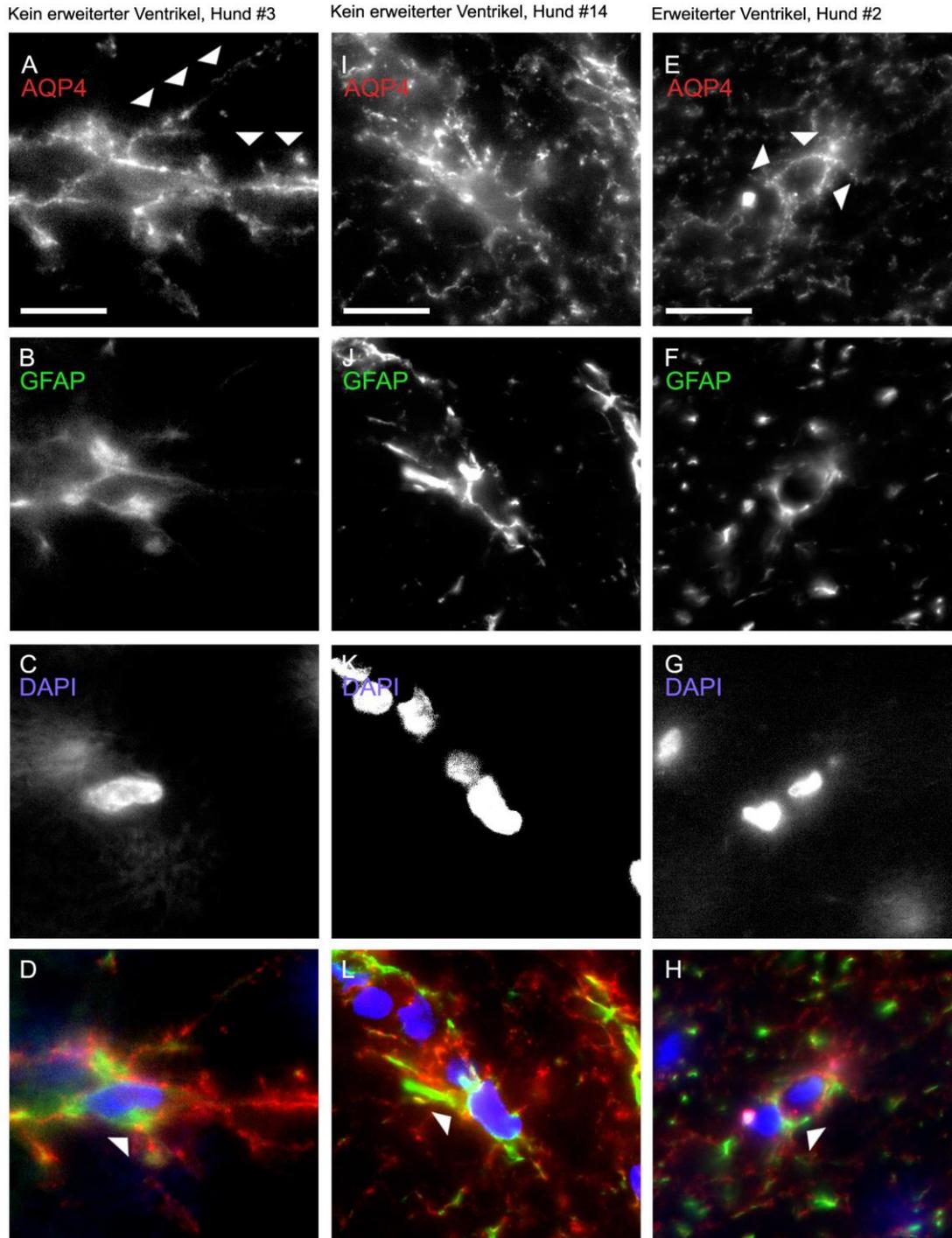


Abbildung 18: Einzelne Astrozyten von Hunden mit und ohne erweitertem Ventrikel.

AQP4 (A, I und E), GFAP (B, J und F) und DAPI (C, K und G) als einzelne Farbkanäle und als übereinandergelegte Bilder (D, L und H). Die Pfeilspitzen in A, E und I markieren die unterschiedlichen Lokalisationen von AQP4 bei Hunden ohne erweiterten Ventrikel (linke und mittlere Spalte) und einem Hund mit erweitertem Ventrikel (rechte Spalte). Die Pfeilspitzen in D, L und H zeigen die Orte der Kolokalisation von AQP4 und GFAP.

Die Bilder wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 10µm.

## Ergebnisse

Von den gleichen Proben wurden die Cortices untersucht. In Abbildung 19 sind diese abgebildet.

- Besonders bei Hund #1 ist im AQP4 und im GFAP Kanal das in den Voruntersuchungen aufgefallene Netzmuster zu erkennen.
- Außerdem fallen bei allen Hunden Objekte mit starkem Signal auf. Diese Objekte tauchen sowohl im AQP4, als auch im GFAP Kanal auf und sind in D, H und L kolokalisiert als gelb gefärbte Objekte sichtbar.
- Exemplarisch sind zwei dieser Objekte bei Hund #3 im AQP4, GFAP und übereinander gelagertem Kanal mit Pfeilspitzen markiert.

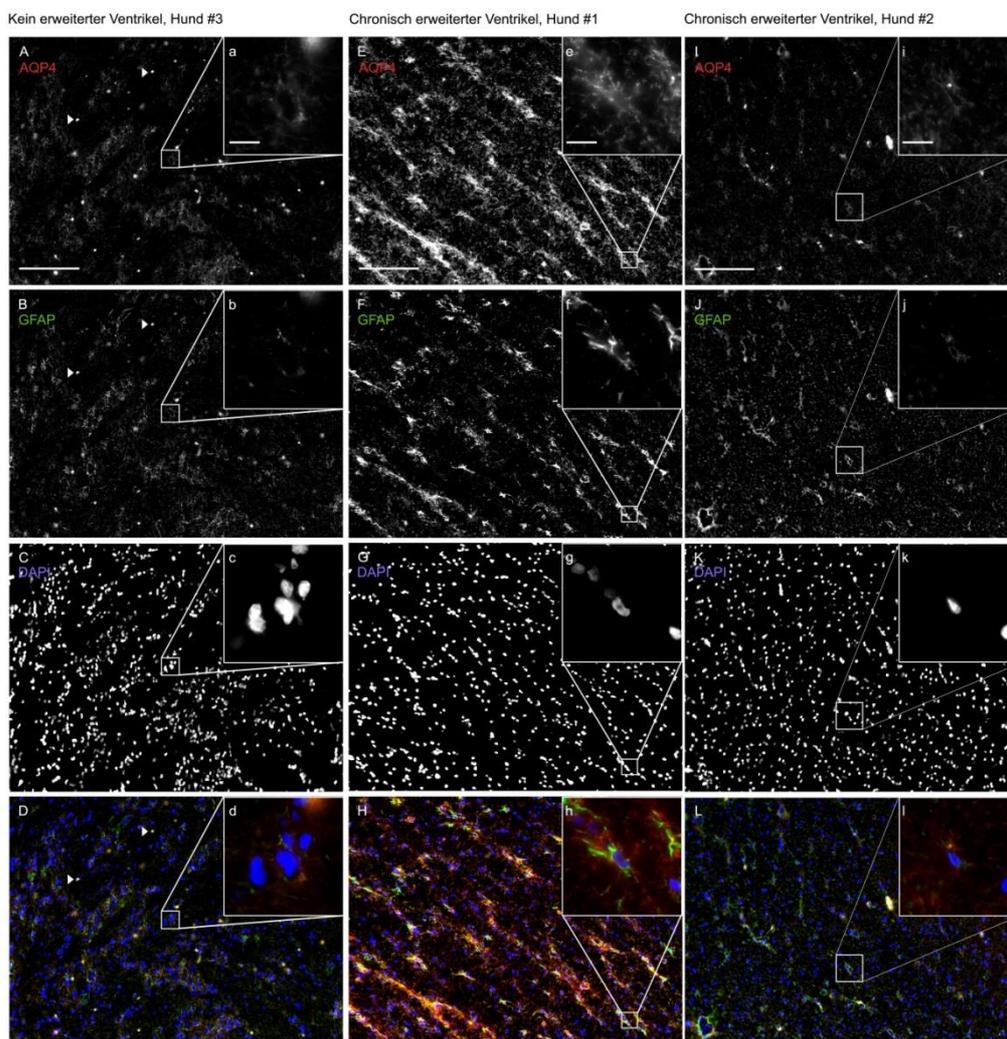


Abbildung 19: Vergleich der Cortices drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI (C, G und K) als einzelne Farbkänel und übereinandergelegt (D, H und L). Die linke Spalte zeigt einen Hund ohne erweiterten Ventrikel, die mittlere und rechte Spalte jeweils einen Hund mit erweitertem Ventrikel. Auffällig sind das Netzmuster bei dem Hund in der mittleren Reihe und die D, H und L gelb angefärbten Objekte, die sich als Überlagerungen kreisrunder Objekte aus allen Farbkänel darstellen.

A-L wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm.

a-l wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 10µm.

## Ergebnisse

Als Abschluss des ersten Durchlaufs sind die Kleinhirne der drei Hunde dargestellt. Der dunkle äußere Bereich ist das Stratum moleculare, bestehend aus den Fortsätzen der Purkinjezellen. Nach innen folgt die dünne Purkinjezellschicht, bestehend aus den Zellleibern der Purkinjezellen. Den Rest des nun folgenden hellen Bereichs macht das Stratum granulosum aus. Es besteht aus dicht aneinander liegenden Körnerzellen. Die beschriebenen Bereiche machen die graue Substanz aus. Innen folgt als dunkler Bereich die weiße Substanz des Kleinhirns.

- Das AQP4 und das GFAP Signal ist in Abbildung 20 besonders in der Purkinjezellschicht und im Stratum granulosum deutlich.
- Analog zum Großhirn ist das AQP4 Signal angrenzend an Gefäße besonders stark, wie in den Ausschnitten a und d abgebildet.

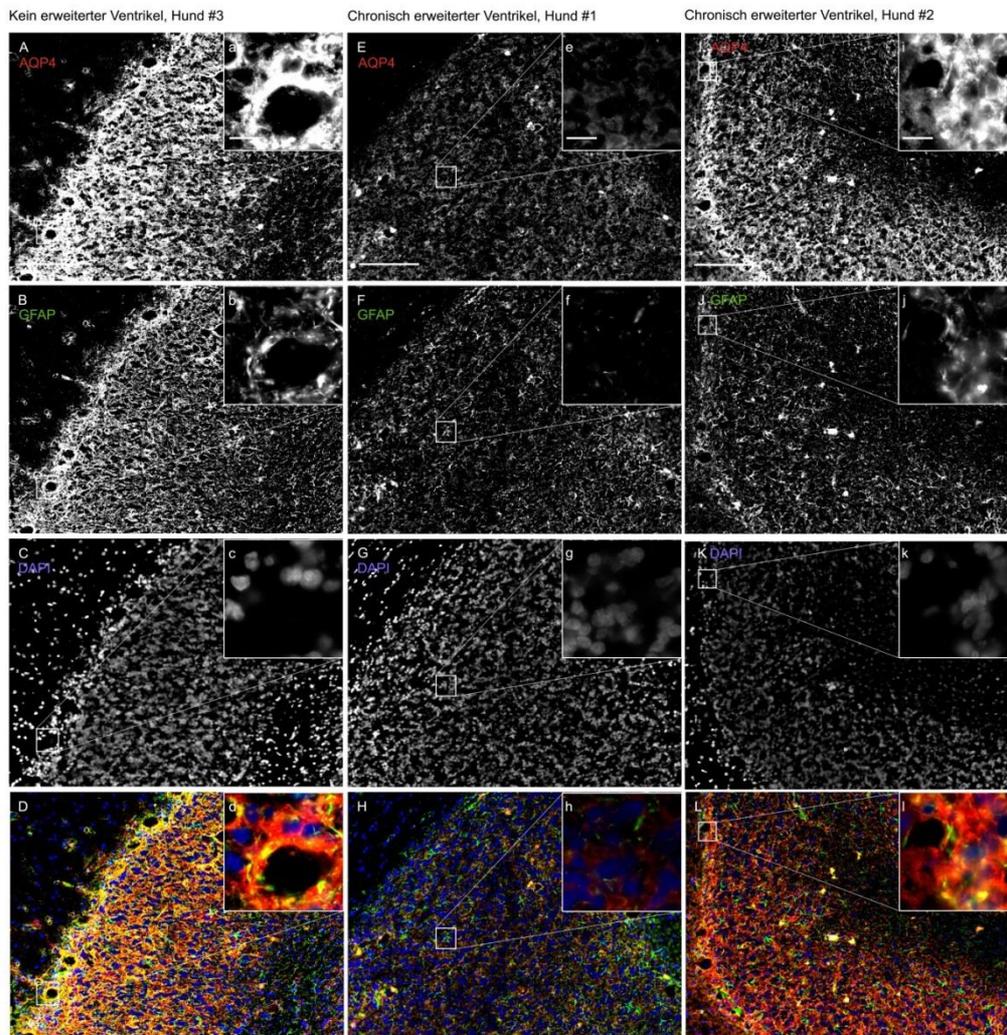


Abbildung 20: Vergleich der Kleinhirne drei verschiedener frisch gefrorener Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI C, G und K) als einzelne Farbkanäle und übereinandergelegt (D, H und L). A-L wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm. a-l wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 10µm.

## Ergebnisse

Von den gleichen drei Hunden wurden im nächsten Durchlauf die in Formalin fixierten Proben bearbeitet.

- Die auswertbare Darstellung dieser Proben gelang nur in einigen Fällen. Bei 5 der 15 bearbeiteten Hunde konnten einer oder mehrere Farbkanäle, auch in mehrmaligen Versuchen, nicht dargestellt werden.
- Wie in Abbildung 21 zu sehen ist wurden die gleichen Strukturen in allen drei Farbkanälen angefärbt. So entsteht ein einheitlich gefärbtes Bild, das keine Differenzierung zwischen Strukturen erlaubt.

Kein erweiterter Ventrikel, Hund #9

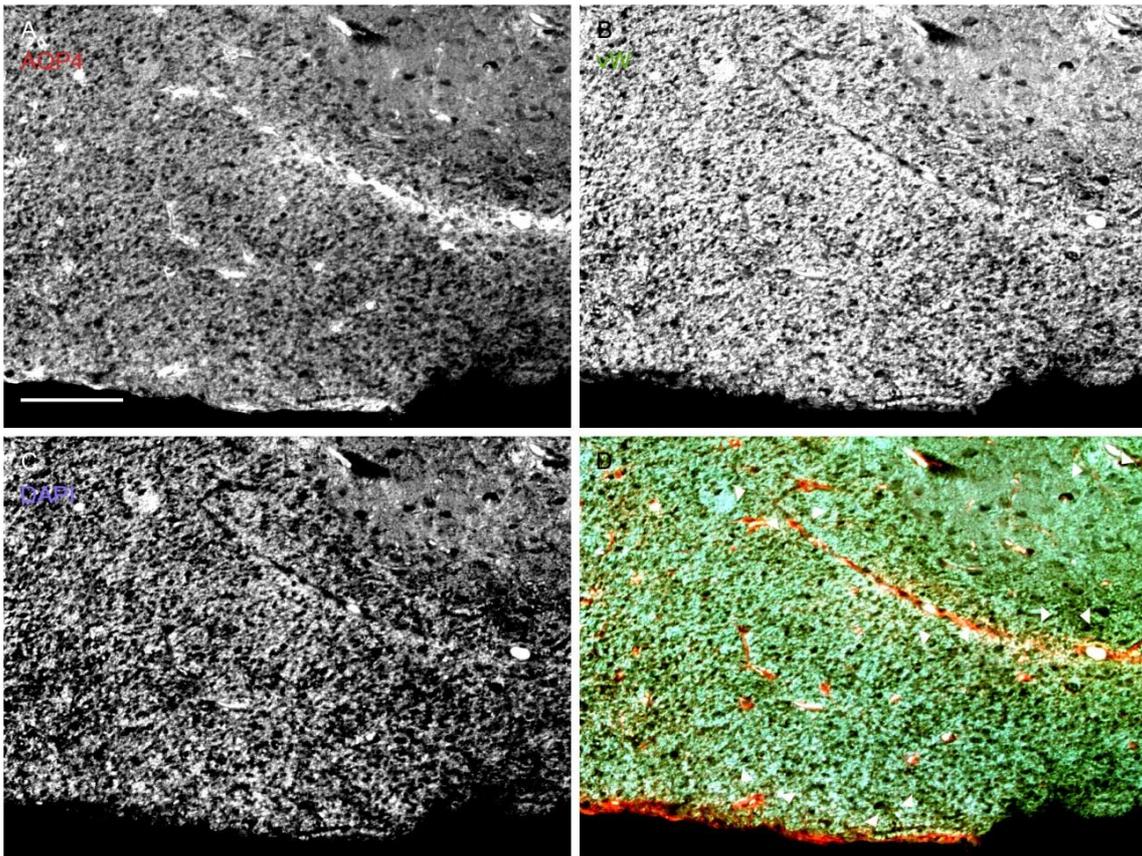


Abbildung 21: Undifferenziert angefärbte Probe.

AQP4 (A), GFAP (B) und DAPI (C) als einzelne Farbkanäle und als übereinandergelegtes Bild (D). Die Buchstaben A-D sind zur besseren Lesbarkeit unterschiedlich gefärbt.

Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab 100µm.

In Abbildung 22 sind die Ventrikel der in Formalin fixierten Proben zu sehen. Bei den abgebildeten Hunden war die Färbung erfolgreich.

- Das AQP4 Signal ist in Bild E am deutlichsten. Das GFAP Signal in Bild F.

## Ergebnisse

- Das die Ventrikelwand auskleidende Ependym ist in allen drei Proben aufgelockert, bei den Proben von Hund #1 (E-H) hebt es sich vom Untergrund ab, bei den Proben von Hund #2 (I-L) ist kaum noch Ependym vorhanden. In den Vergrößerungen ist dies deutlich zu erkennen.
- Erneut fallen die im AQP4 und GFAP Kanal gleichermaßen angefärbten runden Objekte auf.

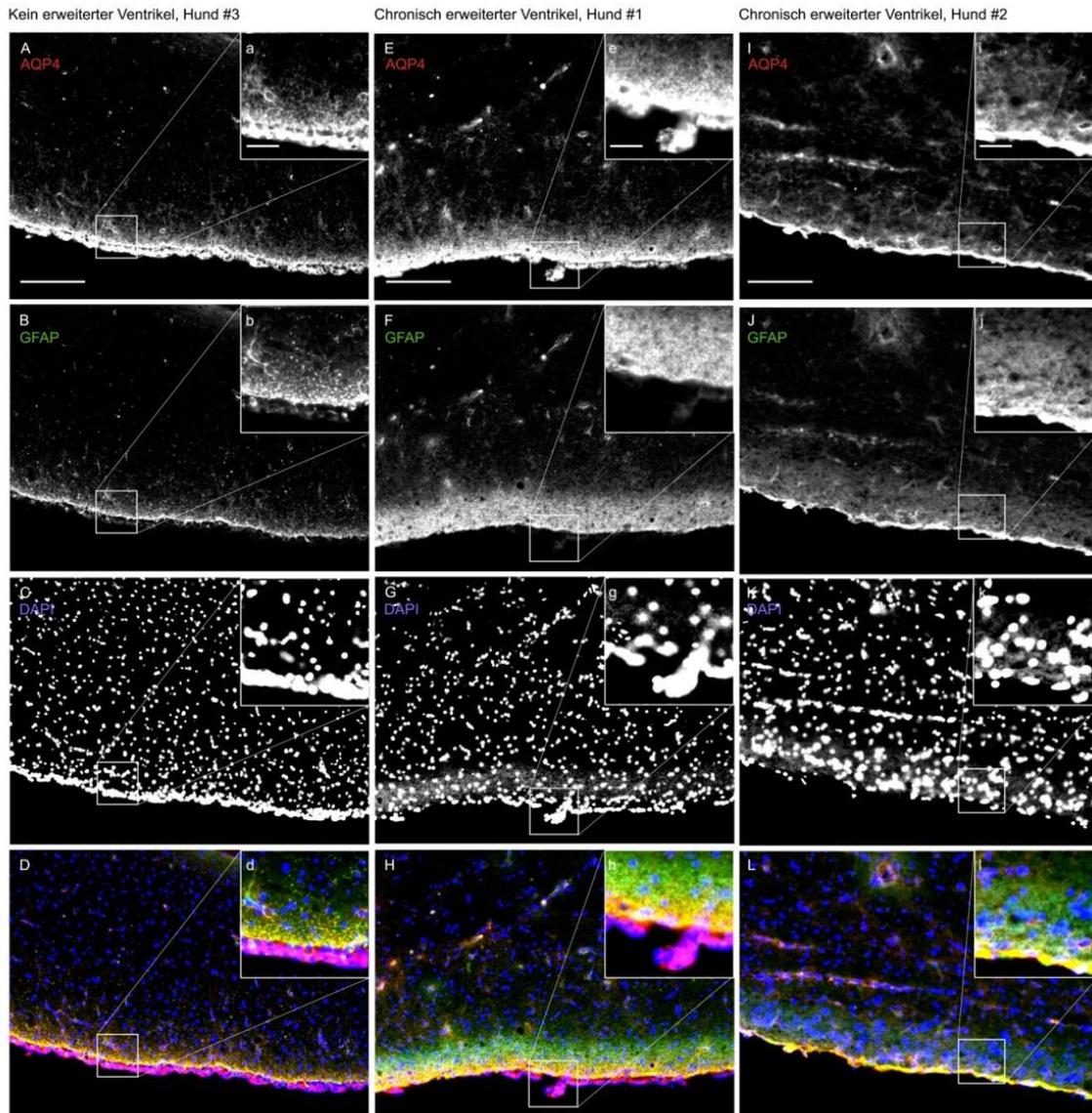


Abbildung 22: Vergleich der Ventrikel drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI (C, G und K) als einzelne Farbkanäle und übereinandergelegt (D, H und L). Die linke Spalte zeigt einen Hund ohne erweiterten Ventrikel, die mittlere und rechte Spalte jeweils einen Hund mit erweitertem Ventrikel. Der Ventrikel befindet sich ventral in allen Bildern.

A-L wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm.

a-l wurden in einer 40x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 25µm.

## Ergebnisse

In Abbildung 23 sind die Cortices drei verschiedener in Formalin fixierter Proben abgebildet.

- Bei Hund #1 gelang keine korrekte Anfärbung, daher wurde er für diese Abbildung mit Hund #14 ausgetauscht, der keinen erweiterten Ventrikel hatte.
- In B und J fällt auf, dass der GFAP Kanal diffuser angefärbt hat als bei den frisch gefrorenen Proben in Abbildung 19. Dadurch ergibt sich in den Überlagerungen D und L ein grüneres Gesamtbild.

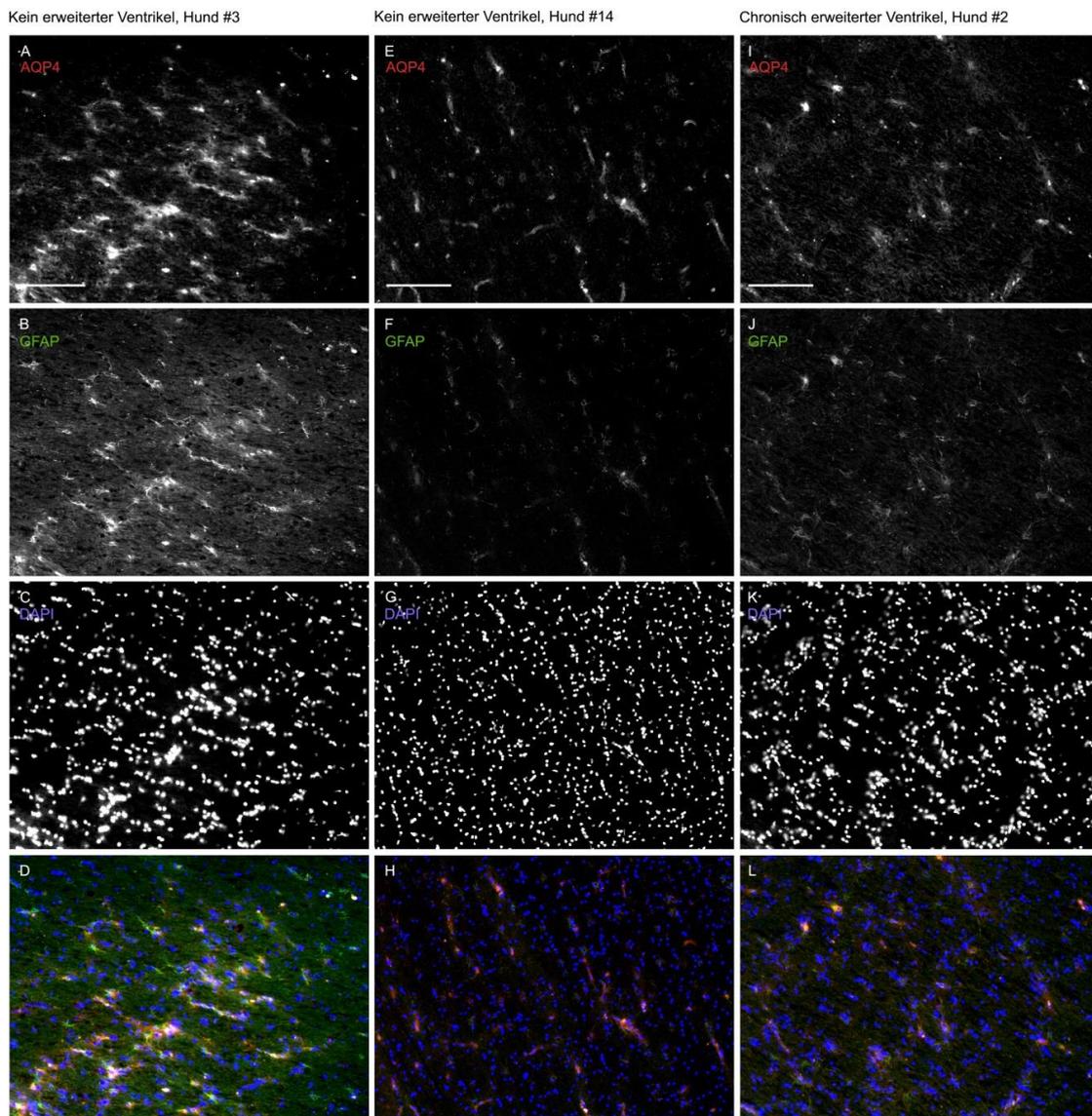


Abbildung 23: Vergleich der Cortices drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI (C, G und K) als einzelne Farbkanäle und übereinandergelegt (D, H und L). Die linke und mittlere Spalte zeigen jeweils einen Hund ohne erweiterten Ventrikel, die rechte Spalte einen Hund mit erweitertem Ventrikel.

Alle Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm.

## Ergebnisse

In Abbildung 24 sind die Kleinhirne der in Formalin fixierten Proben abgebildet.

- Die Schichtung ist wie in den Kleinhirnbildern der direkt gefrorenen Proben zu erkennen.
- In Ausschnitt A sind zentral im Bild deutlich drei sternförmige Strukturen mit einem starken AQP4 Signal zu erkennen. Vergrößerungen dieser Strukturen sind in Abbildung 25 abgebildet. Die Pfeilspitzen in den übereinandergelegten Kanälen zeigen die zu den AQP4 intensiven Strukturen passenden Kerne.

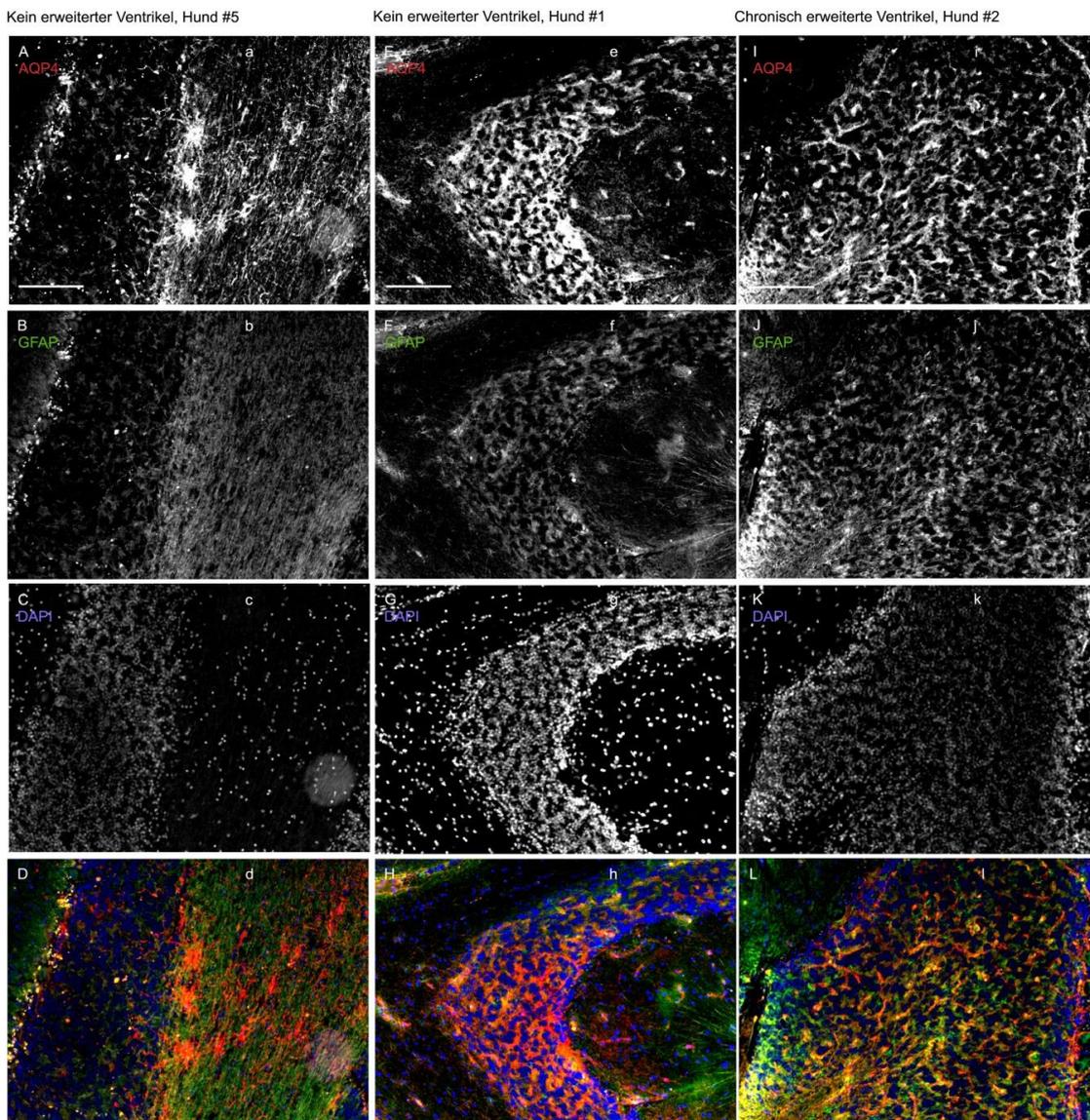


Abbildung 24: Vergleich der Kleinhirne drei verschiedener in Formalin fixierter Proben mit chronisch erweitertem und normalem Ventrikel.

AQP4 (A, E und I), GFAP (B, F und J) und DAPI (C, G und K) als einzelne Farbkanäle und übereinandergelegt (D, H und L). Die linke und mittlere Spalte zeigen jeweils einen Hund ohne erweiterten Ventrikel, die rechte Spalte einen Hund mit erweitertem Ventrikel.

Die Bilder wurden in einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 100µm.

## Ergebnisse

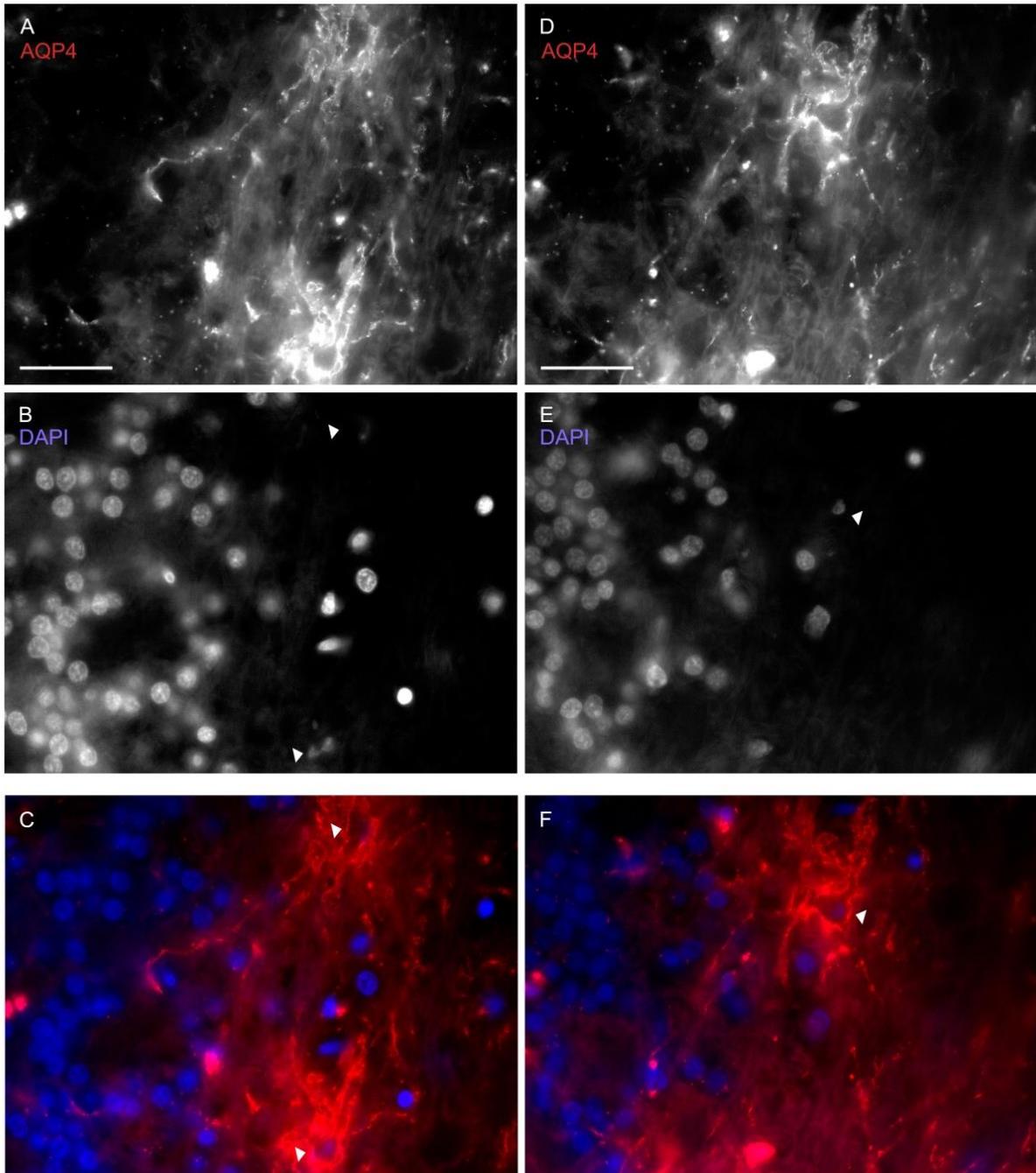


Abbildung 25: Vergrößerung sternförmiger Strukturen zwei verschiedener Hunde.

AQP4 (A und D) und DAPI (B und E) als einzelne Bilder und übereinandergelegt (C und F). Die Pfeilspitzen in B, E, C und F zeigen die zu den AQP4 intensiven Strukturen gehörenden Kerne an.

Die Bilder wurden in einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbe 10µm

### 4.3.6 Vergleich subjektive Einordnung gegen semiquantitative Messung der Leuchtkraft

Das Mikroskopieren jedes Immunfluoreszenzdurchgangs begann mit einem visuellen Screening aller Proben dieses Durchgangs und der subjektiven Einordnung der Leuchtkraft des AQP4 und des GFAP Kanals in eine vierstufige Skala (nicht darstellbar, +, ++, +++). Nach dem Mikroskopieren wurde die Leuchtkraft erneut bestimmt, dieses Mal semiquantitativ anhand der Fotos. Das Ergebnis dieser semiquantitativen Messung wurde in beleuchteten Bildpunkten pro Kanal ausgegeben.

Um zu messen, wie stark die subjektive Einordnung der Leuchtkraft der Schnitte von der semiquantitativen Messung der Fotos abwich, wurden beide Werte in

Tabelle 6 gegenübergestellt. Die Werte beziehen sich für die fünf Hunde bei denen frisch gefrorene Gehirne vorlagen (#1, #2, #3, #14, #15) auf Schnitte von frisch gefrorenen Proben, für alle anderen auf Schnitte von in Formalin fixierten Proben.

Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen wurde der Wert für die Leuchtkraft aus der semiquantitativen Auswertung der subjektiven Einordnung zugeteilt:

- + entsprach Werten bis 100.000 beleuchtete Bildpunkten
- ++ Werten bis 1.000.000 beleuchteten Bildpunkten
- +++ Werten über 1.000.000 beleuchteten Bildpunkten.

Die subjektive Einordnung entsprach in 16 der 32 auswertbaren Fälle (50%) dem semiquantitativ gemessenen Wert.

## Ergebnisse

Hund	AQP4 Ventrikel	AQP4 Cortex	GFAP
#1	+++ 634.161	+++ 1.210.365	+++ 1.437.211
#2	++ 618.858	++ 175.340	++ 138.332
#3	+++ 112.733	++ 14.899	+++ 125.676
#4	+ 408.359	+ 120.854	+ 364.824
#5	+ 401.221	nicht darstellbar	++ 525.796
#6	nicht darstellbar	nicht darstellbar	nicht darstellbar
#7	nicht darstellbar	nicht darstellbar	nicht darstellbar
#8	+++ 884.748	++ 1.049.722	+ 1.151.654
#9	++ 970.931	++ 855.995	++ 1.066.937
#10	+ 119.346	nicht darstellbar	++ 67.220
#11	++ 930.539	++ 568.845	+++ 1.013.348
#12	nicht darstellbar	nicht darstellbar	nicht darstellbar
#13	++ 85.592	nicht darstellbar	nicht darstellbar
#14	++ 479.932	++ 354.272	++ 195.562
#15	+++ 1.266.311	++ 541.256	+++ 851.236

**Tabelle 6: Vergleich der subjektiven Einordnung gegenüber der semiquantitativen Messung der Leuchtkraft. Die Werte für die subjektive Einordnung sind als nicht darstellbar, +, ++ und +++ angegeben. Die Werte der semiquantitativen Messung in beleuchtete Bildpunkte pro Bild. Abweichungen der subjektiven Einordnung von der semiquantitativen Messung sind rot markiert.**

### 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll zur Darstellung von AQP4 im Hundegehirn mittels Immunfluoreszenz etabliert, das miteinander vergleichbare Ergebnisse aus sehr unterschiedlichem Probenmaterial erlaubt. Darüber hinaus wurden Besonderheiten der Verteilung von AQP4 im Hundegehirn beobachtet.

Im Folgenden wird zuerst diskutiert, wie die Ergebnisse der Vorversuche sich auf das finale Immunfluoreszenzprotokoll ausgewirkt haben. Anschließend werden die aufgefallenen Besonderheiten der Verteilung von AQP4 diskutiert und ein Fazit gezogen.

#### 5.1 Etablierung des Protokolls

Verschiedene Vorversuche wurden durchgeführt um die Parameter des finalen Immunfluoreszenzprotokolls zu bestimmen. Ziel ist es, dass das Immunfluoreszenzprotokoll am Ende den Anforderungen der Vergleichbarkeit genügt.

##### 5.1.1 Heterogenität des Probenmaterials

Im Klinikalltag ist nur sehr kurzfristig vorherzusagen, welche Patienten versterben, und welche davon als Spender für wissenschaftliches Probenmaterial dienen werden. Als Spender kommen nur solche Tiere in Frage, die von ihren Besitzern nach ihrer Euthanasie der Forschung überlassen werden. Dies erschwert nicht nur die Vorhersage, wann Probenmaterial zur Verfügung steht sondern auch welcher Art dieses Probenmaterial ist. Anders als bei einem klassischen Versuchsablauf mit Labortieren und klar definierten Parametern muss das eingesetzte Immunhistochemie Protokoll daher sehr robust gegenüber den Variationen sein, die bei einer hohen Bandbreite an Probenmaterial entstehen. Eine hohe Zuverlässigkeit in der Darstellung von AQP4 ist essentiell.

Um diese Zuverlässigkeit zu gewährleisten wurden die Probenspender in dieser Arbeit so gewählt, dass sie sich stark voneinander unterscheiden und häufig auftretende Hunderassen in verschiedenen Altern und mit unterschiedlichen Vorerkrankungen, die zur Euthanasie führten, abdecken. Daher erlaubt diese Zusammenstellung von Proben eine belastbare Aussage über die Darstellbarkeit von AQP4 periventriculär und im Kleinhirn verschiedener Hunde.

## Diskussion

In dieser Arbeit wurde zwischen einem erweiterten Ventrikel und einem normalen Ventrikel unterschieden. Die aktuelle Studienlage legt jedoch nahe, dass dies nicht der einzige Faktor ist, der Einfluss auf die Menge und Verteilung von AQP4 im Gehirn hat. Wie schnell und aus welchem Grund eine Erweiterung des Ventrikels stattfand könnte die AQP4 Menge und Verteilung ebenso beeinflussen, wie der intracranielle Druck zur Zeit der Euthanasie. Kausale Aussagen über die Ursache der Verteilung von AQP4 in Proben mit erweitertem Ventrikel sind daher in dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich. Die Darstellung von AQP4 im kaninen Gehirn lag im Zentrum dieser Arbeit. Alle darüber hinaus gehenden Ergebnisse müssen immer unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass die Studienpopulation und die Kontrollgrößen an eine Arbeit zur Etablierung einer Methode angepasst war. Zukünftige Studien können auf die hier gewonnene Basis aufbauen und einzelne Kontrollgrößen und ihre Auswirkung auf AQP4 getrennt voneinander untersuchen.

### 5.1.2 Nachweis der AQP4 Spezifität

In allen untersuchten Proben konnte AQP4 auf dem Genlevel mittels einer **PCR** nachgewiesen werden. Die Menge an AQP4 Genmaterial wurde über die Housekeeping Gene  $\beta$ -Actin und GAPDH bestimmt, die beide gleichmäßig gemessen wurden. Die starken Schwankungen der Menge an AQP4 in den Ventrikeln passen zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz. Wenn ausreichend Daten über die Menge AQP4 in gesunden kaninen Gehirnen vorliegt, wird der Gennachweis Aussagen darüber erlauben, ob bei einer Pathologie eine tatsächliche Veränderung der AQP4 Menge oder nur eine Umverteilung vorliegt. In zukünftigen Studien empfiehlt es sich, dies zu nutzen um bei einer auf kausale Zusammenhänge ausgelegten Probenzahl die Menge an exprimiertem AQP4 zu bestimmen.

Das Ergebnis der **Konfokalmikroskopie** zeigt, dass ein Großteil der AQP4 und GFAP Signale exakt kolokalisieren. Dies gilt besonders für die direkt periventrikulär gelegenen Bereiche und die als Netzstruktur sichtbaren Astrozytenausläufer. Dass besonders die Ausläufer von Astrozyten AQP4 Signal zeigen ist in der 3D Darstellung des Astrozyten deutlich zu erkennen.

## Diskussion

Die Kolokalisation von AQP4 mit **von Willebrand** zeigt, dass AQP4 in den perivaskulären Fortsätzen von Astrozyten vorkommt. Die Literatur berichtet dort von einer erhöhten Polarisation von AQP4 (Skjolding et al., 2010; Skjolding et al., 2013; Tait et al., 2008). Dies deutet wie die Ergebnisse der anderen Vortests darauf hin, dass der genutzte Primärantikörper AQP4 anfärbt. Außerdem belegt die Kolokalisation, dass sich AQP4 im Hundehirn analog zum Gehirn von Mäusen, Ratten und dem Menschen verhält (Skjolding et al., 2010, Tait et al., 2008). Damit ist wahrscheinlich, dass der genutzte Antikörper ausschließlich AQP4 markiert hat.

In der **Negativkontrolle** wurde kein echtes AQP4 Signal beobachtet. Die wenigen beleuchteten Bildpunkte sind Artefakte. Damit ist die Spezifität des AQP4 Primärantikörpers belegt. Zu beachten ist, dass der Standard für Negativkontrollen in der Immunhistochemie die Zugabe eines spezifischen Blockungspeptids und der Goldstandard der Test an Proben einer Knockout Maus ist (Brownjohn & Ashton, 2014). Das Blockungspeptid blockt kompetitiv an das Zielantigen und verhindert so eine Anlagerung des später hinzugegebenen Primärantikörpers. Für den genutzten AQP4 Primärantikörper liegt zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit kein Blockungspeptid vor. Die Verwendung einer Knockout Maus kommt ebenfalls nicht in Frage da der Primärantikörper am Hund getestet werden soll und ein Knockout Hund nicht verfügbar ist.

### 5.1.3 Direkt gefrorene Proben besser geeignet als in Formalin fixierte Proben

Die direkt gefrorenen Proben lieferten zuverlässigere Ergebnisse als die in Formalin fixierten Proben. Nahezu alle direkt gefrorenen Proben lieferten auswertbare und untereinander vergleichbare Ergebnisse. Die in Formalin fixierten Proben zeigten hingegen eine höhere Fehlerquote. Das Ependym der Ventrikelpalten war häufiger abgelöst und erlaubte so keine belastbaren Aussagen über eine Degradation des Ependyms als Reaktion auf einen Hochdruckzustand. Außerdem erschien der GFAP Kanal oft verwaschen und ermöglichte so keine Beurteilung feiner Strukturen. In Abbildung 26 sind exemplarisch zwei Ventrikelausschnitte des gleichen Hundes, einmal in Formalin fixiert und einmal frisch gefroren, abgebildet. Die in Formalin fixierte Probe ist durch eine unspezifische GFAP Anfärbung grünlich verwaschen. Es sind keine feinen Strukturen zu erkennen. In der frisch gefrorenen Probe sind Strukturen in allen Kanälen spezifisch angefärbt

## Diskussion

und ermöglichen es so auch feine Strukturen zu beurteilen. Die DAPI Färbung ist in allen Proben zuverlässig. Dies deckt sich mit der bekannten Robustheit dieser Kernfärbemethode.

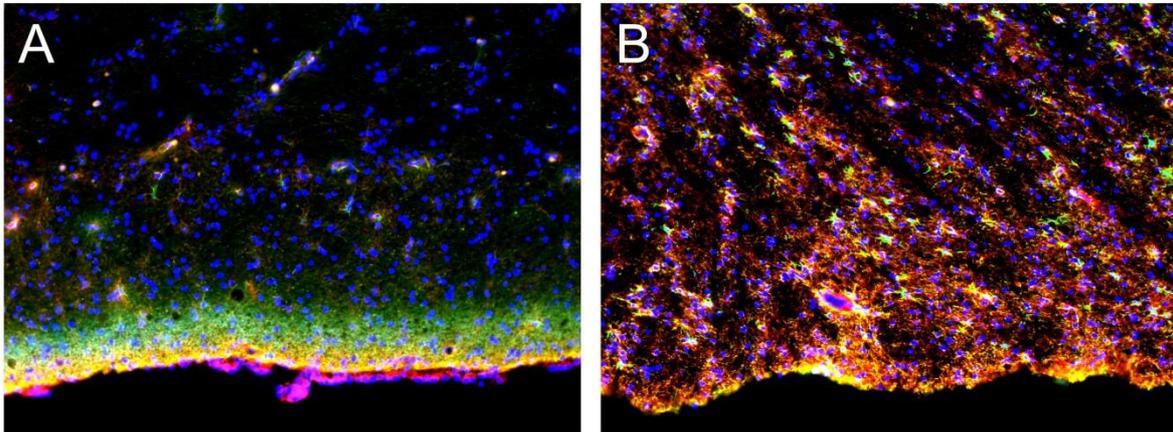


Abbildung 26: In Formalin fixierte und frisch gefrorene Probe.

Gegenüberstellung eines Ventrikelausschnittes des gleichen Hundes. Einmal wurde die Probe in Formalin fixiert (A) und einmal frisch gefroren (B). In der frisch gefrorenen Probe sind auch feine Strukturen genau zu erkennen. In der in Formalin fixierten Probe ist insbesondere der GFAP Kanal unspezifisch angefärbt.

Die in dieser Arbeit benutzten in Formalin fixierten Proben wurden unterschiedlich lange in Formalin gelagert. Dies und die unterschiedlichen Lagerbedingungen, wie zum Beispiel Lagertemperatur oder Sonneneinstrahlung, könnten der Grund für die hohe Fehlerquote sein. Die Fehlerquote der Proben korrelierte jedoch nicht mit der Lagerzeit, daher ist diese Erklärung anzuzweifeln. Es erscheint wahrscheinlich, dass Formalin unabhängig von den Lagerbedingungen und der Lagerzeit für kanine Gehirnproben zur Bearbeitung mit diesem Immunfluoreszenzprotokoll nicht geeignet ist. Es gilt die klare Empfehlung für das in dieser Arbeit etablierte Protokoll frisch gefrorene Proben zu verwenden. Die Proben sollten zügig nach Eintreten des Todes, wie beschrieben entnommen und schockgefroren werden. Frisch gefrorene Proben haben weiterhin den Vorteil, dass, wenn sie auch auf kurzen Transportwegen auf Trockeneis gekühlt und luftdicht verschlossen werden, eine Lagerung potenziell sehr lange möglich ist. Dadurch können Gehirnproben dann genommen werden, wenn sie anfallen und zu einem späteren Zeitpunkt gesammelt verarbeitet werden.

Ist die Entnahme von frisch gefrorenen Gehirnproben nicht möglich, ist zu beachten, dass der **Lagerzustand** und die **Schichtdicke** der in Formalin fixierten

## Diskussion

Proben eine maßgebliche Auswirkung auf die Qualität der Immunhistochemie haben. Während das periventrikuläre Signal in allen Proben stark ist verringert eine Lagerung über vier Tage bei  $-65^{\circ}$  Celsius und eine Verringerung der Schichtdicke von  $20\mu\text{m}$  auf  $10\mu\text{m}$  das Signal in den vom Ventrikel entfernten Bereichen bis zum Signalverlust.

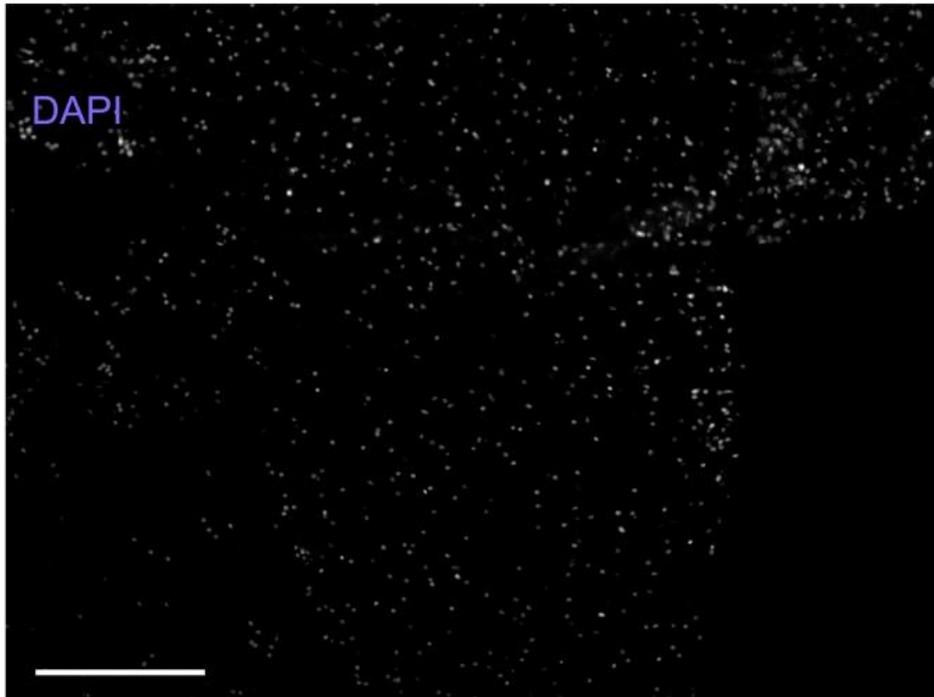


Abbildung 27: Überlappender Bereich.

In der  $10\mu\text{m}$  dicken Probe überlappt der periventrikuläre Bereich rechts oben im Bild. Die Signaldichte ist im DAPI Kanal an dieser Stelle höher.

Maßstab  $100\mu\text{m}$ .

Der intensiv angefärbte Bereich in der mit  $10\mu\text{m}$  geschnittenen Probe ist auf ein Artefakt zurückzuführen. Hier ist der periventrikuläre Bereich umgeklappt, siehe Abbildung 27, und doppelt so viele Astrozyten sind angefärbt, wie anhand der höheren Signaldichte im DAPI Kanal zu sehen ist. Dies erklärt auch, warum die Anzahl an beleuchteten Bildpunkten im DAPI Kanal zwischen der gelagerten und der frischen Probe abweicht. In der  $20\mu\text{m}$  dicken Probe ohne umgeklappten Bereich ist die Abweichung im DAPI Kanal minimal. Dies zeigt, dass die Proben miteinander vergleichbar sind und die Abweichung der AQP4 Werte echt ist.

Eine Lagerung der in Formalin fixierten Proben über mehrere Tage nach dem Schneiden erzeugt schlechtere Signale in der Immunhistochemie. Hier sind die frisch

## Diskussion

gefrorenen Proben erneut klar im Vorteil da das Fixationsmedium nicht während der Verarbeitung gewechselt werden muss.

### 5.1.4 Schichtdicke mit 20µm optimal

Die Schichtdicke wurde als Resultat der Vorversuche auf 20µm festgelegt, da der Verlust an beleuchteten Bildpunkten im AQP4 Kanal bei 10µm dicken Proben zu stark ist. Außerdem erzeugt eine Schichtdicke von 20µm eine bessere Verwertbarkeit am Kryostaten. Bei der niedrigeren Schichtdicke neigen die Schnitte dazu sich zusammen zu rollen und müssen dann verworfen werden, was gerade bei kleinen Proben mit wenig Material problematisch ist. Diese Punkte überwiegen den Nachteil, dass bei einer höheren Schichtdicke die Kolokalisation erschwert wird da mehr Zellen übereinander liegen. Ohnehin ist eine definitive Kolokalisation in einer Immunhistochemie am Durchlichtmikroskop nicht möglich, dieses Problem steigt jedoch mit höheren Schichtdicken. Man kann keine definitive Aussage darüber treffen in welcher Ebene der Probe ein beleuchteter Bildpunkt liegt. Um diesen Nachteil vollends auszugleichen wurde die bereits diskutierte Kolokalisation am Konfokalmikroskop durchgeführt.

### 5.1.5 AQP4 Antikörper maximal 1:250 verdünnen

In der Verdünnungsreihe des AQP4 Primärantikörpers zeigt sich eine Abnahme des Signals mit steigender Verdünnung. Ein Signalverlust tritt bereits in der zweiten getesteten Verdünnungsstufe 1:500 auf. Es sind also Strukturen, die eigentlich AQP4 enthalten nicht angefärbt. Periventrikulär ist das AQP4 Signal so stark, dass alle Strukturen, wenn auch weniger intensiv, angefärbt sind. Weiter entfernt vom Ventrikel fehlt jedoch ein Großteil der Strukturen, die in der 1:250 Verdünnung noch angefärbt sind. In den stärkeren Verdünnungen sind kaum noch echte Signale zu erkennen. Aus diesem Grund wird der AQP4 Primärantikörper im finalen Immunhistochemieprotokoll mit 1:250 verdünnt.

### 5.1.6 Keine Zugabe von Triton-X

Das AQP4 Signal ist am deutlichsten ohne die Zugabe von **Triton-X**. Da AQP4 in den Zellwänden von Astrozyten polarisiert und Triton-X diese Zellwände schädigt, mit dem Ziel den Zugang der Primärantikörper zu zytoplasmatischen

## Diskussion

Zielmolekülen zu erhöhen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Obwohl arbeitsgruppeninterne Protokolle nahe legen, dass die Zugabe von Triton-X die Leuchtkraft des im Zytoplasma gelegenen GFAP Kanals intensiviert, wurde im finalen Immunhistochemieprotokoll darauf verzichtet Triton-X einzusetzen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem AQP4 Signal, der GFAP Kanal dient nach der Etablierung des Protokolls lediglich der Verortung.

### 5.1.7 Semiquantitative Messung der Leuchtkraft ist essentiell

Nur in 50% der Fälle entsprach die subjektive Einordnung der Leuchtkraft den semiquantitativ gemessenen Werten. Von der subjektiven Einordnung auf die tatsächliche Leuchtkraft zu schließen ist wenig praktikabel. Dies kann daran liegen, dass der für die semiquantitative Messung angewandte Threshold, der definiert ab wann ein Bildpunkt als belichtet zählt, ungenaue Ergebnisse erzielt. In diesem Fall wäre der semiquantitativ gemessene Wert unbrauchbar. Dies erscheint unwahrscheinlich, da in allen Proben der gleiche Algorithmus verwendet wurde. Eine Verschiebung der Werte aufgrund des Thresholds, z. B. eine Überbewertung beleuchteter Bildpunkte, würde nur in eine Richtung ausfallen. In den Ergebnissen weicht die subjektive Einordnung aber in beide Richtungen von der semiquantitativen Messung ab, ein Fehler im Threshold ist somit unwahrscheinlich. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 28 bildlich dargestellt.

Eine zweite mögliche Fehlerquelle ist der Autor, der die subjektive Einordnung durchgeführt hat. Obwohl eine Verblindung der Proben stattfand, kann eine mangelnde Routine des Autors in der Einschätzung von Immunfluoreszenzfotos zu Überschätzungen und Unterschätzungen der Leuchtkraft führen. Menschlicher Fehler passt zu dem gemessenen Abweichungsmuster in Abbildung 28 und ist somit am wahrscheinlichsten.

## Diskussion

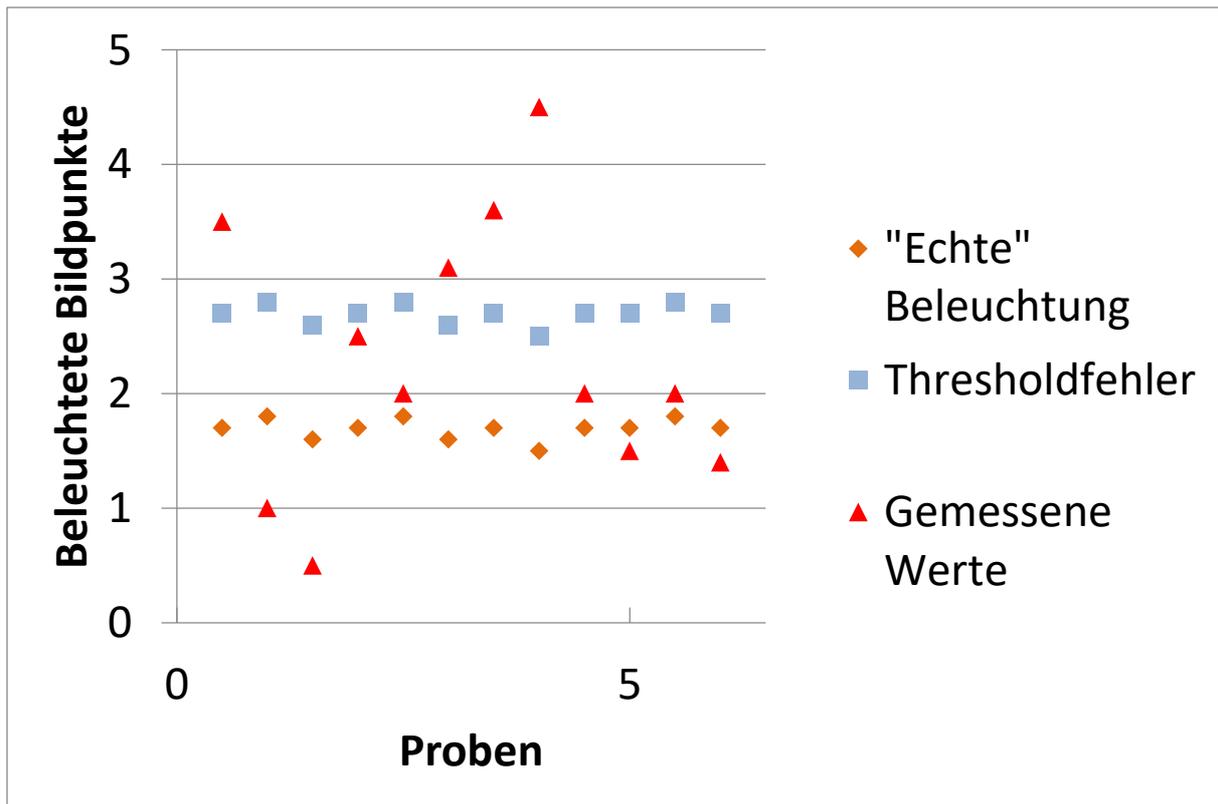


Abbildung 28: Thresholdfehler.

Die grünen Rauten geben die Werte der „echten“ Beleuchtung an, die blauen Quadrate stellen einen hypothetischen Thresholdfehler dar, der die Anzahl der beleuchteten Bildpunkte überbewertet. Die roten Dreiecke stellen die Streuung der gemessenen Werte dar. Die Abweichung beim Thresholdfehler ist parallel zur „echten“ Beleuchtung nach oben verschoben, die Abweichung der gemessenen Werte zufällig verteilt.

Eine subjektive Einordnung ist ergänzend zu der semiquantitativen Messung wichtig um die Belichtungswerte während der Mikroskopie einstellen zu können. Deshalb kann nicht darauf verzichtet werden. In zukünftigen Studien erscheint es deshalb sinnvoll die subjektive Einordnung durch mehrere Personen durchführen zu lassen und zu vergleichen. Eine semiquantitative Messung der Leuchtkraft muss immer durchgeführt werden, da die subjektive Einordnung alleine sehr unzuverlässig ist. Der gewählte Threshold hat sich als zuverlässig bewährt.

### 5.1.8 Fazit der Vorversuche

Durch die Vorversuche wurde gezeigt, dass der genutzte AQP4 Primärantikörper das gesuchte Zielantigen zuverlässig markiert und welche Parameter während der Immunfluoreszenz gewählt werden müssen, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen. Das Ergebnis ist ein robustes Immunfluoreszenzprotokoll.

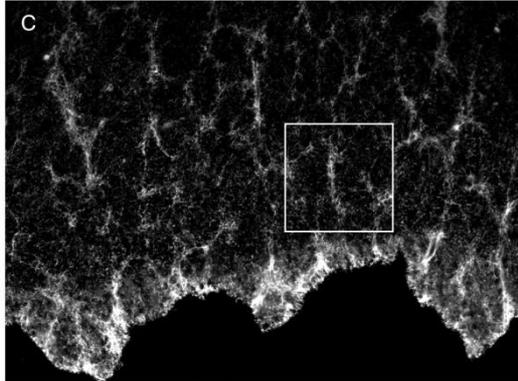
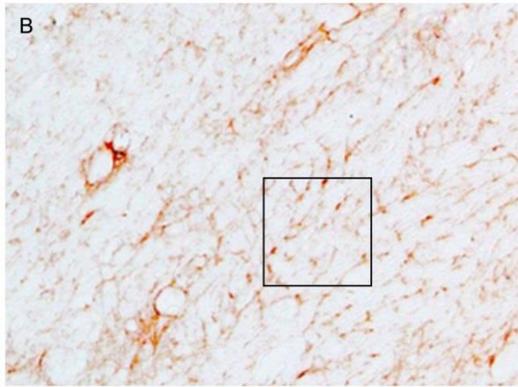
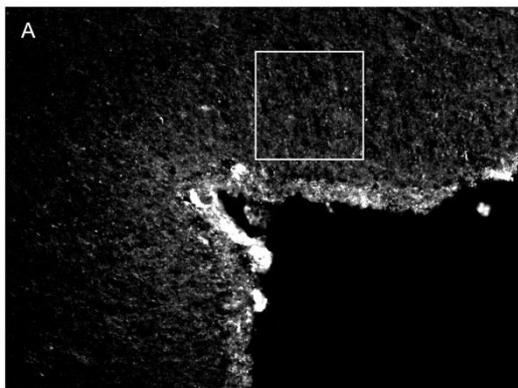
### 5.2 Verteilung von AQP4

Mit dem etablierten Immunfluoreszenzprotokoll wurden alle vorhandenen Proben bearbeitet. Dabei fielen trotz der auf eine Methodenetablierung ausgelegten Probenzahl Strukturbesonderheiten auf. Im Folgenden werden diese Beobachtungen zur Verteilung von AQP4 im kaninen Gehirn diskutiert.

#### 5.2.1 Netzmuster

In verschiedenen Proben war ein Netzmuster deutlich zu sehen.

Ein ähnliches Netzmuster ist der Arbeitsgruppe von Skjolding an Ratten aufgefallen



(Skjolding et al., 2010) und zeigt dort, dass AQP4 Signal in den netzartig verbundenen Ausläufern der Astrozyten vorhanden ist. In dieser Arbeit markiert das Netzmuster ebenfalls Astrozytenausläufer. Die Skjolding Arbeitsgruppe unterscheidet zusammenhängende und nicht zusammenhängende Netzmuster und setzt diese mit akutem, subakutem und chronischem Hydrozephalus in Zusammenhang. In der akuten Phase liegt bei den untersuchten Ratten ein Netzmuster vor, in der subakuten Phase verschwindet es um in der chronischen Phase wieder nachweisbar zu sein. Damit lässt sich bei Ratten über die Ausprägung des Netzmusters erkennen wie lange der

**Abbildung 29: Netzmuster.**

In den Kästen ist das Netzmuster deutlich zu erkennen. A ist eine eigene in Formalin fixierte Probe, B ist aus der Publikation von Skjolding et al. (2010) entnommen und C ist eine eigene frisch gefrorene Probe, in der das Netzmuster über die gesamte Fläche besonders deutlich ist.

Hydrozephalus vorlag. Die Netzstruktur in der vorliegenden Arbeit ist der von Skjolding et al. (2010) sehr ähnlich, siehe Abbildung 29, ist aber nur in manchen Proben sichtbar. Besonders deutlich ist die Netzstruktur hier in frisch gefrorenen

## Diskussion

Proben zu erkennen, da die feinen Strukturen besser erhalten bleiben. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass in zukünftigen Studien auf frisch gefrorene Proben zurückgegriffen werden sollte.

Die Netzstruktur kommt, anders als bei Skjolding et al. (2010), sowohl innerhalb der Gruppe ohne erweiterten Ventrikel als auch in der Gruppe mit erweitertem Ventrikel vor. Da in dieser Arbeit nicht zwischen verschiedenen Stadien eines Hydrozephalus unterschieden wurde, kann keine Aussage über die zeitliche Ausprägung der Netzstruktur getätigt werden. Somit ist eine Unterscheidung der Dauer des Hochdruckzustandes durch den Hydrozephalus in dieser Arbeit noch nicht möglich. Es bietet sich an in zukünftigen Studien zu überprüfen, wie lange der Hydrozephalus zum Zeitpunkt der Euthanasie vorlag. Sollte sich zeigen, dass das Netzmuster wie bei den Ratten verändert ist, bietet dies potenziell die Möglichkeit in Zukunft post mortem eine Aussage treffen zu können, wie lange ein Hund an einem Hydrozephalus erkrankt war.

### 5.2.2 Lipofuszinartefakte

In mehreren Proben fielen unabhängig von der Fixationsmethode große, runde angefärbte Strukturen auf. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Artefakte, da sie sich sowohl im AQP4 als auch im GFAP und DAPI Kanal identisch anfärben. Vermutlich handelt es sich um Lipofuszin.

Lipofuszin ist als Alterspigment bei Säugetieren bekannt und ein gelb-braunes Material, das sich durch Oxidationsstress von Proteinen und Lipiden bildet. Da Lipofuszinmoleküle sich untereinander mit Oxidationsprodukten, wie z.B. 4-Hydroxy-2-Nonenal vernetzen, können die so gebildeten Cluster nicht abgebaut werden. Sie akkumulieren im Laufe des Lebens eines Säugetiers und lagern sich als prominente dunkle Flecken in der Haut und anderen Geweben, z.B. dem Gehirn ab (Jung et al., 2007).

Beim Menschen ist bekannt, dass Lipofuszin sich in einer Immunhistochemie des Gehirns als Artefakt darstellt (Liutkiene, Stropus, Pilmane, & Dabuzinskiene, 2007). Im kaninen Gehirn wurde Lipofuszin in Phagozyten nachgewiesen und auch im kaninen Gehirn ist Lipofuszin als Struktur mit einer großen Ähnlichkeit zu den Artefakten in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen worden (Chambers et al. 2012). In Abbildung 30 sind die Lipofuszinartefakte von Chambers et al. (2012) den Lipofuszinartefakten dieser Arbeit gegenübergestellt, um die morphologische

## Diskussion

Ähnlichkeit zu belegen. Die beobachteten Lipofuszinartefakte stellen keinen Makel des Immunfluoreszenzprotokolls oder der Fixationsmethode dar.

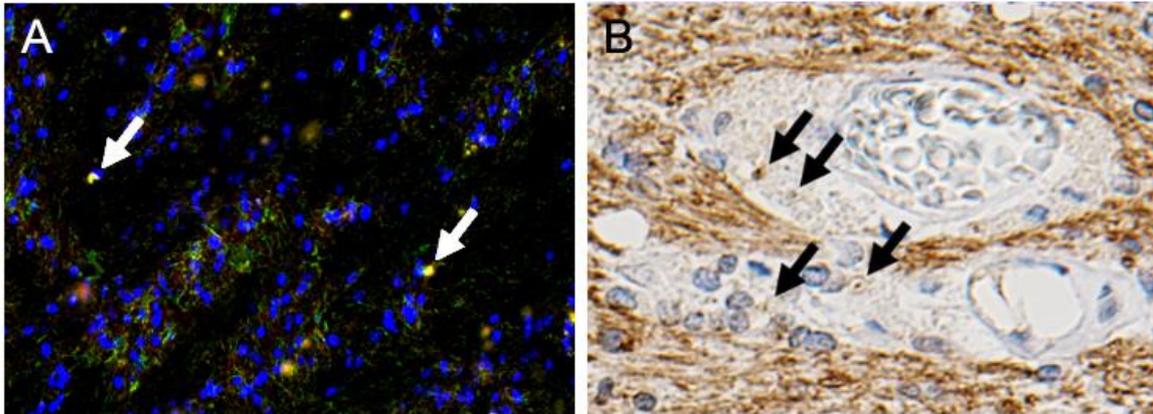


Abbildung 30: Lipofuszinartefakte.

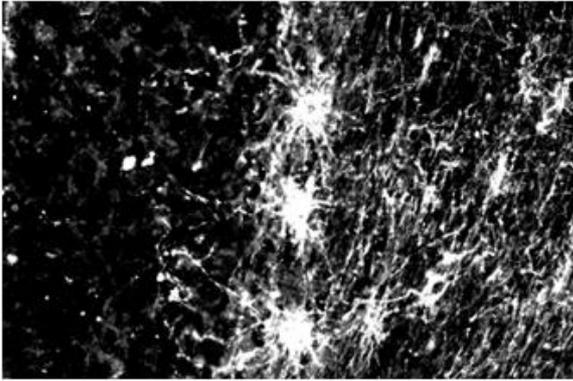
Gegenüberstellung der Lipofuszinartefakte dieser Arbeit (weiße Pfeile in A) und der Lipofuszinartefakte von Chambers, Uchida und Nakayama (schwarze Pfeile in B).

### 5.2.3 AQP4 positive kanine Purkinjezellen

Im Zerebellum fielen große, sternförmige Zellen auf, die ein deutliches AQP4 Signal zeigen. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um Purkinjezellen. Sie verfügen über einen großen Zelleib mit zahlreichen Ausläufern und sind im Stratum moleculare und in der Purkinjezellschicht lokalisiert. In Abbildung 31 sind die gefundenen Zellen und eine schematische Darstellung von Purkinjezellen gegenübergestellt. Obwohl es sich bei der schematischen Darstellung um einen Lateralschnitt und bei der Immunfluoreszenz um einen Transversalschnitt handelt ist die morphologische Ähnlichkeit deutlich. In der Immunfluoreszenz sind die zahlreichen Zellausläufer und der große Zelleib klar zu erkennen und stark AQP4 positiv.

## Diskussion

Sternförmige Zellen im Cerebellum



Schema Purkinjezellen

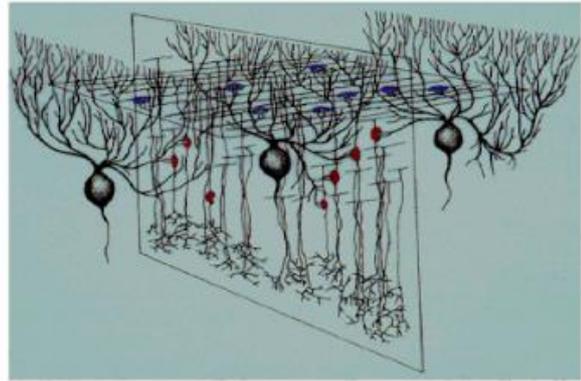


Abbildung 31: Vergleich sternförmige Zelle in Zerebellum und Schema Purkinjezelle.

Links ist der AQP4 Kanal eines Transversalschnittes des Zerebellums zu sehen, rechts eine schematischer Lateralanschnitt von Purkinjezellen aus „Examining Excitatory and Inhibitory Synapses on Cerebellar Purkinje Cells: An Electron Microscopic Study“ von A. Esquivel (2008).

Purkinjezellen mit AQP4 Signal sind bisher in keiner Spezies beschrieben. Hubbard et al. (2015) untersuchten kürzlich die Verteilung von AQP4 im Gehirn von Mäusen. Im Zerebellum dieser Mäuse fiel auf, dass die Purkinjezellen kein AQP4 Signal zeigten. Stavale et al. (2013) fanden ebenfalls kein AQP4 Signal in Purkinjezellen im Gehirn von Ratten, die einem Spinnentoxin ausgesetzt waren oder deren Kontrolltieren. Hier fiel lediglich auf, dass die zwischen den Purkinjezellen liegenden Astrozyten als Reaktion auf das Toxin vermehrt AQP4 exprimierten.

Verschiedene Gründe können das AQP4 Signal in den Purkinjezellen erklären. Zum einen kann es sich um eine Fehlreaktion handeln, wie zum Beispiel eine unspezifische Anfärbung. Gegen solch eine einmalige Fehlanfärbung spricht, dass AQP4 positive Zellen mit ähnlicher Morphologie in unveröffentlichten Immunfluoreszenzen von Hundekleinhirnen der Arbeitsgruppe dieser Arbeit gefunden wurden. In diesen Immunfluoreszenzen wurde jedoch der gleiche AQP4 Primärantikörper verwendet, wie in der vorliegenden Arbeit. Dass sich dieser Primärantikörper gegen ein ungewolltes Molekül in der Membran von Purkinjezellen richtet ist daher nicht auszuschließen.

Weiterhin könnte es sein, dass es sich bei den Zellen nicht um Purkinjezellen handelt. Dies erscheint aufgrund der charakteristischen Morphologie und Lokalisation von Purkinjezellen jedoch unwahrscheinlich, obwohl Bergmann Glia hier in Betracht gezogen werden könnten. Zwar zeigten die gefundenen Zellen einen gelappten Kern, der untypisch für Purkinjezellen ist, dies kann jedoch daran liegen, dass die Kerne

## Diskussion

nicht in der gleichen Ebene lagen oder schräg angeschnitten wurden und es sich somit um ein Artefakt handelt.

Um diese potentiellen Fehlerquellen zu untersuchen, sollte in einer zukünftigen Studie untersucht werden, ob sich die kaninen Purkinjezellen auch mit anderen AQP4 Antikörpern markieren lassen um eine Fehlbindung des Antikörpers zu überprüfen. Gleichzeitig empfiehlt sich eine Kolo-kalisation zwischen AQP4 und Purkinjezellen. Nur so kann sichergestellt werden, dass tatsächlich Purkinjezellen angefärbt werden. Kürzlich zeigten Whitney et al. (2008), dass Calbindin-D28k in der Lage ist, Purkinjezellen zuverlässiger zu markieren, als die klassische Nisselfärbung, wenn post mortem entnommene Proben genutzt werden. Eine Immunfluoreszenz mit verschiedenen AQP4 Antikörpern und Calbindin-D28k bietet sich daher an.

### 5.2.4 AQP4 ist im Ependym verringert

Im Ependym war das AQP4 Signal bei Hunden mit erweitertem Ventrikel schwächer als bei den Kontrolltieren. Die Ursache hierfür ist eine Degeneration des Ependyms. Diese Degeneration wurde bereits bei Mäusen als Reaktion auf einen anhaltenden erhöhten Ventrikeldruck gezeigt (Skjolding et al., 2010). Bei den Mäusen bildeten sich zuerst die Mikrovilli zurück bevor es zu einem kompletten Verlust des Ependyms kam. Diese Abstufungen sind auch bei den Hunden zu beobachten.

Alle Proben von Hunden mit erweitertem Ventrikel zeigten ein stark beschädigtes oder komplett degeneriertes Ependym mit wenig AQP4 Signal. Bei den

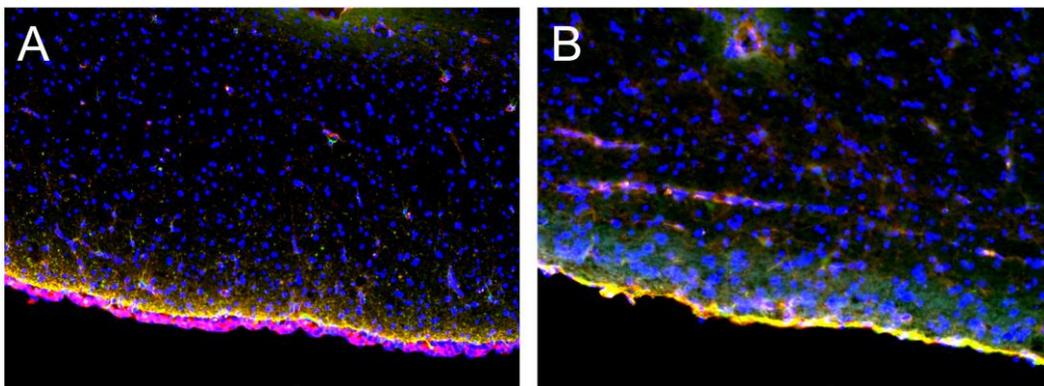


Abbildung 32: Ependymschäden.

Das Ependym von einem Hund ohne erweitertem Ventrikel (A) und von einem Hund mit erweitertem Ventrikel (B). Das Ependym des Hundes mit erweitertem Ventrikel ist beinahe vollständig degeneriert.

## Diskussion

Hunden ohne erweiterten Ventrikel war das Ependym intakt und reich an AQP4 Signal.

Die niedrige AQP4 Menge im Ependym von Hunden mit Hydrozephalus greift Fragestellungen aus aktuellen Studien auf. Schmidt et al. (2016) maßen einen erhöhten AQP4 Wert im Liquor von Hunden mit Hydrozephalus. In ihrer Diskussion stellen Schmidt et al. (2016) die Hypothese auf, dass dies möglicherweise auf zwei Faktoren zurückzuführen sei. Einerseits durch eine erhöhte Abschilferung von Ependymzellen als Reaktion auf erhöhten Druck, wie sie auch in dieser Arbeit schon diskutiert wurde. Diese Hypothese lässt sich mit der vorliegenden Arbeit belegen und visualisieren. Gleichzeitig kommt es aber auch zu der von Schmidt et al. (2016) ebenfalls diskutierten, erhöhten Bildung von AQP4 im periventrikulären Cortex als Reaktion auf einen Hydrozephalus. Auch eine erhöhte Bildung von AQP4 könnte zu mehr AQP4 im Liquor führen.

### 5.2.5 AQP4 ist im Cortex erhöht

Der Cortex zeigte in den Proben mit erweitertem Ventrikel eine Hochregulation der AQP4 Signale. Diese periventrikuläre Hochregulation von AQP4 hat eine hohe Ähnlichkeit mit der von Nestic et al. (2010) beschriebenen astrozytären Hochregulation von AQP4 nach Rückenmarkstraumata. Nestic et al. (2010) führen die AQP4 Hochregulation auf eine Reaktion auf astrozytäre Schwellungen zurück. Weiterhin prognostizieren sie, dass die AQP4 Hochregulation auch nach Verheilen des Traumas ein Leben lang bestehen bleibt. Dies bedeutet auch, dass die negativen Eigenschaften von übermäßiger AQP4 Expression, wie gesteigerte Anfälligkeit für zytotoxische Ödeme, ebenfalls ein Leben lang bestehen blieben. Eine medikamentöse Regulation von AQP4 ist demnach auch für chronisch erkrankte Patienten sehr sinnvoll.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheinen Hunde mit Hydrozephalus als sehr gut geeignetes Modell um diese Prognose zu überprüfen. Gleichzeitig deuten die Ergebnisse darauf hin, dass in der Studie von Schmidt et al. (2016), wie vermutet, im Liquor von hydrozephalischen Hunden nicht nur abgeschilferte Ependymzellen, sondern auch hochreguliertes AQP4 gemessen haben. In Zukunft kann dank der jetzt etablierten Immunfluoreszenz überprüft werden, ob im Liquor gemessenes AQP4 mit einer astrozytären Hochregulation übereinstimmt.

### 5.2.6 Unterschiedliche Verteilungen von AQP4 auf Astrozyten

Betrachtet man die Astrozyten einzeln so war die Verteilung der AQP4 Signale auf der Zelloberfläche sehr unterschiedlich. Die Astrozytenoberflächen waren nicht gleichmäßig angefärbt, sondern zeigten Lokalisationen mit erhöhtem AQP4 Signal. Es gab in der vorliegenden Arbeit drei Expressionsmuster, wie in **Abbildung 33** dargestellt, die sich bei verschiedenen Hunden wiederholen. Diese waren:

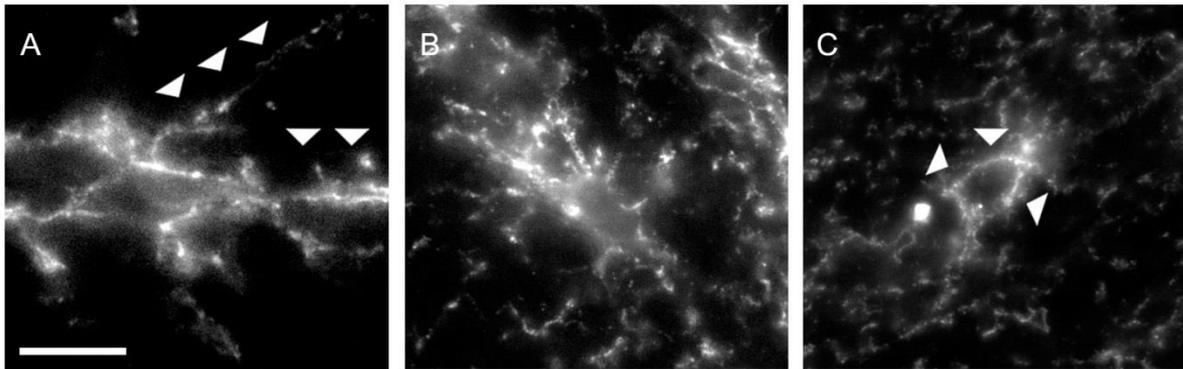


Abbildung 33: Expressionsmuster AQP4 auf Astrozyten.

AQP4 Signal in drei unterschiedlichen Astrozyten von unterschiedlichen Hunden. Die Pfeilspitzen in A (perivaskulären Astrozytenausläufer) und C (Membran der Astrozytenkörper) zeigen die Orte gesteigerter AQP4 Polarisation an. In B ist AQP4 über den gesamten Astrozyten gleichmäßig verteilt.

Maßstab 100µm.

- A. Das AQP4 Signal war in den **perivaskulären Ausläufern der Astrozyten** polarisiert.
- B. Das AQP4 Signal war über den **gesamten Astrozyten** gleichmäßig verteilt.
- C. Das AQP4 Signal war besonders stark in der **Membran der Astrozytenkörper**.

Skjolding et al. (2013) konnten ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster beobachten. Sie verglichen einerseits die Gehirnproben von gesunden Menschen und Menschen mit einem Hydrozephalus und andererseits Ratten mit einem Kaolin induzierten Hydrozephalus gegen gesunde Kontrollratten. Bei beiden humanen Gruppen beobachteten sie die AQP4 Signale hauptsächlich in der Membran von Astrozytenkörpern unabhängig davon ob ein Hydrozephalus vorlag oder nicht. Ganz anders reagierten die Astrozyten der Ratten. Dort unterschied sich das AQP4 Expressionsmuster deutlich zwischen Tieren mit einem Kaolin induzierten Hydrozephalus und den gesunden Kontrolltieren. Die Ratten von Skjolding et al.

## Diskussion

(2013) mit Kaolin induziertem Hydrozephalus zeigten AQP4 Signale hauptsächlich in den perivaskulären Astrozytenausläufern. Es liegt also ein starker Speziesunterschied zwischen dem Mensch und der Ratte vor. Die Unterschiede der astrozytären AQP4 Expression zwischen Menschen und Ratten sind mehrfach beschrieben (Medici et al. 2011; Perez et al., 2007), die Unterschiede bei Hunden bisher jedoch nicht. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit können diese Unterschiede zum ersten Mal beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Hunde unterschiedliche AQP4 Expressionsmuster, diese waren jedoch unabhängig von dem Vorliegen eines Hydrozephalus. Um zu verstehen, wie speziesspezifische Unterschiede zustande kommen muss zuerst der Mechanismus verstanden werden, der AQP4 polarisiert.

Für die Polarisation an den perivaskulären Astrozytenausläufern im Gegensatz zum Astrozytenkörper ist der Dystrophin-assoziierte Protein Komplex verantwortlich. Entscheidend hierfür sind die Proteine  $\alpha$ -Syntrophin und  $\beta$ -Dystroglycan (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Skjolding et al., 2013). Amiry-Moghaddam et al. (2003) zeigten, dass  $\alpha$ -Syntrophin Knockout Mäuse bei gleichbleibender Gesamtmenge AQP4 perivaskulär deutlich weniger AQP4 Signal zeigten als eine Kontrollgruppe. Dies legt nahe, dass  $\alpha$ -Syntrophin eine entscheidende Rolle bei der perivaskulären Lokalisation von AQP4 spielt. Ohne  $\alpha$ -Syntrophin sind genauso viele AQP4 Kanäle vorhanden, sie können nur nicht auf der Oberfläche polarisiert werden, was sie effektiv unwirksam macht.

Nicht nur ein Hydrozephalus sondern auch ein Trauma beeinflusst das Expressionsmuster von AQP4 in Astrozyten. Nach einer Stichverletzung zeigten Ratten einen Verlust von  $\beta$ -Dystroglycan, dem anderen entscheidenden Bestandteil des Dystrophin-assoziierten Protein Komplexes und verloren ebenfalls die Fähigkeit AQP4 in den perivaskulären Ausläufern von Astrozyten zu verankern (Szabo & Kalman, 2008). Der Dystrophin-assoziierte Protein Komplex ist also in seiner Gesamtheit verantwortlich dafür, AQP4 zu polarisieren. Diese Erkenntnis ermöglicht es potenziell Medikamente zu entwickeln, die AQP4 nicht insgesamt inhibieren oder verstärken sondern auch die Verteilung von AQP4 auf Astrozyten zu beeinflussen. Wegen der angesprochenen Speziesunterschiede zwischen Ratten und Menschen lohnt sich ein Blick auf den Hund als eventuell der Ratte überlegenes Modell für die Beeinflussung der AQP4 Verteilung an menschlichen Astrozyten. Am Hund kann möglicherweise analoger zum Menschen untersucht werden, wie sich AQP4 auf

## Diskussion

Astrozyten verteilt. Da AQP4 beeinflussende Medikamente in Zukunft zuerst für den humanen Markt entwickelt werden, würden Hunde davon profitieren, wenn humane Medikamente auch auf den Hund anwendbar wären. Daher lohnt sich ein Abgleich der bisherigen Studien mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten drei Expressionsmustern.

Bei Skjolding et al. (2013) ist das astrozytäre AQP4 Signal bei Ratten mit einem Hydrozephalus in den perivaskulären Astrozytenausläufern zu finden, vergleichbar mit dem dargestellten „Expressionsmuster A“. In dieser Arbeit ist jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster und dem Vorliegen eines Hydrozephalus zu sehen. Die Hunde mit Hydrozephalus verteilen sich auf alle drei Expressionsmuster. Dies liegt einerseits daran, dass die Probenzahl der vorliegenden Arbeit auf die Etablierung einer Immunfluoreszenz ausgelegt ist und keine belastbaren Aussagen über Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen eines Hydrozephalus und dem AQP4 Expressionsmuster in Astrozyten erlaubt. Andererseits gilt die angesprochene Limitation, dass der durch Kaolin Injektion ausgelöste Hydrozephalus bei Ratten stets nicht kommunizierend ist. Bei Hunden und Menschen kommt der kommunizierende Hydrozephalus häufiger vor. Inwiefern ein Unterschied in der astrozytären AQP4 Verteilung zwischen einem kommunizierenden und nicht kommunizierenden Hydrozephalus vorliegt ist unklar.

Um einen genaueren Vergleich zwischen den Expressionsmustern bei Hunden im Vergleich mit den bekannten Expressionsmustern bei Ratten zu ermöglichen bedarf es weiterer Studien. Aufbauend auf den bei Hunden beobachteten drei verschiedenen Expressionsmustern bietet sich eine zukünftige Arbeit an, die eine höhere Zahl an Hunden untersucht und für diese miterhebt, wie lange der Hydrozephalus bestand und ob dieser kommuniziert. So kann ein zeitlicher und kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Hydrozephalus und dem astrozytären AQP4 Expressionsmuster überprüft werden. Wichtig für diese potentielle Studie wird sein, dass die Probenentnahme zügig geschieht und die Proben direkt schockgefroren werden, da unbekannt ist, wie lange es dauert, bis Astrozyten ihr perivaskuläres AQP4 Signal nach einem Trauma verlieren.

### 5.3 Fazit

Die hier etablierte Immunfluoreszenz eignet sich für die Beobachtung von AQP4 im Hundegehirn. Der genutzte Antikörper der Firma Santa Cruz bindet spezifisch an AQP4 und liefert ein robustes Ergebnis, das auf eine große Bandbreite unterschiedlicher kaniner Gehirne anwendbar ist. Frisch gefrorenes Probenmaterial ist in Formalin fixiertem Probenmaterial in seiner Auswertbarkeit deutlich überlegen.

Bereits mit der auf die Etablierung eines Immunfluoreszenzprotokolls ausgelegten Hundepopulation ließen sich neue Erkenntnisse über die Verteilung von AQP4 im kaninen Gehirn gewinnen. Zukünftige Studien können nun spezifische Fragestellungen gezielt angehen und dafür passende Hundepopulationen wählen. Jeder Hund, der den Einschlusskriterien dieser Arbeit entspricht, ist ein potentieller Probenspende. Die Gehirne können lange gelagert und für verschiedene Studien mehrfach verwendet werden, da jede Immunfluoreszenz nur geringe Probengrößen benötigt. Durch das in dieser Arbeit etablierte Immunfluoreszenzprotokoll sind zukünftig Studien mit für die Veterinärmedizin außergewöhnlich hohen Probenzahlen mit wenig Aufwand umsetzbar.

Dass der Hund sich als Modell für den humanen Hydrozephalus bewährt hat ist von Vorteil für die Veterinär- und die Humanmedizin. Während die Humanmedizin Zugriff auf zuverlässiges Probenmaterial bekommt für das kein Tier zusätzlich euthanasiert werden muss, gewinnt die Veterinärmedizin Zugriff auf humanmedizinische Forschungsvorhaben und damit verbundene Fördergelder. Die Versorgung aller kaninen und humanen Patienten mit Hydrozephalus wird in der Zukunft von der Entwicklung einer medikamentösen AQP4 Regulation profitieren. Dafür wird mehr Grundlagenforschung benötigt. Mit dieser Arbeit ist ein weiterer Schritt in diese Richtung getan.

## 6 Zusammenfassung

### Hintergrund

Wasser spielt eine wichtige Rolle in Säugetiergehirnen. Physiologische und pathologische Prozesse bauen osmotische Gradienten auf, die kompensiert werden müssen um die Homöostase zu erhalten. Aufgrund der knöchernen Begrenzung des Gehirns führen Schwellungen zu einem Druckanstieg mit oft fatalem Ausgang. Um die Wasserhomöostase zu erhalten kommen verschiedene Mechanismen zum Einsatz, die Wasser stetig umverteilen. Erst in den 1990ern wurde der Hauptmechanismus für diese wichtige Funktion entdeckt: Die Aquaporine (AQPs). AQPs sind Wasserkanal Proteine, die bidirektionalen und energieunabhängigen Durchfluss von Wasser ermöglichen. AQP4 ist das häufigste AQP im Gehirn von Säugetieren und steht seit längerem im Fokus der Neurowissenschaften. Im Gehirn von Ratten, Mäusen und Menschen wird AQP4 in Gliazellen exprimiert. Dort vermittelt es den Wassertransport durch die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke.

### Ziel der Studie

Die Expressionsrate von AQP4 variiert bei pathologischen Zuständen. Ratten mit einem Hydrozephalus zeigten einen AQP4 Anstieg in periventriculären Hirnanteilen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Kompensationsmechanismus aufgrund des erhöhten Wasserdrucks, Aghayev et al. (2012) führen jedoch an, dass weitere Studien benötigt werden, um diese Theorie auf den Hydrozephalus von Menschen übertragen zu können. Ein Grund hierfür ist, dass der Hydrozephalus bei Ratten nicht auf den Hydrozephalus bei Menschen übertragbar ist. Der kommunizierende Hydrozephalus ist die häufigste Form bei Menschen, Ratten zeigen diese Form jedoch nie. Hunde, besonders sogenannte Toy Rassen, jedoch neigen zur Ausbildung eines kommunizierenden Hydrozephalus. Diese Hunde erhalten häufig einen peritonealen Shunt um den intracraniellen Druck zu vermindern. Dies ist momentan die Methode der Wahl, allerdings ist sie mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden, die zum Tod des Hundes führen können. Mit der Einverständnis der Besitzer könnten diese Hunde als Hirnspende dienen um die Verteilungsmuster von AQP4 im kommunizierenden Hydrozephalus zu untersuchen. AQP4 wurde bisher nie im caninen Gehirn untersucht. Diese Studie

hat als Zielsetzung die Etablierung eines Immunfluoreszenzprotokolls, das AQP4 im caninen Gehirn darstellen kann.

### **Methoden**

Immunfluoreszenz, rtPCR und Konfokalmikroskopie wurden genutzt um an den Gehirnen von 15 Hunden ein immunfluoreszenzprotokoll zu etablieren. Die Gehirne wurden direkt nach der Euthanasie in Formalin fixiert oder frisch gefroren. Nach der Etablierung des Protokolls wurde eine semiquantitative Belichtungsmessung benutzt um die AQP4 Verteilung in periventriculären Bereichen und im Cerebellum zu untersuchen.

### **Ergebnisse**

Es wurde ein robustes und zuverlässiges Immunfluoreszenzprotokoll mit einer hohen AQP4 Spezifität etabliert. Die in Formalin fixierten Proben waren den frisch gefrorenen Proben in Detaillierbarkeit und Auswertbarkeit deutlich unterlegen. Verschiedene neue AQP4 Expressionsmuster wurden beschrieben.

### **Schlussfolgerungen**

Das Immunfluoreszenzprotokoll ist auf verschiedene Hundegehirne anwendbar, die AQP4 Spezifität ist hoch. Die neu beschriebenen AQP4 Expressionsmuster sind ein vielversprechender Ausgangspunkt für zukünftige Studien. Mit dem etablierten Protokoll ist es möglich große Probenmengen zu sammeln, die Gehirne solange zu lagern bis ausreichend Studienmaterial vorhanden ist und dann in einem Durchgang untereinander vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

## 7 Summary

### **Background**

Water plays a critical role in the mammalian brain. Physiological and pathological processes build osmotic gradients that need to be compensated in order to maintain water homeostasis. Due to the rigid bone structures of the skull brain swelling will compress the tissue with oftentimes fatal outcome. To maintain water homeostasis and prevent brain swelling different mechanisms are constantly at work to relocate water. Only since their discovery in the 1990s the main force behind water redistribution in the brain is known: Aquaporins (AQPs). AQPs are water channel proteins, which allow bidirectional, energy independent bulk flow of water. AQP4 is the most common AQP in mammalian brains and has been in the focus of neuroscience for the last years. In rodent and human brains AQP4 is expressed mainly in supporting tissue, namely in glia cells. There it facilitates water crossing the blood-brain and blood-CSF boundaries.

### **Aim of the study**

It has been shown that the expression rate of AQP4 varies in pathologies. Rodents with hydrocephalus showed a marked increase in AQP4 expression in the periventricular white matter and cerebral cortex. This might be a compensatory mechanism due to the increase of water that needs to be relocated in rodent brains but Aghayev et al. (2012) noted that further evidence is needed to apply this theory to human hydrocephalus. This is partly because rodent hydrocephalus models are not transferable to human hydrocephalus. Communicating hydrocephalus is the most common type in man but rodents do not express this type. Dogs, especially toy breeds, on the other hand are prone to developing communicating hydrocephalus. These dogs often need to undergo peritoneal shunting surgery to relief intracranial pressure. A procedure that is the current method of choice. But as all intracranial surgeries it comes with severe side effects that might lead to death during the procedure. With the owners' consent these dogs could act as organ donors and their brains could be fixated and used to study AQP4 in communicating hydrocephalus. AQP4 has not yet been investigated in the canine brain. This study aimed to establish a novel immunofluorescence staining to visualize AQP4 in the brain of euthanized dogs.

### **Methods**

Immunocytochemistry, rtPCR, and Confocal Microscopy were used on the brains of 15 dogs to establish an immunocytochemistry protocol. Brains were fixed in Formalin or freshly frozen directly after euthanasia. After establishing the protocol semiquantitative exposure measurements were used to evaluate AQP4 patterns in the periventricular regions and the cerebellum.

### **Results**

A robust and reliable immunocytochemistry protocol with a high likelihood of staining AQP4 was established. Formalin fixed brains were inferior to freshly frozen material concerning visibility of cell structures. Different novel AQP4 expression patterns were found.

### **Conclusion**

The immunocytochemistry protocol is applicable to a wide range of canine brains and very likely to be AQP4 specific. The novel AQP4 expression patterns are the starting point for future research. With the established protocol it is now possible to collect a large amount of specimens from dogs that die during surgery or are euthanized for other reasons, store these brains until sufficient numbers are achieved and then assess AQP4 expression in one set.

## 8 Immunfluoreszenzprotokoll

Arbeitsschritt	Dauer
<b>Stocklösungen ansetzen</b> <u>Stock A:</u> 0,2 molar $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ + $\text{H}_2\text{O}$ Natriumhydrogenphosphatmonohydrat (M=137,99 g/mol) der Firma Merck (55,2g auf 2 Liter Aqua dest.) <u>Stock B:</u> 0,2 molar $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ + $2\text{H}_2\text{O}$ Natriumphosphat dibasisch Dihydrat der Firma Sigma-Aldrich (71,2g auf 2 Liter Aqua dest.) <u>Für 2L Pufferlösung (PBS):</u> 280ml Stock A + 720ml Stock B. 1:1 verdünnen mit $\text{H}_2\text{O}$ . Molarität anschließend 0,1mol. <u>Fixations-Lösung:</u> 10ml 20% PFA Fix zu 90ml PBS -> ergibt 2% PFA Fix <u>NDS:</u> 10% Normal Donkey Serum + 90 % PBS	
<b>Schnitte im Kryostaten temperieren</b>	00:10 h
<b>Trocknen</b> Währenddessen Proben mit <b>PAP Pen</b> umranden	00:08 h
<b>Fixation</b> mit PFA Fix in <b>Glasküvette auf Schüttler</b>	00:10 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Blocking Solution</b> auftragen in <b>feuchter Kammer bei Raumtemperatur</b>	01:00 h
<b>Primärantikörper</b> auftragen in <b>feuchter Kammer bei 4° Celsius</b>	24:00 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Sekundärantikörper</b> auftragen in <b>verdunkelter feuchter Kammer bei Raumtemperatur</b>	02:00 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>DAPI</b> 1:10000 in 100ml PBS als Tauchbad in <b>verdunkelter Glasküvette</b> auf Schüttler	00:15 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Waschen</b> in PBS	00:05 h
<b>Deckeln</b> mit Citifluor	
Proben lichtgeschützt lagern bei 4° Celsius	

## 9 Literaturverzeichnis

1. Aghayev, K., Bal, E., Rahimli, T., Mut, M., Balci, S. & Vrionis, F. (2012). Aquaporin-4 expression is not elevated in mild hydrocephalus. *Acta neurochirurgica*, 154(4), 753-759. <http://doi.org/10.1007/s00701-011-1241-9>
2. Amiry-Moghaddam, M., & Ottersen, O. P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 991–1001. <http://doi.org/10.1038/nrn1252>
3. Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Haug, F. M., Froehner, S. C., et al. (2003). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 2106–2111. <http://doi.org/10.1073/pnas.0437946100>
4. Badaut, J., Brunet, J. F., & Regli, L. (2007). Aquaporins in the brain: From aqueduct to “multi-duct.” *Metabolic Brain Disease*, 22(3-4), 251–263. <http://doi.org/10.1007/s11011-007-9057-2>
5. Badaut, T., Lasbennes, T., Magistretti, P. J., & Regli, L. (2002). Aquaporins in brain: Distribution, physiology, and pathophysiology. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(4), 367–378. <http://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00001>
6. Biel, M., Kramer, M., Forterre, F., Jurina, K., Lautersack, O., Failing, K., & Schmidt, M. J. (2013). Outcome of ventriculoperitoneal shunt implantation for treatment of congenital internal hydrocephalus in dogs and cats: 36 cases (2001-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(7), 948–958. <http://doi.org/10.2460/javma.242.7.948>
7. Bloch, O., Papadopoulos, M. C., Manley, G. T., & Verkman, A. S. (2005). Aquaporin-4 gene deletion in mice increases focal edema associated with staphylococcal brain abscess. *Journal of Neurochemistry*, 95(1), 254–262. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03362.x>
8. Brownjohn, P. W., & Ashton, J. C. (2014). What can be concluded from blocking peptide controls? *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 22(8), 634. <http://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182a77fe5>
9. Chambers, J. K., Uchida, K., & Nakayama, H. (2012). White matter myelin loss in the brains of aged dogs. *Experimental Gerontology*, 47(3), 263–269.

<http://doi.org/10.1016/j.exger.2011.12.003>

10. Filippidis, A. S., Kalani, M. Y. S., & Rekate, H. L. (2011). Hydrocephalus and Aquaporins: The role of Aquaporin-4. In *Hydrocephalus* (Vol. 113, pp. 55–58). Vienna: Springer Vienna. [http://doi.org/10.1007/978-3-7091-0923-6\\_12](http://doi.org/10.1007/978-3-7091-0923-6_12)
11. Furman, C. S., Gorelick-Feldman, D. A., Davidson, K. G. V., Yasumura, T., Neely, J. D., Agre, P., & Rash, J. E. (2003). Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13609–13614. <http://doi.org/10.1073/pnas.2235843100>
12. Glasbey, C. A. (1993). An analysis of histogram-based thresholding algorithms. *Graphical Models and Image Processing*, 55(6), 532–537. <http://doi.org/10.1006/cgip.1993.1040>
13. Gonen, T., & Walz, T. (2006). The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39(4), 361–396. <http://doi.org/10.1017/S0033583506004458>
14. Gunnarson, E., Zelenina, M., Axehult, G., Song, Y., Bondar, A., Krieger, P., et al. (2008). Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia*, 56(6), 587–596. <http://doi.org/10.1002/glia.20627>
15. Hubbard, J. A., Hsu, M. S., Seldin, M. M., & Binder, D. K. (2015). Expression of the astrocyte water channel Aquaporin-4 in the mouse brain. *ASN Neuro*, 7(5), 1–14. <http://doi.org/10.1177/1759091415605486>
16. Huber, V. J., Tsujita, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., & Nakada, T. (2007). Identification of arylsulfonamides as Aquaporin 4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5), 1270–1273. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.010>
17. Iacovetta, C., Rudloff, E., & Kirby, R. (2012). The role of Aquaporin 4 in the brain. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1), 32–44. <http://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00390.x>
18. Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Lipofuscin - Formation, distribution, and metabolic consequences. *Molecular Mechanisms and Models of Aging*, 1119(1), 97–111. <http://doi.org/10.1196/annals.1404.008>
19. Li, X., Kong, H., Wu, W., Xiao, M., Sun, X., & Hu, G. (2009). Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience*, 162(1), 67–77.

<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.044>

20. Liutkiene, G., Stropus, R., Pilmane, M., & Dabuzinskiene, A. (2007). Age-related structural and neurochemical changes of the human superior cervical ganglion. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 189(5), 499–509. <http://doi.org/10.1016/j.aanat.2007.01.010>
21. Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J., & Verkman, A. S. (1997). Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *Journal of Clinical Investigation*, 100(5), 957. <http://doi.org/10.1172/JCI231>
22. Manley, G. T., Fujimura, M., Ma, T. H., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A. W., et al. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature Medicine*, 6(2), 159–163. <http://doi.org/10.1038/72256>
23. Medici, V., Frassoni, C., Tassi, L., Spreafico, R., & Garbelli, R. (2011). Aquaporin 4 expression in control and epileptic human cerebral cortex. *Brain Research*, 1367, 330–339. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.005>
24. Migliati, E., Meurice, N., DuBois, P., Fang, J. S., Somasekharan, S., Beckett, E., et al. (2009). Inhibition of Aquaporin-1 and Aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site. *Molecular Pharmacology*, 76(1), 105–112. <http://doi.org/10.1124/mol.108.053744>
25. Nedergaard, M. (2013). Garbage truck of the brain. *Science*, 340(6140), 1529-1530. <http://doi.org/10.1126/science.1240514>
26. Nesic, O., Guest, J. D., Zivadinovic, D., Narayana, P. A., Herrera, J. J., Grill, R. J., et al. (2010). Aquaporins in spinal cord injury: The janus face of Aquaporin 4. *Neuroscience*, 168(4), 1019–1035. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.037>
27. Oowler, B. K., Pitham, T., & Wang, D. (2010). Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7(1), 15. <http://doi.org/10.1186/1743-8454-7-15>
28. Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2005). Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13906–13912.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M413627200>

29. Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric Nephrology*, *22*(6), 778–784. <http://doi.org/10.1007/s00467-006-0411-0>
30. Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(4), 265–277. <http://doi.org/10.1038/nrn3468>
31. Papadopoulos, M. C., Saadoun, S., & Verkman, A. S. (2008). Aquaporins and cell migration. *European Journal of Physiology*, *456*(4), 693–700. <http://doi.org/10.1007/s00424-007-0357-5>
32. Pasantés-Morales, H., & Cruz-Rangel, S. (2010). Brain volume regulation: Osmolytes and Aquaporin perspectives, *168*(4), 871–884. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.074>
33. Perez, E., Barrachina, M., Rodriguez, A., Torrejon-Escribano, B., Boada, M., Hernandez, I., et al. (2007). Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. *Brain Research*, *1128*(1), 164–174. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.109>
34. Preston, G. M., & Agre, P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(24), 11110–11114. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11110>
35. Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., & Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red-cell CHIP28 protein. *Science*, *256*(5055), 385–387. <http://doi.org/10.1126/science.256.5055.385>
36. Przyborowska, P., Adamiak, Z., Jaskolska, M., & Zhalniarovich, Y. (2013). Hydrocephalus in dogs: A review. *Veterinarni Medicina*, *58*(2), 73–80.
37. Rossi, A., Crane, J.M., Verkman, A.S. (2011). Aquaporin-4 Mz Isoform: Brain Expression, Supramolecular Assembly and Neuromyelitis Optica Antibody Binding. *Glia*, *59*(7), 1056-1063. <http://doi.org/10.1002/glia.21177>
38. Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2016). Datasheet Blank Template, 1–1.
39. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

40. Schmidt, M. J., Rummel, C., Hauer, J., Kolecka, M., Ondreka, N., McClure, V., & Roth, J. (2016). Increased CSF aquaporin-4, and interleukin-6 levels in dogs with idiopathic communicating internal hydrocephalus and a decrease after ventriculo-peritoneal shunting. *Fluids and Barriers of the CNS*, 13(1), 12. <http://doi.org/10.1186/s12987-016-0034-1>
41. Skjolding, A. D., Holst, A. V., & Broholm, H. (2013). Differences in distribution and regulation of astrocytic Aquaporin-4 in human and rat hydrocephalic brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(2), 179-191. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01275.x>
42. Skjolding, A. D., Rowland, I. J., & Sjøgaard, L. V. (2010). Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7, 20. <http://doi.org/10.1186/1743-8454-7-20>
43. Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G. T., & Verkman, A. S. (2004). Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(2), C426–C432. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>
44. Stavale, L. M., Soares, E. S., Mendonca, M. C. P., Irazusta, S. P., & da Cruz Hoefling, M. A. (2013). Temporal relationship between Aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon*, 66, 37–46. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.026>
45. Szabo, A., & Kalman, M. (2008). Post traumatic lesion absence of beta-dystroglycan-immunopositivity in brain vessels coincides with the glial reaction and the immunoreactivity of vascular laminin. *Current Neurovascular Research*, 5(3), 206–213. <http://doi.org/10.2174/156720208785425657>
46. Tait, M. J., Saadoun, S., Bell, B. A., & Papadopoulos, M. C. (2008). Water movements in the brain: Role of Aquaporins. *Trends in Neurosciences*, 31(1), 37–43. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.003>
47. Verkman, A. S., Binder, D. K., Bloch, O., Auguste, K., & Papadopoulos, M. C. (2006). Three distinct roles of Aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758(8), 1085–1093. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.018>

48. Wang, Y., Schulten, K., & Tajkhorshid, E. (2005). What makes an Aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *13*(8), 1107–1118. <http://doi.org/10.1016/j.str.2005.05.005>
49. Whitney, E. R., Kemper, T. L., Rosene, D. L., Bauman, M. L., & Blatt, G. J. (2008). Calbindin-D28k is a more reliable marker of human Purkinje cells than standard Nissl stains: A stereological experiment. *Journal of Neuroscience Methods*, *168*(1), 42–47. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.09.009>
50. Xie, K., Yang, J., Zhang, Z.G., Zhu, Y.M. (2005). Semi-automated brain tumor and edema segmentation using MRI. *European Journal of Radiology*, *56*(1), 12-19. <http://doi.org/10.1016/j.ejrad.2005.03.028>
51. Yang, B. X., & Verkman, A. S. (1997). Water and glycerol permeabilities of Aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(26), 16140–16146. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16140>
52. Yang, B., Zhang, H., & Verkman, A. S. (2008). Lack of Aquaporin-4 water transport inhibition by antiepileptics and arylsulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(15), 7489–7493. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.005>
53. Yukutake, Y., & Yasui, M. (2010). Regulation of water permeability through Aquaporin-4. *168*(4), 885–891. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.029>
54. Zelenina, M. (2010). Regulation of brain Aquaporins. *Neurochemistry International*, *57*(4), 468–488. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.03.022>

## 10 Abkürzungsverzeichnis

AQP	Aquaporin (Plural AQPs)
CHIP28	Channel forming integral protein 28
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
MIP	Major integral protein
MRT	Magnetresonanztomograph
NPA Motiv	Asparagin-Prolin-Alanin Motiv
OAP	Orthogonal Array of Particles
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chainreaction (Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rtPCR	Real time PCR
taq Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
vW	von Willebrand

## Danksagung

Ich danke Martin Schmidt dafür ein offener und engagierter Doktorvater zu sein, egal ob ich Tierarzt an der Klinik mit direktem „Zugriff“ auf sein Büro war oder es die Distanz zwischen meinem Home Office und einem Nationalpark in Namibia zu überbrücken galt.

Christoph Rummel danke ich dafür mich in die Physiologie aufgenommen und mich mit einer zen-artigen Seelenruhe in Labortechniken eingewiesen zu haben, wenn ich mal wieder spontan an sein Büro klopfte. Wenn ich irgendwann eine solche Ruhe inmitten so vieler Projekte behalte ist das mehr wert als jeder Titel. Außerdem danke ich Christoph für die Chance Teil eines großartigen DFG Projekts gewesen zu sein. Generell gilt mein dank allen Physiologen für die Integration in das Team vom ersten Tag an. So eine Atmosphäre kann sich jeder nur wünschen. Besonders Doreen Marks und Daniela Ott halfen mir stets aus und machten die Laborzeit sehr angenehm.

Danken möchte ich auch meinem jugendlichen Ich, dass Jahre vor dem Computer mit der Einarbeitung in Photoshop und der Erstellung von Grafiken verbracht hat. Es kommt dann doch immer anders, aber ausgezahlt hat sich der Einsatz eindeutig.

Die vielen Monate vor dem Schreibtisch hat mir, nicht ganz uneigennützig, Kaya Gesellschaft geleistet und mir immer wieder klar gemacht, dass man manchmal auch einfach in der Sonne sitzen und Vögel beobachten muss. Genauso meine Gießener und Bonner Freunde und Lennart an der russischen Grenze, die mich erfolgreich aus meiner Gedankenwelt geholt haben. Gregor, danke, dass du mir ein lehrreicher Spiegel bist.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die meine Entscheidungen immer unterstützt haben und ohne die ich nicht hier wäre. Wörtlich, wie im übertragenen Sinn.

Eine weitere Person hat mich immer unterstützt, mir den Rücken freigehalten, mich auch in schlechten Zeiten geliebt und nie meine Seite verlassen. Was soll mit einer solchen Partnerin schon schief gehen.

Danke Jana.

## 11 Erklärung

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, Februar 2017