

Fachgebiet für Neuropathologie
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen
Universität München

Reaktive Astrozyten in der perivaskulären Nische nach Schädelhirntrauma:
Expression von Aldehyddehydrogenase 1 und Aquaporin 4

Claire Zoe Ertelt-Delbridge

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel

2. Priv.-Doz. Dr. Axel Preßler

Die Dissertation wurde am 29.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2017 angenommen.

1	EINLEITUNG	2
1.1	ASTROZYTEN	3
1.2	SAURES GLIAFASERPROTEIN (GFAP) UND KI-67 (MIB1)	4
1.3	ALDEHYDDEHYDROGENASE (ALDH)	5
1.4	ALDEHYDDEHYDROGENASE 1 (ALDH1)	7
1.5	AQUAPORIN 4 (AQP4)	8
2	ZIELSETZUNG	10
3	MATERIAL UND METHODEN	11
3.1	UNBEDENKLICHKEITSERKLÄRUNG DER ETHIKKOMMISSION	11
3.2	MATERIAL	11
3.3	HISTOLOGISCHE BEARBEITUNG	15
3.4	AUSWERTUNG	21
4	ERGEBNISSE	23
4.1	GFAP/KI-67	23
4.2	GFAP/ALDH1	26
4.3	ALDH1A1 UND ALDH1A3	30
4.4	ALDH1L1	34
4.5	AQUAPORIN 4 (AQP4)	35
5	DISKUSSION	41
5.1	GFAP UND KI-67	42
5.2	ALDH1 UND DIE SUBTYPEN ALDH1A1, ALDH1A3 UND ALDH1L1	44
5.3	AQUAPORIN 4 (AQP4)	45
6	ZUSAMMENFASSUNG	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	53
9	DANKSAGUNG	54
10	LEBENS LAUF	55

1 Einleitung

Das Schädelhirntrauma (SHT) ist eine der häufigsten nicht-natürlichen Todesursachen weltweit. In den Vereinigten Staaten von Amerika werden pro Jahr ca. 235.000 Menschen mit Schädel-Hirn-Trauma hospitalisiert, 50.000 Unfallopfer versterben. Aktuell leben etwa 3,4 Millionen Amerikaner mit einer Behinderung aufgrund eines überlebten SHT (Corrigan et al., 2010).

Besonders häufig sind Verkehrsunfälle die Ursache (Myburgh et al., 2008).

Auch in Deutschland versterben viele Unfallopfer nach SHT. Laut statistischem Bundesamt verunglückten allein in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 2013 377.481 Menschen im Straßenverkehr. 64.057 dieser Unfallopfer waren schwer verletzt und 3.339 Unfälle verliefen tödlich (destasis.de, 2013). Angesichts dieser Zahlen ist eine suffiziente Therapie des SHT unerlässlich und die Reduzierung von möglichen Spätfolgen ist nicht nur für Betroffene maßgebend, sondern auch von ökonomischen Interesse.

Die therapeutischen Optionen bei SHT sind weiterhin begrenzt und in erster Linie symptomatisch. Noch immer entscheiden vor allem die Schwere des Traumas und die individuelle Konstitution den klinischen Verlauf. Dies ist nicht zuletzt der schwierigen Übertragbarkeit von experimentell ermittelten Ergebnissen zu gehirnspezifischen Traumareaktionen auf die klinische Situation und die mögliche Therapie geschuldet. Selbstverständlich ist aus ethischen Gründen die experimentelle Traumaforschung auf das Tiermodell beschränkt.

Es muss also nach Möglichkeiten gesucht werden, am Tiermodell ermittelte Daten mit der Reaktion in humanem Gewebe vergleichen zu können. Nach einem Trauma reagieren die verschiedenen Zelltypen des Gehirns auf die entstandene Kontusion und die daraus resultierenden Folgen. Hierbei spielen die Hypoxie und das entstehende Hirnödem eine zentrale Rolle. Perivaskulär gelegene Astrozyten sind ein besonders interessanter Subtyp der Astrozyten, deren Reaktion auf traumatische Verletzung des Gehirns Einfluss auf angrenzende Neurone, die extrazelluläre Matrix, die Mikroglia und die Blutgefäße nimmt.

Besonders bemerkenswert war die Arbeit von Bardehle et al. (2013), die zum ersten Mal an lebenden Mäusen in Echtzeit die Reaktion von juxtavaskulär gelegenen Astrozyten auf ein Trauma zeigen konnte. Eine Untergruppe der gefäßnahen Astrozyten proliferierte, was in Aufnahmen von Mitosen und in der positiven Reaktion auf den Proliferationsmarker Ki-67 gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sind bahnbrechend, da zuvor angenommen wurde, dass Astrozyten nach einem Trauma aus Stammzellnischen zu der Läsion migrieren und dann vor Ort hypertrophieren und möglicherweise proliferieren (Sofroniew, 2009). Der Versuch diese proliferationsaktive Subpopulation, an humanem adultem Gehirngewebe, in der perivaskulären Nische nach Trauma nachzuweisen, gab den Anstoß für diese Arbeit.

1.1 Astrozyten

Ende des 19. Jahrhunderts werden Astrozyten, anhand muriner und humaner Gehirne, in protoplasmatische und fibröse Subtypen klassifiziert (Retzius, 1893, Andriezen, 1893). Aktuellere Arbeiten beschreiben im humanen Hirn zusätzlich intralaminäre Astrozyten und varikös-projizierende Astrozyten (Sosunov et al., 2014, Tabata, 2015). Beide Typen reagieren positiv auf Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (GFAP)- und sind CD44-positiv, unterscheiden sich aber durch Lage und Morphologie voneinander.

Intralaminäre Astrozyten sind in der Lamina I des Kortex zu finden, von dort strecken sie lange Fortsätze mit wenigen Verzweigungen in die Lamina II-IV aus. Diese enden vielfach an Blutgefäßwänden (Colombo and Reisin, 2004, Sosunov et al., 2014).

Varikös-projizierende Astrozyten finden sich in der Lamina V und VI und haben zwei verschiedene Arten von Fortsätzen: Zahlreiche etwa 100 µm lange Fortsätze und ein bis fünf bis zu 1 mm lange Fortsätze, die teils im Neuropil, teils an Gefäßwänden enden (Oberheim et al., 2009, Sosunov et al., 2014).

Die Rolle und Bedeutung von Astrozyten, in ihrer Interaktion mit Neuronen und deren Auswirkung auf die Homöostase des zentralen Nervensystems, ist erst in den letzten 50 Jahren besser verstanden worden.

In den sechziger und siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts erforschte man zunächst die Stoffwechselaktivität von Astrozyten und ihren Einfluss auf umliegende Neurone. Nicholls and Kuffler (1965), beschrieben den Gehalt von Na^+ und K^+ in glialen Zellen und Neuronen, Hyden and Lange (1965) maßen den Sauerstoffverbrauch.

Ein funktionell relevanter extrazellulärer Spalt konnte 1965 von Vanharreveld et al. (1965) gezeigt werden. Sieben Jahre später erkannten Benjamin and Quastel (1972), dass das von Neuronen sezernierte Glutamat teilweise von umliegenden Astrozyten aufgenommen, in Glutamin umgewandelt und an die Neuronen zurück übertragen wird. Hier kann es wieder zu Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) umgewandelt werden.

Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass Astrozyten eine metabolische Funktion neben den Neuronen erfüllen und somit Einfluss auf die synaptische Übertragung haben.

Die feinen astrozytären Fortsätze umgeben den synaptischen Spalt und regulieren vor allem über Ionenkanäle (z.B. Na^+/K^+ ATase, K^+/Cl^- Kotransporter und $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Kotransporter) die Übertragung (Verkhratsky et al., 2014).

Erst 1994 entdeckten Agre et al. (1994) einen neuen Typ von transmembranären Wasserkanälen, die Aquaporine (AQP). Noch im selben Jahr konnten Jung et al. (1994) cDNA von einem AQP-Subtyp aus Ependymzellen und Astrozyten in Rattenhirnen isolieren. Der Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) auf Astrozyten war entdeckt und ein weiterer Beitrag der Astrozyten an der gehirnspezifischen Homeostase aufgezeigt.

1.2 Saures Gliafaserprotein (GFAP) und Ki-67 (mib1)

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Intermediärfilament in reifen Astrozyten, das in den astrozytären Fortsätzen für Stabilität sorgen soll. Demnach wird es besonders in reaktiven, hypertrophen Astrozyten synthetisiert. In den sechziger Jahren wurde GFAP erstmals, von Eric Shooter an der Stanford Universität, aus der reaktiven Astroglie in Multiple-Sklerose Plaques isoliert und 1971 erstmals von Eng et al. publiziert. In den letzten Jahrzehnten konnte die GFAP- Expression in der Astroglie von

traumatischen, neurodegenerativen und neoplastischen Läsionen gezeigt werden (Eng et al., 2000). Heute ist es ein alltäglicher immunhistochemischer Marker in der neuropathologischen Diagnostik und Forschung. Im Folgenden wird GFAP in Kombination mit Ki-67 und der Aldehyddehydrogenase 1 immunhistochemisch und in der Immunofluoreszenz untersucht, um die Spezifität reaktiver Astrozyten im Gewebe zu sichern.

Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der in allen aktiven Abschnitten des Zellzyklus exprimiert wird (G_1 , S, G_2 und Mitose), nicht aber in der Ruhephase der Zelle (G_0) (Scholzen and Gerdes, 2000). Immunhistochemisch wird dieser Antikörper verwendet, um den Anteil proliferierender Zellen in einem Gewebe erkennen zu können und beispielsweise in Tumoren einen Eindruck über die Wachstumstendenz zu gewinnen.

1.3 Aldehyddehydrogenase (ALDH)

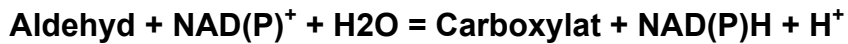
Die Enzymgruppe der Aldehyddehydrogenasen katalysieren verschiedenste Reaktionen im menschlichen Organismus. Insgesamt sind 19 humane Gene bekannt, die Subtypen der Aldehyddehydrogenase kodieren.

Tabelle 1.1 Subtypen der ALDH1 im Menschen

Gene (Mensch)	Enzymname	Substrat
<i>ALDH1A1</i>	Retinal-Dehydrogenase 1	Retinal
<i>ALDH1A2</i>	Retinal-Dehydrogenase 2	Retinal
<i>ALDH1A3</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 1A3	Retinal
<i>ALDH1L1</i>	10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase	10-Formyltetrahydrofolat
<i>ALDH1L2</i>	10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase	10-Formyltetrahydrofolat
<i>ALDH2</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 2	breites Spektrum
<i>ALDH3A1</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 3A1	aromatische Aldehyde
<i>ALDH3A2</i>	Fettaldehyd-Dehydrogenase	langkettige Fettaldehyde (C ₆ bis C ₂₄), gesättigt oder ungesättigt
<i>ALDH3B1</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 3B1	mittel- und langkettige gesättigte und ungesättigte Aldehyde
<i>ALDH3B2</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 3B2	nicht bekannt
<i>ALDH4A1</i>	S)-1-Pyrrolin-5-carboxylat--Dehydrogenase	(S)-1-Pyrrolin-5-carboxylat, Semialdehyde
<i>ALDH5A1</i>	Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase	Succinatsemialdehyd
<i>ALDH6A1</i>	Methylmalonatsemialdehyd-Dehydrogenase	Methylmalonatse-mialdehyd
<i>ALDH7A1</i>	alpha- Amino adipat-6-semialdehyd -Dehydrogenase	L-2-Amino adipat-6-semialdehyd, Betainaldehyd
<i>ALDH8A1</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 8A1	9-cis-Retinal, 13-cis-Retinal, Benzaldehyd, Decanal
<i>ALDH9A1</i>	Trimethylaminobutyraldehyd-Dehydrogenase	4-Trimethylaminobutyraldehyd; breites Spektrum
<i>ALDH16A1</i>	nicht bekannt	nicht bekannt
<i>ALDH18A1</i>	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	Glutamat

Die Aldehyddehydrogenasen finden sich im Zytosol, in Zellkernen, in Mitochondrien und in endoplasmatischen Retikula (Marchitti et al., 2008).

Wie der Name impliziert setzt die ALDH, unter Abhängigkeit des Coenzym NAD(P)⁺ und Wasser, ein Aldehyd zu einem Carboxylat und NAD(P)H + H⁺ um.



Einer der wichtigsten Stoffwechselwege ist hierbei die Beteiligung der ALDH am Alkoholabbau in der Leber. Hier oxidiert die zytosolische ALDH Acetaldehyd zu Acetat.

Aldehyde entstehen durch den oxidativen Abbau von Membranlipiden, Aminosäuren, Kohlehydraten und Neurotransmittern (Marcato et al., 2011).

Die Superfamilie der ALDH ist aber nicht nur in der Lage Aldehyde zu oxidieren und damit Toxine abzubauen, sie ist auch beteiligt am Aufbau zellulär essentieller Moleküle wie Retinolsäure, Betain und Gamma-Aminobuttersäure (GABA). Außerdem weist die ALDH auch nicht-enzymatische Eigenschaften wie die Fähigkeit Verbindung mit Hormonen und anderen Molekülen einzugehen auf (Jackson et al., 2011).

1.4 Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1)

Die ALDH1- Familie ist am Retinolstoffwechsel beteiligt. Die Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 oxidieren Retinalaldehyde zu Retinoaten, die über Bindung an die ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren RAR (nukleärer Retinsäurerezeptor) und RXR (retinoidaler Rezeptor X) die Transkription proliferations- und differenzierungsrelevanter Gene aktivieren. Diese Eigenschaft der ALDH1 macht das Enzym relevant im Zellstoffwechsel von Stammzellen und Tumorstammzellen (Ma and Allan, 2011).

Stammzellen haben die Eigenschaft sich selbst zu erneuern und zu reifen Zellen auszudifferenzieren. So können sie untergegangenes Gewebe ersetzen. Diese Eigenschaft ist therapeutisch von großem Interesse, speziell im Hinblick auf zerebrale Pathologien. Die ALDH1A1 und die ALDH1L1 sind in neuronalen Stammzellen zu finden, insbesondere in Astrozyten, die neurale

Stammzelleigenschaften aufweisen (Adam et al., 2012, Foo and Dougherty, 2013).

Die ALDH1A3 ist der prominente Subtyp in Gliomzellen, vor allem in höhergradigen Gliomen (Zhang et al., 2015).

Aktuell wird die Expression von ALDH1 und deren mögliche prognostische Aussagekraft in zahlreichen Tumoren untersucht. Das Enzym findet sich, in seinen verschiedenen Isoformen, unter anderem in Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Lungenkarzinomen, Prostatakarzinomen und Rektumkarzinomen (Bednarz-Knoll et al., 2015, Ayub et al., 2015, Huang et al., 2015, Huo et al., 2015, Matsika et al., 2015, Oh et al., 2015). Auch in mesenchymalen Tumoren ist die ALDH1 von Interesse, z.B. in Solitären Fibrösen Tumoren (SFT) und embryonalen Rhabdomyosarkomen. In primären astrozytären Hirntumoren, den Astrozytomen und Glioblastomen, konnte die prognostische Relevanz der ALDH1- Expression gezeigt werden (Bouvier et al., 2013, Nakahata et al., 2015, Liu et al., 2012, Rasper et al., 2010).

1.5 Aquaporin 4 (AQP4)

AQP4 gehört zur Familie der Aquaporine, einer Gruppe membranständiger ubiquitär exprimierter Wasserkanäle, von denen bislang 14 Isoformen bekannt sind. AQP4 ist der häufigste Typ im zentralen Nervensystem von Säugetieren und findet sich unter physiologischen Bedingungen an den Endfüßchen von Astrozyten, besonders entlang der Glia limitans und den Blutgefäßen (Rash et al., 1998, Nielsen et al., 1997). Diese Lokalisation ist durch einen intrazellulären Anker, dem α - β -dystroglycan, bedingt. Dieses transmembrane Proteinpaar verbindet AQP4 mit den vaskulären Basallaminaproteinen Agrin und Laminin. Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise nach einem SHT, kann diese Verbindung sich lösen und das AQP4 verteilt sich diffus entlang der astrozytären Membran. Hierdurch entsteht das charakteristische diffuse Expressionsmuster von AQP4 nach Verletzung der Bluthirnschranke. Dies wird auch Dysregulation genannt (Noell et al., 2011).

Wasser kann bidirektional über AQP4-Kanäle transportiert werden. So kann es über Endfüßchen an Blutgefäßen intrazellulär aufgenommen und an das Hirnparenchym abgegeben werden. Umgekehrt kann intraparenchymales Wasser wieder rückresorbiert und abgegeben werden (Iloff et al., 2012).

Die Beteiligung von AQP4 an dem Auftreten und der Resorption des zytotoxischen und vasogenen Hirnödems gilt heute als unstrittig.

Interessanterweise ist gegenwärtig noch unbekannt, ob es sich um eine direkte Funktion, oder um eine unvermeidbare Auswirkung der Dysregulation von AQP4 handelt. Neben dem beschriebenen Wassertransport initiiert die Dysregulation eine Reihe von zellulären Aktionen in reaktiven Astrozyten: Cytokine werden ausgeschüttet, die proinflammatorisch wirken (Li et al., 2011). In AQP4-exprimierenden, neuronalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von AQP4 die Expression von Connexin43 und Calciumkanälen (L-Typ) runterreguliert und AQP4 somit direkt Einfluß auf Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen nimmt (Kong et al., 2008). Die AQP4-abhängige Migration von Astroglia nach einem SHT konnte auch bereits *in-vivo* am Mausmodell demonstriert werden (Auguste et al., 2007).

In der neurovaskulären Nische kommt AQP4 nach neuen Erkenntnissen eine weitere besondere Rolle zu. Der Virchow-Robinsche Spalt ist mit interstitieller Flüssigkeit gefüllt, die perivaskulär das Gehirn, einem lymphatischen System ähnelnd, drainiert (Laman and Weller, 2013). Die Regulation der Abgabe und Aufnahme der interstitiellen Flüssigkeit obliegt den AQP4-Kanälen.

2 Zielsetzung

Diese Arbeit soll die Reaktion der Astrozyten der perivaskulären Nische auf das SHT beim erwachsenen Menschen untersuchen. Zunächst wird, in Anlehnung an die Arbeit von Bardehle et al. (2013), die Proliferation der perivaskulären Astrozyten immunhistochemisch und histomorphologisch betrachtet. In einem nächsten Schritt sollen die perivaskulären Astrozyten an humanem Gewebe weiter charakterisiert werden. Hierzu wird die Expression des Wasserkanals AQP4 und die ALDH1 in Kombination mit dem GFAP und die Subtypen ALDH1A1, ALDH1A3 und ALDH1L1 untersucht. AQP4 ist der prädominante Wasserkanal in Astrozyten, der wesentlich an der Entstehung und der Resorption des posttraumatischen Hirnödems beteiligt ist. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass AQP4 aber auch an der intrazellulären Steuerung der Proteinexpression beteiligt ist, wie im Folgenden weiter ausgeführt werden soll.

Die Enzymfamilie der Aldehyddehydrogenase soll in dieser Arbeit ebenfalls genauer beleuchtet werden. Das Enzym gilt heute als Stammzellmarker in zahlreichen mesenchymalen und epithelialen humanen Zelltypen und in Tumoren. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass reaktive Astrozyten nicht nur ihren eigenen Zellmetabolismus umstellen können, sondern damit auch großen Einfluß auf den neuronalen Stoffwechsel und die synaptische Übertragung haben, wie im Folgenden dargestellt wird.

In der vorgelegten Arbeit soll gezeigt werden, ob humane Astrozyten der perivaskulären Nische in der Reaktion auf ein SHT Stammzeleigenschaften aufweisen und ob diese Reaktion sich in einem zeitlichen Verlauf darstellen lässt. Genauere Kenntnis dieser Pathomechanismen stellt in Zukunft eine Subtypisierung der Astrozyten und mögliche therapeutische Optionen in Aussicht.

3 Material und Methoden

3.1 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission

Zunächst wurde eine Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München beantragt und erteilt (UE 087-13).

3.2 Material

Im Rahmen der gerichtlichen Obduktion wurden die Gehirne der Verstorbenen entnommen und mindestens 14 Tage in 10%-Formalin fixiert. Nach Abschluss der gerichtlich angeordneten Untersuchungen konnte formalinfixiertes Hirngewebe von 23 Verstorbenen mit einem SHT unterschiedlichen Alters nach einem standardisierten Entnahmeprotokoll für SHT (siehe Abbildung 2) entnommen und zur Paraffinfixierung eingekapselt werden. Das Kollektiv konnte zunächst aus Proben von 10 männlichen und 13 weiblichen Verstorbenen im Alter von 16 Jahren bis 93 Jahren zusammengestellt werden. Alle Verstorbenen waren zum Todeszeitpunkt hospitalisiert, so dass die Obduktionen am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians Universität München nach 24 bis 48 Stunden post-mortem durchgeführt werden konnten und die autolytischen Veränderungen minimal waren.

Die untersuchten Gehirne wiesen Kontusionen nach SHT in der Folge von Stürzen oder Verkehrsunfällen auf.



Abbildung 1 Makroskopischer Befund der Fallnummer 2, 72-jähriger Patient mit einer ausgedehnten frontalen Kontusion nach Verkehrsunfall.

Die personenbezogenen Daten der Verstorbenen wurden anonymisiert, somit ist kein Rückschluß auf ihre Identität möglich. Eine Zusammenfassung der Daten findet sich in Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1 Untersuchungskollektiv in der Übersicht

Nr.	Geschlecht	Alter (y)	Traumaursache	Überlebenszeit (h)
1	w	86	Sturz	120
2	m	72	Verkehrsunfall	12
3	m	87	Sturz	72
4	m	17	Verkehrsunfall	144
5	m	21	Verkehrsunfall	72
6	w	77	Verkehrsunfall	3360
7	w	59	Sturz	72
8	w	72	Sturz	240
9	m	75	Sturz	120
10	w	79	Verkehrsunfall	312
11	w	92	Sturz	24
12	w	82	Verkehrsunfall	24
13	w	73	Sturz	168
14	w	93	Sturz	216
15	m	35	Verkehrsunfall	120
16	w	77	Sturz	12
17	w	88	Sturz	312
18	m	78	Verkehrsunfall	12
19	w	80	Verkehrsunfall	288
20	m	53	Sturz	48
21	m	38	Sturz	12
22	w	16	Verkehrsunfall	2
23	m	77	Sturz	48

Die Gehirne wurden in koronarer Schnitfführung in 1 cm dicke Scheiben geschnitten und folgende Proben entnommen:

- Kontusionsareal (Kortex und angrenzendes Marklager)
- Subependymale Zone
- Corpus callosum frontal
- Nucleus lentiformis rechts
- Hippocampus links
- Splenium
- Parietaler Kortex
- Occipitaler Kortex
- Pons
- Kleinhirn

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde im Folgenden mit dem Material des jeweiligen Kontusionsareals gearbeitet.

Für die post-traumatische Überlebenszeit wurden Fälle von 2 bis 312 Stunden in die Studie eingeschlossen.

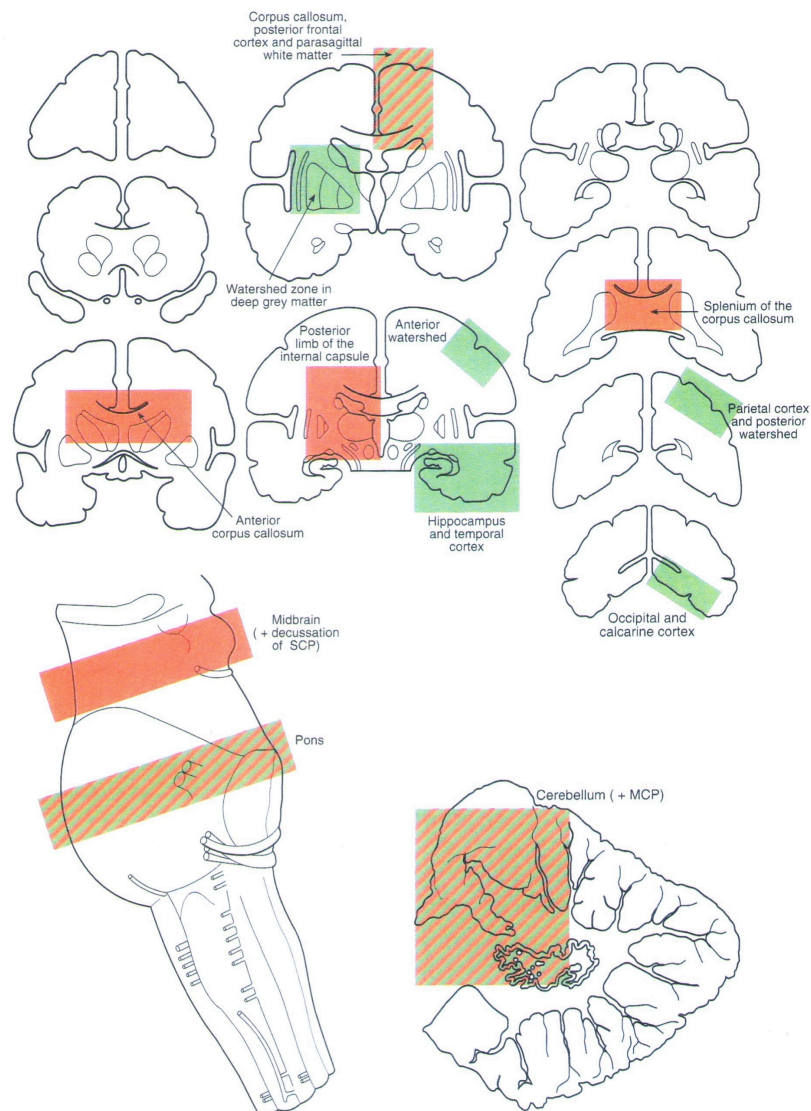


Abbildung 2 Modifiziert aus Dawson TP, Neal JS. *Manual of Practical Neuropathology Techniques*: Elsevier Science & Technology Books (Dawson and Neal, 2000).

3.3 Histologische Bearbeitung

Das Gewebe wurde über Nacht entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in 2 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Diese Schnittpräparate wurden immunhistochemisch und mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Zur Kontrolle wurde jeweils frontaler Kortex eines 55-jährigen Verstorbenen ohne bekanntes Trauma und das Operationsgewebe eines Patienten mit der gesicherten Diagnose eines Glioblastoms verwendet. Zur Kontrolle der Färbungen gegen ALDH1 und der Subtypen ALDH1A1, ALDH1A3 und ALDH1L1 wurde zusätzlich humanes

Leberparenchym verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2 Verwendete Antikörper

Antigen	Antikörperbeschreibung	Hersteller
GFAP	Monoklonal, Maus, anti-gliales saures Faserprotein Klon 6F2	Dako Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GFAP	Polyklonal, Kaninchen	Dako Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Ki-67 (mib-1)	Monoklonal, Kaninchen, Proliferationsmarker, C- Terminus Klon SP6	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ki-67 (mib-1)	Monoklonal, Maus, Proliferationsmarker Klon MIB-1	Dako Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Aquaporin 4	Polyklonal, Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ALDH1	Monoklonal, Maus, ALDH1- Subtyp Klon 44/ALDH	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
ALDH1A1	Monoklonal, Kaninchen, C- Terminus humanes ALDH1A1 Klon EP1933Y	Nuvos Biologicals Europe, Cambridge, UK
ALDH1A3	Polyklonal, Kaninchen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ALDH1L1	Monoklonal, Kaninchen IG6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 3.3 Verwendete Chemikalien und Materialien

Name	chemische Formel	Hersteller
Citronensäuremonohydrat	$C_6H_{10}O_8$	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	
Natriumchlorid	NaCl	
Wasserstoffperoxid (30%)	H_2O_2	
di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck KG Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	NaOH	
ImmPACT DAB	Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Ref: K5001	Vector Laboratory Burlingham, USA
Avidin-Biotin Blocking Kit ABC-Kit		Vector Laboratory Burlingham, USA
Aqua PolyMount	Eindeckelmedium	Polysciences Inc., Pennsylvania, USA

Bovines Serumalbumin		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Normal Pferdeserum		Vector Laboratory Burlingham, USA
biotynlierter Pferde Anti-Maus IgG		Vector Laboratory Burlingham, USA
biotynlierter Pferde Anti- Kanninchen IgG		Vector Laboratory Burlingham, USA
Pertex		Histolab Products AB, Göteborg, Schweden
Alexa flour 568 donkey-anti rabbit		Life technologies Carlsbad, USA
Alexa flour 488 donkey-anti mouse		Life technologies Carlsbad, USA
4',6-Diamidine-2'-phenylindole Dihydrochlorid		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Meyer's-Hämalaun		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Alkohole		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine von Kaltwasserfischhaut		Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Formalin		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Triton X100		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.4 Verwendete Pufferlösungen

PBS-Puffer (10x, pH 7,4)	
NaCl	138 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
KCl	2,7 mM

Citrat-Puffer (pH 6,0)	
Citronensäure-Monohydrat	2,1 g
Aqua dest.	0,5 l
NaOH (5N)	auf pH 6 einstellen

Blocking-Puffer	
PBS-Puffer	1 x
Bovines Serumalbumin	1 %
Triton X100	0,1 %
Gelatine von Kaltwasserfischhaut	0,2 %
Normales Pferdeserum	2,5 %

Tabelle 3.5 Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrotom	HM355	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
pH Meter	EL-30	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Mini-Shaker	Mini shaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Dampfkocher	TEFAL Steam cuisine	Groupe SEB Deutschland, GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Mikroskop	AxioSkope 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kamera	AxiCam MRc5	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Färbeautomat	Ventana XT	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA

Die immunhistochemischen Färbungen für GFAP, Ki-67, AQP4 und ALDH1 erfolgten in einem automatisierten Ventana System. Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung erfolgte mit Protease 1 oder CC1 (Ventana).

Die immunhistochemische Färbungen der ALDH1A1, ALDH1A3 und ALDH1L1 wurde per Hand durchgeführt.

- Hierzu wurden Leerschnitte zunächst 15 Minuten bei 56 Grad Celsius inkubiert.
- Dann wurden die Schnitte in Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und mit H₂O gespült.
- Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 30 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) in einem Dampfkocher gekocht.
- Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde zur Reduzierung einer unspezifischen Hintergrundreaktion die endogene Peroxidase mit 1,5 % H₂O₂ 15 Minuten lang geblockt.
- Danach 5 x spülen in H₂O.
- 30 Minuten Blocking-Puffer mit 2,5 % Normales Pferdeserum und Avidin (1 Tropfen pro ml Blocking-Puffer) einwirken lassen.
- 2 x spülen mit PBS.
- Auftragen des Primärantikörpers und Inkubation über Nacht bei 4 Grad Celsius. Der Antikörper wurde verdünnt in Blocking-Puffer mit 2,5 % Normales Pferdeserum und Biotin (1 Tropfen pro ml Blocking-Puffer).
- 2 x waschen mit PBS.
- Korrespondierender Sekundärantikörper verdünnen mit Blocking-Puffer (1:200) und für 30 Minuten auftragen.
- 3 x in PBS waschen.
- ABC-Kit Vector mischen und auftragen.
- 1 x PBS.
- DAB DACO System auftragen.
- 3 x waschen in H₂O.
- 2 Minuten gegenfärben mit Meyer's-Hämalaun.

- 5 x waschen in H₂O.
- 2 Minuten in PBS.
- 3 Minuten in 70% Ethanol.
- 2 x 3 Minuten in 100% Ethanol.
- 5 Minuten in Xylol.
- Eindeckeln mit Pertex.

Die Immunfluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern GFAP und Ki-67, sowie GFAP und ALDH1 wurden von Hand gefärbt.

- Die Leerschnitte wurden zunächst 15 Minuten bei 56 Grad Celsius inkubiert.
- Dann wurden die Schnitte in Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und mit H₂O gespült.
- Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 30 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) in einem Dampfkocher gekocht.
- Blocking-Puffer mit 2,5 % NHS wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen.
- 2 x PBS.
- Es folgte das Auftragen des Primärantikörpers und Inkubation über Nacht bei 4 Grad Celsius. Der Antikörper wurde verdünnt in Blocking-Puffer mit 2,5 % Normales Pferdeserum.
- 2 x PBS.
- 45 Minuten Einwirkzeit des Sekundärantikörpers, verdünnt mit Blocking-Puffer (1:200).
- 3 x PBS.
- Hoechst (DNA/nuclei) in PBS 1:10.000 verdünnt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 2 x PBS.
- Eindeckeln mit Aqua Poly Mount.

3.4 Auswertung

Zur Auswertung der positiven juxtavaskulär gelegenen Astrozyten wurden in jedem unmittelbar an die Kontusion angrenzendem Hirnareal 10 kapilläre

Blutgefäße zufällig ausgewählt und 4 Gesichtsfelder, mit dem Blutgefäß im Zentrum, in der 20x Vergrößerung ausgezählt (siehe Abbildung 3).

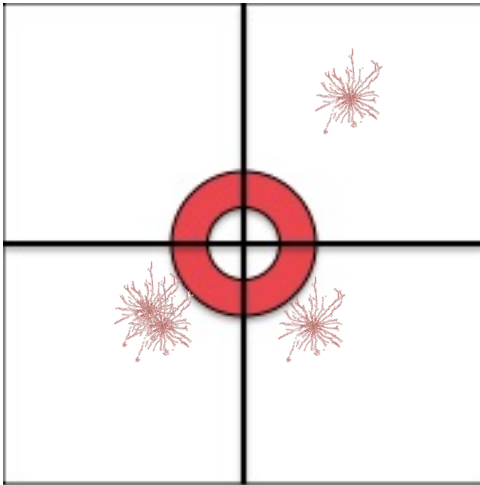


Abbildung 3 Schema der mikroskopischen Auswertung

Danach wurden die Werte der ausgezählten 4 juxtavaskulären Gesichtsfelder pro Gefäß addiert und das Ergebnis pro Blutgefäß jeweils einem Score von 0-3 zugeordnet und ein entsprechender Mittelwert pro Schnittpräparat gebildet.

Tabelle 3.6 Klassifikation der ausgezählten Gesichtsfelder

Score	Parameter
0	Keine positiven perivaskulären Astrozyten
1	1-5 positive Astrozyten pro Gefäß
2	5-10 positive Astrozyten pro Gefäß
3	mehr als 10 positive Astrozyten pro Gefäß

4 Ergebnisse

4.1 GFAP/Ki-67

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigen sich periläsional zahlreiche hypertrophe GFAP-positive Astrozyten, die mit den Endfüßchen ihrer Fortsätze unmittelbar entlang der Blutgefäße ansetzen. Viele Astrozyten weisen einen vergrößerten Zelleib mit zahlreichen ausgeprägten und langen Fortsätzen in das umliegende perläsionale Gewebe auf, wie auch Bardehle et al. es in perivaskulären Astrozyten bei Mäusen nach SHT zeigen konnten (2013). Oftmals finden sich auch Pärchen von Astrozyten, deren Zellkörper unmittelbar aneinander liegen und den Eindruck einer unmittelbar vorausgegangenen Zellteilung machen (siehe Abbildung 4). Es zeigt sich jedoch in keiner der zahlreichen Versuche eine überzeugende Expression von Ki-67. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Überlebenszeit nach dem SHT und unabhängig von Alter oder Geschlecht der Unfallopfer.

Auch der Versuch der immunhistochemischen und immunfluoreszierenden Färbung an frischem, kryofixiertem Gewebe brachte kein anderes Ergebnis. Ebenso lieferte ein Antikörperwechsel das gleiche Ergebnis.

Eine ausgeprägte Hypertrophie und der unmittelbare Kontakt der Fortsätze mit den Blutgefäßen und dem traumanahen Hirnparenchym läßt sich zweifelsohne gut erkennen, eine Ki-67-positive Proliferation der Zellen ließ sich aber in den durchgeführten Untersuchungen nicht überzeugend beweisen (siehe Abbildung 5).

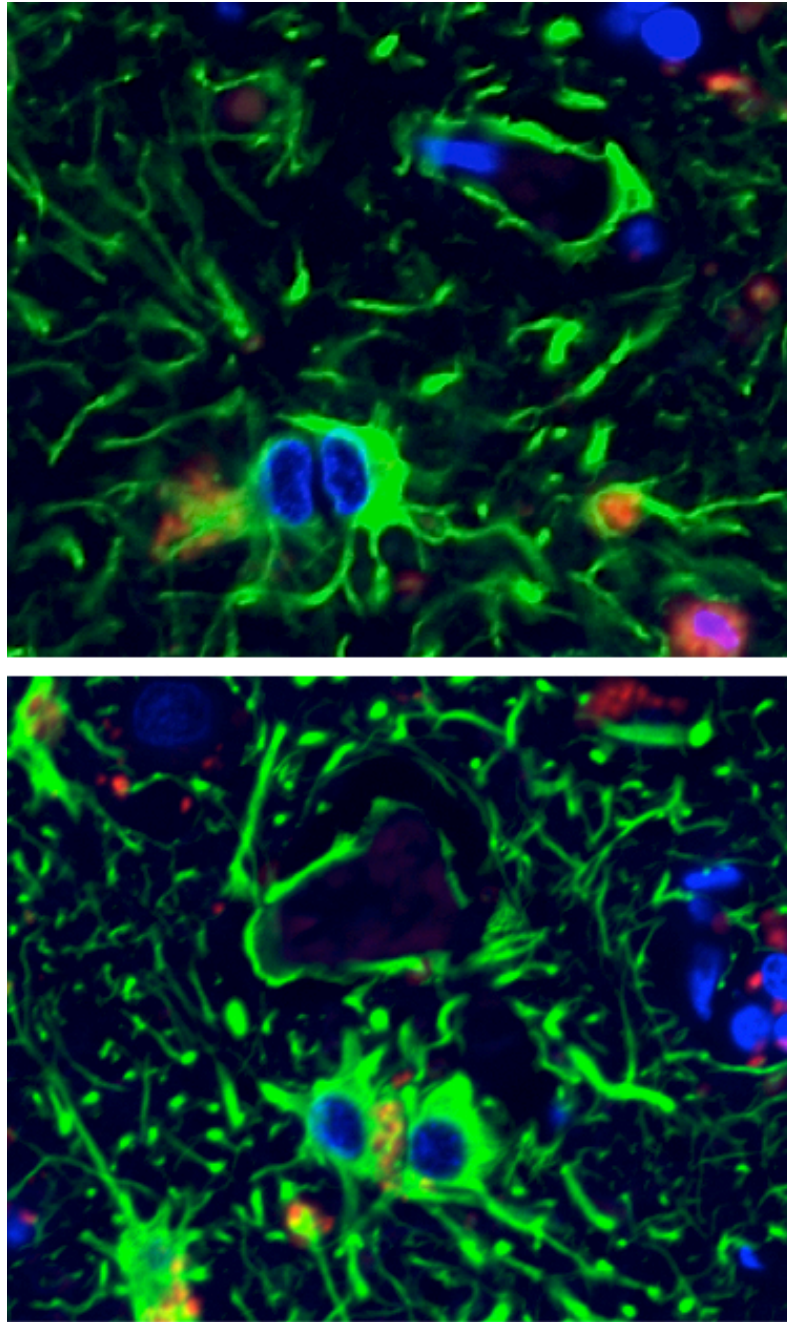


Abbildung 4 GFAP und Ki-67 Immunfluoreszenz **GFAP/ Ki-67/ DAPI** Reaktive perivaskuläre Astrozyten, die paarweise vorliegen (400x Vergrößerung).

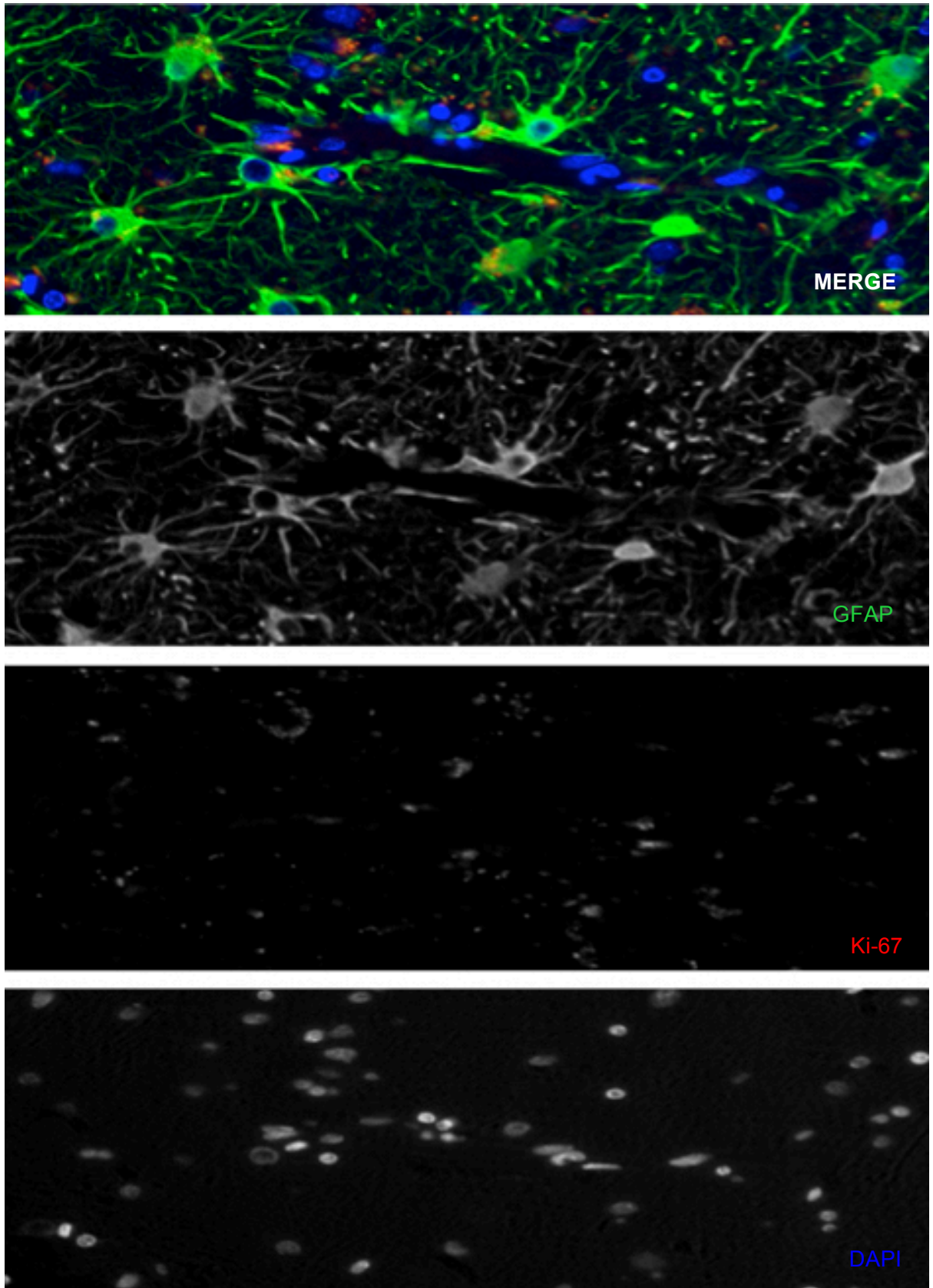


Abbildung 5 GFAP und Ki-67 Immunfluoreszenz **GFAP/ KI-67/ DAPI** Reaktive perivaskuläre Astrozyten, entlang eines Blutgefäß. Man erkennt in der Reaktion gegen GFAP ein weites Zytoplasma und prominente Zellfortsätze. Keine überzeugende Koexpression von Ki-67 (400x).

4.2 GFAP/ ALDH1

Zahlreiche der beschriebenen hypertrophen perivaskulären Astrozyten zeigen in der Immunfluoreszenz eine Koexpression von GFAP und ALDH1 (siehe Abbildung 6). Interessanterweise nimmt diese Koexpression innerhalb einer posttraumatischen Überlebenszeit von 24-216 Stunden deutlich zu und erreicht zwischen dem 8. und 12. Tag ein Plateau (siehe Diagramm 1, detaillierte Auflistung in Tabelle 4.1). Danach fällt die Zahl der koreaktiven Astrozyten auf Ausgangswerte zurück.

Bemerkenswerterweise zeigt sich auch eine Korrelation der Expressionsstärke mit dem Alter der Verunglückten. So finden sich deutlich mehr GFAP- und ALDH1-positive perivaskuläre Astrozyten bei Verstorbenen mit einem erreichten Lebensalter von 60 bis 93 Lebensjahren, als bei der jüngeren Altersgruppe von 16 bis 59 Jahren (siehe Diagramm 2).

Das Geschlecht der Verstorbenen hat in dieser Untersuchung keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der Immunfluoreszenz. Gleiches gilt für die Traumaursache, bei einer Unterscheidung zwischen Stürzen und Verkehrsunfällen als Unfallmechanismus.

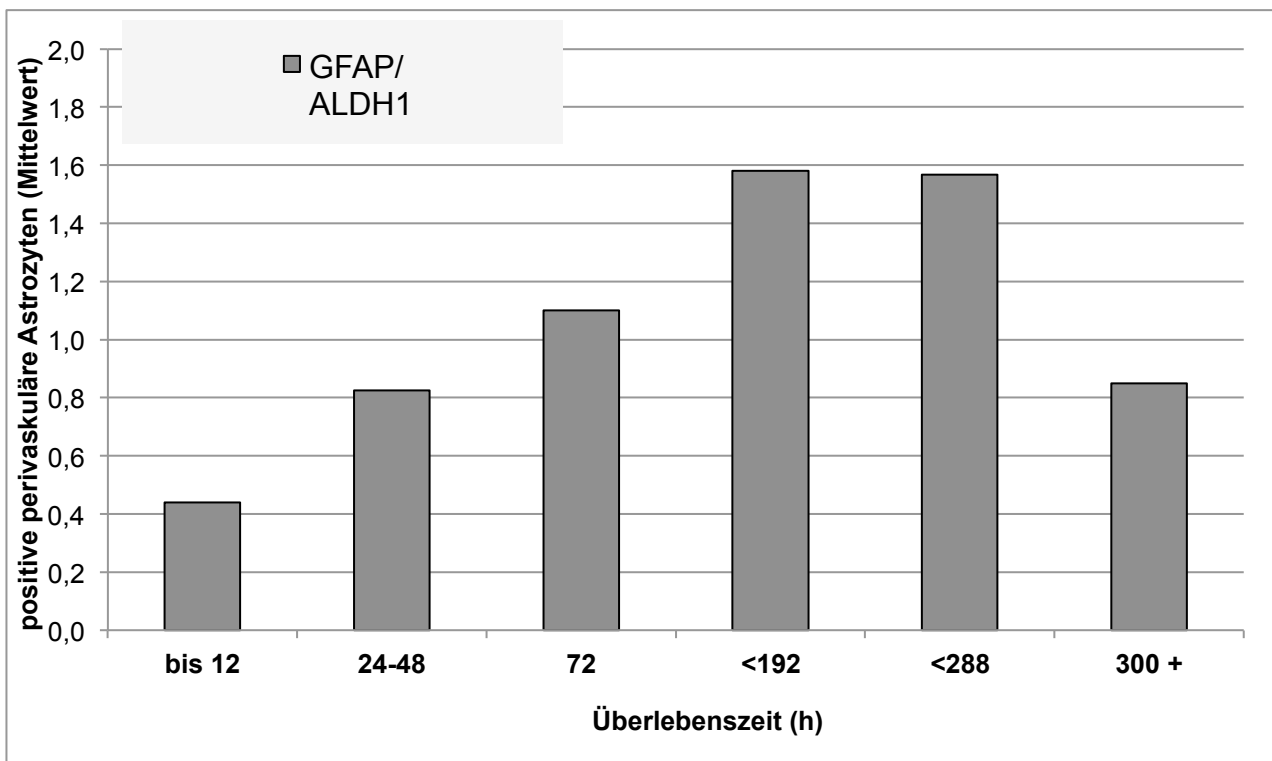


Diagramm 1 Koexpression von GFAP und ALDH1 im Bezug zu der Überlebenszeit

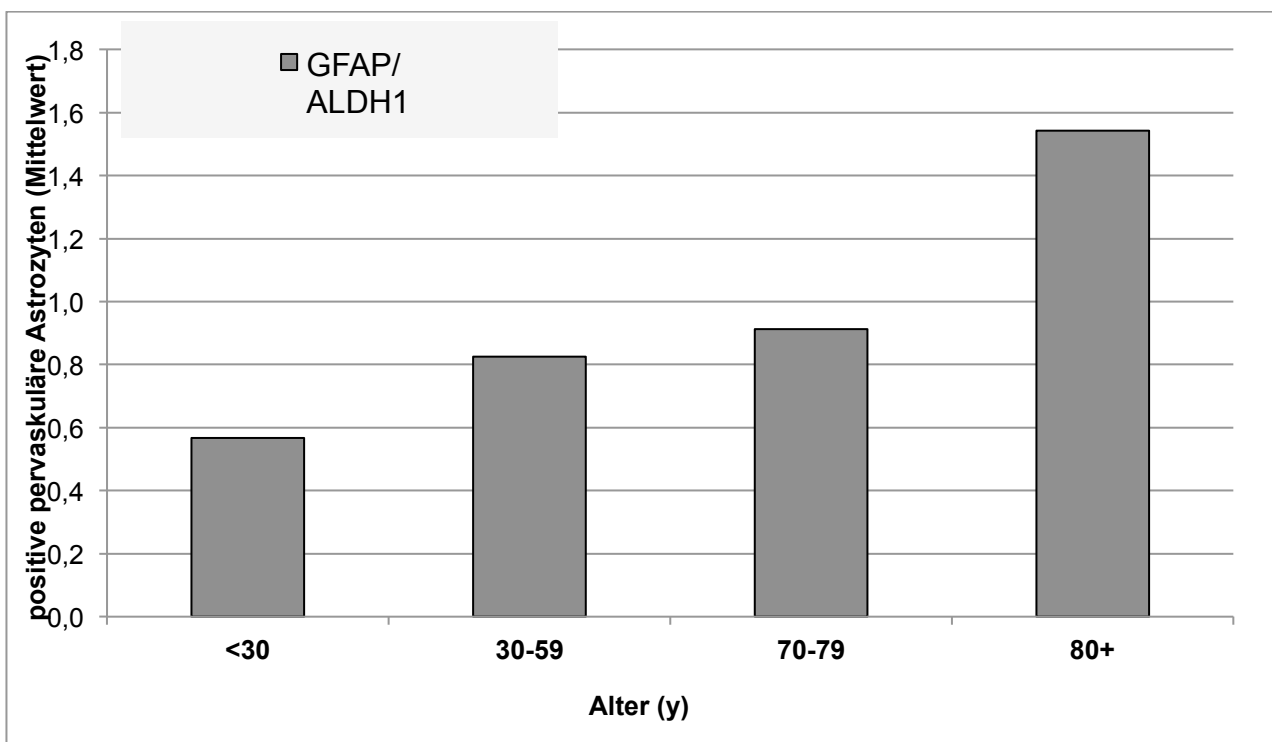


Diagramm 2 Koexpression von GFAP und ALDH1 in Bezug auf das Alter der Verstorbenen

Tabelle 4.1 Auswertung GFAP/ALDH1

Nr.	Geschlecht	Alter	Trauma	Über- lebenszeit (h)	GFAP/ ALDH1
22	w	16	Verkehrsunfall	2	0,3
18	m	78	Verkehrsunfall	12	0,1
16	w	77	Sturz	12	0,1
21	m	38	Schlag und Sturz	12	0,2
2	m	72	Verkehrsunfall	12	1,5
11	w	92	Sturz	24	0,8
12	w	82	Verkehrsunfall	24	2,1
20	m	53	Sturz	48	0,1
23	m	77	Sturz	48	0,3
7	w	59	Sturz	72	1,0
5	m	21	Verkehrsunfall	72	1,1
3	m	87	Sturz	72	1,2
9	m	75	Sturz	120	1,0
15	m	35	Verkehrsunfall	120	2,0
1	w	86	Sturz	120	2,1
4	m	17	Verkehrsunfall	144	0,3
13	w	73	Sturz	168	2,5
14	w	93	Sturz	216	2,6
8	w	72	Sturz	240	0,8
19	w	80	Verkehrsunfall	288	1,3
17	w	88	Sturz	312	0,7
10	w	79	Verkehrsunfall	312	1,0

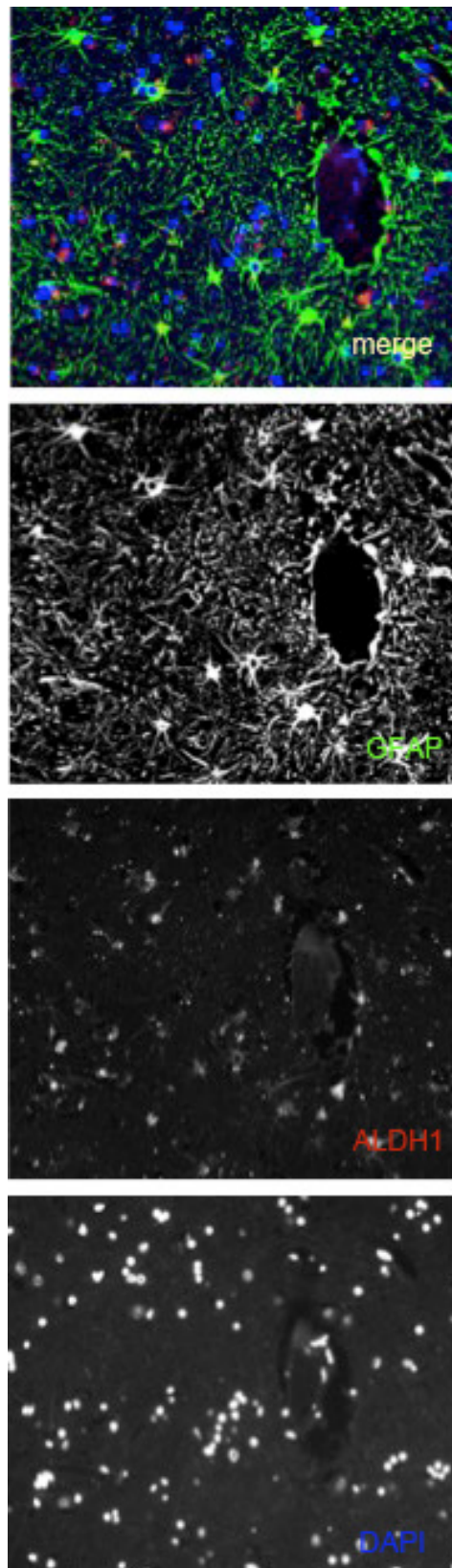


Abbildung 6 GFAP und ALDH1 Immunfluoreszenz **GFAP**/**ALDH1**/**DAPI** Reaktive perivaskuläre Astrozyten um ein transversal angeschnittenes Blutgefäß (100x Vergrößerung).

4.3 ALDH1A1 und ALDH1A3

In einem zweiten Schritt folgte eine Subtypisierung der ALDH1-positiven Astrozyten in ALDH1A1- und ALDH1A3-Subtypen mittels Immunhistochemie. Nahezu alle reaktiven perivaskulären Astrozyten sind ALDH1A1-positiv, während sich nur ganz vereinzelt schwach reaktive perivaskuläre ALDH1A3-positive Exemplare finden (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Die Ergebnisse der Auswertung der ALDH1A1-Immunhistochemie, im Hinblick auf Expression nach Überlebenszeit, Alter, Geschlecht und Traumaursache, stimmen mit den Ergebnissen der GFAP/ ALDH1-Immunfluoreszenz überein (Diagramm 1 und Diagramm 2 mit Diagramm 3 und Diagramm 4).

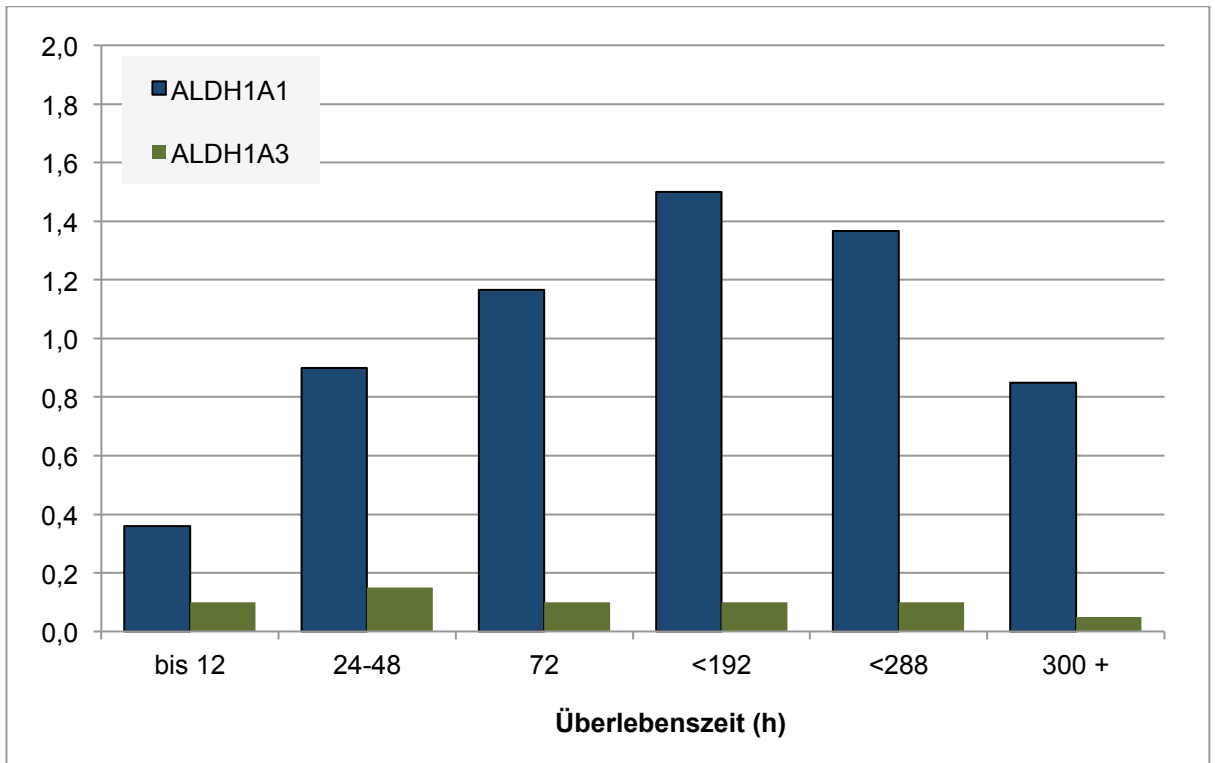


Diagramm 3 Vergleich der Expression von ALDH1A1 und ALDH1A3 in Bezug zur Überlebenszeit

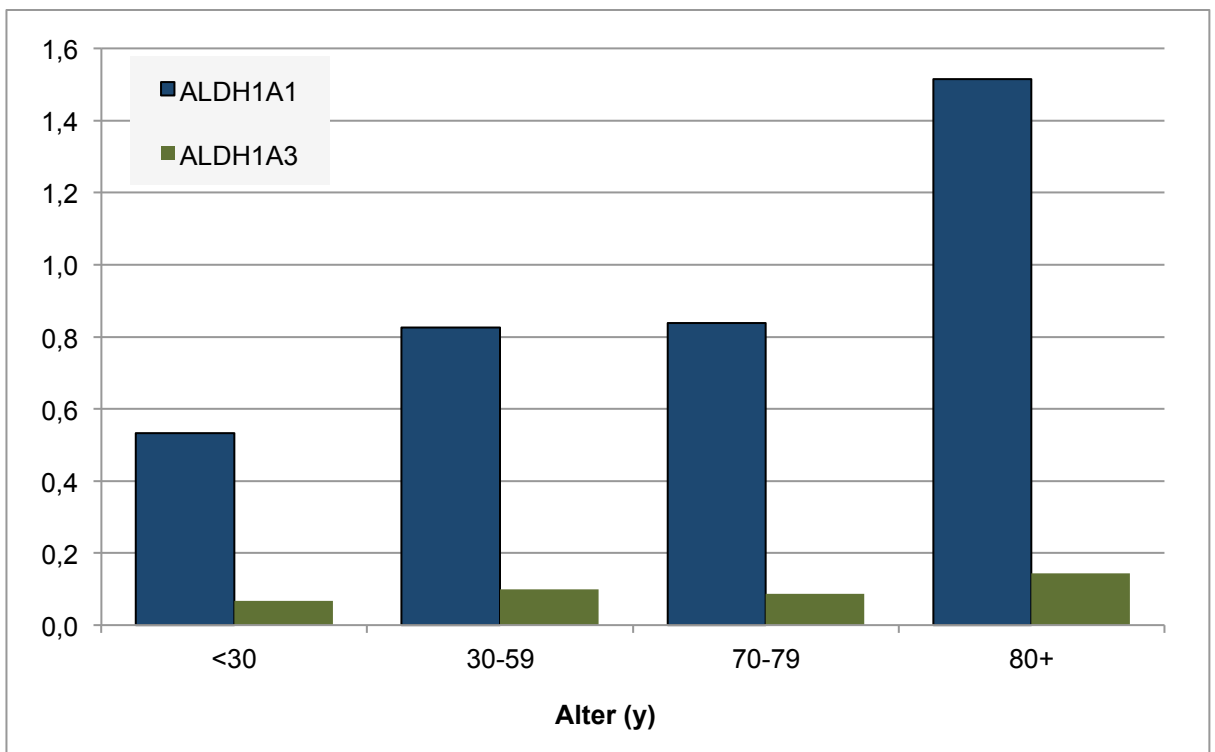


Diagramm 4 Vergleich der Expression von ALDH1A1 und ALDH1A3 in Bezug zum Alter

Tabelle 4.2 Auswertung ALDH1A1 und ALDH1A3

Nr.	Geschlecht	Alter	Trauma	Über- lebenszeit (h)	ALDH1A1	ALDH1A3
22	w	16	Verkehrsunfall	2	0,1	0,1
18	m	78	Verkehrsunfall	12	0,1	0,1
16	w	77	Sturz	12	0,0	0,1
21	m	38	Schlag und Sturz	12	0,1	0,0
2	m	72	Verkehrsunfall	12	1,5	0,2
11	w	92	Sturz	24	0,9	0,4
12	w	82	Verkehrsunfall	24	2,2	0,1
20	m	53	Sturz	48	0,3	0,1
23	m	77	Sturz	48	0,2	0,0
7	w	59	Sturz	72	1,1	0,2
5	m	21	Verkehrsunfall	72	1,2	0,1
3	m	87	Sturz	72	1,2	0,0
9	m	75	Sturz	120	1,1	0,1
15	m	35	Verkehrsunfall	120	1,8	0,1
1	w	86	Sturz	120	2,2	0,2
4	m	17	Verkehrsunfall	144	0,3	0,0
13	w	73	Sturz	168	2,1	0,1
14	w	93	Sturz	216	2,5	0,2
8	w	72	Sturz	240	0,7	0,0
19	w	80	Verkehrsunfall	288	0,9	0,1
17	w	88	Sturz	312	0,7	0,0
10	w	79	Verkehrsunfall	312	1,0	0,1

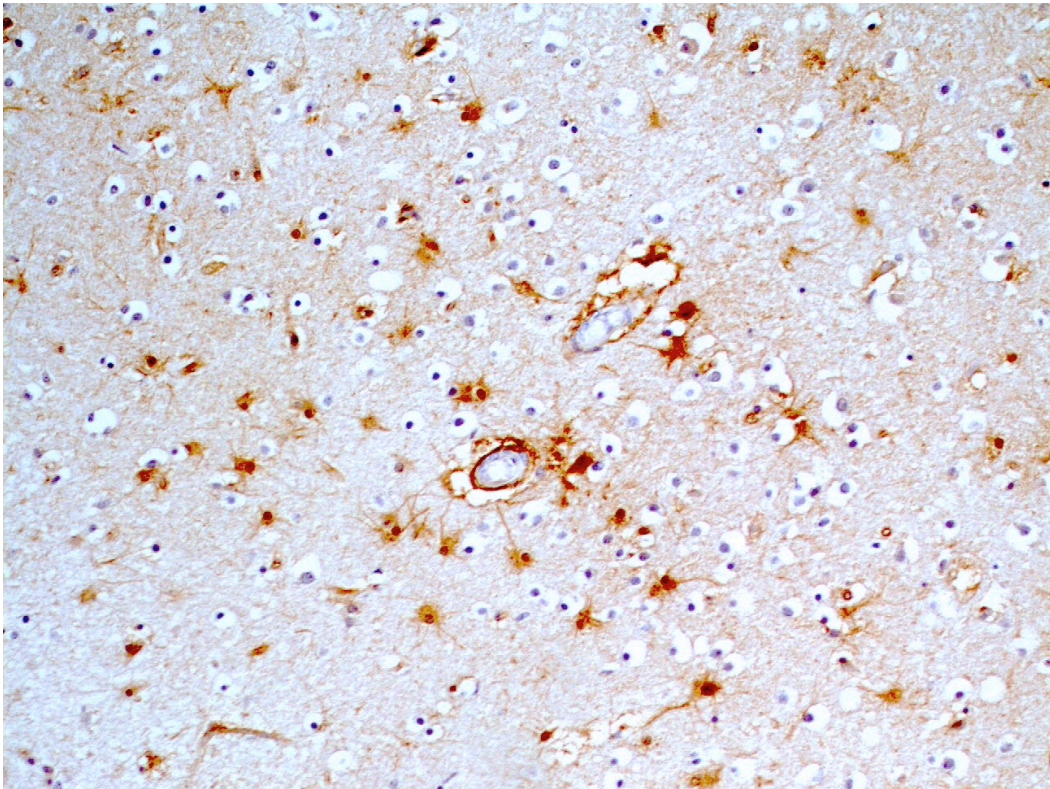


Abbildung 7 Prominente ALDH1A1-positive perivaskuläre Astrozyten. (200x Vergrößerung)

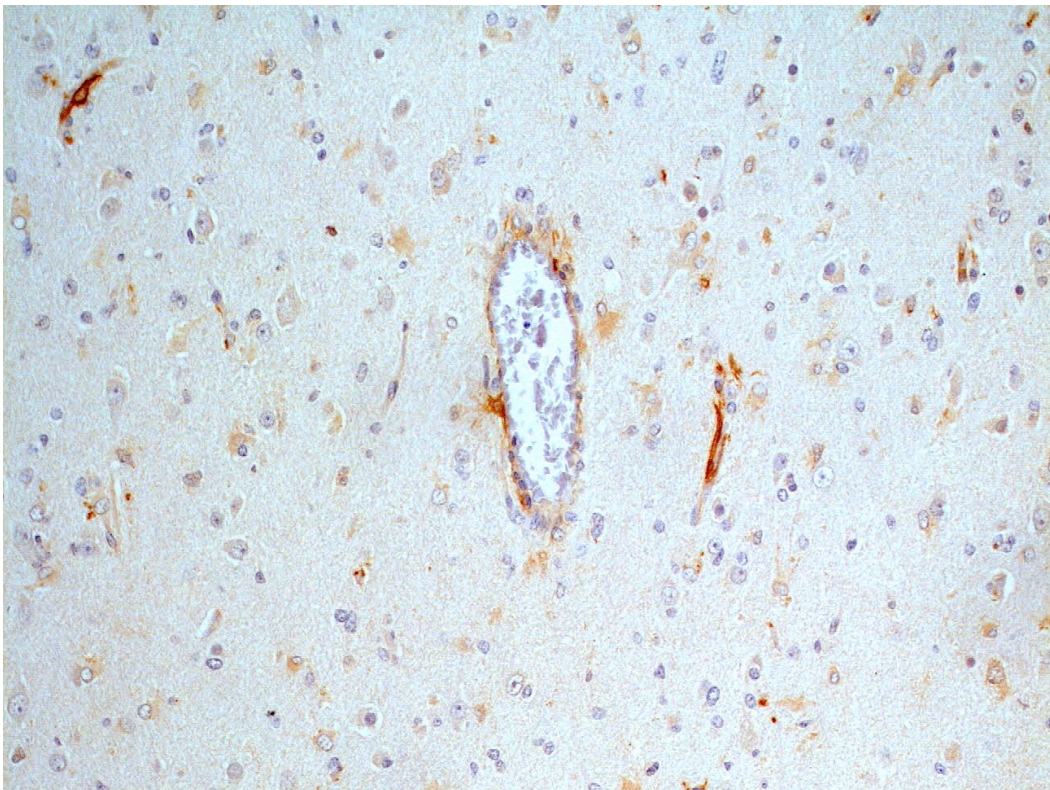


Abbildung 8 In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen ALDH1A3 zeigt sich eine schwächere Reaktion und eine geringere immunreaktive Anzahl der perivaskulären Astrozyten, bei positiv verlaufener Kontrollreaktion. (200x Vergrößerung)

4.4 ALDH1L1

Die ALDH1L1-Expression ist in Astrozyten bereits beschrieben und gilt als robuster Marker (Foo and Dougherty, 2013, Cahoy et al., 2008). Zum Vergleich mit der Expression der Isoformen ALDH1A1 und ALDH1A3 wurden die peritumoral entnommenen Proben ebenfalls mit einem Antikörper gegen die ALDH1L1 untersucht. Hier zeigte sich eine positive Reaktion in zahlreichen disseminiert gelegenen Astrozyten, allerdings eine geringere Expression der perivaskulär gelegenen Astrozyten im Vergleich zu der ALDH1A1 (siehe Abbildung 9). Besonders diejenigen perivaskulär gelegenen Astrozyten, deren Endfüßchen unmittelbar den Gefäßwänden anliegen, waren nur ganz vereinzelt ALDH1L1-positiv. Somit eignete ALDH1L1 sich nicht gut zur Darstellung und Auswertung der für die Fragestellung relevanten perivaskulären, reaktiven Astrozyten.

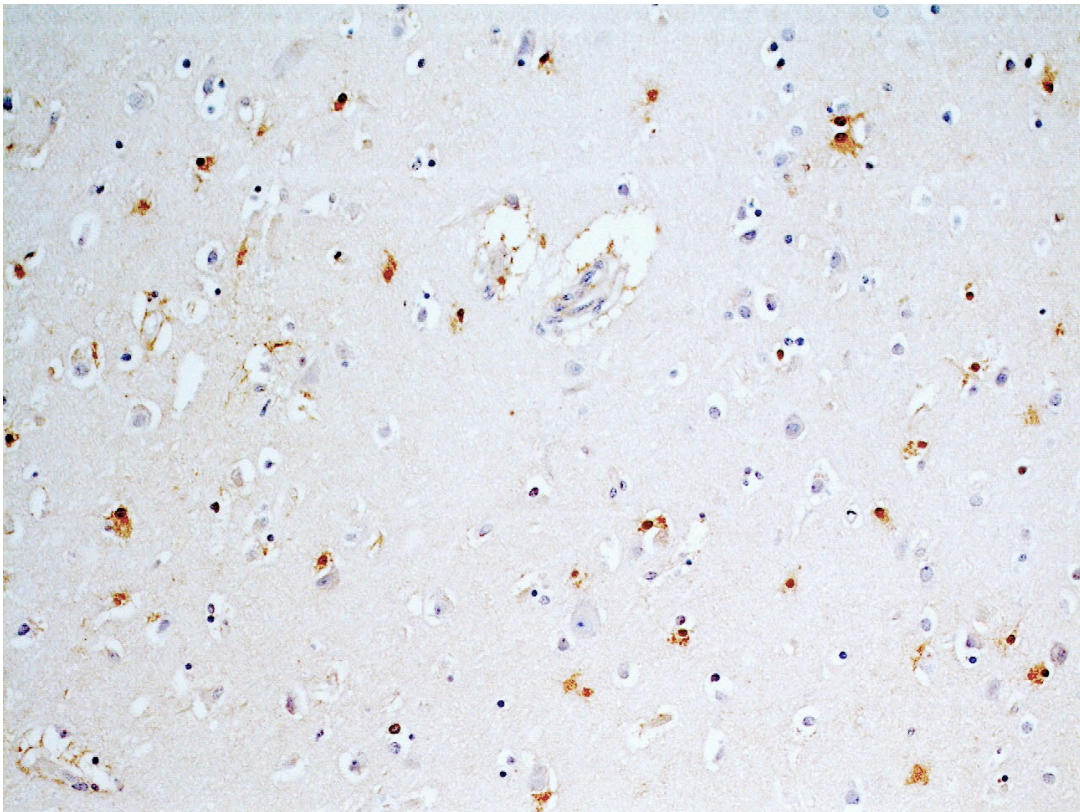


Abbildung 9 Zahlreiche Astrozyten reagierten ALDH1L1 positiv, allerdings fanden sich nur ganz vereinzelt perivaskulär gelegene Exemplare. (200x Vergrößerung)

4.5 Aquaporin 4 (AQP4)

In der immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen AQP4 reagieren die perivaskulären Astrozyten nach Trauma positiv. Die Dysregulation von AQP4 zeigt sich in einer diffusen membranösen Reaktion, die nicht mehr auf die Endfüßchen beschränkt ist (Abbildung 10).

Besonders prominent ist diese Dysregulation in Astrozyten die in der unmittelbar an die graue Substanz angrenzenden weißen Substanz liegen.

Die Dysregulation und Expressionsstärke der perivaskulären Astrozyten korreliert mit der ALDH1- und ALDH1A1-Expression (Abbildung 11).

Zwar zeigt AQP4 einen deutlich schnelleren Anstieg der immunreaktiven Astrozyten, bereits nach 12 Stunden posttrauma, AQP4 und GFAP/ ALDH1 bzw. ALDH1A1 erreichen aber jeweils um den 8. Tag nach SHT (216 Stunden) ein Maximum (Diagramm 5 und Tabelle 4.3).

AQP4 zeigt, im Unterschied zu GFAP/ ALDH1 bzw. ALDH1A1, keine Plateauphase und die Expression fällt binnen 4 Tage (96 Stunden) auf Ausgangswerte zurück (Diagramm 5).

Wieder zeigt die Altersgruppe der älteren Verstorbenen (60-93 Jahre) mehr AQP4-positive Astrozyten als die Gruppe der Jüngeren (16-59 Jahre) (Diagramm 6).

Diese Ergebnisse sind Unabhängig vom Geschlecht und der Traumaursache.

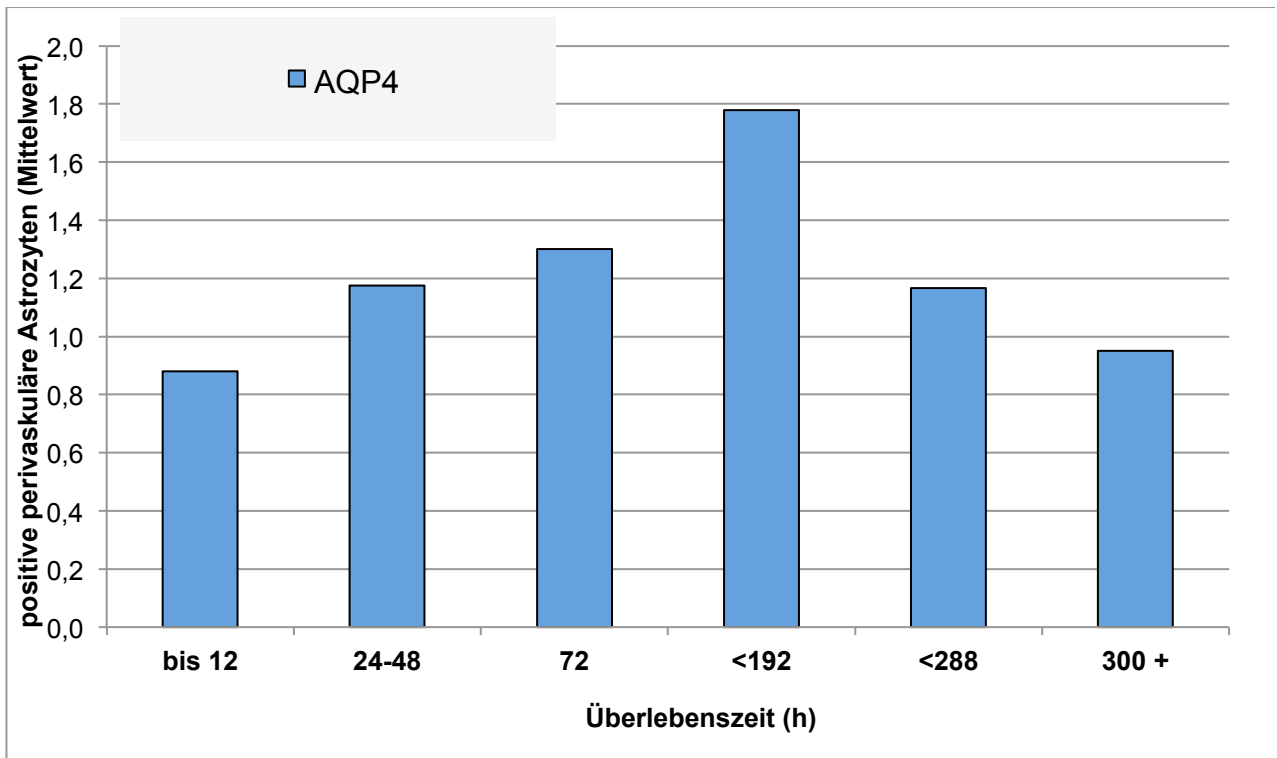


Diagramm 5 AQP4 Expression in perivaskulären Astrozyten in Bezug zur Überlebenszeit

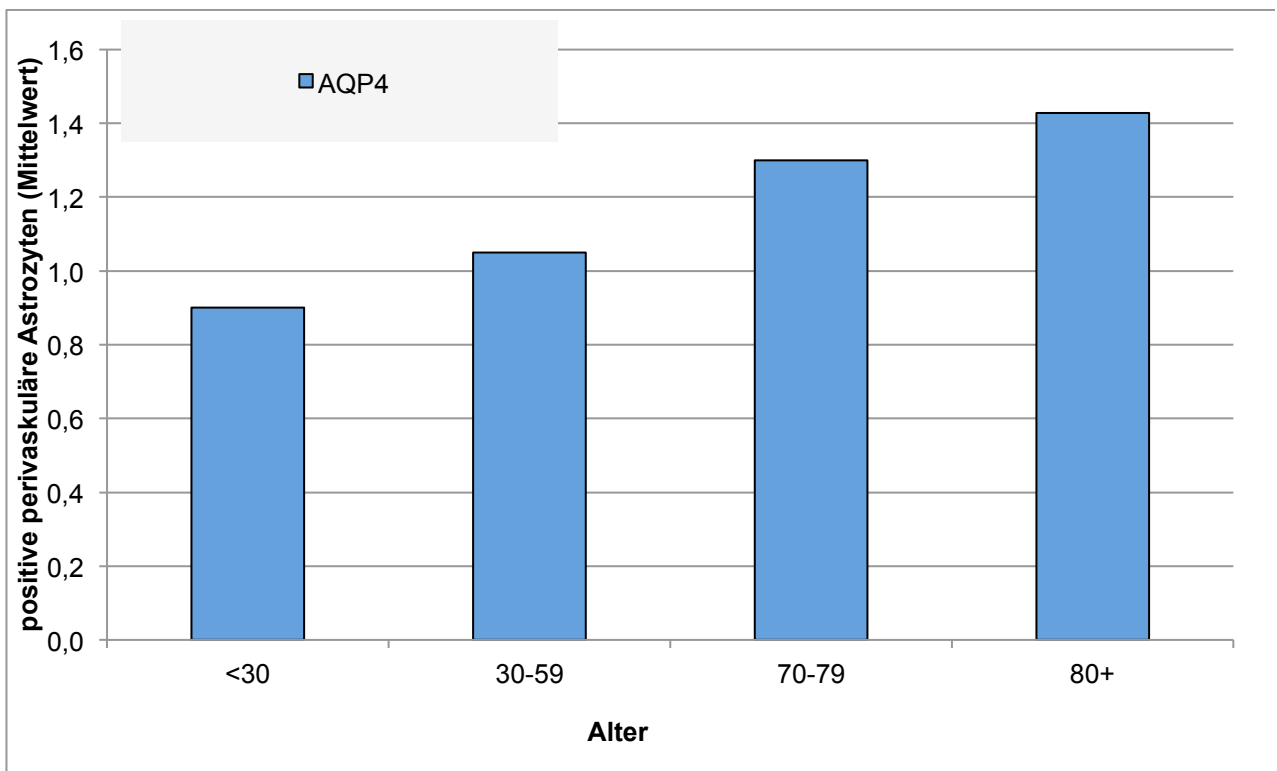


Diagramm 6 AQP4 Expression in Bezug zum Alter der Verstorbenen

Tabelle 4.3 Auswertung AQP4

Nr.	Geschlecht	Alter	Trauma	Über- lebenszeit (h)	AQP4
22	w	16	Verkehrsunfall	2	0,8
18	m	78	Verkehrsunfall	12	0,3
16	w	77	Sturz	12	0,8
21	m	38	Schlag und Sturz	12	0,8
2	m	72	Verkehrsunfall	12	1,7
11	w	92	Sturz	24	0,7
12	w	82	Verkehrsunfall	24	2,4
20	m	53	Sturz	48	0,7
23	m	77	Sturz	48	0,9
7	w	59	Sturz	72	1,2
5	m	21	Verkehrsunfall	72	1,5
3	m	87	Sturz	72	1,2
9	m	75	Sturz	120	1,9
15	m	35	Verkehrsunfall	120	1,5
1	w	86	Sturz	120	2,7
4	m	17	Verkehrsunfall	144	0,4
13	w	73	Sturz	168	2,4
14	w	93	Sturz	216	2,2
8	w	72	Sturz	240	1,0
19	w	80	Verkehrsunfall	288	0,3
17	w	88	Sturz	312	0,5
10	w	79	Verkehrsunfall	312	1,4

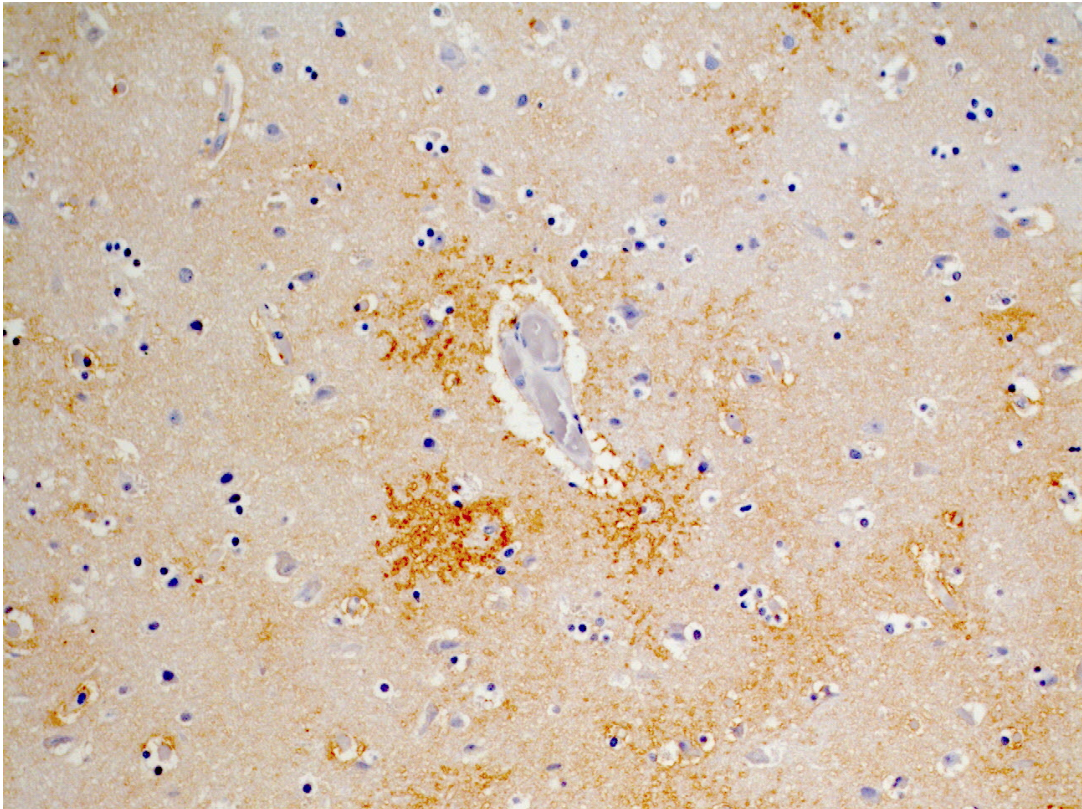


Abbildung 10 AQP4 ist im Zytoplasma und entlang der Fortsätze der perivaskulären Astrozyten exprimiert. (200x Vergrößerung)

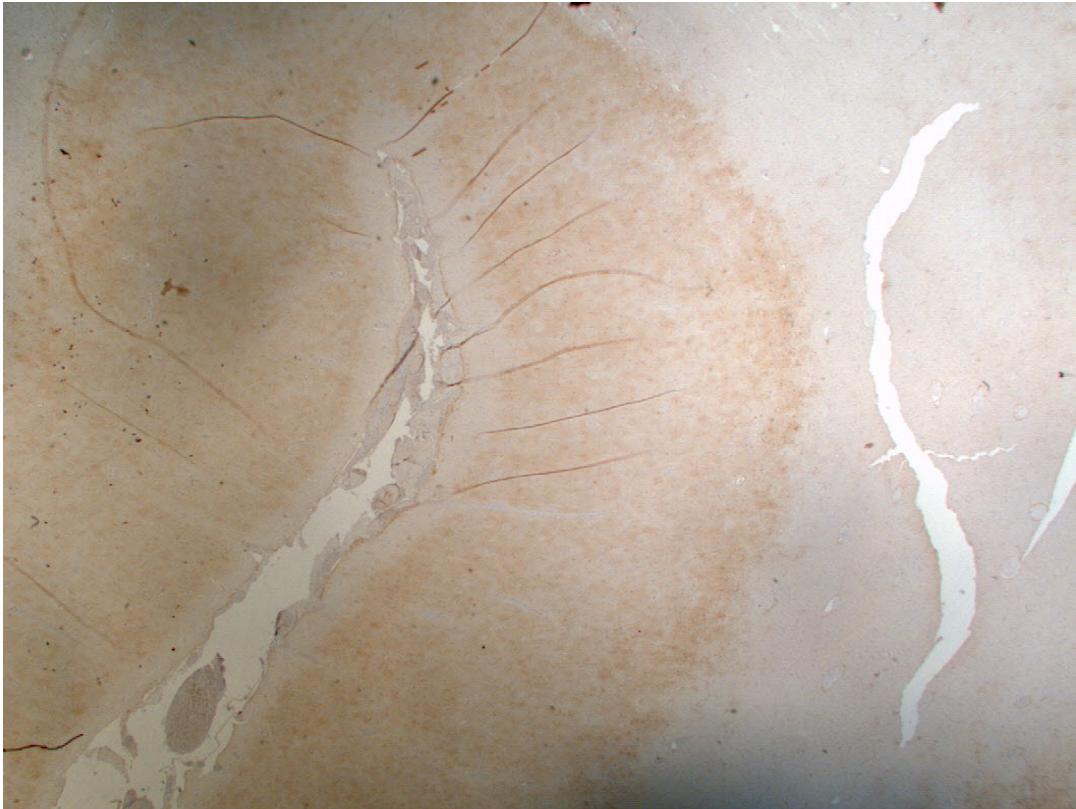


Abbildung 11 Die kräftigste Expression von AQP4 in den Astrozyten zeigte sich am Übergang von grauer zu weißer Substanz im kortikalen, periläsionalen Hirngewebe. (50x Vergrößerung)

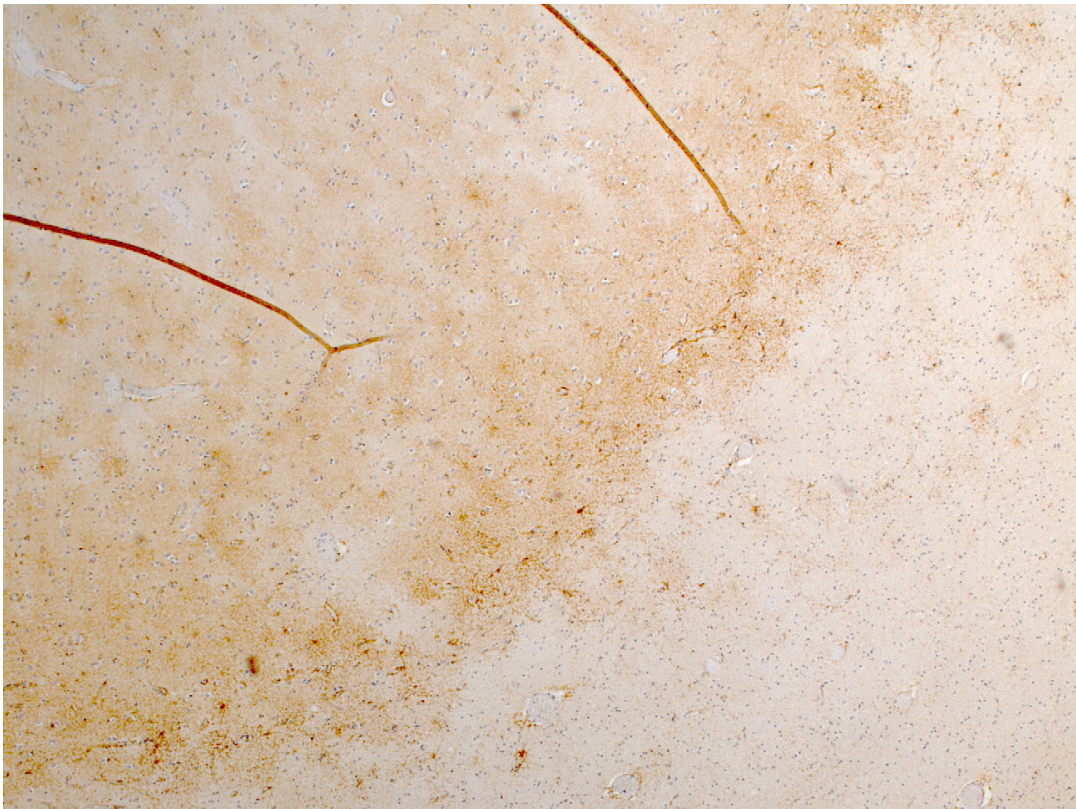


Abbildung 12 AQP4-positive Astrozyten entlang der Grenze von grauer und weißer Substanz im Kortex, angrenzend an eine Kontusion (100x Vergrößerung)

5 Diskussion

Das SHT ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit, die auch viele junge Menschen betrifft. Besonders häufig sind hier Verkehrsunfälle und Sportunfälle die Ursache. Aufgrund der verbesserten Sicherheitstechnik in Kraftfahrzeugen und der zunehmenden Akzeptanz von Schutzhelmen im Straßenverkehr und beim Sport überleben viele Unfallopfer zunächst, auch nach schwerem SHT (Lam et al., 2015, Lloyd and Conidi, 2015, Markowitz and Chatterji, 2015). Die ersten Tage nach einem solchen Unfall sind in der Regel entscheidend für das Überleben, aber auch für das Ausmaß der Spätfolgen (Harmsen et al., 2015). Hier spielt das Hirnödem, begleitet von einer Hypoxie des Hirngewebes, eine zentrale Rolle. Die Schnittstelle für den Austausch von Sauerstoff, Wasser und Proteinen ist die perivaskuläre Nische. Hier befindet sich ein Netzwerk aus Astrozyten mit einer vermittelnden Rolle zwischen den Blutgefäßen, den Neuronen und dem angrenzenden Parenchym. Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, die Reaktion der Astrozyten in der perivaskulären Nische nach einem SHT im zeitlichen Verlauf, anhand von immunhistochemischen und immunofluoreszierenden Färbungen, an postmortalen humanen Hirngewebeproben, unter dem Gesichtspunkt des Stammzellpotentials zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die perivaskulären Astrozyten nach 24 Stunden mit einer beginnenden Hypertrophie und der Dysregulation von AQP4 reagieren. Die reaktiven Astrozyten sind in der Doppelimmunfluoreszenz GFAP- und ALDH1-positiv. Außerdem exprimieren sie ALDH1A1 und nur vereinzelt die Isoformen ALDH1A3 und ALDH1L1. Diese Reaktionen erreichen ihr Maximum zwischen dem 5. und 9. Tag posttrauma und fallen binnen 14 Tagen auf den Ausgangswert zurück. Das spricht für eine Aktivierung der Astrozyten, die sowohl Einfluß auf das Hirnödem nimmt, als auch das Resultat einer veränderten, hypoxischen Stoffwechsellage des betroffenen Hirnareals ist.

Im Vergleich zu immunhistochemischen und immunofluoreszierenden Untersuchungen an Mäusen konnte mithilfe der Ki-67 Färbung keine Proliferation der perivaskulären Astrozyten an adultem, humanen Gewebe in

dieser Studie gezeigt werden. Die Reaktion im Kontrollgewebe (Glioblastom) und die interne Kontrolle in intravasalen Leukozyten verlief hier in allen Färbeversuchen positiv. Dennoch ist die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz die geeignete Methode für die Darstellung der Astrozyten an dem verwendeten formalinfixierten Hirngewebe und die Überprüfung der aufgestellten Hypothese. Sicherlich könnten andere Antikörper-basierte oder RNA-basierte Methoden auch gute Ergebnisse zu der Expression der genannten Marker liefern, jedoch ist hier die Morphologie von entscheidender Wichtigkeit. Um nur die Astrozyten der perivaskulären Nische darstellen und auswerten zu können, ist eine in-situ Methode mit Erhalt der Histomorphologie unverzichtbar. Die Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP und ALDH1 sowie der ALDH1-Subtypen, lieferten gute Präparate von reaktiven, hypertrophen Astrozyten, die sich zum Auszählen eigneten. AQP4 bildete zusätzlich das weite und feinfibrilläre Netzwerk der astrozytären Fortsätze ab. Auf den Schnittpräparaten konnte das unmittelbar an das Trauma grenzende Hirngewebe gut identifiziert werden und repräsentative Blutgefäße leicht abgegrenzt werden.

5.1 GFAP und Ki-67

In dieser Studie konnte die an Mäusen gesicherte Ki-67-positive Proliferation der juxtavaskulären Astrozyten an humanem Hirngewebe nicht nachvollzogen werden. Dennoch weisen diese Astrozyten beim Menschen eine distinkte Morphologie auf, die an die Bilder und die Beschreibung der Maushirn-basierten Arbeit (Bardehle et al., 2013) erinnert (siehe Abbildung 13).

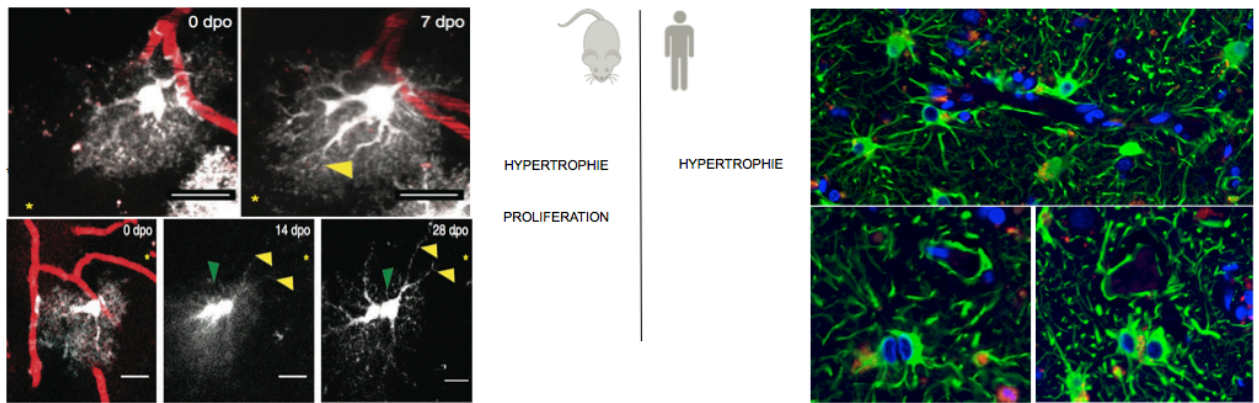


Abbildung 13 Vergleich der Bilder aus Maus und Mensch: Live-imaging-Bilder aus der Maus (linke Bildhälfte) modifiziert aus Bardehle, S., et al. Nat Neurosci 2013, 16: 580-586. (Bardehle et al., 2013) Die gelben Pfeilspitzen deuten auf polarisierende Fortsätze der Astrozyten, die grünen Pfeile verdeutlichen die Teilung der Zelleiber.

Die Astrozyten weisen in beiden Spezies Zeichen der Hypertrophie mit großen Zellkernen, breitem Zelleib und zahlreichen verzweigten Fortsätzen auf. Viele liegen paarweise vor. Hier konnte in den Mäusehirnen eine Zellteilung live aufgezeichnet werden, diese trat 14 Tage nach dem SHT auf (Bardehle et al., 2013). In der vorliegenden Studie an humanem Gewebe konnte kein humaner Fall mit der exakt vergleichbaren Zeit post trauma untersucht werden. Möglicherweise ist hier ein relevantes Zeitfenster nicht erfasst worden. Auch ist zu diskutieren, inwiefern das Alter der Versuchstiere (2-3 Monate) eine Rolle spielt und die Proliferationsaktivität diesem geschuldet ist. Eine Untersuchung menschlicher Astrozyten in einem großen Altersspektrum ist interessant und hinsichtlich der untersuchten Marker aufschlußreich, aber unter dem Gesichtspunkt der Ursprungsfrage, nach einer möglichen *in-situ* Proliferation der Astrozyten, zu hinterfragen. Die Erfahrung aus dieser Studie zeigt, dass hier die Untersuchung kindlicher Hirne mit einer post-traumatischen Überlebenszeit von mindestens 336 Stunden von großem Interesse wäre. Die Sammlung eines solchen repräsentativen Kollektivs anhand von rechtsmedizinischen Sektionen bedarf sicherlich mehrerer Jahre. Zudem stellt sich die Frage, inwiefern die Fixationszeit der Gehirne eine Auswirkung auf die immunhistochemische Darstellbarkeit der Astrozyten hat. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Fixationszeit zwischen einem und sechs Monaten gute Ergebnisse lieferte.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit ist es, nach Kenntnisstand der Autorin, niemand anderem gelungen, eine perivaskuläre Proliferation der ortsständigen Astrozyten nach SHT, in humanem Hirngewebe zu zeigen.

5.2 ALDH1 und die Subtypen ALDH1A1, ALDH1A3 und ALDH1L1

Dies ist, nach Kenntnisstand der Autorin zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit, die erste Studie, die sich mit der Expression von ALDH1 und der Unterscheidung der Subtypen ALDH1A1 bzw. ALDH1A3 in reaktiven Astrozyten nach Trauma im menschlichen Gehirn befasst. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Subtypisierung der ALDH1 in Astrozyten sinnvoll sein kann um Subpopulationen und deren Reaktivität besser charakterisieren zu können. Bislang galt die ALDH1L1 als stabiler Marker für Astrozyten (Foo and Dougherty, 2013, Cahoy et al., 2008) und es findet sich eine gewisse Koexpression mit GFAP. Barreto und Boesmans zeigten jedoch, dass beide Marker nicht in allen reaktiven Astrozyten expremiert werden (Barreto et al., 2011, Boesmans et al., 2014). Dies konnte in den vorliegenden Färbungen bestätigt werden. Interessanterweise exprimieren vor allem die perivaskulären Astrozyten mehr ALDH1A1 und weniger ALDH1L1. Dies könnte in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer regulierenden Funktion auf umliegende Neurone stehen. Kim et al. konnten aktuell beweisen, dass ALDH1A1 sich auf die Synthese von GABA in Neuronen auswirkt und damit direkten Einfluss auf die Übertragung im synaptischen Spalt hat (2015). Die seit den sechziger Jahren bereits bekannte Beteiligung der Astrozyten am GABA-Stoffwechsel der Neurone könnte somit um neue Erkenntnisse erweitert werden. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Astrozyten für die Homöostase des Gehirns in der neurovaskulären Nische.

In der Auswertung der durchgeführten Färbungen zeigte sich eine stärkere Expression von ALDH1 und GFAP in den perivaskulären Astrozyten der älteren Verstorbenen. Aktuelle Studien zur Alterung von Astrozyten und ihrem Einfluss auf die Alterung des Gehirns zeigen, dass verstärkt GFAP synthetisiert wird und eine generelle Umstellung zu einem proinflammatorischem Phenotyp stattfindet (Garwood et al., 2016). Dies spricht insgesamt für eine Veränderung der Reaktivität der Astrozyten mit

zunehmenden Alter und für eine direkte Einflussnahme auf den Verlauf einer posttraumatische Läsion.

5.3 Aquaporin 4 (AQP4)

Die Ergebnisse der AQP4-Färbungen zeigen insgesamt eine stärkere Expression in den Gehirnen der älteren Verstorbenen. Diese Tatsache ist besonders interessant im Kontext des Einfluß von AQP4 auf die Drainage von Proteinen über die interstitielle Flüssigkeit im Gehirn. Dies konnte insbesondere bei Morbus Alzheimer gezeigt werden (Perez et al., 2007). AQP4 wird im alternden Gehirn hochreguliert, um dem anfallenden gesteigerten Proteinausfall durch entzündliche und degenerative Prozesse gerecht zu werden und den Abtransport zu gewährleisten. Möglicherweise ist also die gezeigte gesteigerte Expression nicht nur eine verstärkte Reaktion der Älteren auf das SHT, sondern diese Patienten wiesen bereits vor dem Trauma eine erhöhte Expression im Vergleich zu den jüngeren Verstorbenen auf. Dies ist ein bedeutsamer forensischer Aspekt der Ergebnisse. Versuchen das Ausmaß eines Hirnödems anhand der AQP4-Expression zu determinieren sollte mit Vorsicht begegnet werden, da gezeigt werden konnte, dass nicht zuletzt das Alter eines Verstorbenen hier Einfluß nimmt.

Bei der Auswertung der AQP4-Färbungen fiel deutlich auf, dass besonders Astrozyten im Bereich des Übergangs von grauer zu weißer Substanz eine stärkere Immunfärbung zeigen. Diese Beobachtung wurde auch bei der Darstellung von AQP4 nach Ischämien gemacht (Stokum et al., 2015). Beachtenswert ist hier der charakteristische neuropathologische Befund bei der chronischen traumatischen Enzephalopathie, bei dem sich eine Akkumulation von tau-Protein in den Windungstätern an der Grenze von grauer zu weißer Substanz zeigt (McKee et al., 2015).

Diese Region scheint besonders vulnerabel für traumatische, aber auch für hypoxische Ereignisse. Das kann anhand der AQP4-Färbungen in dieser Arbeit nachvollzogen werden (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

6 Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit untersucht die Proliferationsaktivität reaktiver perivaskulärer Astrozyten nach SHT in humanem, adultem Hirngewebe. Außerdem wird die Expression des Wasserkanals AQP4 und des Enzyms ALDH1 mit seinen Subtypen ALDH1A1, ALDH1A3 und ALDH1L1 immunhistochemisch und in der Doppelimmunfluoreszenz dargestellt. Alle Ergebnisse werden im Bezug zur posttraumatischen Überlebenszeit und zum Alter der Verstorbenen betrachtet.

Hierzu wurde an Kontusionsherde angrenzendes Hirngewebe von 22 Verstorbenen im Alter zwischen 16 und 93 Jahren untersucht. Es handelt sich um 12 Frauen und 10 Männer mit einer post-traumatischen Überlebenszeit zwischen 2 und 312 Stunden.

Die Auswertung am Lichtmikroskop und am Fluoreszenzmikroskop erfolgte semiquantitativ anhand einer 4-Punkteskala.

Im Vergleich zu in der Literatur vorbeschriebenen Untersuchungen an der Maus, konnten in der vorliegenden Arbeit keine eindeutig proliferationsaktiven perivaskulären Astrozyten im humanen, adulten Hirngewebe nach SHT identifiziert werden.

Die untersuchten perivaskulären reaktiven Astrozyten zeigen eine vermehrte Expression des Enzyms ALDH 1, wobei hier der Subtyp ALDH1A1 deutlich gegenüber den Subtypen ALDH1A3 und ALDH1L1 dominiert. Die Expression steigt nach 12 Stunden posttraumatischer Überlebenszeit an und erreicht ihr Maximum nach 192 Stunden (8 Tagen). Danach zeigt sich eine Abnahme der Expression.

Der Wasserkanal AQP4 zeigt eine Dysregulation mit zytoplasmatischer und membranärer Expression nach 12 Stunden post trauma. Auch hier ergibt sich ein Punktum maximum nach 192 Stunden (8 Tage) und ein anschließender Rückgang der Expression. Besonders kräftig immunpositiv reagieren die perivaskulären Astrozyten an der Grenze von grauer zu weißer kortikaler Substanz.

Verstorbene höheren Lebensalters weisen eine deutlich höhere Anzahl ALDH1- und AQP4-positiver perivaskulärer Astrozyten auf. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ALDH1 um den Subtyp ALDH1A1 handelt, der hier exprimiert ist. Dies ist interessant vor dem Hintergrund, dass ALDH1A1 und ALDH1A3 aktuell in ihrer Eigenschaft als Stammzellmarker in glialen Tumoren diskutiert werden und diese Arbeit die Bedeutung der reaktiven Astrozyten unterstreicht.

Die altersabhängige Expression von ALDH1A1 und AQP4 spricht für eine Veränderung und Adaptation der perivaskulären reaktiven Astrozyten mit zunehmendem Alter, was nicht zuletzt relevante klinische Auswirkungen auf ein posttraumatisches Hirnödem oder die Rekonvaleszenz nach einem SHT haben kann.

7 Literaturverzeichnis

- ADAM, S. A., SCHNELL, O., POSCHL, J., EIGENBROD, S., KRETZSCHMAR, H. A., TONN, J. C. & SCHULLER, U. 2012. ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathol*, 22, 788-97.
- AGRE, P., SMITH, B. L., BAUMGARTEN, R., PRESTON, G. M., PRESSMAN, E., WILSON, P., ILLUM, N., ANSTEE, D. J., LANDE, M. B. & ZEIDEL, M. L. 1994. Human red cell Aquaporin CHIP. II. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia. *J Clin Invest*, 94, 1050-8.
- ANDRIEZEN, W. L. 1893. The neuroglia elements in the human brain. *British medical journal*, 2, 227.
- AUGUSTE, K. I., JIN, S., UCHIDA, K., YAN, D., MANLEY, G. T., PAPADOPOULOS, M. C. & VERKMAN, A. S. 2007. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J*, 21, 108-16.
- AYUB, T. H., KEYVER-PAIK, M. D., DEBALD, M., ROSTAMZADEH, B., THIESLER, T., SCHRODER, L., BARCHET, W., ABRAMIAN, A., KAISER, C., KRISTIANSEN, G., KUHN, W. & KUBLER, K. 2015. Accumulation of ALDH1-positive cells after neoadjuvant chemotherapy predicts treatment resistance and prognosticates poor outcome in ovarian cancer. *Oncotarget*, 6, 16437-48.
- BARDEHLE, S., KRUGER, M., BUGGENTHIN, F., SCHWAUSCH, J., NINKOVIC, J., CLEVERS, H., SNIPPERT, H. J., THEIS, F. J., MEYER-LUEHMANN, M., BECHMANN, I., DIMOU, L. & GOTZ, M. 2013. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci*, 16, 580-6.
- BARRETO, G. E., SUN, X., XU, L. & GIFFARD, R. G. 2011. Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct. *PLoS One*, 6, e27881.
- BEDNARZ-KNOLL, N., NASTALY, P., ZACZEK, A., STOUPIEC, M. G., RIETHDORF, S., WIKMAN, H., MULLER, V., SKOKOWSKI, J., SZADE, J., SEJDA, A., WELNICKA-JASKIEWICZ, M. & PANTEL, K. 2015. Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression. *Oncotarget*, 6, 26789-803.
- BENJAMIN, A. M. & QUASTEL, J. H. 1972. Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. *Biochem J*, 128, 631-46.
- BOESMANS, W., ROCHA, N. P., REIS, H. J., HOLT, M. & VANDEN BERGHE, P. 2014. The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glial cells. *Neurosci Lett*, 566, 102-5.
- BOUVIER, C., BERTUCCI, F., METELLUS, P., FINETTI, P., MAUES DE PAULA, A., FOREST, F., MOKHTARI, K., MIQUEL, C., BIRNBAUM, D., VASILJEVIC, A., JOUVET, A., COINDRE, J. M., LOUNDOU, A. & FIGARELLA-BRANGER, D.

2013. ALDH1 is an immunohistochemical diagnostic marker for solitary fibrous tumours and haemangiopericytomas of the meninges emerging from gene profiling study. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 10.
- CAHOY, J. D., EMERY, B., KAUSHAL, A., FOO, L. C., ZAMANIAN, J. L., CHRISTOPHERSON, K. S., XING, Y., LUBISCHER, J. L., KRIEG, P. A., KRUPENKO, S. A., THOMPSON, W. J. & BARRES, B. A. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28, 264-78.
- COLOMBO, J. A. & REISIN, H. D. 2004. Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Research*, 1006, 126-131.
- CORRIGAN, J. D., SELASSIE, A. W. & ORMAN, J. A. 2010. The epidemiology of traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*, 25, 72-80.
- DAWSON, T. P. & NEAL, J. S. 2000. *Manual of Practical Neuropathology Techniques*, Elsevier Science & Technology Books.
- DESTASIS.DE. 2013. *Transport & Verkehr / Verkehrsunfälle* [Online]. Statistisches Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland. Available: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/Verkehrsunfaelle.html> [Accessed].
- ENG, L. F., GHIRNIKAR, R. S. & LEE, Y. L. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25, 1439-51.
- ENG, L. F., VANDERHAEGHEN, J. J., BIGNAMI, A. & GERSTL, B. 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28, 351-4.
- FOO, L. C. & DOUGHERTY, J. D. 2013. Aldh1L1 is expressed by postnatal neural stem cells in vivo. *Glia*, 61, 1533-41.
- GARWOOD, C. J., RATCLIFFE, L. E., SIMPSON, J. E., HEATH, P. R., INCE, P. G. & WHARTON, S. B. 2016. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias; a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*.
- HARMSSEN, A. M., GIANNAKOPOULOS, G. F., MOERBEEK, P. R., JANSMA, E. P., BONJER, H. J. & BLOEMERS, F. W. 2015. The influence of prehospital time on trauma patients outcome: a systematic review. *Injury*, 46, 602-9.
- HUANG, R., LI, X., HOLM, R., TROPE, C. G., NESLAND, J. M. & SUO, Z. 2015. The expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in ovarian carcinomas and its clinicopathological associations: a retrospective study. *BMC Cancer*, 15, 502.
- HUO, W., DU, M., PAN, X., ZHU, X. & LI, Z. 2015. Prognostic value of ALDH1 expression in lung cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8, 2045-51.
- HYDEN, H. & LANGE, P. W. 1965. The Steady State and Endogenous Respiration in Neuron and Glia. *Acta Physiol Scand*, 64, 6-14.
- ILIFF, J. J., WANG, M., LIAO, Y., PLOGG, B. A., PENG, W., GUNDERSEN, G. A., BENVENISTE, H., VATES, G. E., DEANE, R., GOLDMAN, S. A., NAGELHUS, E. A. & NEDERGAARD, M. 2012. A paravascular pathway

- facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*, 4, 147ra111.
- JACKSON, B., BROCKER, C., THOMPSON, D. C., BLACK, W., VASILIOU, K., NEBERT, D. W. & VASILIOU, V. 2011. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*, 5, 283-303.
- JUNG, J. S., BHAT, R. V., PRESTON, G. M., GUGGINO, W. B., BARABAN, J. M. & AGRE, P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 13052-6.
- KIM, J. I., GANESAN, S., LUO, S. X., WU, Y. W., PARK, E., HUANG, E. J., CHEN, L. & DING, J. B. 2015. Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 350, 102-6.
- KONG, H., FAN, Y., XIE, J., DING, J., SHA, L., SHI, X., SUN, X. & HU, G. 2008. AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells. *J Cell Sci*, 121, 4029-36.
- LAM, C., LIN, M. R., CHU, S. F., TSAI, S. H., BAI, C. H. & CHIU, W. T. 2015. The effect of various types of motorcycle helmets on cervical spine injury in head injury patients: a multicenter study in Taiwan. *Biomed Res Int*, 2015, 487985.
- LAMAN, J. D. & WELLER, R. O. 2013. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 840-56.
- LI, L., ZHANG, H., VARRIN-DOYER, M., ZAMVIL, S. S. & VERKMAN, A. S. 2011. Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation. *FASEB J*, 25, 1556-66.
- LIU, D. Y., REN, C. P., YUAN, X. R., ZHANG, L. H., LIU, J., LIU, Q., YUAN, J., YUAN, D. & JIANG, X. J. 2012. ALDH1 expression is correlated with pathologic grade and poor clinical outcome in patients with astrocytoma. *J Clin Neurosci*, 19, 1700-5.
- LLOYD, J. & CONIDI, F. 2015. Brain injury in sports. *J Neurosurg*, 1-8.
- MA, I. & ALLAN, A. L. 2011. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev*, 7, 292-306.
- MARCATO, P., DEAN, C. A., GIACOMANTONIO, C. A. & LEE, P. W. 2011. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, 10, 1378-84.
- MARCHITTI, S. A., BROCKER, C., STAGOS, D. & VASILIOU, V. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4, 697-720.
- MARKOWITZ, S. & CHATTERJI, P. 2015. Effects of bicycle helmet laws on children's injuries. *Health Econ*, 24, 26-40.
- MATSIKA, A., SRINIVASAN, B., DAY, C., MADER, S. A., KIERNAN, D. M., BROOMFIELD, A., FU, J., HOOPER, J. D., KENCH, J. G. & SAMARATUNGA, H. 2015. Cancer stem cell markers in prostate cancer: an immunohistochemical study of ALDH1, SOX2 and EZH2. *Pathology*, 47, 622-8.

- MCKEE, A. C., STEIN, T. D., KIERNAN, P. T. & ALVAREZ, V. E. 2015. The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy. *Brain Pathol*, 25, 350-64.
- MYBURGH, J. A., COOPER, D. J., FINFER, S. R., VENKATESH, B., JONES, D., HIGGINS, A., BISHOP, N., HIGLETT, T., AUSTRALASIAN TRAUMATIC BRAIN INJURY STUDY INVESTIGATORS FOR THE, A. & NEW ZEALAND INTENSIVE CARE SOCIETY CLINICAL TRIALS, G. 2008. Epidemiology and 12-month outcomes from traumatic brain injury in australia and new zealand. *J Trauma*, 64, 854-62.
- NAKAHATA, K., UEHARA, S., NISHIKAWA, S., KAWATSU, M., ZENITANI, M., OUE, T. & OKUYAMA, H. 2015. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Is a Potential Marker for Cancer Stem Cells in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *PLoS One*, 10, e0125454.
- NICHOLLS, J. G. & KUFFLER, S. W. 1965. Na and K Content of Glial Cells and Neurons Determined by Flame Photometry in the Central Nervous System of the Leech. *J Neurophysiol*, 28, 519-25.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17, 171-80.
- NOELL, S., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., MACK, A. F., BEEDLE, A. M., SATZ, J. S., CAMPBELL, K. P., WOLBURG, H. & FALLIER-BECKER, P. 2011. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci*, 33, 2179-86.
- OBERHEIM, N. A., TAKANO, T., HAN, X., HE, W., LIN, J. H. C., WANG, F., XU, Q., WYATT, J. D., PILCHER, W., OJEMANN, J. G., RANSOM, B. R., GOLDMAN, S. A. & NEDERGAARD, M. 2009. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 29, 3276-3287.
- OH, S. Y., SOHN, S. H., YIM, H., LEE, D., SUH, K. W. & KIM, Y. B. 2015. ALDH1 is a prognostic factor for patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy and radical resection for stage III rectal cancer. *J Surg Oncol*, 111, 243-7.
- PEREZ, E., BARRACHINA, M., RODRIGUEZ, A., TORREJON-ESCRIBANO, B., BOADA, M., HERNANDEZ, I., SANCHEZ, M. & FERRER, I. 2007. Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. *Brain Res*, 1128, 164-74.
- RASH, J. E., YASUMURA, T., HUDSON, C. S., AGRE, P. & NIELSEN, S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11981-6.
- RASPER, M., SCHAFFER, A., PIONTEK, G., TEUFEL, J., BROCKHOFF, G., RINGEL, F., HEINDL, S., ZIMMER, C. & SCHLEGEL, J. 2010. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*, 12, 1024-33.
- RETZIUS, G. 1893. Studien über ependym und neuroglia. *Biol Unters*, 5, 2-26.

- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SOFRONIEW, M. V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-47.
- SOSUNOV, A. A., WU, X., TSANKOVA, N. M., GUILFOYLE, E., MCKHANN, G. M. & GOLDMAN, J. E. 2014. Phenotypic Heterogeneity and Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. *The Journal of Neuroscience*, 34, 2285-2298.
- STOKUM, J. A., MEHTA, R. I., IVANOVA, S., YU, E., GERZANICH, V. & SIMARD, J. M. 2015. Heterogeneity of aquaporin-4 localization and expression after focal cerebral ischemia underlies differences in white versus grey matter swelling. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 61.
- TABATA, H. 2015. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 9.
- VANHARREVELD, A., CROWELL, J. & MALHOTRA, S. K. 1965. A Study of Extracellular Space in Central Nervous Tissue by Freeze-Substitution. *J Cell Biol*, 25, 117-37.
- VERKHRATSKY, A., NEDERGAARD, M. & HERTZ, L. 2014. Why are Astrocytes Important? *Neurochem Res*.
- ZHANG, W., LIU, Y., HU, H., HUANG, H., BAO, Z., YANG, P., WANG, Y., YOU, G., YAN, W., JIANG, T., WANG, J. & ZHANG, W. 2015. ALDH1A3: A Marker of Mesenchymal Phenotype in Gliomas Associated with Cell Invasion. *PLoS One*, 10, e0142856.

8 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AQP	Aquaporin
cDNA	komplementäre DNA
Cl	Chlorid
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6'-Diamino-2-phenylindole
GABA	Gamma- Aminobuttersäure
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
IHC	Immunhistochemie
K	Kalium
Na	Natrium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SFT	Solitärer fibröser Tumor
SHT	Schädelhirntrauma

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel und Prof. Dr. med. Matthias Graw für die Möglichkeit diese interdisziplinäre Arbeit im Fachgebiet für Neuropathologie der Technischen Universität München und dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu können. Ich bedanke mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die damit verbundene Freiheit.

Ich bedanke mich bei meinem Freund Prof. Dr. med. Andreas Büttner, der den Anstoß zu dieser Arbeit gegeben hat und mich für die forensische Neuropathologie begeistert hat.

Ein herzliches Dankeschön an meine wunderbaren Kolleginnen in der Neuropathologie, die mir im Alltag sowohl Freude als auch Stütze waren: Dr. Friederike Lämmer, Sandra Baur, Ingrid Hoepner, Dr. Andrea Schäfer, Dr. Veronika Lachner, Dr. Julia Köritzer, Dr. Velia Hülsmeier, PD Dr. med. Frauke Neff und Friederike Liesche.

Danke an die tollen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin der LMU, die mich unterstützt haben, besonders: Prof. Dr. med. Wolfgang Keil, PD Dr. med. Jutta Schöpfer, Fabian Kriner und Susanne Ring.

Ich danke Fr. PD Dr. Svetlana Sirko für die guten Gespräche und ihre Bereitschaft ihr großes fachliches Wissen zu teilen.

Last but not least, ein großes Dankeschön den wichtigsten Blondinen in meinem Leben: Meiner Mutter Dr. Ulla Ertelt, meinen Schwestern Greta und Katharina, meinen Freundinnen Bambi und Astrid.

10 Lebenslauf

Claire Zoe Ertelt-Delbridge, geboren am 24.01.1983 in Recklinghausen.

- 2002 Abitur an der Anna-Schmidt-Schule in Frankfurt am Main.
- 2003 Französischstudium an der Universität Sorbonne, Paris, Frankreich.
- 2006 Erstes humanmedizinisches Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 2010 Zweites humanmedizinisches Staatsexamen an der Technischen Universität München.
- 2011-2016 Assistenzärztin in der Allgemeinen Pathologie und der Neuropathologie am Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München.
- 2016- Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Klinikum rechts der Isar.