

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen
Abteilung allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
Leiter: Professor Dr. B. Bültmann**

**Blutgefäße des *Glioblastoma multiforme*:
Elektronenmikroskopische und immunozytochemische
Untersuchungen zu Veränderungen der perivaskulären
extrazellulären Matrix und der Endothelzellen.**

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

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

**vorgelegt von
Arne Fischmann, geb. 02. August 1972
aus
Tübingen**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Duffner

gewidmet meinen Eltern,
die mich stets unterstützt haben

I. Inhaltsverzeichnis:

I.	Inhaltsverzeichnis	4
II.	Verwendete Abkürzungen	7
1.	Einleitung	
1.1	Epidemiologie	8
1.2	Histogenese und Pathologie	8
1.2.1	Histogenese	8
1.2.2	Makro- und Mikropathologie	9
1.2.3	Ödem	10
1.3	Endothel und Angiogenese	11
1.3.1	Angiogenese	11
1.3.2	Basalmembran	13
1.3.3	Tumorangiogenese	13
1.3.4	Angiogenese der Glioblastome	14
1.4	Blut-Hirn-Schranke	15
1.4.1	Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	15
1.4.2	Glut-1 als Transporterprotein der Blut-Hirn-Schranke	16
1.5	Extrazellulärmatrix	16
1.5.1	Aufbau der Extrazellulärmatrix	16
1.5.2	Kollagene	17
1.5.3	Tenascin	18
1.5.4	Laminin und Fibronectin	19
1.5.5	Agrin	20
1.5.6	Matrix-Metalloproteinasen	20
1.6	Zielsetzung dieser Studie	21
2.	Materialien und Methoden	
2.1	Materialien	22
2.1.1	Patienten	22
2.1.2	Verwendete Antikörper	22
2.2	Methoden	23

2.2.1	Aufarbeitung der Gewebeprobe	22
2.2.2	Einbettung zur Elektronenmikroskopie	24
2.2.3	Anfertigung von Ultradünnschnitten zur Elektronenmikroskopie	25
2.2.4	Immunfluoreszenz	26
2.2.5	Sekundärkontrolle	28
3.	Ergebnisse	
3.1	Elektronenmikroskopie	29
3.1.1	Struktur der Gefäße	29
3.1.2	Elektronenmikroskopische Zeichen der Schrankenstörung	31
3.2	Immunfluoreszenz	32
3.2.1	Kollagen I	32
3.2.2	Kollagen III	34
3.2.3	Kollagen IV	35
3.2.4	Fibronektin	35
3.2.5	Laminin	36
3.2.6	Tenascin	36
3.2.7	Agrin	39
3.2.8	Glut-1	41
4.	Diskussion	
4.1	Ultrastruktur	45
4.1.1	Gefäßdicke	45
4.1.2	Gefäßmorphologie	46
4.1.3	Extrazellulärmatrix	48
4.1.4	Endothelmorphologie und Veränderungen der BHS	49
4.2	Änderungen im Aufbau der Extrazellulärmatrix	53
4.2.1	Kollagen I	53
4.2.2	Kollagen III	54
4.2.3	Kollagen IV	55
4.2.4	Fibronektin	56

4.2.5	Laminin	56
4.2.6	Tenascin	57
4.2.6.1	Tenascin-Expression im Tumorgewebe	57
4.2.6.2	Regulation der Tenascin-Expression	58
4.2.6.3	Tenascin in Zonen fokaler Nekrose	58
4.2.7	Agrin	61
4.2.8	Glut-1	63
4.2.9	MMP-9	65
4.2.10	Einschränkungen dieser Studie	66
4.3	Ausblick	67
5.	Zusammenfassung	68
6.	Abbildungen	70
7.	Literatur	79
8.	Danksagung	92
9.	Lebenslauf	93

II. Verwendete Abkürzungen:

BHS	Blut-Hirn-Schranke
bFGF	basic fibroblast growth factor
EGF	Epithelial growth factor
EGFL	Epithelial growth factor like
ECM	Extrazellulärmatrix
FN	Fibronektin
GBM	Glioblastoma Multiforme
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MT-MMP	Membrane-type Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF- β	Platelet-derived growth factor- β
PET	Positronenemmissionstomographie
SMA	Glattmuskel-Aktin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TJ	Tight Junction
TN	Tenascin
TN-C	Tenascin-C
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vasculärer Permeabilitätsfaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung:

1.1 Epidemiologie

Etwa 1-2 % aller neoplastischen Veränderungen des Menschen entstehen im ZNS. Von diesen bilden die Neubildungen neuroektodermalen Ursprungs, insbesondere die Gliome, die größte Gruppe, noch vor den Meningiomen und Angiomen. Von diesen entfallen die Hälfte auf die Glioblastome, entsprechend etwa 15-30% aller hirneigenen Tumoren. Die Inzidenz der Glioblastome liegt bei etwa 2 bis 3 Fällen pro 100.000 Einwohner, dies entspricht etwa 4000-5000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland.

Das Glioblastoma multiforme ist der bösartigste und therapieresistenteste hirneigene Tumor und entspricht nach der WHO-Klassifikation einem Gliom Grad IV (Kleihues et al. 2002). Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose beträgt etwa 12 Monate, trotz intensiver chirurgischer, radio- und chemotherapeutischer Bemühungen gelang es bislang nicht, die Prognose wesentlich zu verbessern (Johannesen et al. 2002). Das Augenmerk wurde daher in letzter Zeit verstärkt auf alternative Therapiemodalitäten wie z.B. die Immuntherapie, Radioimmuntherapie oder Antiangiogenese gelenkt.

1.2 Histogenese und Pathologie

1.2.1 Histogenese

Etwa die Hälfte der hirneigenen Neubildungen entsteht aus Gliazellen. Diese bilden ein Netzwerk, das einerseits ein Stützgewebe für die ihm inliegenden Neurone bildet, andererseits wichtige Funktionen des ZNS erfüllt. Nach heutigem Wissensstand hat dabei jede Gliazelle mit Ausnahme der Mikroglia und Oligodendroglia einen Kontaktpunkt sowohl zu einem benachbarten Gefäß als auch zu mindestens einer Nervenzelle, wobei die Gesamtheit der

Gliazellen mit ihren Ausläufern als Glion bezeichnet wird (Übersicht in: Wolburg 2001) Astrozyten übernehmen dabei Stütz- und Versorgungsfunktionen, Mikroglia bilden die Abwehrzellen des ZNS, Oligodendroglia bilden die Markscheiden im ZNS, während periphere Nervenfasern von Schwannschen Zellen umschichtet werden.

Gliazellen sind neben den Endothelzellen die einzigen Zellen des ZNS, die zur Proliferation in der Lage sind, allerdings ist der Zellumsatz im Vergleich zu sonstigen Geweben gering. Die Gliome entstehen durch Störungen der Autoregulation der Proliferation und Apoptose, wobei von einem mehrstufigen Prozess ausgegangen wird. Das Glioblastom bildet die Endstufe dieses Entartungsprozesses und kann sowohl direkt als auch durch Entartung aus Tumoren geringerer Malignität entstehen, wobei sich die beiden Entitäten in ihrer genetischen Ausstattung unterscheiden (Kleihues et al. 2002).

1.2.2 Makro- und Mikropathologie

Makroskopisch zeigt sich, bezeichnet im Suffix „multiforme“, ein vielfältiges Bild mit zahlreichen Nekrosen, Einblutungen, der typischen glasartigen Tumormasse sowie einer ausgeprägten Ödembildung. Oft hat der Tumor bei der Erstdiagnose bereits beide Hirnhälften befallen (sogenanntes Schmetterlings-Glioblastom).

Histologisch ist der Tumor gekennzeichnet durch ein stark dedifferenziertes pleomorphes Zellbild mit zahlreichen Mitosen, nekrotischen Gebieten die von Zonen erhöhter Zelldichte - sogenannten Pseudo-Palisaden - umgeben sind, sowie Gefäßneubildungen mit abnormal großen, häufig glomerulär angeordneten Kapillaren (Waggener und Beggs 1976). Diese sind typisch für das Glioblastom und eines der Differenzierungskriterien zwischen Gliomen Grad III und Grad IV nach WHO, wobei die Gefäßdichte einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt (Leon et al. 1996). Die Wachstumsfraktion beträgt etwa 15 bis 30%, allerdings bedingt eine hohe Zellverlustrate von über

80%, dass sich die Tumormasse nur alle 40 bis 50 Tage verdoppelt (Hoshino 1984).

Zwar neigt das Glioblastom nicht zur Metastasenbildung: in weniger als 1% wurden, meist erst nach neurochirurgischer Intervention, Fernmetastasen gefunden (Zappia und Wolf 1992). Man findet jedoch eine ausgeprägte lokale Streuung und Migration der Tumorzellen insbesondere entlang lokaler Gefäße; in experimentellen Tumoren war die von Tumorzellen befallene Hirnmasse im Durchmesser etwa 2,5 mal größer als der makroskopisch sichtbare Tumor (Ji et al. 1996), so dass eine Resektion mit dem nötigen tumorfreien Sicherheitsabstand nicht möglich ist, ohne große Teile gesunden Gehirns zu opfern. Angesichts des bei Erstdiagnose meist fortgeschrittenen Stadiums ist ein kurativer chirurgischer Ansatz damit illusorisch.

1.2.3 Ödem

Die Ödembildung ist einer der entscheidenden Morbiditätsfaktoren des GBM und oft sind die dadurch ausgelösten Symptome des erhöhten Hirndrucks die ersten Anzeichen der Erkrankung. Die Reduktion des Ödems, insbesondere durch Kortikosteroide ist ein wichtiger palliativer Therapiefaktor.

Die Ätiologie des Ödems ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht jedoch davon aus, dass eine erhöhte Gefäßpermeabilität auf Grund des Verlustes der Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften des Hirnkapillar-Endothels im Tumorgebiet wesentlich zur Entstehung beiträgt. Andererseits deuten ultrastrukturelle Studien der Kapillaren im eigentlichen Tumor sowie im umliegenden Gewebe darauf hin, dass im peritumoralen Gewebe extrazelluläre Flüssigkeit resorbiert und damit das Ödem reduziert wird (Dinda et al. 1993). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der Haupteffekt der Ödemreduktion durch Kortikosteroide auf einem antagonistischen Effekt zu VEGF beruht (Heiss et al. 1996) und eine hohe Korrelation zur Gefäßdichte besteht (Guerin et al. 1992a).

1.3 Endothel und Angiogenese

1.3.1 Angiogenese

Endothelzellen gehören im gesunden Säuger zu den Zellen mit der geringsten Teilungsaktivität: nur 1 von 10.000 Zellen (0,01%) befindet sich jeweils in der Mitose, zum Vergleich: Darmepithel weist etwa 14% an Zellen in der Replikation auf (Hanahan und Folkman 1996). In verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen, wie z.B. Wundheilung, Menstruation oder Tumorentstehung, kommt es zur Aktivierung der Gefäße und Angiogenese, um dem veränderten Versorgungsbedarf der Gewebe gerecht zu werden. Dabei löst sich die Gefäßstruktur auf, Endothelzellen und Perizyten teilen sich und wachsen in gerichteter Proliferation aus (Gerhardt und Betsholtz 2003). Anschließend organisiert sich die Gefäßstruktur neu in ein funktionsfähiges Gefäß.

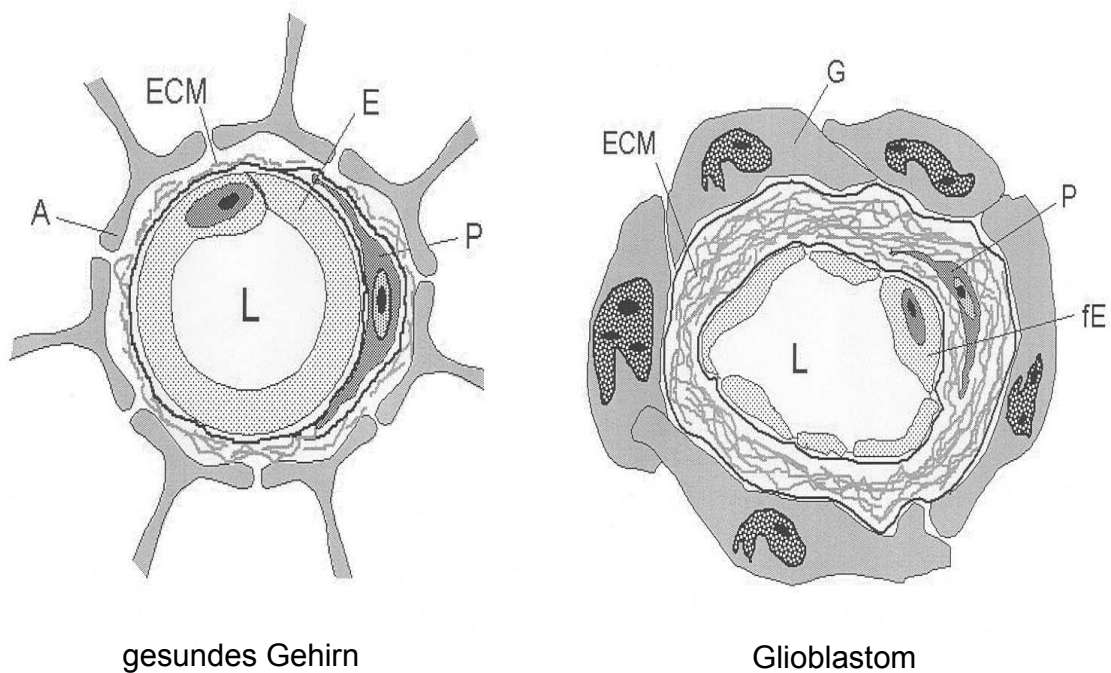
Die Regulation dieses komplexen Wachstums wird über diverse pro- und antiangiogenetische Faktoren wie VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor), Angiopoetin-1 und -2, bFGF (Basic Fibroblast growth factor), EGF (Epithelial growth factor) und ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche gesteuert (Übersicht in: Hanahan 1997). Dabei spielt die Extrazellulärmatrix eine wichtige Rolle sowohl in Bezug auf die Migration der Endothelzellen als auch, was die Speicherung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren betrifft. Hierbei spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle, indem sie die Moleküle der Extrazellulärmatrix spalten und eine gerichtete Migration ermöglichen, aber auch eine frühzeitige Apoptose der Endothelzellen verhindern (Vu und Werb 2000).

VEGF ist ein wichtiger Faktor der embryonalen und physiologischen Angiogenese. Die Promotor-Region des VEGF Gens enthält einen Hypoxie-sensiblen Bereich. Das damit ausgelöste erhöhte Gefäßwachstum kann einerseits die Sauerstoffversorgung wieder herstellen. Andererseits führt es aber auch zu pathologischen Neovaskularisationen, wie z.B. in der Retina bei

diabetischer Retinopathie (Hernandez et al. 2001) oder auch in hypoxischen Tumorarealen (Plate et al. 1992). Auch andere proangiogen wirkende Proteine werden durch Hypoxie verstärkt exprimiert und synthetisiert, unter anderem PDGF- β (Platelet-derived-growth-factor β) und MMP-9. Diese wirken teilweise synergistisch mit VEGF, und stimulieren zusätzlich die Expression von VEGF in vaskulären Glattmuskelzellen (Enholm et al. 1997).

Abbildung 1

Struktur von Kapillaren in gesundem ZNS und in Glioblastomen: Die Endfußbildenden Astrozyten sind durch Tumorzellen ersetzt. Das Endothel ist schmal und fenestriert, die ECM vermehrt mit deutlicher Trennung der einzelnen Basalmembran-Lagen (schwarze Linie). A=Astrozytenendfuß, E=Endothelzelle, ECM= Extrazellulärmatrix, fE = fenestriertes Endothel, G = Gliomzelle, P = Perizyt.



1.3.2 Basalmembran

Jede Epi- oder Endothelschicht ist vom darunter liegenden Gewebe abgegrenzt durch eine Faserschicht, die Basalmembran genannt wird.

Die Basalmembran der Hirnkapillaren besteht überwiegend aus Kollagenen, insbesondere Kollagen IV sowie Laminin und Fibronectin. Sie liegt direkt unterhalb der Endothelzellen, hat aber auch direkten Kontakt zu der sie umgebenden Astroglia (Abbildung 1). Dieser direkte Kontakt der Astroglia zu den Gefäßen scheint nötig zu sein, um die Blut-Hirn-Schranke aufrecht zu erhalten.

1.3.3 Tumorangiogenese

Gefäßneubildungen sind ein charakteristisches Merkmal des GBM. Die Gefäßfläche innerhalb eines Schnittes ist um ein vielfaches höher als in gesundem Gewebe.

So verwendeten Brem et al. (1974) die Gefäße als Grading-Merkmal. Studien an Glioblastomen zeigten, dass 12.5% der Endothelzellen in Tumoren proliferieren, was eine mehr als 40fache Steigerung darstellt (Heiss et al. 1996, Plate 1999). Dabei zeigten Studien an Tiermodellen, dass Angiogenese einen wichtigen Schritt in einer frühen Phase der Tumorentstehung darstellt (Plate et al. 1995; Hanahan und Folkman 1996). Dies traf nicht nur auf die Glioblastome sondern auch auf die übrigen untersuchten Tumorarten, wie z.B. die dermalen Fibrosarkome oder Plattenepithelkarzinome zu. Hanahan und Folkman (1996) postulierten, dass eine Störung der Regulation von pro- und antiangiogenen Faktoren eine Ein/Aus-Reaktion moduliert, welche die Angiogenese aktiviert – den so genannten angiogenic switch.

Dabei wird die Tumorangiogenese entscheidend von der umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) beeinflusst, welche Wachstumsfaktoren speichert und freisetzt. So spielt z.B. Tenascin eine wichtige Rolle in der Angiogenese von Glioblastomen und bei der Störung der Blut-Hirn-Schranke (Rascher et al.

2002). Andererseits verändern die einwachsenden Zellen die sie umgebende Matrix und bilden innerhalb kurzer Zeit eine eigene perivaskuläre Matrix (Carey 1991). Zwei wichtige Faktoren in der Aktivierung des angiogenic switch sind VEGF und MMP-9 (Arbiser et al. 1997). Antiangiogene Faktoren wie z.B. Angiostatin sind in der Lage das Tumorwachstum und teilweise auch die Dedifferenzierung zu unterdrücken (Kirsch et al. 1998). Aus diesen entwickelte antiangiogene Medikamente bilden einen Pool aus potentiellen Therapeutika.

1.3.4 Angiogenese der Glioblastome

Schon 1960 konnte Sarah Luse zeigen, dass sich die Gefäße aus diversen Hirntumoren elektronenmikroskopisch von denen in gesundem Gehirngewebe unterscheiden (Luse 1960). Allerdings fand Luse v. a. Änderungen der allgemeinen Gefäßform sowie eine doppelte Basalmembran, jedoch keine Endothelveränderungen (Abbildung 1). Nachfolgende ultrastrukturelle Studien zeigten eine verdünnte Endothelschicht, vermehrt Vesikel und vereinzelt Fenestrierungen (Hirano et al. 1975). Die Tight Junctions die das morphologische Korrelat der Blut-Hirn Schranke bilden, sind teilweise verkürzt; die Zellmembranen sind weiter von einander distanziert, als in gesundem Gehirngewebe (Long 1970), wobei diese Ergebnisse nicht aus Gefrierbruch-Studien stammen. Selten findet sich eine komplette Auflösung der Endothelintegrität mit Lückenbildungen. Allerdings bestand keine Einigkeit zwischen den einzelnen Forschergruppen welche dieser Elemente für die Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind und welche sich nur als Nebeneffekte zeigen (Long 1970; Cox et al. 1976; Weller et al. 1978; Stewart et al. 1987; Bertossi et al. 1997).

Dabei wurde eine große morphologische Ähnlichkeit der neuentwickelten Gliomgefäße zu Gefäßen im embryonalen ZNS festgestellt (Weller et al. 1977). Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass sich die Mechanismen der embryonalen Angiogenese und der Tumorangio-genese in vielen Punkten ähneln und analoge Mechanismen die Gefäßbildung und Struktur steuern (Plate und Risau 1995, Plate und Mennel 1995).

1.4 Blut-Hirn-Schranke

1.4 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Die Gefäße des Gehirns unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von denen aller übrigen Organe. Sie bilden eine dichte Barriere, welche die empfindlichen Neurone innerhalb des ZNS vor schädlichen Substanzen im Blut schützt und andererseits ein für sie optimales Milieu aufbaut. Man weiß heute, dass Endothelzellen diese so genannte Blut-Hirn-Schranke aufbauen. Dabei bilden die Endothelzellen Tight Junctions aus, so dass ein Transport wasserlöslicher Substanzen nur noch über Carrier-Proteine innerhalb der Zellen möglich ist (Wolburg und Risau 1995). Die Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften der Hirnkapillar-Endothelzellen sind aber nicht *a priori* eine Eigenschaft dieser Zellen, sondern das Ergebnis enger und komplexer Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen, Astrozyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix. Die Tight Junctions sind charakterisiert durch spezielle transmembranöse Proteine: Occludin und die Claudine, welche in die sich berührenden Zellmembranen eingelassen sind und den Interzellularspalt zum verschwinden bringen (Tsukita et al. 2001). Die Tight Junction-Proteine sind gewebespezifisch. In Gehirnendothelzellen dominieren Occludin sowie Claudin-3, -5 und -12 (Wolburg und Lippoldt 2002; Nitta et al. 2003; Wolburg et al. 2003). Fenestrierungen der Kapillarwand finden sich in Blut-Hirn-Schranken-Epithelien nicht.

Die Störung der Blut-Hirn-Schranke in Glioblastomen ist ein wichtiger pathologischer Faktor und wird heute überwiegend der Wirkung von VEGF zugeschrieben – dieser Faktor ist auch als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bekannt, der für die Induktion von Fenestrierungen verantwortlich ist (Esser et al. 1998). Weitere Faktoren wie Scatter-Factor/Hepatocyte-Growth-Factor spielen ebenfalls eine wichtige Rolle (Book et al. 1999).

1.4.2 Glut-1 als Transporterprotein der Blut-Hirn-Schranke

Da die Blut-Hirn-Schranke eine vollständige Barriere für hydrophile Bestandteile bildet, müssen überlebenswichtige Faktoren mittels aktivem Transport in das ZNS verbracht werden. Im Falle der Glucose, welche den überwiegenden Brennstoff der Zellen im ZNS bildet, erfolgt dies über Mitglieder aus der Familie der Natrium-unabhängigen Glucosetransporter Glut-1 bis Glut-5. Hier spielt insbesondere der erythrozytenspezifische Glukosetransporter Glut-1 eine wichtige Rolle (Wolburg und Risau 1995). Dieser ist in kapillären Endothelien des ZNS nachweisbar und auf Endothelien der Blut-Hirn-Schranke beschränkt (Kalara et al. 1988; Dermietzel et al. 1992), wobei innerhalb des Kortex keine Unterschiede in der Intensität der Markierung entdeckt wurden (Virgintino et al. 1997). Dabei sind die luminalen Membranen um den Faktor 4 geringer mit Glut-1 ausgestattet als die abluminale Membran (Gerhart et al. 1989; Bolz et al. 1996; Virgintino et al. 1997). Die Gefäße des Plexus choroideus und der zirkumventrikulären Organe, welche keine Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften aufweisen, besitzen keinen Glut-1 Transporter. Dagegen sind die Kapillaren des Hoden, der eine Schranke ähnlich der BHS besitzt, Glut-1 positiv (Harik et al. 1990). Aufgrund der engen Korrelation der Glut-1 Expression zu einer funktionstüchtigen Blut-Hirn-Schranke gilt Glut-1 als Markerprotein für die Schrankenfunktion.

1.5 Extrazellulärmatrix

1.5.1 Aufbau der Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (ECM) eines jeden Gewebes bildet ein spezifisches Geflecht das ständig von den inliegenden Zellen umgebaut und optimiert wird. Andererseits speichert die ECM Faktoren, welche die Proliferation, Differenzierung, Genexpression und Migration beeinflussen. Z.T. ist sie über einzelne Proteine oder deren Spaltprodukte selbst aktiv in dieses Geschehen involviert (Venström und Reichardt 1993). Dies geschieht überwiegend über Integrine, v.a. Integrin $\alpha_v\beta_3$ und Dystroglycan.

Insbesondere im ZNS ist dieses fein ausgewogene Wechselspiel von Zellen und der sie umgebenden Matrix ist noch immer nur in Ansätzen verstanden und lässt sich mit heutigen Mitteln nur schwer entwirren. Bekannt ist, dass die ECM für die Migration und axonale Verknüpfung der Nervenzellen eine entscheidende Rolle spielt (Venström und Reichardt 1993).

Die Komponenten der ECM können in vier Kategorien unterteilt werden: Kollagene, nichtkollagene Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Die Kollagene bilden eine Gruppe von mindestens 18 unterschiedlichen Glykoproteinen, welche einen Großteil des menschlichen Gesamtproteins umfasst, wobei Kollagen I mit etwa 90% des Gesamtkollagens die wichtigste Rolle spielt. Die Kollagene I, III und V kommen nahezu ubiquitär vor, während Kollagen IV ausschließlich in Basalmembranen zu finden ist (Alberts et al. 1994).

Die nichtkollagenen Glykoproteine, zu denen Fibronectin, Tenascin, Laminin und Vitronectin gehören, stellen durch die Fähigkeit zur direkten Bindung an die Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellen und ECM dar. Die für das ZNS typische Matrix ist überwiegend auf die subependymalen Regionen, die vaskulären Basalmembranen und die Glia limitans beschränkt, während das eigentliche Hirnparenchym auf eine kollagen- und proteinarme Matrix aufbaut.

1.5.2 Kollagene

Die Kollagene sind die wichtigste Faserkomponente sämtlicher Gewebe des Körpers. Trotz der zahlreichen Funktionen unterscheiden sich die Kollagene in ihrem Aufbau nur wenig. Alle Kollagene bestehen aus einer Tripelhelix, wobei sich die einzelnen Stränge unterscheiden und so das Kollagen charakterisieren. Kollagen I ist der am weitesten verbreitete Subtyp und kommt in nahezu allen Organen, insbesondere jedoch in Bindegewebe vor. Kollagen III bildet einen wichtigen Bestandteil der Wand größerer Blutgefäße. Im Gegensatz zu den genannten Typen formt Kollagen IV keine fibrillären Strukturen, sondern ist in netzwerkartigen Verbindungen anzutreffen und bildet eine wichtige Komponente der Basalmembran (Alberts et al. 1994). Das Vorkommen von Kollagen IV um

ein Gefäß lässt daher auf ein ausgereiftes Gefäß schließen, welches bereits eine Basalmembran gebildet und organisiert hat (Thyberg und Hultdardh- Nilsson 1994; Hanahan und Folkman 1996).

1.5.3 Tenascin-C

Tenascin-C wurde synchron in verschiedenen Laboratorien entdeckt als: Glial/Mesenchymal-extracellular-Matrix-Protein (GMEM), Myotendinous Antigen, Hexabrachion, Cytotactin, J1_{200/220}, Tenascin und Neuronectin (Übersicht in: Jones und Jones 2000) Wenn im folgenden von Tenascin (TN) die Rede ist, so handelt es sich stets um TN-C.

Zusammen mit vier anderen Proteinen (TN-R, TN-W, TN-X und TN-Y) bildet es eine Familie, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung insbesondere des Nervensystems sowie der Knochen spielen. So trägt TN-C wesentlich zur Neuronenmigration bei. Weitere wichtige Funktionen des TN-C liegen in der Wundheilung und Entzündung. Im adulten Organismus wird TN-C lediglich in Fällen exprimiert, die eine neue Gewebestrukturierung und Angiogenese erfordern, wie z.B. bei der Wundheilung, Entzündung und Tumorentstehung. TN-C bildet Hexamere aus Untereinheiten von 190 bis 300 kDa. Diese sind an der so genannten Tenascin-assembly Domäne über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Dabei können in einem Hexamer verschiedene Splice-Varianten der TN-C Untereinheiten vertreten sein, so dass eine Vielzahl an TN-C Varianten existiert (Jones und Jones 2000).

Ein Großteil des TN-C besteht aus einer Reihe von FN III Domänen. Diese sind in der Lage, eine Vielzahl von Liganden, darunter diverse ECM-Proteine zu binden. Beispiele dafür sind: die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta6$, die an der Gliomzellmigration beteiligt sind; $\alpha9\beta1$ und $\alpha8\beta1$, die bei der Adhäsion an Glattmuskelzellen und Astrozyten eine Rolle spielen (LaFleur et al. 1997), sowie die MMP-2 und -3 die eine wichtig Rolle bei der Neuorganisation von Geweben spielen (Jones und Jones 2000). Über die Bindung an Fibronektin wird TN-C in die ECM integriert. Die Wirkung der Tenascine auf die Migration wird vermutlich

durch die Regulation der Adhäsion vermittelt (Brooks et al. 1984; Jones und Jones 2000).

Die Expression des Tenascin-Genes wird über diverse Promotoren gesteuert welche durch b-FGF, EGF (Sakai et al. 1995) und Transforming Growth-Factor (TGF)- β aktiviert werden (Copertino et al. 1997). In astrozytären Tumoren wird TN-C überwiegend von Tumorzellen aber auch von angiogenen Gefäßen exprimiert (Zagzag et al. 1996).

1.5.4 Laminin und Fibronectin

Laminin ist eines der am frühesten ausgebildeten Proteine der Basallamina und ubiquitär vorkommend. Ähnlich wie Kollagen IV ist auch Laminin in netzwerkartigen Strukturen organisiert und in der Lage zahlreiche Proteine der ECM, sowie die angrenzenden Zellen zu binden (Alberts et al. 1994; Tunggal et al. 2000). Dabei ist die Expression der unterschiedlichen Laminin-Isoformen für spezifisch für das umgebende Gewebe. So wird die α -4 Kette nur von Endothelzellen synthetisiert (Aumailley und Smyth 1998). Über die genaue Verteilung der einzelnen Isoformen ist dennoch sehr wenig bekannt. Eine der Hauptaufgaben der Laminine besteht in der Vermittlung von Adhäsion, insbesondere über Integrine, welche auch die Polarität der aufliegenden Endo- und Epithellagen vermitteln. Mutationen der Laminin-Gene verursachen z.B. Epidermolysis bullosa oder kongenitale muskuläre Dystrophie (Aumailley und Smyth 1998).

Wie Laminin, so ist auch Fibronectin in der Lage, diverse Matrixkomponenten sowie angrenzende Zellen zu verbinden. Fibronectin ist ein großes Glykoprotein, welches ubiquitär in Vertebraten nachweisbar ist und von umgebenden Zellen zu netzwerkartigen Strukturen verknüpft werden kann, wobei je nach Umgebungsgewebe unterschiedliche splicing-Varianten zu finden sind. Einzelne Untereinheiten des Fibronectin finden sich auch in einer Vielzahl weiterer Proteine des Körpers, z.B. in Tenascin (Jones und Jones 2000). Die Hauptaufgabe des Fibronectin besteht vermutlich in der Organisation der Matrix sowie der Verknüpfung ihrer Komponenten (Alberts et al. 1994).

1.5.5 Agrin

Agrin ist ein Proteoglykan aus der Gruppe der Heparansulfate, welches zuerst aus dem Elektrischen Organ des *Torpedo californica* isoliert wurde (Nitkin et al. 1987) und von verschiedenen Typen von Nervenzellen exprimiert wird. Myozyten in Zellkultur sind nach Zugabe von Agrin in der Lage, synaptische Komplexe auszubilden (Alberts et al. 1994). Agrin ist für die Clusterung des Acetylcholin-Rezeptors in der Membran der motorischen Endplatte verantwortlich (McMahan 1990). Darüber hinaus wurde Agrin in der Basalmembran von Gefäßen des ZNS nachgewiesen, ebenso wie in Gefäßen des Hodens und Thymus, welche ebenfalls eine Blut-Gewebe-Schranke aufweisen (Barber und Lieth 1997). Es wird daher vermutet, dass Agrin wesentlich zur Induktion und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beiträgt (Rascher et al. 2002). Im ZNS wird Agrin überwiegend durch Astrozyten gebildet, wobei die Expression- wie bei den meisten Proteinen der Basalmembranen- wesentlich durch die Endothelzellen der einwachsenden Gefäße gesteuert wird (Lieth et al. 1995).

1.5.6 Matrix-Metalloproteinasen

Der ständige Umbau der Extrazellulärmatrix geschieht überwiegend durch eine spezielle Klasse von Proteinen, den so genannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Dies sind ist eine Gruppe von derzeit 17 Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine Zinkfingerstruktur im enzymatisch aktiven Zentrum ist. Die Matrix-Metalloproteinasen sind teilweise membrangebunden (MT-MMP-1 und -2), teilweise werden sie als inaktive Vorstufen in den Extrazellularraum sezerniert, wo sie durch andere Proteinasen aktiviert werden (Vu und Werb 2000). Die so genannten Gelatinasen MMP-2 und -9 spalten zwar keine Kollagene, sind jedoch wichtig für die weitere Zerlegung der Kollagen-Spaltprodukte sowie von Laminin und Nidogen. Obwohl MMPs für eine Vielzahl von lebenswichtigen Prozessen, insbesondere in der Embryonalphase, verantwortlich gemacht werden, sind MMP-knock-out Mäuse in der Lage,

lebensfähige Junge zu werfen. Die Wirkung der MMP scheint daher komplexer zu sein als ursprünglich vermutet, wobei der Einfluss auf die Angiogenese eine wichtige Rolle spielt (Übersicht in: Shapiro 1998)

MMPs finden sich in Tumoren verschiedenster Ursprungsgewebe, in welchen sie unter anderem für die Angiogenese mitverantwortlich gemacht werden (Nielsen et al. 1997; Westermarck und Kähäri 1999). So verhindert eine Inhibition von MMP-2 die Reaktion vaskulärer Glattmuskelzellen auf PDGF- β (Vu und Werb 2000). Dabei ist die Wirkung der MMPs auf die Angiogenese ambivalent, da sie einerseits durch die Modifikation der ECM die Gefäßausprossung ermöglichen, andererseits aber auch antiangiogene Faktoren aus der Matrix freisetzen. Zum Beispiel stellt ein 29kD Fragment des Fibronectin einen potenten Inhibitor der Angiogenese dar (Hanahan et al. 1996), während MMP-12 in der Lage ist, Angiostatin zu aktivieren und so das Wachstum von Lungenkarzinomen zu inhibieren (Shapiro 1998).

1.6 Zielsetzung dieser Studie:

Aufgrund des infiltrierenden Wachstums der Glioblastome finden sich unterschiedliche Zonen innerhalb eines Tumors- nicht infiltrierte Neuropil, solides Tumorgewebe, palisadenartige Zellverbände sowie fokale Nekrosen. Es wurde aus diesem Grund vermutet, dass sich Material, welches aus dem Zentrum des Tumors stammte von Proben aus dem Rand des Resektionsareals unterscheidet, und zwar sowohl in der Verteilung der extrazellulären und insbesondere der extravasalen Matrix, aber auch im Aufbau der Gefäße und in den Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke. Die Proben aus der Tumorperipherie weisen vermutlich Zeichen der intakten Vaskularisierung auf, während die Gefäße aus dem Tumorzentrum deutliche pathologische Veränderungen zeigen. Ziel der Untersuchung war die Charakterisierung der schrittweisen Veränderungen der ECM Berücksichtigung des lokalen Milieus sowie der Störung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Des Weiteren sollten die ultrastrukturellen Merkmale der Gefäße unter Berücksichtigung der Lokalisation innerhalb des Tumors untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien:

2.1.1 Patienten:

Die Gewebeproben, die in dieser Studie verwendet wurden, stammen von Patienten, welche an einem Glioblastom erkrankt waren und in der Neurochirurgischen Universitätsklinik eine Operation zur Tumorreduktion erhielten. Dabei wurden zu Studienzwecken jeweils eine Probe aus dem Zentrum des Tumors, sowie eine Probe aus dem Rand des Operationsgebiets entnommen, wobei die Proben aus dem Zentrum mit dem Suffix Z, diejenigen aus der Tumorperipherie mit dem Suffix P bezeichnet wurden. Bei den Tumoren Nr. 10 und 14 wurde, wegen der geringen Tumormasse, nur eine Probe entnommen. Eine weitere Gewebeprobe jedes Patienten wurde im Rahmen der diagnostischen Abklärung an das Institut für Hirnforschung der Universität zur histopathologischen Untersuchung weitergeleitet. Kontrollgewebe wurde im Rahmen einer Entlastungsoperation bei Hirnblutung nach Verkehrsunfall sowie bei einem Patienten mit cerebralem Angiom gewonnen.

Sämtliche Proben stammen aus dem aus therapeutischen Gründen zur Resektion vorgesehenen Areal, in keinem Fall wurde das Operationsareal aufgrund der Studie erweitert. Die Genehmigung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät lag vor

2.1.2 Verwendete Antikörper

Für die Markierung wurden die folgenden monoklonalen Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

- 1:50 Kaninchen Anti-humanes-Kollagen I (Sanbio; Cellysystems, Remagen)
- 1:50 Kaninchen Anti-humanes-Kollagen III (Sanbio; Cellysystems, Remagen)
- 1:100 Maus Anti-humanes-Kollagen IV (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- 1:50 Maus Anti-humanes-Laminin (DAKO, Carpinteria, USA)

- 1: 250 Kaninchen Anti-humanen-Fibronektin (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- 1:50 Maus Anti-humanen-Tenascin (DAKO, Carpinteria, USA)
- 1:50 Kaninchen Anti-MMP-9 (Biotrend, Köln)
- 1:100 Maus Anti-MMP-2 (Biotrend, Köln)
- 1:50 Maus Anti-Desmin (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- 1: 400 Kaninchen Anti-humanen-Glut-1
- 1:200 Maus Anti-Smooth-Muscle-Aktin (SMA)

Als Sekundärantikörper wurden folgende mit Fluoreszenzfarbstoffen auf Cyanin-Basis markierte Antikörper verwendet. :

- 1:100 Schaf Anti-Kaninchen mit CY2 (Dianova, Hamburg)
- 1:200 Schaf Anti-Maus mit CY3 (Dianova, Hamburg)

Zur Lagerung wurden die Antikörper 1:1 mit Glycerol versetzt und aliquotiert im Gefrierschrank bei -18°C gelagert.

2.2 Methoden:

2.2.1 Aufarbeitung der Gewebeprobe

Um autolytische Vorgänge auf ein Minimum zu reduzieren und eine optimale Struktur- und Immunogenität zu gewährleisten wurden die Gewebeprobe direkt vom Operateur entgegengenommen. Die Zuordnung der Probe zu einer Lokalisation innerhalb des Tumors erfolgte dabei durch den Operateur, der vor Durchführung der Untersuchung in das Prozedere eingewiesen wurde.

Noch im Operationstrakt wurde mit der Fixation begonnen. Die einzelnen Fixationsschritte werden, in Abhängigkeit von der Untersuchungsmodalität, in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.2 Einbettung zur Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurde das entnommene Tumorgewebe in etwa 1mm³ große Stücke zerlegt. Diese wurden in 2,5% Glutaraldehyd (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) in HMSS-Puffer auf pH 7,4 eingestellt und für 4 Stunden auf Eis unter ständiger Bewegung fixiert. Anschließend wurde das Glutaraldehyd gegen Cacodylatpuffer (Dimethylarsinsäure Natriumsalz, pH 7,4; Merck, Darmstadt) ausgetauscht, wobei der Puffer zumindest einmal ausgetauscht wurde, um Reste der Fixantien zu entfernen. Die Proben wurden anschließend bis zur Einbettung im Kühlschrank gelagert, wobei aufgrund der Fixation keine Verluste der Ultrastruktur zu befürchten sind. Für die Einbettung wurde das Gewebe in möglichst kleine Stücke zerteilt. Dies geschah in Cacodylatpuffer, um Austrocknung zu verhindern. Die Gewebestücke wurden für die weitere Aufarbeitung in ein Schnappdeckelglas mit Cacodylatpuffer überführt. Die restliche Prozedur und die Einbettung selbst fanden bei Raumtemperatur, und wenn nicht anders angegeben, auf einem Schüttler statt. Das Gewebe wurde mit 1% Osmiumtetroxid (Polyscience Inc., Warrington, USA) in Cacodylatpuffer für 2 Stunden nachfixiert und kontrastiert. Anschließend wurde zweimal für 10 bis 15 Minuten mit Cacodylatpuffer gewaschen. Danach wurde mit 50% Ethanol (Merck, Darmstadt) für 30 min. gewaschen und entwässert. Die Kontrastierung erfolgte mit 3% Uranylazetat (Merck, Darmstadt) in 70% Alkohol über Nacht. Am folgenden Tag wurde das Gewebe jeweils 30 min. in 70%, 80%, 95% und absolutem Alkohol entwässert. Zum Abschluss wurde das Gewebe für zweimal 20 min in Propylenoxid (Merck, Darmstadt) entwässert. Um eine schnittfeste Konsistenz zu erzielen wurde das Gewebe mit dem Kunstharz Araldit infiltriert. Dies erfolgte in mehreren Schritten mit folgenden Araldit-Propylenoxid-Mischungen: 1:1 für eine Stunde, 3:1 für 2 Stunden, schließlich über Nacht in reinem Araldit. Dabei wurde wegen der Scherkräfte kein Schüttler mehr verwendet.

Am dritten Tag der Einbettung wurden die Gewebeproben mit frischem Araldit in Flacheinbettungsformen eingelegt und ausgerichtet. Die Polymerisation fand bei 60°C im Wärmeschrank über 30 bis 48 Stunden statt.

2.2.3 Anfertigung von Ultradünnschnitten zur Elektronenmikroskopie

Die auspolymerisierten Blöckchen welche die Gewebeproben enthielten wurden auf einer Ultratrim Fräse (Reichert, Österreich) zugetrimmt, um eine minimale trapezförmige Schnittfläche zu erreichen. Semidünnschnitte von 0,2 bis 0,5 µm wurden mit Glasmessern, die auf einen Freiwinkel von 6° eingestellt waren, auf einem Ultramikrotom OM U 3 (Reichert, Österreich) angefertigt, auf unbeschichtete Objektträger (Menzel-Gläser) übertragen, auf einer Wärmeplatte (H22 electronic: Gerhard, Bonn) getrocknet, mit Richardsons Reagenz eingefärbt und unter dem Mikroskop auf gefäßreiche Bereiche abgesehen. Die Blöckchen wurden daraufhin mit Hilfe einer Rasierklinge weiter zugetrimmt, so dass die endgültige Schnittfläche bei einer Größe von ca. ¼ mm² nur das interessierende Areal mit hoher Gefäßdichte enthielt. Von den derart präparierten Blöcken wurden mit einem Diamantmesser (Diatome, Zürich) bei gleicher Gradeinstellung Ultradünnschnitte von etwa 50 bis 90 nm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Formvar (Merck, Darmstadt) beschichtete Kupfernetz- oder -Schlitzträger (VECO GmbH, Solingen) aufgezogen und getrocknet.

Nun wurde mit Bleizitrat (Merck, Darmstadt) für 5 min kontrastiert, mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Nach der abschließenden Trocknung können die Grids auch über lange Zeiträume hin gelagert werden ohne dass sich Qualitative Einbußen finden lassen.

Zur Auswertung wurden die Schnitte an einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Dabei wurden die Schnitte vollständig durchsucht und sämtliche zur Darstellung kommenden Gefäße auf Agfa Bovira-Speed Negativ-Film (Agfa,) photographiert. Zur Übersicht und zur Darstellung hyperplastischer Gefäße wurde dabei mit einer 2500fachen Vergrößerung gearbeitet. Kleinere Gefäße und Ausschnitte aus

hyperplastischen Gefäßen wurden mit 4000 bis 10.000facher Vergrößerung photographiert. Die Darstellung feinsten Details sowie einzelner Zell-Zell Verbindungen erfolgte mit 25.000facher Vergrößerung.

2.2.4 Immunfluoreszenz

Das Gewebe wurde in maximal 1 cm³ große Stücke zerlegt und für 2 Stunden in 4% in PFA in HMSS auf Eis fixiert. Anschließend wurde über eine Sucrose-Reihe kryoprotectiert. Dazu wurde das Gewebe in 12% und 15% Sucrose in HMSS für jeweils eine Stunde, anschließend noch 2 Stunden in 18% Sucrose in HMSS überführt, jeweils auf einem Schüttler auf Eis. Danach wurde die Gewebeprobe in Tissue-Teck OTC (Sakura-Fineteck, Niederlande) eingebettet und in Stickstoffdämpfen langsam eingefroren. Daraufhin kann das Gewebe bei -80°C über längere Zeit gelagert werden, ohne dass ein Verlust an Struktur oder Antigenizität entsteht.

Zur Immunfluoreszenz-Markierung wurde das Gewebe auf einem Cryostat (Reichert, Österreich) geschnitten, wobei die Schnittdicke bei 10 bis 15 µm lag. Die fertigen Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und bei 37°C auf der Heizplatte getrocknet. Dabei wurden von jedem Gewebe Serienschnitte angefertigt, die auf mehrere Objektträger aufgebracht wurden, die nicht direkt verwendeten Objektträger wurden bis zur weiteren Verarbeitung für wenige Tage bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden diese Schnitte vor der Markierung erneut auf der Heizplatte bei 37°C getrocknet.

Die auf Objektträger aufgebrachten Schnitte wurden mit 4% PFA in HMSS-Puffer für 10 min in einer Küvette nachfixiert. Dann zweimal mit TBS für 5 bis 10 min gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift 0,1% TX 100 (Serva, Heidelberg) beigefügt wurde, um eine bessere Benetzung der Schnitte in den folgenden Schritten zu erreichen. Anschließend wurde für 20 min mit 5% Magermilch (Merck, Darmstadt) und 0,1% TX 100 in TBS geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Dies fand auf dem Objektträger statt, wobei 1 ml Magermilchpuffer aufpipettiert wurde.

Die Primärantikörper wurden entsprechend der erforderlichen Endkonzentration (siehe unten) mit Magermilch-Puffer versetzt, für 3 bis 4 min bei 3000-4000 U/min zentrifugiert um Antikörperaggregate abzutrennen und der Überstand für die Markierung verwendet. Pro Objektträger wurde mit 75µl Antikörper-Suspension markiert und mit Parafilm überzogen um ein Austrocknen zu verhindern.

Sowohl für Erst- als auch für Zweitantikörper wurde entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C im Kühlschrank über Nacht markiert. Wurde bei Raumtemperatur markiert, so wurde anschließend 2- bis 3-mal für 5 bis 10 Minuten mit TBS gewaschen. Falls im Kühlschrank markiert wurde, musste 4- bis 5-mal für 10 Minuten gewaschen werden. Der erste dieser Waschschriffe wurde dabei auf dem Objektträger durchgeführt um Hintergrund und Artefakte durch Antikörper in der Waschlösung zu reduzieren, die anschließenden Waschschriffe fanden in einer Küvette statt. Im letzten Waschschriff wurde 0,1% TX 100 zugesetzt, um eine bessere Benetzung bei der Zweitantikörper-Markierung zu erreichen.

Auch die Zweitantikörper wurden mit Magermilch-Puffer versetzt. Dabei wurden die CY-3 Konjugate auf 1:200, die CY-2 Konjugate auf 1:100 verdünnt. Die Markierung selbst erfolgte mit den gleichen Maßangaben wie die Markierung mit Erstantikörpern, jedoch unter weitmöglicher Lichtabschottung, um ein Ausbleichen zu verhindern.

Nach der Markierung mit Zweitantikörpern wurde zuerst mit TBS für 10 min gewaschen. Als zweiter Waschschriff wurde eine Zellkernfärbung mit Hoechst 33258 (Hoechst-Chemie, Frankfurt-Hoechst) ebenfalls für 10 min bei 4°C durchgeführt um anschließend erneut mit TBS, versetzt mit 0,1% TX100, zu waschen. Schließlich wurden die Schnitte mit 90% Glycerol in TBS, das als Ausbleichschutz mit einigen Kristallen Phenylendiamin versetzt wurde, eingedeckelt. Die Präparate wurden an einem Laser-Scanning-Mikroskop (Axiovert 135M LSM; Zeiss, Oberkochen) betrachtet und interessante bzw. repräsentative Bereiche eingescannt. Dabei wurde für Übersichten mit einer Vergrößerung vom 1:100 für Ausschnitte von 1:400 bzw. 1:630 gearbeitet. Die

Bilder wurden mittels der Software Adobe Photoshop (Version 5.5; Adobe, Mountain View, USA) zur Publikation weiterverarbeitet, eine Retusche fand dabei nicht statt.

2.2.5 Sekundärkontrolle

Um unspezifische Reaktionen der Gewebe mit den Zweitantikörpern zu erkennen, wurde in jeder Serie eine Negativkontrolle mitgeführt. Hier wurde während des Markierungsschrittes mit reinem Puffer ohne Erstantikörper markiert. Dabei wurde von sämtlichen Schnitten einer Markierungsserie eine Negativkontrolle mitgeführt.

3. Ergebnisse:

3.1 Elektronenmikroskopie

3.1.1 Struktur der Gefäße

In allen untersuchten Tumoren wies das Tumorstroma ausgeprägte Veränderungen auf, wobei nur in einzelnen Proben Myelinscheiden identifiziert werden konnten. In allen Proben war das Stroma deutlich ödematös verändert. Hyperplastische Gefäße fanden sich in den meisten untersuchten Tumorgeweben, wobei sowohl die Größe als auch die Zahl der Gefäße deutliche Unterschiede aufwiesen. Eine Ausnahme bilden die peripheren Areale aus den Tumoren 4 und 8, in welchen sich keine hyperplastischen Gefäße nachweisen ließen. Dabei fand sich in Tumor 4 eine deutlich erhöhte Anzahl kleinerer Gefäße, so dass auch in diesem die Gefäßdichte über der des gesunden Gehirnes lag (Tabelle 1).

Darüber hinaus wiesen die Tumoren 4, 9 und 12 jeweils mehrere Gefäßkomplexe auf (Tabelle 1, Abbildung 8a). Diese bestanden aus mehreren Gefäßen, welche in eine gemeinsame Extrazellulärmatrix eingebettet und durch diese von dem umgebenden Tumorstroma getrennt waren. Die einzelnen Gefäße dieser Komplexe waren meist nicht wesentlich vergrößert; häufig besaßen sie eine eigene Basalmembran und einzelne direkt zugeordnete Perizyten. Weitere Perizyten, die vollständig von einer eigenen Basallamina umgeben waren, waren locker in die umgebende Matrix eingebettet. Den Abschluss zum umgebenden Stroma bildete eine weitere Basallamina. Das Gegenstück zu den hyperplastischen Gefäßen bilden kleine Gefäße mit schlitzförmigem Lumen ohne nachweisbare Erythrozyten im Gefäßlumen. Diese waren in den Tumoren 3, 4, 5, 6, 7, 9, und 12 nachzuweisen. Vor allem die Proben aus der Tumorperipherie der Tumoren 3, 4, 5 und 12 wiesen eine erhöhte Zahl dieser Gefäße auf, welche in der Literatur meist als Gefäßknospen bezeichnet werden. Dabei waren of mehrere dieser Gefäßknospen direkt aneinander anliegend - vereinzelt auch in den oben erwähnten Gefäßkomplexen.

Tabelle 1: Elektronenmikroskopie

Tumor	Vesikel	Weite TJ	Fenestr.	Protub.	Hpl. Gef.	Schl. L.
TU 2 Z	-	-	+	++	++	-
TU 3 P	++	++ ¹	-	+++	++	++
TU 3 Z	-	+	-	+	+	+
TU 4 P	++	-	-	+	- ³	++
TU 4 Z	+	-	-	++	+++ ²	-
TU 5 P	-	++ ¹	-	++	++	++
TU 5 Z	+	-	-	++	+++	+
TU 6 P	+	+	-	++	+++	-
TU 6 Z	+	-	-	+	+++	+
TU 7 P	+	+	-	+	+++	+
TU 7 Z	++	-	-	+++	++	-
TU 8 P	+	-	-	++	-	-
TU 9 P	++	-	-	+++	+++	-
TU 9 Z	+	-	-	++	+++ ²	+
TU 12 P	+	+	-	+++	+	++
TU 12 Z	+	+	-	++	- ²	+

Pathologische Eigenschaften in der elektronenmikroskopischen Morphologie der Gefäße.

Weite TJ = distanzierte Endothelmembranen, die eine minimale Lücke in der Endothelschicht verursachen. Fenestr. = Fenestrierungen in der Endothelschicht. Protub. = fadenförmige Protuberanzen der luminalen Endothelzell-Membran. Hpl. Gef. = hyperplastische Gefäße. Schl. L. = schlitzförmiges Lumen der Gefäße ohne nachweisbare Perfusion.

+++ = sehr häufig zu finden, ++ = häufig zu finden, + = vereinzelt zu finden, - = nicht detektiert. 1 = In den Proben fanden sich Gefäße welche vollständig zum umgebenden Tumorgewebe geöffnet waren und einen Durchtritt von Zellen aus dem Lumen zeigten. 2 = Es fanden sich größere Komplexe von Gefäßen welche von einer gemeinsamen Matrix und Basalmembran umschlossen waren. 3 = erhöhte Gefäßdichte kleiner Gefäße ohne nachweis hyperplastischer Gefäße. Die Proben aus den Tumoren 8 Z, 10 und 11 waren nahezu vollständig nekrotisch. Gefäße ließen sich in diesen Proben nicht nachweisen.

Ein Charakteristikum der Tumorgefäße, welches sich in allen Proben mehr oder minder ausgeprägt nachweisen ließ, waren villöse Protuberanzen der Endothelzellen in das Lumen des Gefäßes (Abbildung 3); fadenförmige Ausstülpungen der Membran mit nur minimalen Plasmaanteilen, welche die Oberfläche der Endothelzelle um ein vielfaches vergrößern. Dabei fanden sich deutlich mehr dieser Protuberanzen in kleineren Gefäßen mit ansonsten regulärer Morphologie, während die hyperplastischen Gefäße mit dünnem Endothelsaum nur wenige Protuberanzen zeigten (Abbildung 4).

Die Perizyten der meisten Gefäße unterschieden sich nicht von denjenigen aus den Proben gesunden Gehirngewebes. Die Assoziation der Perizyten an das Gefäß war jedoch lockerer- teils aufgrund der ödematösen Schwellung des Gewebes, teils aufgrund der deutlich vermehrten Matrix der Basalmembran, welche die Perizyten von den Endothelzellen distanzierte (Abbildung 5 und 8a). Die Basalmembran sowohl der kleineren, als auch der hyperplastischen und glomeruloiden Gefäße stellte sich in den meisten Fällen elektronenmikroskopisch unauffällig dar. Es fanden sich aber auch Areale in denen die Basalmembran aufgelockert erschien, sowie Verdopplungen der Membran (Abbildung 6). In Gefäßen mit deutlich vermehrter Matrix war die Basalmembran oft nicht von den umgebenden Kollagenen Fasern zu trennen (Abbildung 8a).

3.1.2 Elektronenmikroskopische Zeichen der Schrankenstörung.

Fenestrae gelten als Charakteristikum der Gefäße ohne Blut-Hirn-Schranke und sind im ZNS ausschließlich im Plexus choroideus und in den zirkumventrikulären Organen sowie im Hypophysenstiel anzutreffen. Mit Ausnahme eines einzelnen Gefäßprofiles in Tumor Nr. 2 fanden sich keine Fenestrierungen in den untersuchten Proben (Tabelle 1).

Dagegen zeigten mehrere Gefäße in den Tumoren 3, 5, 6, 7 und 12 eine Diskontinuität des Endothels sowie z. T. auch der Basallamina mit direkter Verbindung des Endovaskularraumes zum Interstitium (Tabelle 1, Abbildung 7). Zum Teil waren Erythrozyten in der Umgebung der Gefäße als Zeichen einer

intrazerebralen Mikroblutung nachweisbar (Abbildung 3). Dabei waren die Endothelzellen der offenen Gefäße nicht beschädigt, zeigten eine intakte Zellmembran und ein unauffälliges Zytoplasma. Die Lücken waren in einigen Fällen direkt neben intakt imponierenden TJ lokalisiert; pathologisch imponierende TJ als Ursache der Lückenbildungen waren in den entsprechenden Gefäßen nicht zu finden. Auch fanden sich in der Umgebung der offenen Gefäße keine Traumafolgen, welche die intrazerebrale Blutung erklären könnten. Der Nachweis offener Gefäße war nicht mit der Lokalisation innerhalb des Tumors assoziiert – sie fanden sich sowohl in Proben aus dem Tumorzentrum als auch in Proben, welche vom Rand der Resektion stammten. Die Mehrzahl der Gefäße der untersuchten Tumoren zeigten zahlreiche Vesikel, sowohl innerhalb der Zelle als auch in direktem Kontakt zur luminalen und abluminalen Membran (Abbildung 6). Eine Korrelation der Vesikeldichte zur Lokalisation innerhalb des Tumors ließ sich nicht feststellen.

3.2 Immunfluoreszenz

3.2.1 Kollagen I

Kollagen I war in der Tumormatrix sämtlichen Tumoren nachzuweisen, wobei sich in vielen Fällen die Markierung der perivaskulären ECM nicht vom umgebenden Tumorstroma unterschied, in einzelnen Fällen sogar geringer war (Tabelle 2).

Dabei waren die glomeruloiden Gefäße in den Tumoren 3- 13 deutlich stärker für Kollagen I markiert als das sie umgebende Stroma, während sich die kleinen Gefäße nicht von dem umgebenden Tumorstroma abhoben. Ebenso waren die Aggregate aus kleineren Gefäßen deutlich positiv (Abbildung 8b). In den Tumoren 5, 6, 10 und 13 war auch die perivaskuläre ECM der kleineren Gefäße deutlich markiert. Die Markierung war sowohl bei den glomeruloiden als auch bei den kleineren Gefäßen in den Proben aus dem Tumorzentrum stärker als in der Peripherie. Den Extremfall bildete Tumor 9, bei welchem nur die Gefäße aus dem Tumorzentrum für Kollagen markiert waren, während in den Proben aus der Tumorperipherie die Gefäße sich nicht vom Stroma unterschieden.

Die Markierung der Gefäße aus den Tumoren 8 und 11 unterschied sich deutlich von den übrigen Tumoren. In den Proben aus den peripheren Anteilen des Tumors fand sich eine deutlich stärkere Markierung für Kollagen 1 als in denen aus zentralen Anteilen des Tumors. Eine analoge Markierung fand sich auch für Kollagen III sowie für Fibronectin und Laminin. Darüber hinaus war auch die Markierung für TN in den peripheren Anteilen stärker, während Agrin in den zentralen Anteilen des Tumors eine stärkere Markierung aufwies.

Tabelle 2: Kollagene, Laminin und Fibronectin

Tumor	Kollagen I	Kollagen III	Kollagen IV	Laminin	Fibronectin
TU 1 Z	-	-	+++	++	+++
TU 1 P	-	+++	++	++	+++
TU 2 P	-	-	++	++	+++
TU 2 Z	-	-	+++	-	+++
TU 3 P	+ ¹	-	+++	+	+++
TU 3 Z	+	-	+++	++ ²	+++
TU 4 P	+ ¹	-	+++	+	+
TU 4 Z	+	+ ¹	+++	+	+
TU 5 P	+ ¹	+ ¹	+++	+	+++ ²
TU 5 Z	+	-	+++	++ ²	+
TU 6 P	+	+ ¹	++	+	+++ ³
TU 6 Z	+	-	+	+	++
TU 7 P	+ ¹	-	+++	++	+
TU 7 Z	+ ¹	++	+++	+	+++ ²
TU 8 P	+ ¹	++ ¹	++	+++	+++
TU 8 Z	+	-	++	-	+++

Tabelle 2 (Fortsetzung): Kollagene, Laminin und Fibronectin

Tumor	Kollagen I	Kollagen III	Kollagen IV	Laminin	Fibronectin
TU 9 P	-	++	+	-	++
TU 9 Z	+	+ ¹	++	+	++
TU 10 Z	++	+ ¹	++	+	+
TU 11 P	++	+	+++	++	+
TU 11 Z	+ ¹	-	++	+	+
TU 12 P	+ ¹	-	+++	+	+++
TU 12 Z	++	-	++	+	++
TU 13 P	+ ²	++	++	++	++
TU 13 Z	+	-	+++	+	+++
TU 14 P	++		+++	+	+++
TU 14 Z	-	-	+++	+	+++
TU 15 Z	+	-	+++	+	+++
Kontrolle 1	-	-	+++	++	+++
Kontrolle 2	-	-	+++	++	+++

Markierung der perivaskulären ECM für die Matrixproteine Kollagen I, III und IV, sowie für Laminin und Fibronectin. Die Stärke der Markierung wird dabei als Differenz zur umgebenden Tumormatrix angegeben: +++ = sehr starke Markierung, ++ = mäßige Markierung, += geringe Markierung, bzw. lediglich Markierung einzelner Gefäße. ¹ = lediglich hyperplastische Gefäße zeigen eine stärkere Markierung der perivaskulären ECM als die umgebende Matrix. ² = große Gefäße zeigen eine stärkere Markierung als kleine. ³ = Die ECM ist in mehreren Lagen organisiert.

3.2.2 Kollagen III

Die Markierung für Kollagen III im Tumorstroma war deutlich geringer als diejenige für Kollagen I, in den meisten Tumoren unterschied sie sich nicht, oder nur geringfügig von der unspezifischen Hintergrundmarkierung (Tabelle 2).

Eine spezifische Markierung der Gefäße für Kollagen III war insbesondere um hyperplastische Gefäße auffällig, mit Betonung der zentralen Anteile der Tumoren 1, 4, 7, 10 und 13. Dabei fand sich eine deutliche Korrelation der Markierung mit derjenigen für Kollagen I. In den Tumoren 8 und 11 waren die Gefäße der Proben aus der Tumor-Peripherie deutlich stärker für Kollagen III markiert als diejenigen des Tumorzentrums. Dabei war diese unterschiedliche Markierung, wie oben erwähnt, für alle Kollagene, sowie für weitere Matrixproteine nachzuweisen.

Auch die Gefäße der Tumoren 5, 6 und 9 wiesen eine deutliche Markierung der Tumorperipherie auf, während sich zentrale Gefäße nicht vom Hintergrund abhoben. Anders als in den Tumoren 8 und 11 fand sich hier keine atypische Markierung für Tenascin, Agrin und Glut-1, und auch keine Korrelation zur Expression von Kollagen I, III oder Laminin.

3.2.3 Kollagen IV

Kollagen IV ließ sich in der Matrix sämtlicher Gefäße der Tumoren nachweisen. Hierin unterschieden sich die Tumoren nicht von den Kontrollgeweben. Auch fand sich keine Korrelation der Expression zur Größe der Gefäße (Tabelle 2). Unterschiede in der Markierung zwischen Tumorzentrum und -peripherie betrafen dabei nicht die Stärke der Markierung der einzelnen Gefäße, sondern lediglich die Gefäßdichte. Eine spezifische Intensität der Immunmarkierung in Abhängigkeit vom umgebenden Tumorstroma ließ sich nicht nachweisen. Doppelmarkierungen mit Fibronectin zeigten, dass die Extrazellulärmatrix aller Gefäße, welche für Fibronectin positiv waren, auch eine deutliche Markierung für Kollagen IV aufwies. Eine Korrelation der Markierung zur Lokalisation der Gefäße innerhalb des Tumors oder zu sonstigen Matrixproteinen ließ sich nicht nachweisen.

3.2.4 Fibronectin

Fibronectin bildet einen essentiellen Bestandteil der vaskulären Basalmembranen. Dem entsprechend wiesen alle Gefäße, sowohl in den

Proben mit Tumorgewebe, als auch in den Kontrollgeweben eine deutliche Markierung auf (Tabelle 2). In den Kontrollen war diese Markierung auf die perivaskuläre Matrix beschränkt, während das umgebende Stroma keine vom Hintergrund unterscheidbare Markierung aufwies. Dagegen war das Stroma der untersuchten Gliome deutlich positiv markiert und wies einen beträchtlichen Anteil an Fibronektin auf, der jedoch zwischen den Tumoren variierte. Die Gefäßgröße hatte in der Regel keinen Einfluss auf die Markierung der Extrazellulärmatrix für Fibronektin (Abbildung 10b). Eine Ausnahme bildeten die Tumoren 5 und 7, die in einzelnen Proben eine verstärkte Markierung der hyperplastischen Gefäße aufwiesen. Eine morphologische Besonderheit zeigte sich in Tumor 6. Hier war die perivaskuläre Fibonektin-Markierung in mehreren Lagen organisiert, welche durch eine Lage an Kollagen IV voneinander separiert waren.

3.2.5 Laminin

Laminin war in den Basalmembranen der Gefäße aller untersuchten Tumoren nachweisbar (Tabelle 2). Einzig die Proben aus dem Zentrum der Tumoren Nummer 2 und 8 sowie aus der Peripherie des Tumor 9 wiesen keine herausragende Laminin-Markierung der Gefäße auf und unterschieden sich nicht wesentlich von dem sie umgebenden Tumorstroma, bzw. der Hintergrundmarkierung. In Tumor 3 und 5 schien die Markierung der hyperplastischen Gefäße, über der kleinerer zu liegen, wobei in diesen Proben die Markierung für Kollagen I und Kollagen III nicht von der Größe der Gefäße abhing. Eine Korrelation der Laminin-Markierung zu anderen Matrixproteinen, den MMP oder zur Lokalisation innerhalb des Tumors fand sich nicht.

3.2.6 Tenascin

Tenascin wies von allen in dieser Studie untersuchten Matrix-Proteinen die deutlichsten Veränderungen auf, sowohl gegenüber dem Kontrollgewebe als auch innerhalb der Tumoren auf.

Sowohl in den Proben aus dem gesunden Gehirn, als auch in den Gefäßen aus der Umgebung des Angioms fand sich keinerlei Markierung für TN, welche über den Hintergrund hinausging. Desweiteren fand sich keine TN-Markierung des gesunden ZNS-Stromas.

Dagegen wies das Stroma der meisten untersuchten Tumoren eine deutliche Markierung für TN auf, welche sich deutlich von der unspezifischen Hintergrundmarkierung abhob. Auch die Gefäße der Tumoren wiesen eine gegenüber dem Tumorstroma deutlich erhöhten Anteil an Tenascin in der perivaskulären ECM auf.

Die auffälligste Veränderung fand sich innerhalb der Zonen fokaler Nekrose. Während die Fibronektin-Markierung der Gefäße sich nicht von nicht-nekrotischem Tumorgewebe unterschied, war der Tenascin-Gehalt der Basalmembran in den Nekrosen massiv erhöht (Tabelle 3, Tabelle 6). Diese Veränderung fand sich in allen Zonen fokaler Nekrose, die in den hier untersuchten Tumorproben nachweisbar waren. Auch war kein Zusammenhang mit der Gefäßgröße festzustellen; sowohl sehr kleine, normal erscheinende als auch hyperplastische Gefäße zeigten diese vermehrte Tenascin-Markierung innerhalb der Nekrosezone (Abbildung 10).

Es fand sich eine deutliche Korrelation der Expression von TN zu derjenigen von Agrin und MMP-9. Diese wird in den Abschnitten über Agrin bzw. MMP-9 abgehandelt.

Tabelle 3: Tenascin

Tumor	Fibronektin	Tenascin
TU 1 P	+++	+++ ¹
TU 1 Z	+++	+++ / -
TU 2 P	+++	+ / -
TU 2 Z	+++	+++ / - ¹
TU 3 P	+++	++
TU 3 Z	+++	-
TU 4 P	+	+++/ ¹
TU 4 Z	+	+++/ ¹
TU 5 P	+++ ²	- ³
TU 5 Z	+	+++
TU 6 P	+++	++
TU 6 Z	++	+ / -
TU 7 P	+	+++/ ¹
TU 7 Z	+++ ²	+++/ ¹
TU 8 P	+++	+ / -
TU 8 Z	+++	+ / -
TU 9 P	++	+
TU 9 Z	++	++/ -
TU 10 Z	+	-
TU 11 P	+	+++
TU 11 Z	+	++/ -
TU 12 P	+++	-
TU 12 Z	++	+
TU 13 P	++	++
TU 13 Z	+++	+/-
TU 14 P	+++	++
TU 14 Z	+++	++/-
Kontrolle 1	+++	-
Kontrolle 2	+++	-

Markierung gegen Tenascin und Fibronektin :

+++ = sehr starke Markierung,
 ++ = mäßige Markierung,
 + = geringe Markierung,
 - = keine Markierung der Gefäße,
 welche über die Tumormatrix hinausgeht.

+++/- = Die Gefäße in einigen Arealen sind sehr deutlich, in anderen Arealen nicht für TN positiv.

¹ = Stärkere Markierung der Gefäße in nekrotischen Arealen als im nicht-nekrotischen Tumorgewebe.

² = große Gefäße zeigen eine stärkere Markierung als kleine.

³ = fehlende Markierung für TN, wobei die Struktur des Gewebes, sowie der Gefäße derjenigen aus den Kontrollen ähnelte.

3.2.7 Agrin

In den Kontrollgeweben, sowohl aus einem Verkehrsunfall als auch aus einem Hämangiom, wiesen die Gefäße eine Basalmembran auf, welche deutlich für Agrin positiv war.

Dagegen war in den untersuchten Tumoren die Markierung der Basalmembranen für Agrin deutlich geringer, in einzelnen Schnitten war keine Markierung der Gefäße festzustellen. Hierbei fand sich keine eindeutige Korrelation zur Lokalisation innerhalb des Tumors, analog zur Markierung für andere untersuchte Matrixproteine (Tabelle 4). Die Markierung verhielt sich jedoch umgekehrt zu derjenigen für TN: In Arealen, in welchen die Gefäße TN-negativ waren, fand sich eine deutliche Markierung mit Agrin: z.B. in Tumor 1, 3Z, 4P, 7Z, 9Z oder 12 P. Dagegen fand sich keine Markierung für Agrin in den Tumoren 6Z, 8P, 9P, 11Z 13P und 14. In diesen Proben war die Basalmembran deutlich TN positiv. In einzelnen Arealen, z.B. innerhalb von TU 2 Z, 6P, 7P, 8Z, 11P oder 13Z, fand sich diese ausschließende Varianz der Markierung innerhalb des einzelnen Schnittes, wobei Gefäße mit stärkerer TN-Markierung der Matrix negativ für Agrin waren (Abbildung 14). Lediglich in den Gefäßen aus Tumor 5P war weder eine Markierung für Agrin noch für TN nachzuweisen. In den Tumoren 2P, 4Z, 5Z, 12Z, und 15Z fand sich eine größere Zahl an Gefäßen, welche sowohl für Agrin als auch für TN positiv waren. In diesen waren die einzelnen Proteine deutlich voneinander getrennt, wobei sich Agrin ausnahmslos auf der luminalen Seite der Basalmembran fand, während die abluminale, dem Tumorstroma zugewandte Seite deutlich immunopositiv für TN markiert wurde (Abbildung 13). Damit wiesen auch die Gefäße, welche sowohl für TN als auch für Agrin positiv markiert wurden, eine deutliche räumliche Separation der Proteine auf.

Tabelle 4: Tenascin und Agrin

Tumor	Tenascin	Agrin
1 Z	+++/-	++ ¹
2 P	++/-	++
2 Z	++/-	++/- ²
3 Z	-	++
4 P	+++/-	+++ ¹
4 Z	+++/-	++
5 P	-	-
5 Z	+++	++
6 P	++/- ²	++/- ²
6 Z	+++/-	-
7 P	+++/ ²	+++/- ²
7 Z	++/-	++ ¹
8 P	++/-	-
8 Z	++/- ²	++/- ²
9 P	++	-
9 Z	++/-	++ ¹
11 P	+++	++ ²
11 Z	++/-	-
12 P	-	++ ¹
12 Z	+	+
13 P	+++	-
13 Z	++/-	++ ²
14 P	+++	-
14 Z	++/-	-
15 Z	++	++
Kontrolle 1	-	+++
Kontrolle 2	-	+++

Markierung gegen TN und Agrin:

Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Markierung der einzelnen Gefäße, geringe Abweichungen wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurde die Markierung des Tumorstromas nicht in die Auswertung einbezogen.

+++ = starke Markierung,
 ++ = mäßige Markierung,
 + = schwache Markierung,
 - = keine Markierung.
 ++/- = mäßige Markierung einzelner Gefäße, andere Gefäße zeigen keine Markierung- in einigen Tumoren sind diese unterschiedlichen Markierungen in unterschiedlichen Schnitten oder in unterschiedlichen Regionen eines Schnittes lokalisiert.

¹ = Agrin-Markierung in einem Areal ohne TN-Markierung.

² = Gegenläufige Markierung von TN und Agrin

Diskrepanzen in der Markierung für TN zu Tabelle 3 und 6 beruhen darauf, dass die Markierungen für TN in jeder Tabelle an unterschiedlichen Schnittstufen (derselben Gewebeprobe) durchgeführt wurden. Daher unterscheiden sich die Gewebeareale und damit die Markierung geringfügig voneinander.

3.2.8 Glut-1

In den Proben mit gesundem Kontrollgewebe aus einem Verkehrsunfall fand sich eine deutliche Markierung der Gefäße für Glut-1, als Marker der intakten Blut-Hirn-Schranke. Eine geringere Markierung fand sich in den Proben aus einem Hämangiom (Tabelle 5).

Mit Ausnahme der zentralen Anteile aus Tumor 8 fand sich eine positive Markierung der Endothelzellen in allen untersuchten Tumoren, wobei die Markierung sowohl zwischen den einzelnen Proben, als auch innerhalb eines Schnittes deutlich variieren konnte. Dabei fand sich Glut-1 in den Gefäßen luminal der Markierung für SMA als Markerprotein der Glattmuskelzellen und Perizyten. Daher ist von einer Markierung der Endothelzellen mit Glut-1 auszugehen (Abbildung 11a). In einzelnen Tumoren (TU 5, 7, 11, 13) fand sich eine stärkere Markierung der peripheren Areale, allerdings zeigten die Tumoren 9 und 12 eine stärkere Markierung des Zentrums, so dass sich keine strenge Korrelation nachweisen ließ.

In den meisten untersuchten Tumoren fand sich eine gegenläufige Tendenz in der Markierung für Glut-1 und MMP-9: Areale mit starker Markierung für Glut-1 wiesen nur eine geringe Markierung der Gefäße für MMP-9 auf und umgekehrt (Tabelle 5, Abbildung 11). In einzelnen Proben (TU 1 Z, 2 Z, 7 Z, 9 Z, 12P, 13 P und 14 Z) fand sich diese Gegenläufigkeit innerhalb eines Schnittes: Gefäße mit einer positiven Markierung für MMP-9 wiesen keine Glut-1 Markierung auf und umgekehrt. 3.2.10 MMP-2 und MMP-9

Keines der Kontrollgewebe zeigte eine Markierung für MMP-2. Die Markierung der Tumorproben beschränkte sich auf wenige Areale, mit einer nur geringen Markierung der einzelnen Zellen. MMP-2 positive Gefäße ließen sich in keinem Fall nachweisen (Tabelle 6).

Während die Kontrolle 2 -gesundes Gehirn- keinerlei Markierung für MMP-9 zeigte, fand sich in der ersten Kontrolle (aus einem Hämangiom) eine geringfügige Markierung der Gefäße.

Tabelle 5: Glut-1 und MMP

Tumor	MMP-9	Glut-1	SMA
TU 1 Z	++	+++ ¹	++
TU 2 Z	++/-	+++ ¹	+++
TU 3 Z	-	+++	++
TU 4 Z	++/-	++	++
TU 5 P	-	+++	+++
TU 5 Z	++/-	++	-
TU 6 Z	++	++	n.u.
TU 7 P	++	+++	-
TU 7 Z	++	++/- ¹	+
TU 8 Z	+	-	n.u.
TU 9 P	-	+	++
TU 9 Z	+/-	+++ ¹	+++
TU 11 P	-	+++	+
TU 11 Z	++	++	++
TU 12 P	++/-	++/+ ¹	++
TU 12 Z	++	++	n.u.
TU 13 P	+	+++ ¹	+
TU 13 Z	-	++/-	++
TU 14 Z	++/-	++ ¹	-
Kontrolle 1	+	++	+
Kontrolle 2	-	++++	+

**Markierung gegen
MMP-9, Glut-1 und
SMA:**

Lediglich die Markierung der Endothelien bzw. Perizyten wurde berücksichtigt. Eine Markierung von Leukozyten gegen MMP-9 wurde als negativ gewertet.

+++=starke Markierung,
++=mäßige Markierung,
+=schwache Markierung,
-=fehlende

Gefäßmarkierung
+++/- = unterschiedliche Markierung in verschiedenen Arealen.

¹=gegenläufige Markierung für MMP-9 und Glut-1

Tabelle 6: TN und MMP

Tumor	Tenascin	TN in Nekrose	MMP-2	MMP-9
1 P	+++/-	+	-	+/-
1 Z	++/-		- (+)	+ ¹
2 P	++/-		-	++/-
2 Z	+++/-	+	-	+/- ¹
3 P	++		-	-
3 Z	-		-	-
4 P	+++/-	+	-	+ ³
4 Z	+++/-	+	-	++ /- ^{2 3}
5 P	-		- /(+)	+/-
5 Z	+++		-	++/- ²
6 P	++/-		n.u.	
6 Z	+++/- ²		-	++ ²
7 P	+++/ ²		-	++/- ²
7 Z	++/-	+	-	++ ²
8 P	++/-		n.u.	++
8 Z	++/-		n.u.	+
9 P	++		-	-
9 Z	++/- ²		+	+/- ²
11 P	+++		-	-
11 Z	++/-		-	++ ³
12 P	-		-	++/-
12 Z	+		-	++
13 P	+++		+	+
13 Z	++/-		-	- ³
14 P	+++		n.u.	-
14 Z	++/-		-	++/-
Kontrolle 1	-		-	+
Kontrolle 2	-		-	-

Tabelle 6 (vorige Seite): Markierung der Gefäße für TN, MMP-2 und -9

Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Markierung der einzelnen Gefäße, geringe Abweichungen wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurde die Markierung des Tumorstromas nicht in die Auswertung einbezogen.

+++ = starke Markierung, ++ = mäßige Markierung, + = schwache Markierung, - = keine Markierung. +/- = mäßige Markierung einzelner Gefäße, andere Gefäße zeigen keine Markierung:

+++/+ Unterschiedliche Markierung der Gefäße in verschiedenen Regionen des Tumors. Im Falle des TN bezieht sich dies vor allem auf die deutlich verstärkte Expression in Zonen fokaler Nekrose (siehe dort).

¹ = Kolokalisation von MMP-9 und TN in einzelnen Gefäßen. ² = ausschließende Markierung von TN und MMP-9. ³ = Markierung von Leukozyten, keine oder nur vereinzelt Gefäße markiert

Die untersuchten Tumoren wiesen dagegen ein deutliches Spektrum der Markierung für MMP-9 auf: von einer fehlenden Markierung in den Tumoren 3, 9P, 11P, 13 Z und 14P über einzelne positive Zellen welche vermutlich Leukozyten und Tumorzellen entsprechen in den Proben aus Tumor 4Z und 11Z, bis hin zu einer deutlichen Markierung der Gefäße in den Tumoren 6, 7, 8P und 12 (Tabelle 6).

Wie oben erläutert, verhielten sich die Markierungen für MMP-9 und Glut-1 gegensätzlich zueinander: Glut-1 positive Gefäße wiesen keine oder nur eine geringe Markierung für MMP-9 auf und umgekehrt.

MMP-9 fand sich in den meisten Tumoren – z.B. TU 1, 2Z, 4P, 3Z, 8, 12Z 10/3- korrelierend zur Expression von Tenascin. Dabei war die MMP-9-Markierung meist auf die Endothelien beschränkt, welche von einer Matrix aus TN umgeben waren (Abbildung 12). In einzelnen Gefäßen war jedoch auch die Region am äußeren Rand der Basalmembran mit MMP-9 markiert. Allerdings ließen sich in vielen Fällen die Markierung eindeutig einwandernden Leukozyten zuordnen (Abbildung 9). Eine eindeutige Korrelation der MMP-9 Expression zur Expression von TN ließ sich jedoch nicht herstellen, da in einzelnen Arealen MMP-9 um TN negative Gefäße markiert war.

4. Diskussion

4.1 Ultrastruktur

4.1.1 Gefäßdichte

Eine erhöhte Gefäßdichte mit pathologischen Tumorgefäßen gilt als Charakteristikum der Glioblastome und wird in der WHO-Klassifikation als Unterscheidungsmerkmal zu niedriger malignen Tumoren des ZNS verwendet (Kleihues et al. 2002). Quantitative Messungen im Tiermodell zeigen dagegen eine unveränderte Gefäßzahl, wobei die einzelnen Gefäße einen größeren Durchmesser aufweisen (Shivers et al. 1984; Stewart et al. 1985). Arosarena et al. (1994) fanden sogar eine reduzierte Gefäßdichte sowohl in subkutan als auch in intrazerebral implantierten 9L und F98 Tumorzelllinien.

Auch in den Tumoren dieser Studie war die Gefäßdichte innerhalb sämtlicher Proben erhöht, sie wurde allerdings nicht quantifiziert. Dabei fanden sich jedoch deutliche Unterschiede innerhalb des einzelnen Tumors, so dass Areale mit deutlich erhöhter Gefäßzahl oft direkt an Areale mit einer relativ geringen Zahl an hyperplastischen Gefäßen angrenzten. Ein gutes Beispiel stellt Tumor 4 dar, welcher in den Proben aus der Tumorperipherie eine deutlich erhöhte Anzahl an strukturell unauffälligen Gefäßen aufwies, während die Proben aus dem Zentrum eine deutlich geringere Zahl an Gefäßen zeigte, welche jedoch deutlich hyperplastisch sind (Abbildung 4). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Wesseling et al. (1998). Diese fanden in humanem Glioblastomen überwiegend eine reduzierte Zahl an Gefäßen mit abnorm vergrößertem Durchmesser, welche im Allgemeinen als glomeruloid beschrieben werden. In Fällen, bei denen keine glomeruloiden Gefäße nachweisbar waren, lag die Zahl der nachweisbaren Kapillaren über der des gesunden Kortex. Effektiv liegt damit die Gefäßfläche über derjenigen des gesunden Kortex, wobei dies vor allem der erhöhten Zahl an glomeruloiden Gefäßen zugeschrieben wurde (Wesseling et al. 1998). Am ehesten lassen sich diese Unterschiede mit der lokalen Verteilung der Wachstumsfaktoren erklären: in der ausreichend versorgten Tumorperipherie liegt lediglich eine geringe Menge an Wachstumsfaktoren vor,

so dass eine geregelte Angiogenese möglich ist, während in den deutlich hypoxischen Arealen des Tumorzentrums ein Überschuss an hypoxie-induzierten Wachstumsfaktoren, ohne geordnete Regulationsmechanismen eine unkontrollierte Angiogenese hervorruft, welche zu den bekannten hyperplastischen Gefäßen führt. Dies trifft insbesondere auf Tumorareale zu welche direkt an fokale Nekrosen angrenzen, und eine exzessive Expression von VEGF aufweisen (Plate und Risau 1995). In den licht- und immunfluoreszenz-mikroskopischen Schnitten der vorliegenden Studie fanden sich in den Zonen fokaler Nekrose deutlich hyperplastische Gefäße (Abb. 4, 10). Die vermehrte Expression von Tenascin um diese Gefäße lässt auf eine Überexpression von Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF als Ursache schließen.

4.1.2 Gefäßmorphologie

Erste Studien zur Elektronenmikroskopie der hirneigenen Tumoren wurden von Luse (1960) durchgeführt, beschränkten sich aber hauptsächlich auf die Morphologie der Tumorzellen und streiften die Gefäße nur kurz. Sie zeigten jedoch, dass sich die Gefäße aus diversen Hirntumoren elektronenmikroskopisch von denen in gesundem Gehirngewebe unterscheiden, wobei keine exakte Beschreibung dieser Unterschiede erfolgte (Luse 1960). Spätere Untersuchungen befassten sich ausgiebiger mit der Gefäßkonfiguration sowohl im Tiermodell als auch an Autopsiegewebe (Vick und Bigner 1972; Cox et al. 1976; Waggener und Beggs 1976; Weller et al. 1977; Shivers et al. 1984; Roy und Sarkar 1989). Eine funktionsfähige Blut-Hirn-Schranke ließ sich in keiner dieser Studien nachweisen: Tracer-Substanzen wie Lanthanum und Meerrettich-Peroxidase penetrierten leicht die Gefäßwände (Long 1970; Shivers et al. 1984; Nir et al. 1989).

In den meisten Tumoren, welche im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, fand sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Gefäßen innerhalb eines Gewebelockes von unter 1mm³. So lagen normal wirkende Gefäße direkt neben glomeruloiden Kapillaren mit vergrößertem Lumen und dünner Endothelschicht (Abb. 2, 4). Dies deckt sich mit bisherigen Studien, sowohl am Tiermodell als auch an humanem Gewebe aus Autopsien, in welchen keine

einheitliche Endothelkonfiguration innerhalb der Gliome festgestellt werden konnte (Weller et al. 1977; Shivers et al. 1984; Roy et al. 1989).

Die Gefäßknospen mit schlitzförmigem Lumen und hypertrophen Endothelschichten waren auch im Tumormodell an Ratten beobachtet worden und entsprechen vermutlich unreifen, wachsenden Gefäßen (Cox et al. 1976; Weller et al. 1977). Für diese These spricht auch, dass diese Gefäße in einer Untersuchung von Nishio et al. (1983) keine Anreicherung mit Kontrastmittel zeigten. Zusätzlich fanden sich, wie in einer anderen Studie (Roy und Sarkar 1989) einzelne Gefäße mit mehrlagiger Endothelschicht, welche möglicherweise ebenfalls knospenden Gefäßen entsprechen. Das Auftreten dieser Gefäße in kleinen Gruppen entspricht vermutlich einer Verzweigung des entstehenden Gefäßbaumes. Die Assoziation dieser Gefäßknospen mit der vermehrten Expression von Extrazellulärmatrix um die Gefäßkomplexe lässt sich am ehesten durch die Überexpression von Wachstumsfaktoren erklären.

Zahlreiche Gefäße sowohl aus dem Tumorzentrum als auch aus der Peripherie wiesen eine reguläre Endothelschicht auf. Andererseits fanden sich, wie in vorhergehenden Studien (Shivers et al. 1984; Roy und Sarkar 1989), auch deutlich ausgedünnte Endothelsäume (Abbildung 7) welche nur noch aus nahe beieinander liegenden Membranen bestanden und überwiegend um deutlich hyperplastische Gefäße anzutreffen waren (Vick und Bigner 1972; Waggener und Beggs 1976). Die Zahl der Perizyten und Glattmuskelzellen um diese Gefäße war eher gering, was gegen eine Differenzierung in Arteriolen oder Venolen spricht (Abbildung 4).

Zwischen der Lokalisation der Proben innerhalb des Tumors (Peripherie bzw. Zentrum) und der Morphologie der Gefäße (glomeruloid, hyperplastisch, normal, Gefäßknospen oder Konglomerate) fand sich kein Zusammenhang. Stattdessen lagen die verschiedenen Arten von Gefäßprofilen oft in unmittelbarer Nachbarschaft. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bertossi et al. (1997), die keine Unterschiede in Gefäßgröße, Endotheldicke und Struktur der TJ zwischen Gefäßen aus dem Randgebiet des Tumors und aus Regionen mindestens 3 cm vom Tumorrand entfernt fanden. Während Weller und Griffin

(1978) Gefäßknospen überwiegend in der Tumorperipherie fanden, waren sie in den hier untersuchten Tumoren auch im Zentrum des Tumors nachzuweisen. Hier scheint das jeweilige lokale Milieu an Wachstumsfaktoren den Hauptauschlag zu geben, was mit Ergebnissen von Plate et al. (1992) vereinbar ist, die einen deutlichen Anstieg der Wachstumsfaktoren um lokale nekrotische Zonen nachweisen konnten.

Eine dreidimensionale Rekonstruktion des Gefäßbaumes eines anaplastischen Astrozytoms zeigte zwei Arten von Gefäßen: eine Gruppe, welche neoangiogenetischen Gefäßen, ähnlich der Situation während der Vaskularisierung des embryonalen Gehirns, entspricht, während die zweite Gruppe hochpathologisch erschien mit multiplen Protrusionen, Anastomosen und Septenbildungen (Orita et al. 1988). Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass ein Teil der Vaskulatur eines Tumors den ursprünglich vorhandenen Gefäßen des gesunden ZNS entspricht und von Tumorzellen umwachsen wird, während der Rest durch Neoangiogenese neu entsteht (Arosarena et al. 1994; Holash et al. 1999).

Insgesamt fanden sich deutliche Inhomogenitäten in der Gefäßverteilung, sowohl zwischen den Tumoren dieser Studie als auch innerhalb des einzelnen Tumors. Dies könnte auch die Unterschiede in der Interpretation durch verschiedene Arbeitsgruppen erklären: in Abhängigkeit vom Probenmaterial, sowie den untersuchten Tumorsubtypen stellt sich die Gefäßverteilung unterschiedlich dar. Experimente am Tiermodell, welche sich meist auf Tumoren aus einem einzelnen Zellklon und dessen Morphologie beschränken, zeigen eher einen Zusammenhang zwischen Gefäßmorphologie und Lokalisation, während Studien an OP-Material auf verschiedenen Tumorklonen basieren und daher ein deutlich inhomogeneres Bild zeigen und folglich keinen Zusammenhang zwischen Tumortyp und Gefäßmorphologie erkennen lassen.

4.1.3 Extrazellulärmatrix:

Im Vergleich zu gesundem ZNS war die Struktur des Gewebes deutlich aufgelockert mit vergrößertem Extrazellulärraum (Abbildungen 2, 3 und 8a). Ähnliche Ergebnisse waren bereits in anderen Arbeiten beschrieben worden

(Cox et al. 1976; Weller et al. 1977)– insbesondere der Perivaskularraum war vergrößert mit abnormal großen Perizyten (Abbildung 8a und 5), wobei sich im Tiermodell die Perizytengröße unverändert zeigte (Stewart et al. 1985).

Durch die vermehrte Matrix sowie das perivaskuläre Ödem waren in den hier untersuchten Gefäßen, ebenso wie in bisherigen Studien (Hirano und Matsui 1975; Nishio et al. 1983), die Endfüße der umliegenden Astrozyten von den Gefäßen innerhalb des Tumors distanziert (Abbildung 6 und 8a). Wie bereits erläutert, spielt der direkte Kontakt der Gefäße zu den umgebenden Astrozyten eine wesentliche Rolle für eine integrale BBB. Damit beeinträchtigt das Ödem und die vermehrte ECM die Funktion des Endothels, was wiederum zu einer Zunahme des Ödems führt. Folgerichtig ließ sich in keiner der bisherigen Perfusionsstudien eine funktionsfähige Blut-Hirn-Schranke nachweisen (Long 1970; Shivers et al. 1984; Nir et al. 1989).

Die Basalmembran der Gliomgefäße war deutlich inhomogener als in gesundem Gewebe, vereinzelt fanden sich, analog zu früheren Studien (Weller et al. 1977; Nishio et al. 1983), Kollagenfibrillen, welche in die Basalmembran integriert waren. Diese gingen direkt in die umgebende Matrix über und bildeten häufig breite Matrixsäume welche die Gefäße von ihrer Umgebung trennten (Abbildung 5 und 8a/b). Auch doppelte oder dreifache Basalmembranen, welche durch einen breiteren Saum mit Protein voneinander getrennt waren, fanden sich reichlich; zum Teil auch eine vollständige Auflösung der Basalmembran. Schon frühe Studien zeigten eine deutlich verdickte und inhomogene Basalmembran, welche jedoch auch Lücken aufwies (Waggner und Beggs 1976; Nishio et al. 1983). Dabei war der direkte Kontakt der Perizyten zur Basalmembran teilweise durch dazwischenliegende Tumorzellen unterbrochen (Waggner und Beggs 1976), ein Ergebnis, das in den vorliegenden Proben nicht nachvollzogen werden konnte. Insbesondere um glomeruloide Gefäße war in publizierten Studien die Zahl der Perizyten erhöht (Wesseling et al. 1997). Es bleibt jedoch unklar, ob dies lediglich auf dem größeren Umfang dieser Gefäße oder auf einer tatsächlichen funktionell-anatomischen Änderung beruht. Die Veränderungen des Kontaktes zwischen Endothel und umgebenden Perizyten und Glia

genügen dennoch, um eine funktionelle Störung der Blut-Hirn-Schranke zu erklären.

4.1.4 Endothelmorphologie und Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke

Ein auffälliges Merkmal der meisten Tumorgefäße waren villöse Ausläufer an der luminalen Oberfläche der Endothelien (Abbildung 3, 6, 8a). Diese entsprechen Anschnitten faltiger Strukturen der Membran, welche überwiegend longitudinal in den Gefäßen verlaufen und axial getroffen werden (Long 1970; Dinda et al. 1993). Die längsten dieser Protuberanzen erreichen die entgegengesetzte Gefäßwand und bilden einen Bogen. Die Vermutung, dass es sich hierbei um größere Endozytosevesikel handelt, konnte in einer rasterelektronenmikroskopischen Studie nicht bestätigt werden. Die Bögen stellten sich dort als eine Variante der villösen Ausläufer dar, welche die Gefäßoberfläche vergrößern (Dinda et al. 1993).

Fenestrae als Zeichen der Gefäßpermeabilität waren in den vorliegenden Gefäßen - mit einer einzelnen Ausnahme - nicht nachzuweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen bisheriger Studien an humanem Gewebe, welche keine oder nur wenige Fenestrierungen zeigten (Waggener und Beggs 1976; Weller und Griffin 1978; Coomber et al. 1987). Im Gegensatz dazu waren Fenestrae in Tumormodellen an Ratten (Nishio et al. 1983; Stewart et al. 1985) und Hunden (Vick und Bigner 1972) reichlich ausgeprägt und wurden für die Ödembildung verantwortlich gemacht. Andere Studien an Ethylnitrose-Harnstoff-induzierten Gliomen in Ratten fanden dagegen keine Fenestrierungen der Gefäße (Nir et al. 1989). Dies verdeutlicht, wie bereits oben diskutiert, die Probleme der Übertragbarkeit von Tiermodellstudien auf humanpathologische Veränderungen.

Nahezu alle Tumorgefäße wiesen einzelne Vesikel auf (Tabelle 1, Abbildung 5 und 6). Dabei war jedoch in vielen Fällen die Zahl der Vesikel gegenüber humanem Kontrollgewebe nur minimal erhöht, wobei sich kein Muster in der Verteilung innerhalb des Tumors feststellen ließ. Dies deckt sich mit den publizierten Ergebnissen. Hier zeigte sich in humanem Tumorgewebe, dass die

Zahl der Vesikel in kleineren und morphologisch normal erscheinenden Gefäßen nur leicht erhöht war, während sie in hyperplastischen Gefäßen deutlich erhöht war (Long 1970; Cox et al. 1976; Waggener und Beggs 1976). Dabei scheinen die Vesikel in peritumoralem Gewebe überwiegend abluminal gelegen zu sein und dienen möglicherweise der Resorption des Ödems (Dinda et al. 1993). Andere Studien zeigten keine Änderung der Vesikeldichte (Coomber et al. 1987) oder sogar eine geringe Zahl an Tracer-gefüllten Vesikeln im Tumorgewebe (Nir et al. 1989), wobei peritumorale Gefäße eine deutlich erhöhte Zahl an Vesikeln aufwiesen, welche durch Fusion regelrechte Gangstrukturen innerhalb der Zelle bildeten und Intra- und Extravasalraum miteinander verbanden (Shivers et al. 1984).

Die Hauptbarriere der Blut-Hirn-Schranke bilden die so genannten Tight Junctions, welche die Gefäße für wasserlösliche Moleküle dicht verschließen. Die Morphologie der Tight Junctions stellte sich in den untersuchten Gefäßen weitgehend unauffällig dar (Abbildung 6). Größere Lücken oder Verkürzungen der TJ konnten nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden. In vielen Studien zeigten die Tight Junctions auch normal aussehender Gefäße deutliche Veränderungen: im Vergleich zu normalem ZNS waren sie länger und stärker gewunden, wobei sie jedoch intakt erschienen (Roy und Sarkar 1989; Dinda et al. 1993). Da die Lokalisation der Proteine innerhalb der TJ, sowie die Zahl der Stränge und Verzweigungen einen erheblichen Einfluss auf die Funktion haben, haben Studien mit Gefrierbruch-Technik die größte Aussagekraft. Innerhalb humanen Tumorgewebes lassen sich jedoch – trotz der erhöhten Gefäßdichte – nur wenige TJ identifizieren. Im Rahmen dieser Studie wurden einzelne Tumoren mittels Gefrierbruch elektronenmikroskopisch untersucht.

Dabei zeigte es sich, dass die Tight Junctions ihre Partikelassoziation, die bei Blut-Hirn-Schranken-Endothelien überwiegend die innere Membranhälfte, also die P-face, betrifft (Wolburg et al. 1994), in gliomatösen Gefäßen auf die äußere Membranhälfte, also die E-face, verlagert (Liebner et al. 2000). Diese Verlagerung der Assoziation der Tight Junction-Partikel von der P- auf die E-face gilt inzwischen als Merkmal pathologischer Blut-Hirn-Schranken-Tight Junctions

(Wolburg und Lippoldt 2002). Außerdem zeigen gliomatöse Gefäße einen spezifischen Verlust von Claudin-3, einem Tight Junction-Protein (Wolburg et al. 2003). Interessanterweise ist kürzlich eine Molekularsieb-ähnliche Funktion der Tight Junctions beschrieben worden, wobei postuliert wird, dass Claudin-5 für die parazelluläre Restriktion von niedermolekularen Substanzen, und Claudin-12 für die von hochmolekularen Substanzen zuständig ist (Nitta et al. 2003). Das könnte bedeuten, dass auch der in gliomatösen Gefäßen beobachtete Verlust von Claudin-3 die molekulare Basis für das entstehende perivaskuläre Ödem darstellt.

Hinzu kommt, dass in mehreren Publikationen Lücken von bis zu 100nm innerhalb der TJ beschrieben wurden (Long 1970; Cox et al. 1976; Nishio et al. 1983; Stewart et al. 1985). Diese schienen in 3-dimensionalen Rekonstruktionen regelrechte Gänge innerhalb der TJ zu bilden und fanden sich auch in einzelnen Fällen in peritumoralem Gewebe (Stewart et al. 1987). Die deutlich erweiterten TJ waren in Tierversuchen über weite Bereiche des Tumors mit Tracer-Substanz gefüllt und schienen für diese permeabel zu sein (Nir et al. 1989). Zusätzlich fanden sich in unreifen Gefäßen größere Lückenbildungen, wobei unklar bleibt ob diese Gefäßknospen durchblutet waren, da sie bei reiferen Gefäßen nicht mehr anzutreffen waren (Weller et al. 1977; Coomber et al. 1987). Vick und Bigner (1972) fanden am Hundemodell auch in größeren Gefäßen Lückenbildungen, wobei jedoch die Tumorentität nicht eindeutig geklärt wurde. Im Gegensatz dazu fanden sich in den hier untersuchten Tumoren auch Lücken in deutlich ausgereiften Gefäßen (Abbildung 7). Die austretenden Erythrozyten sowie die Einblutungen in das umgebende Gewebe beweisen eine funktionelle Durchblutung dieser Gefäße (Abbildung 3). Wie im Ergebnisteil gezeigt, handelt es sich bei den Lückenbildungen jedoch nicht um geöffnete TJ, sondern um parajunctionale Lücken der Endothelschicht. Ein beobachteter Durchtritt eines Leukozyten aus dem Gefäß (Abbildung 9a) findet offensichtlich durch eine Lücke innerhalb der Zelle statt, welche neben einer intakten TJ liegt.

Als alleinige Ursache der Blut-Hirn-Schranken-Störung sind die Lücken trotz der Größe und der nachweisbaren Zellaustritte nicht ausreichend. Zum einen wären deutlich stärkere Einblutungen zu erwarten, zum anderen war die Zahl der offenen Gefäße nicht ausreichend um die Ausdehnung und Menge des Ödems zu erklären. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass die intratumoralen Einblutungen – ein Charakteristikum des GBM – zu einem nicht unerheblichen Teil auf derartigen Lückenbildungen beruhen (Abbildung 3). Das intra- und peritumorale Ödem hingegen beruht am ehesten auf einer Kombination mehrerer Faktoren: Störungen der Morphologie und molekularen Konstitution der Tight Junctions, Flüssigkeitstransport über Vesikel, Lückenbildungen und Fenestrae. Der Beitrag der einzelnen Mechanismen scheint dabei sowohl zwischen den Tumoren, als auch innerhalb des einzelnen Tumors zu variieren.

4.2 Änderungen im Aufbau der Extrazellulärmatrix

4.2.1 Kollagen I

Die gegenüber dem Tumorstroma vermehrte Ablagerung von Kollagen I um Gefäße des Tumors lässt eine insgesamt vermehrte perivaskuläre ECM vermuten, insbesondere im Fall der Tumoren 3, 4, 7, 8, 11, 12 und 13 bei denen vor allem die hyperplastischen Gefäße betroffen waren. Diese Gefäße weisen, wie schon die elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt haben, eine breite Basallamina auf, die deutlich von der umgebenden Matrix abgehoben ist. Dass diese massive Matrixproduktion auch zu einer zunehmenden Antigenizität für Kollagen I führt ist leicht verständlich.

Allerdings müssen auch für Kollagen I spezifische Mechanismen der Regulation existieren, da in den Tumoren 1 und 2 kein vermehrtes Kollagen I nachzuweisen war und auch in den Tumoren 5 und 6 sich die verstärkte Kollagenexpression der Gefäße überwiegend auf zentrale Tumoranteile beschränkte. Eine Ausnahme des Musters bildet Tumor 11, der eine verstärkte perivaskuläre Expression sowohl von Kollagen I als auch der Kollagene III, IV sowie von Laminin in den Proben aus der Tumorperipherie zeigte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine fehlerhafte Lokalisation der

Proben durch den Operateur. Dies erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da die Proben direkt im Operationssaal entgegengenommen und verarbeitet wurden. Am wahrscheinlichsten stammt bei diesen Tumoren die periphere Probe aus einem bereits stark hypoxischen und pathologisch veränderten Bereich, welcher am Rand des Resektionsareals lokalisiert war, während die Probe aus den zentralen Tumoranteilen aus einem relativ gut versorgten Areal aus dem Tumorzentrum stammt. Letztere weist daher eher Merkmale der Tumorperipherie auf. Für diese These spricht auch, dass das Areal aus der Peripherie deutlich stärkere Level an Tenascin aufweist, während die Probe aus dem Tumorzentrum deutliche für Agrin und Glut-1 markiert war- beides Markerproteine der differenzierten Vaskulatur mit intakter Blut-Hirn-Schranke. Bereits in einer früheren Studie von Bellon et al. (1985) war eine deutliche Markierung der Gefäße in Glioblastomen mit Kollagen I nachgewiesen worden, wobei dort keine Markierung des Tumorstromas nachzuweisen war. Während in-vitro- Studien an Gliom-Zelllinien geringere Mengen an Kollagen I gegenüber Kollagen IV aufwiesen (McKeever et al. 1986), war in allen hier untersuchten Tumoren die Markierung des Tumorstromas für Kollagen I deutlich stärker als jene für Kollagen IV. Hier zeigt sich erneut die eingeschränkte Übertragbarkeit eines in-vitro- Modells auf die hochkomplexe Regulation in-vivo.

4.2.2 Kollagen III

Im Fall des Kollagen III ließ sich kein einheitliches Expressionsmuster feststellen. Während in einzelnen Tumoren (1, 4, 7, 10) vor allem die Gefäße im Tumorzentrum vermehrt Kollagen III in der ECM exprimierten, waren es in den Tumoren 5, 6, 8, 9 und 10 vor allem die Gefäße der Peripherie, die sich in ihrer Kollagen III- Expression vom übrigen Tumorstroma abhoben.

Auch hier beschränkte sich, wie schon bei Kollagen I, die vermehrte Antigenizität vor allem auf hyperplastische Gefäße. Allerdings war kein Zusammenhang der Markierung für Kollagen III mit Menge an perivaskulärer Extrazellulärmatrix - wie z.B. für Kollagen I- zu erkennen, was eine rein quantitative Korrelation ausschließt. Im Gegensatz zu anderen Studien (Bellon et al. 1985) war die Markierung für Kollagen III deutlich geringer als diejenige für

Kollagen I, auch unter Berücksichtigung der deutlich geringeren Markierung des Hintergrundes. Möglicherweise spielt hier die Bindungsstärke des Antikörpers eine Rolle, alternativ käme auch hier ein lokal unterschiedliches Milieu in Betracht.

Da sich keine Assoziation der Kollagen III-Veränderung zu histopathologischen Strukturen oder zur Lokalisation innerhalb des Tumors finden ließ, könnten hier bisher unbekannte Regulationsfaktoren eine Rolle spielen. Dafür spricht auch, dass sich keine Korrelation zu den übrigen untersuchten ECM- oder BHS-Marker-Proteinen finden ließ.

4.2.3 Kollagen IV

Kollagen war, wie erwartet, um nahezu alle Gefäße deutlich exprimiert und zeigte keine Markierung des übrigen Tumorstromas. Diese deutliche und auf Gefäße beschränkte Kollagen IV-Markierung entspricht der in anderen Studien beschriebenen Verteilung welche ausschließlich auf Gefäße beschränkt bleibt (Bellon et al. 1985). In Zellkulturen aus Gliomen, ließ sich zwar nachweisen, dass Gliomzellen Kollagen IV exprimieren, dieses in-situ jedoch perivaskulär-möglicherweise über die Astrozytenendfüße- in die ECM deponieren (McKeever et al. 1995). Hier scheint das lokale Milieu eine große Rolle zu spielen, so dass eine Zellkultur die in-vivo Situation nur unzureichend simuliert. Hinzu kommt, dass sich in der Zellkultur nur vereinzelte Kollagen-Fibrillen fanden (McKeever et al. 1986), welche immunhistochemisch in-vivo nicht eindeutig von der unspezifischen Hintergrund-Markierung unterschieden werden können.

An der Markierung für Kollagen IV lässt sich die bereits elektronenmikroskopisch erkennbare Aufspaltung der Basallamina in mehrere Lagen deutlich erkennen. So wiesen insbesondere große Gefäße mit glomeruloider Struktur oft mehrere Lagen an umgebender Kollagen IV-Markierung auf, während kleinere Gefäße nur von einer Lage Basallamina umgeben waren und vermutlich den elektronenmikroskopisch normal wirkenden Gefäßen entsprachen.

Obwohl Kollagen IV überwiegend durch MMP-9 abgebaut wird (Nielsen et al. 1997), fanden sich in Gefäßen mit deutlicher Markierung für MMP-9 keine reduzierte Menge an Kollagen IV, ein Zusammenhang zwischen der Markierung für MMP-9 und Kollagen IV war nicht zu erkennen.

4.2.4 Fibronectin

Fibronectin war um alle Gefäße der Tumoren nachzuweisen und wurde daher als Gefäßmarker verwendet. Innerhalb der einzelnen Tumoren unterlag die Fibronectin-Markierung nur einer geringen Schwankungsbreite, so dass eine Regulation über spezifische Milieu-abhängige Mechanismen nur einen geringen Einfluss zu haben scheint. Die Überexpression von Fibronectin um hyperplastische Gefäße der Tumoren 5 und 7 entspricht vermutlich, ähnlich wie bei Kollagen I, einer vermehrten Expression an Matrix, ohne einen spezifischen Regulationsmechanismus wider zu spiegeln.

In Übereinstimmung mit in-vitro-Studien (McKeever et al. 1986), fand sich eine Markierung des Tumorstromas (Abbildung 10) aufgrund der Fibronectin-Expression der Gliom-Zellen welche jedoch deutlich geringer war als diejenige der Gefäße, so dass sich die Gefäße (nach Korrelation zu HE-Färbungen von Serienschnitten) weiterhin eindeutig identifizieren ließen.

4.2.5 Laminin

Als eines der ersten Proteine, welches in der Embryogenese synthetisiert wird, ist Laminin ein wichtiger Bestandteil nahezu sämtlicher Basalmembranen (Alberts et al. 1994; Aumailley und Smyth 1998). Dabei scheint Laminin in der Basalmembran wichtig für die Organisation der Zellen in kapilläre Strukturen zu sein (Grant et al. 1989). In Versuchen an Gliomzelllinien fanden sich deutliche Variationen der Markierung von Laminin mit einer Schwankung um den Faktor 100 zwischen den einzelnen Zelllinien (McKeever et al. 1986). Auch in den hier untersuchten Tumoren fanden sich deutliche Schwankungen in der Laminin-Markierung der Basalmembranen. Eine Korrelation zu anderen untersuchten Matrixproteinen war jedoch nicht zu erkennen. Am ehesten erklärt sich dies durch die unterschiedlichen Phasen der Angiogenese, in denen die Proteine

synthetisiert werden: während Tenascin und MMP-9 eine wichtige Rolle bei der Migration der Endothelzellen haben, ist Laminin vor allem während der Organisation der Kapillaren von Bedeutung.

4.2.6 Tenascin

Tenascine insbesondere Tenascin-C spielen, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine wichtige Rolle in der Migration und Entwicklung- vor allem in ZNS, Mesenchym und Knorpel, wo es wesentlich zur Gewebemorphogenese und Angiogenese beiträgt. Dagegen sind im gesunden adulten ZNS keine Tenascine mehr nachweisbar. Die Re-Expression beschränkt sich auf physiologische und pathologische Zustände, die eine neue Gewebestrukturierung und Angiogenese erfordern, z.B. bei der Wundheilung, Entzündung und Tumorentstehung (Jones und Jones 2000).

4.2.6.1 Tenascin-Expression in Tumorgewebe:

In astrozytischen Tumoren findet sich vermehrt Tenascin um hyperplastische Gefäße als Zeichen der Neoangiogenese (Mäenpää et al. 1997). In Glioblastomen, nicht jedoch in Tumoren geringerer Malignität, lässt sich Tenascin auch innerhalb der Tumorzellen nachweisen (Donato et al. 1997). Die Tenascin mRNA Expression in Endothelzellen und Perizyten korreliert hierbei zur Aktivität der Angiogenese und dem Malignitätsgrad des Tumors (Zagzag et al. 1995; Zagzag et al. 1996). Im gesunden Gewebe um den Tumor findet sich Tenascin nicht im Stroma sondern nur in der perivaskulären Matrix, als Zeichen einer vermehrten Angiogenese auch in diesen Arealen (Zagzag et al. 1996). Allerdings finden einzelne Forschergruppen auch eine TN-Markierung von Endothel und Glia-Zellen (Mäenpää et al. 1997), wobei hier ein Markierungsartefakt nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die Tumoren, die im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht wurden, zeigten in den peripheren Arealen eine Markierung des Stromas, welche der Negativkontrolle entspricht. Dies deutet auf eine unspezifische Markierung hin nicht auf eine vermehrte Expression.

In diesem Zusammenhang wirft die Verwendung tumornahen Gewebes als Kontrolle Probleme auf: In Tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung der Tumorzellen dem Mehrfachen der makroskopischen Ausdehnung entspricht (Ji et al. 1996): während z.B. der makroskopische Tumor 4mm² einer Schnittfläche einnahm, waren Tumorzellen auf einem Areal von über 10mm² nachweisbar. Bei der Verwendung von tumornahem Gewebe als Negativkontrolle besteht daher die Gefahr, dass es sich bei dieser „Kontrolle“ eher um locker infiltriertes als um tumorfreies Gewebe handelt. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in adultem Gewebe üblicherweise kein TN-C gefunden wird, während in mehreren Studien in tumornahem Gewebe TN-C nachgewiesen wurde (Vitolo et al. 1996; Zagzag et al. 1996). In Tumor 3 dieser Studie wurde eine Probe verarbeitet, welche aus einer Region stammte, welche deutlich vom makroskopischen Tumorrand distanziert war. Diese zeigte dennoch deutlich pathologisch verändertes Gewebe, mit glomeruloiden Gefäßen und offenen Endothellagen- ansonsten ein Charakteristikum der zentralen Tumorareale.

4.2.6.2 Regulation der TN-Expression

Inzwischen ist eine Vielzahl an Faktoren bekannt, die auf die Tenascin-Expression wirken. Sakai et al. (1995) konnten nachweisen, dass epidermale Zell-Linien Tenascin-mRNA exprimieren und Tenascin in das umgebende Medium abgeben, nachdem sie durch TGF- β (transforming-growth-factor), EGF (epidermal-growth-factor), Hepatocyte Growth-factor und PDGF (platelet-derived-growth-factor) stimuliert wurden. Dabei induzierte EGF neben der Tenascin auch die Laminin- und Fibronectin-Expression.

In-vivo Versuche an Ratten zeigten, dass PDGF in der Lage war, die TN Expression zu stimulieren (LaFleur et al. 1994), ohne dass sich ein Einfluss auf die Fibronectin-Expression zeigte. Dies wäre eine Erklärung für die exklusive Expression von TN in Zonen lokaler Nekrose (Abbildung 10). Außerdem ist PDGF in der Lage, die Expression von VEGF (Wang et al. 1999) in endothelialen Zellen und die von MMP-9 (Bond et al. 1998) zu stimulieren. In

den untersuchten Geweben fand sich eine deutliche Kollokalisierung von TN und MMP-9, welche durch erhöhte PDGF-Spiegel innerhalb des Tumors erklärt werden könnte.

Basic-Fibroblast-Growth-Factor (bFGF) steigert ebenfalls die TN-Expression und wurde in Glioblastomen vermehrt nachgewiesen. Die Wirkung von EGF, PDGF und bFGF auf die TN-Expression wird vermutlich über den selben Mechanismus vermittelt, welcher über die Knox 24-Region im TN-C Promotor wirkt, da diese Faktoren alle eine verstärkte Bindung an die Knox 24-Region zeigen (Copertino et al. 1997).

Unter den Matrixproteinen scheint Kollagen I einen Einfluss auf die TN Regulation zu haben. Durch MMP-2 degradiertes Kollagen ist in der Lage, über $\alpha 3$ -Integrine und vermutlich über das Aktin-Zytoskelett vermittelt, Tenascin in Glattmuskelzellen zu induzieren. Natives Kollagen I hingegen hemmt über $\alpha 1$ -Integrin die Expression (Jones und Jones 2000). Welcher dieser Mechanismen in der in-vivo Situation überwiegt, ist bisher unbekannt. In den untersuchten Proben fand sich kein Zusammenhang zwischen der Markierung für TN-C und derjenigen für Kollagen I, daher spielt dieser Zusammenhang vermutlich im humanen Glioblastom keine Rolle, insbesondere da keine erhöhten Spiegel für MMP-2 nachgewiesen werden konnten, welches benötigt würde, um Kollagen I zu aktivieren.

Andererseits hat auch das TN selbst einen Einfluss auf seine Umgebung. Ein Grossteil der TN Untereinheiten besteht aus EGFL-Repeats (epithelial-growth-factor-like), die sich in ähnlicher Weise auch im Laminin finden lassen (Venström und Reichardt 1993). Da EGF einen wesentlichen Einfluss auf die Tenascin-Expression besitzt, ist ein autokriner Loop denkbar, in welchem Tenascin die umgebenden Glattmuskelzellen zur vermehrten Expression von TN anregt. Tenascin ist aber auch in der Lage die Adhäsion verschiedener Zelllinien an andere Matrixproteine zu modifizieren; so findet sich nach Zugabe von TN-haltigem Medium eine reduzierte Adhäsion von Endothelzellen an Fibronektin (LaFleur et al. 1994). Glattmuskelzellen binden über die FN-III Domäne an eine TN-C-haltige Matrix (LaFleur et al. 1994). Die Bindung der

Endothelzellen an TN-C über $\alpha v\beta 3$ -Integrin spielt eine essentielle Rolle für die Angiogenese (Brooks et al. 1984).

4.2.6.3 Tenascin in Zonen fokaler Nekrose

Von den Wachstumsfaktoren hat insbesondere VEGF eine starke positive Wirkung auf die Expression des TN-C, insbesondere in Perizyten (Sharifi et al. 1992). Doch auch Angiopoietin-2 verstärkte die TN-C Expression wesentlich, wie in mehreren Versuchen gezeigt werden konnte (Sharifi et al. 1992; LaFleur et al. 1994). Auch andere Tumorentitäten zeigen eine deutliche VEGF- und bFGF- Expression, was auf eine wichtige Funktion dieser Faktoren für die Tumorentstehung hinweist (Hanahan und Folkman 1996). Plate (1999) konnte zeigen, dass sowohl Angiopoietin-2 als auch VEGF- zumindest in kleineren Gefäßen- in Glioblastomen überexprimiert waren. Diese erhöhten VEGF-Mengen innerhalb der Tumoren- insbesondere perivaskulär- reichen aus um die erhöhte Expression von TN-C zu erklären welche in der vorliegenden Studie um Tumorgefäße gefunden wurden. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Expression von VEGF in perinekrotischen Zonen der Glioblastome nachgewiesen werden (Plate et al. 1994; Plate 1999). Diese nochmals erhöhte VEGF-Expression würde ausreichen, um eine vermehrte Expression von TN in diesen Arealen zu begründen. Tatsächlich fand sich in den hier untersuchten Tumoren eine deutlich vermehrte TN-C Menge um die Gefäße innerhalb der nekrotischen Zonen (Abbildung 10) (Liebner et al. 2000). Dass diese Expression sich nicht auf die perinekrotischen Zonen beschränkt, sondern auch die eigentlichen Nekrosen umfasst, erklärt sich durch die Kinetik der Tumorentstehung: Areale mit schnellem Tumorwachstum weisen eine schlechte Versorgung und konsekutive Hypoxie auf; diese induziert eine vermehrte Expression von VEGF in den Tumorzellen, was wiederum zu einer perivaskulären TN-C Expression führt. Während die Tumorzellen aufgrund der Hypoxie nekrotisch werden, lassen sich die besser versorgten Gefäße noch einige Zeit nachweisen. Zusätzlich induziert der erhöhte Spiegel an Wachstumsfaktoren ein ungerichtetes Gefäßwachstum: der Großteil der

hyperplastischen und glomeruloiden Gefäßformationen wird in und um Zonen der Nekrose gefunden (Wesseling et al. 1997).

Dabei ist stets zu beachten, dass die Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren auf die TN-C Expression sich in vivo häufig wesentlich von den in-vitro- simulierten Ergebnissen unterscheiden. Insbesondere in einer stark heterogenen Umgebung mit häufig auf kleinstem Raum wechselnden Mikromilieus, wie sie das GBM darstellt sind häufig nur in-vivo-Experimente in der Lage eine eindeutige Wirkung fest zu stellen. Zusätzlich konnten neuere Studien zeigen, dass sich die Splicing-Varianten von TN in Gliomen von denen in sonstigen Tumoren und gesundem adultem Gewebe unterscheiden (Carnemolla et al. 1999). Es wird die Aufgabe zukünftiger Studien sein, hier die genaueren Zusammenhänge aufzuzeigen.

4.2.7 Agrin

Agrin ist ein Bestandteil der Basalmembran des ausgereiften Säugergehirnes (Barber und Lieth 1997), der wesentlich zur Aufrechterhaltung einer intakten Blut-Hirn-Schranke beiträgt. Weitere Aufgaben des Agrins sind die Clusterung von Acetylcholinrezeptoren in der Motorischen Endplatte (McMahan 1990) und damit die Organisation der motorischen Endplatte.

In den Kontrollgeweben aus nicht tumorös verändertem Gehirn fand sich eine deutliche Markierung der Basalmembran der Gefäße für Agrin. Im Gegensatz dazu war die Markierung für Agrin in den untersuchten Tumoren deutlich geringer oder nicht nachweisbar. Allerdings fand sich keine Korrelation der Expression zur Lokalisation innerhalb des Tumors: ob die Probe aus der Tumorperipherie oder dem Zentrum des Tumors stammte hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Markierung für Agrin. Es ist hier, wie auch im Falle der übrigen Matrixproteine, davon auszugehen, dass die Proben aus der Peripherie in einigen Fällen deutlichere Veränderungen durch den Tumor erfahren hatten, als diejenigen aus dem Tumorzentrum.

Die Expressionsmuster von TN und Agrin schlossen sich in den untersuchten Tumoren über weite Teile gegenseitig aus (Tabelle 4, Abbildung 14). Agrin ist ein Bestandteil von ausgereiften Blutgefäßen mit Schrankeneigenschaften

(Barber und Lieth 1997), und vermutlich an der Organisation der Zelloberfläche beteiligt, dies ist jedoch bisher nur an Myozyten nachgewiesen (McMahan 1990). Dagegen wird TN vor allem in unreifen und aussprossenden Gefäßen exprimiert und hat vermutlich wichtige Aufgaben in der Regulation von Wachstums- und Bahnungsprozessen. Die sich ausschließende Expression der beiden Moleküle, ist daher vermutlich ein Zeichen unterschiedlicher Aktivitätszustände der Gefäße: einwachsende und neu aussprossende Gefäße zeigen eine deutliche Expression von TN, während ausgereifte oder autochthone Gefäße einen deutlichen Gehalt der Basalmembran an Agrin aufweisen (Rascher et al. 2002). Da die Vaskulatur der meisten Tumoren sowohl ursprüngliche, vom Tumor umwachsene, als auch neu ausgebildete Gefäße enthält (Holash et al. 1999), ist eine gleichzeitige Expression beider Gefäßtypen verständlich.

Eine größere Zahl von Gefäßen wies sowohl TN als auch Agrin in der Basalmembran auf (Abbildung 13). Hierbei handelt es sich vermutlich um einen Übergangszustand der Gefäße hin zu pathologischen Zuständen im Sinne tumoröser Neoangiogenese.

Bisher existieren keine Studien, in welchen die Expression von Tenascin und Agrin während der Entwicklung auf der Ebene des einzelnen Gefäßes korreliert wird, so dass unklar bleibt ob TN und Agrin auch physiologischerweise gleichzeitig um einzelne Gefäße nachweisbar sind. Eine andere möglich Erklärung wäre folgende: in Glioblastomen findet sich eine pathologische Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren, welche in dieser Form während der normalen Entwicklung zu keinem Zeitpunkt auftritt. Dadurch erhalten die Gliom- und Endothelzellen Signale zur Expression von Proteinen, welche während der Entwicklung nicht auftreten, so dass Matrixkomponenten, die sich normalerweise ausschließen, gleichzeitig exprimiert werden.

Dies erklärt auch die räumliche Separation der beiden Moleküle in diesen Gefäßen: in Gliomen wird TN überwiegend von den Gliomzellen synthetisiert und ist daher auf der glialen Seite der perivaskulären Basalmembran lokalisiert

(Zagzag et al. 1996). Dagegen wird die Expression von Agrin durch die sich organisierenden Endothelien organisiert (Lieth et al. 1995), welches dementsprechend auf der endothelialen Seite der Basallamina lokalisiert ist.

4.2.8 Glut-1

Die Expression des Erythrozyten-spezifischen Glucose-Transporters Glut-1 auf Endothelzellen des ZNS ist eng gekoppelt an die Funktion der Blut-Hirn-Schranke. So fand sich die stärkste Markierung für Glut-1, welche in dieser Studie beobachtet wurde, in den Gefäßen der Kontrollgewebe aus gesundem Gehirn (Tabelle 5). Dagegen zeigte die Kontrolle aus einem Hämangiom eine deutlich geringere Markierung für Glut-1, ein sicheres Zeichen dafür, dass hier bereits eine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt, obwohl sich in den entsprechenden Proben kein relevantes Ödem fand.

Obwohl PET-Studien an Gliomen einen erhöhten Glucosetransport zeigen (Rozenal et al. 1993), ist die Expression von Glut-1 reduziert, da die Glucose über die defekte BBB frei in das ZNS diffundieren kann. Nagamatsu et al. (1993) fanden positive Glut-1 Markierung einzelner Tumorzellen, sowie eine sehr schwache Markierung luminaler Membranen in anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen und deutete dies als Zeichen der Unreife der Tumor-Gefäße. Harik und Roessmann (1991) fanden eine fehlende Glut-1 Markierung der hyperplastischen Gefäße in Glioblastomen, wobei die Markierung zum Tumorrand hin zunahm und alle Gefäße im umgebenden ödematösen Gewebe Glut-1-positiv waren. Auch Nishioka et al. (1992) fanden in hyperplastischen Tumorgefäßen keine Glut-1-Expression, wohl aber in unauffälligen Kapillaren. Dagegen fanden Guerin et al. (1990) deutlich reduzierte bzw. fehlende Glut-1-Markierung in Glioblastomen, während Astrozytome niedrigerer Malignität eine normale Glut-1-Markierung aufwiesen, wobei keine Abhängigkeit von der Permeabilität der Gefäße bestand.

Tierexperimentelle Studien mit implantierten Tumorzellen zeigten eine deutliche Glut-1-Expression, die sich jedoch signifikant zwischen zentralnervös und subkutan implantierten Tumoren unterschied, so dass hier vermutlich bereits im

Gewebe vorhandene Gefäße vom Tumor umwachsen wurden und ihre Eigenschaften beibehalten hatten (Arosarena et al. 1994).

Die Expression von Glut-1 in Tumorzellen variiert stark. Nagamatsu et al. (1993) fanden nur in 2 von 14 überwiegend niedrigmalignen astrozytären Tumoren Glut-1 außerhalb der Gefäße, während sie in C-6 Gliomzellen eine hohe Expressionsrate entdeckten. Nishioka et al. (1992) fanden in perinekrotischen Palisaden aus Glioblastomen eine erhöhte Glut-1 Expression der Tumorzellen.

Die Expression von Glut-1 in Tumorzellen sowie die geringere Expression in Gefäßen zeigen Parallelen zu den Vorgängen während der Reifung des Gehirns. Dermietzel et al. (1992) zeigten, dass Glut-1 mit dem Auftreten der BHS aus dem Neuroepithel verschwindet, während gleichzeitig die Gefäße positiv markiert wurden. In einer Art Umkehrung dieses Ablaufs weisen die Tumorzellen des Glioblastoms erneut Glut-1 auf, während die Markierung der Gefäße mit dem Zusammenbruch der BHS verschwindet. Unter Steroidtherapie und teilweiser Restitution der BHS nimmt auch die Zahl Glut-1-positiver Gefäße erneut zu (Guerin et al. 1992a), wobei das Tumorwachstum deutlich verlangsamt wird und die Gefäßdichte abnimmt, was die Bedeutung der Vaskularisation betont. Guerin et al. fanden sowohl am Tiermodell (Guerin et al. 1992a), als auch in Studien an humanen Hirntumoren (Guerin et al. 1992b) einen Zusammenhang zwischen der Gefäßpermeabilität und der Expression von Glut-1, jedoch ein leicht differierendes Muster: bei zunehmender Anaplasie der Tumoren nahm die Permeabilität zu bevor die Markierung für Glut-1 verschwand. Daher vermuteten sie, dass eine komplexe Regulation vorliegt. In anderen Studien (Arosarena et al. 1994; Dermietzel et al. 1992) wurde jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Funktion der BHS und der Expression von Glut-1 festgestellt. So konnten Vorbrodt et al. (2001) zeigen, dass die Verteilung von Glut-1 in den Endothelmembranen eng zur Expression der Tight Junction-Marker ZO-1, Occludin und beta-Catenin korreliert, so dass Glut-1 als BHS-Marker geeignet erscheint.

4.2.9 MMP

In einer Vielzahl an Tumoren spielen die MMPs eine wichtige Rolle im Rahmen der lokalen Tumordinvasion und Ausbreitung (Westermarck und Kähäri 1999). Auch in Ischämischen Insulten (Fujimura et al. 1999) und bei bakterieller Meningitis (Paul et al. 1998) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und der Expression von MMP-9 beschrieben. Die überwiegend ausschließende Expression von Glut-1 und MMP-9 in Gefäßen zeigt, dass auch im Glioblastom ein enger Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-9 und dem Zusammenbruch der BHS besteht. Allerdings fanden sich in Zonen offensichtlicher Ischämie und Nekrose nur wenige MMP-9 positive Zellen, welche vermutlich Leukozyten entsprachen (Abbildung 9). Da die oben genannte Studie (Fujimura et al. 1999) jedoch keine exakte Differenzierung der MMP-Lokalisation erwähnt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesem Fall die MMP-Expression von einwandernden Leukozyten repräsentiert wird, da auch in anderen Studien die Expression von MMPs überwiegend im umgebenden gesunden Gewebe sowie in eingewanderten Entzündungszellen festgestellt wurde (Shapiro 1998). In weiteren Studien wurden im Tiermodell (Sawaya et al. 1998) und an humanem Gewebe (Lampert et al. 1998) erhöhte MMP-9- und MMP-2-Level der Tumorzellen und Endothelien gemessen. In dieser Studie an Humangewebe konnten keine nennenswert erhöhten Spiegel an MMP-2 und -9 in Endothelzellen festgestellt werden. Stattdessen zeigte eine Gegenfärbung mit SMA (smooth-muscle-actin), einem Marker für Glattmuskelzellen und Perizyten, ein überwiegend übereinstimmendes Färbemuster. Dies entspricht den Ergebnissen welche sich beim Mamma-Karzinom finden, welches eine starke MMP-9-Expression in vaskulären Glattmuskelzellen, nicht jedoch in Endothelzellen aufweist (Nielsen et al. 1997). VEGF als wichtiger Angiogenesefaktor ist in der Lage, die Expression von MMP-9 und MMP-1 in vaskulären Glattmuskelzellen zu induzieren (Wang und Keiser 1998). Da VEGF auch die Expression von TN induziert, liegt hierin eine wahrscheinliche Erklärung der korrespondierenden Expression der beiden

Proteine: aufgrund des angiogenetischen Impuls durch VEGF bilden die Perizyten vermehrt MMP und sind so in der Lage in die Umgebung zu infiltrieren und ein Gefäßwachstum zu initiieren (Kim und Kim 1999; Bergers et al. 2000), während TN ein gerichtetes Wachstum ermöglicht. Zusätzlich scheinen MMPs und TN in der Lage zu sein ihre Expression gegenseitig zu stimulieren (Jones et al. 1997).

Unklar bleibt die Ursache der nicht, oder nur geringfügig erhöhten MMP-9-Markierung in den Zonen der fokalen Nekrose. Möglicherweise ist die Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren welche durch die Hypoxie in den nekrotischen Arealen induziert werden, derart von der physiologischen Zusammensetzung entfernt, dass eine MMP-9 Expression unterdrückt wird. Dies könnte auch das vermehrte Vorliegen der glomeruloiden Gefäße in diesen Arealen erklären (Wesseling et al. 1997), da durch die Wachstumsfaktoren zwar die Teilung der Endothelzellen und (über Tenascin) die Organisation in Gefäße induziert wird, nicht aber die Migration der Endothelzellen, für welche MMPs benötigt wird. Die so induzierten Gefäße bilden mehr Endothelzellen an derselben Stelle, und damit ein größeres Lumen.

4.2.10 Einschränkungen dieser Studie

Eine deutliche Einschränkung der Aussagekraft dieser Studie besteht in der Auswahl der Kontrollgewebe. Aus ethischen Gründen ist die Entnahme von Proben aus nicht tumorös verändertem Gehirn auf wenige Spezialfälle wie chirurgische Interventionen bei ausgeprägter Krampfneigung oder traumatisch Zustände beschränkt. So stammte eine der Kontrollen aus einem zerebralen Hämangiom, welches chirurgisch reseziert wurde. Zwar ist das Hämangiom nicht durch ein exzessives perifokales Ödem gekennzeichnet, dennoch kann hier nicht sicher von einer intakten BHS ausgegangen werden. Die Markierungen der Gefäße aus dem Hämangiom für die untersuchten Matrixproteine, sowie für die Marker der BHS stimmen jedoch in nahezu allen Fällen (mit Ausnahme einer diskreten Markierung der Gefäße für MMP-9) mit

den Befunden überein, wie sie aufgrund der Literatur aus gesundem Gehirn mit intakter ZNS zu erwarten sind.

Auch im Falle der zweiten Kontrolle bestehen gewisse Einschränkungen. Diese stammte von einem Patienten welcher im Rahmen einer posttraumatischen Hämatomentlastung operiert wurde. Zwischen der Probenentnahme und der Fixation vergingen etwa 2 Stunden. Eine vollständig intakte Blut-Hirn-Schranke ist daher nicht sicher zu belegen. Es erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, dass eine relevante Destruktion der Matrixproteine bis zu diesem Zeitpunkt stattgefunden hat; insbesondere, da die Markierungen den publizierten Daten entsprachen.

4.3 Ausblick:

Eine derzeit viel diskutierte Möglichkeit ist die direkte Therapie über antiangiogenetische Faktoren, wobei insbesondere VEGF als möglicher Ansatzpunkt betrachtet wird. Allerdings sind bisherige Studien an Menschen nicht über Pilotprojekte hinausgekommen. So gab es erste Versuche eine Radioimmunotherapie mit Anti-Tenascin-Antikörpern zu initiieren welche jedoch bislang auf Phase I Studien begrenzt blieben (Riva et al. 1999). Wie im Tiermodell gezeigt werden konnte beruht die Ödementstehung ebenfalls in weiten Teilen auf VEGF (Heiss et al. 1996), so dass spezifische Antikörper nicht ausschließlich unter kurativen sondern auch unter palliativen Gesichtspunkten interessant erscheinen. Hier zeigen erste Studien in Kombination mit Strahlentherapie gute Erfolge (Bello et al. 2001; Kunkel et al. 2001). Inwiefern sich diese jedoch in der Praxis durchsetzen und welchen therapeutischen Nutzen die Patienten im Endeffekt davontragen, bleibt zukünftigen Studien überlassen.

5. Zusammenfassung:

Das Glioblastom als aggressivster Tumor des ZNS ist insbesondere durch eine deutlich vermehrte Vaskularisation sowie ein ausgeprägtes intra- und peritumorales Ödem charakterisiert. Dabei stellt letzteres einen wichtigen Morbiditätsfaktor dar. Übereinstimmend mit einem Teil der bisher publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass die Zahl der endothelialen Vesikel deutlich erhöht ist, was wesentlich zur Ödementstehung beiträgt. Dagegen fanden sich keine Fenestrae, welche in Tierversuchen für die Gefäßpermeabilität verantwortlich gemacht wurden. Zusätzlich wiesen zahlreiche Gefäße größere Lücken der Endothelschicht auf, durch welche Flüssigkeit und Zellen austreten. Diese sind jedoch in der Zahl nicht ausreichend, um das Ödem vollständig zu erklären, so dass die Entstehung des Ödems vermutlich auf der Veränderung einer Kombination von Lücken, Vesikeln und der molekularen Konstitution der Tight Junctions beruht. Dabei spielt die vermehrte perivaskuläre ECM, die den direkten Kontakt der Endothelzellen zu den umgebenden Astrozyten vermindert, eine wichtige Rolle, da dieser eine essenzielle Grundlage der intakten Blut-Hirn-Schranke darstellt.

Die ECM ist dabei nicht nur quantitativ vermehrt sondern auch in der Zusammensetzung deutlich verändert, wobei Übereinstimmungen mit Gefäßen während der Embryogenese bestehen. So waren die Markierungen für Agrin reduziert und für Tenascin um die Tumorgefäße deutlich vermehrt. Letzteres fand sich vor allem in Zonen fokaler Nekrose, wobei vermutlich eine erhöhte Expression von VEGF und PDGF- β in diesen Arealen als deren Ursache anzunehmen ist. Dabei fand sich eine deutliche Korrelation der Tenascin-Expression zu derjenigen für MMP-9, welches durch dieselben Faktoren induziert wird.

Dagegen war die Markierung für Agrin gegenläufig zu derjenigen für Tenascin: in den meisten Gefäßen fand sich nur eines der beiden Proteine. Wenn beide in der ECM nachweisbar waren, fand sich eine deutliche räumliche Separation, mit Tenascin in den tumoralen Anteilen und Agrin in den endothelialen Anteilen der Basalmembran. Dies erklärt sich am ehesten durch einen unterschiedlichen

Ursprung der beiden Komponenten und unterschiedliche Funktionen: Tenascin als Faktor der Angiogenese welcher von Tumorzellen produziert wird und Agrin als Marker der intakten Vaskularisation, welcher von den sich organisierenden Endothelzellen sezerniert wird.

Die essentiellen Bestandteile der Basalmembran- Fibronectin, Kollagen IV und Laminin- waren jedoch in allen Gefäßen nachweisen, zusätzlich fand sich eine deutliche Markierung für Kollagen I. Dies spricht dafür, dass alle Gefäße innerhalb des Tumors bis zu einem gewissen Grad eine intakte Struktur besitzen, jedoch aufgrund der unkoordiniert ausgeschütteten

Wachstumsfaktoren nicht in der Lage sind, vollständig auszudifferenzieren.

Glut-1 war in zahlreichen Gefäßen innerhalb der Tumoren nachzuweisen, was für eine intakte Blut-Hirn-Schranke dieser Gefäße spricht. Dabei waren diese Gefäße nicht für MMP-9 positiv, während MMP-9 positive Gefäße keine Markierung für Glut-1 aufwiesen. Dies erklärt sich durch die Existenz verschiedener Gefäßtypen innerhalb des Tumors: präexistente Gefäße mit intakter Blut-Hirn-Schranke und neu einwachsende Gefäße, welche keine Schranke aufweisen und vermutlich für die Ödementstehung verantwortlich sind. In der gezielten Behandlung der letzteren über Wachstumsfaktoren und Antikörper gegen die Rezeptoren derselben liegt das Hauptpotenzial der antiangiogenen Therapie, welche in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse zeigte und neue Wege in der Behandlung dieses fatalen Tumors ermöglicht.

6. Abbildungen:

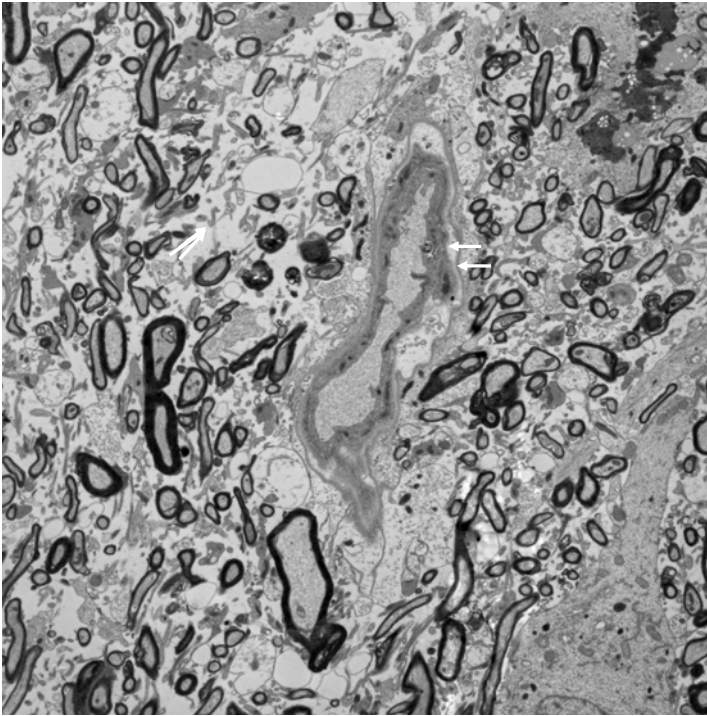


Abbildung 2

Gefäß in ödematös verändertem ZNS aus dem Randbereich des Tumors. Es finden sich zahlreiche Myelinscheiden. Die Endothelien stellen sich im Verhältnis zur Größe des Gefäßes unauffällig dar, es findet sich jedoch eine Aufspaltung der Basalmembran (Pfeile).

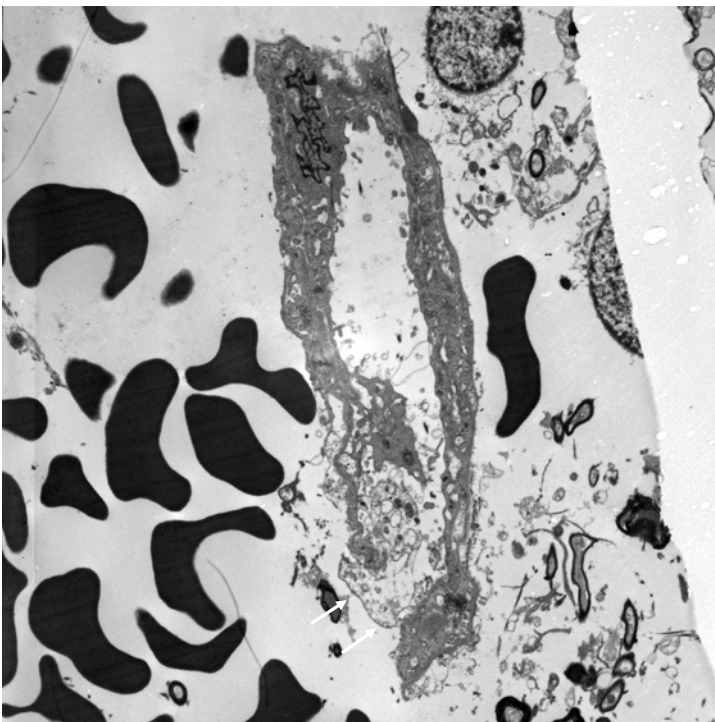


Abbildung 3

Tumorgefäß in deutlich ödematös verändertem Gewebe. Eine größere Lücke in der Endothelschicht als Zeichen der aufgehobenen Blut-Hirn-Schranke (Pfeile). Zahlreiche Erythrozyten finden sich in der Umgebung. Zahlreiche villöse Protuberanzen des Endothels in das Lumen.

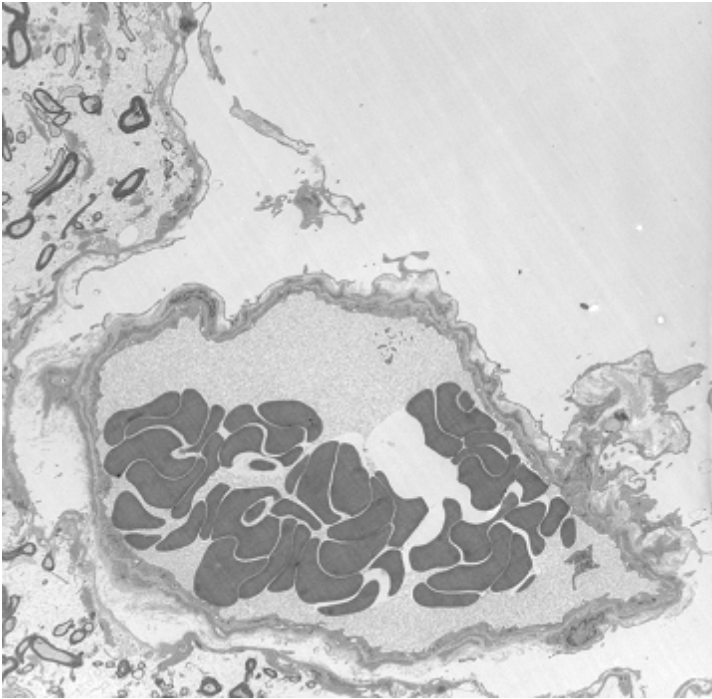


Abbildung 4

Hyperplastisches (glomeruloides) Gefäß in ödematös verändertem ZNS. Trotz der Größe des Gefäßes findet sich lediglich eine einzelne Endothel- und Perizytenlage im Unterschied zu Arteriolen welche eine mehrlagige Muskelschicht aufweisen.



Abbildung 5

Gefäß mit mehreren deutlich vergrößerten Endothelzellen. Das Gefäß ist – wie in Abb. 3- von einer breiten Lage aus ECM umgeben. Die Perizyten haben nur einen geringen Kontakt zu den Endothelzellen.

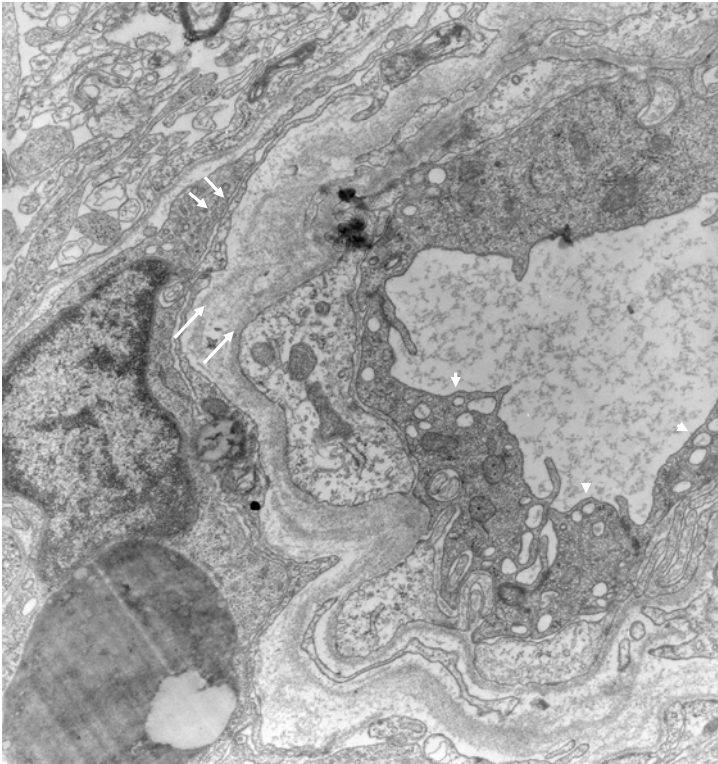


Abbildung 6

Ausschnitt aus einem pathologisch veränderten Tumorgefäß. Deutlich erkennbar die mehrlagige Basalmembran mit deutlicher Distanzierung der Lagen (Pfeile). Zahlreiche Vesikel (Pfeilspitzen) als Zeichen eines erhöhten transzellulären Transports.

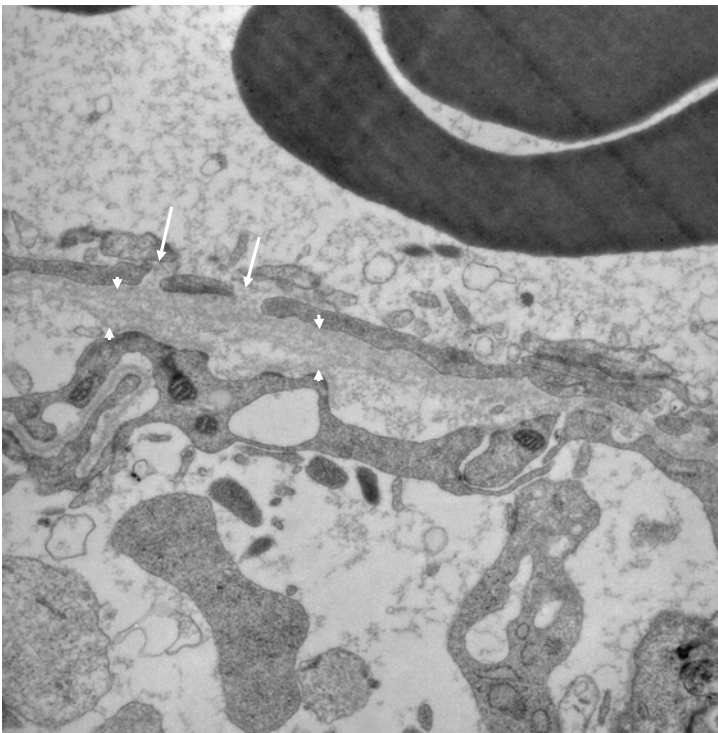


Abbildung 7

Ausschnitt aus der Gefäßwand einer Tumorkapillare. Deutlich sind mehrere Lücken in der Endothelschicht zu erkennen (Pfeile), die Basalmembran (Pfeilspitzen) ist jedoch intakt. Endothelzellen. Das unten im Bild erkennbare Gewebe ist deutlich ödematös verändert.

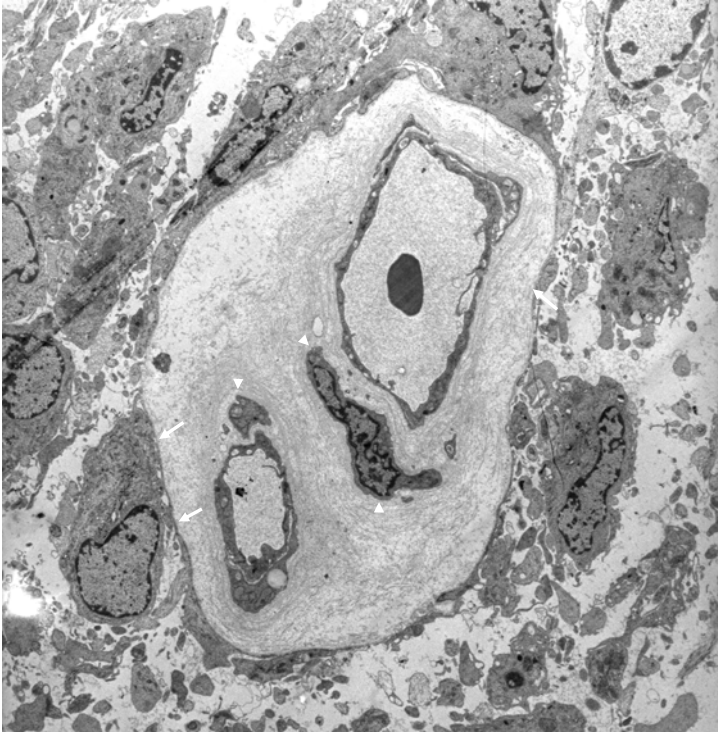


Abbildung 8a

Gefäßkomplex mit mehreren Kapillaren welche von einer gemeinsamen ECM aus kollagenen Fasern umgeben sind. Innerhalb der ECM finden sich perizytäre Zellen (Pfeilspitzen). Den Abschluss zum umgebenden Tumorgewebe bildet eine weitere Basalmembran (Pfeile).

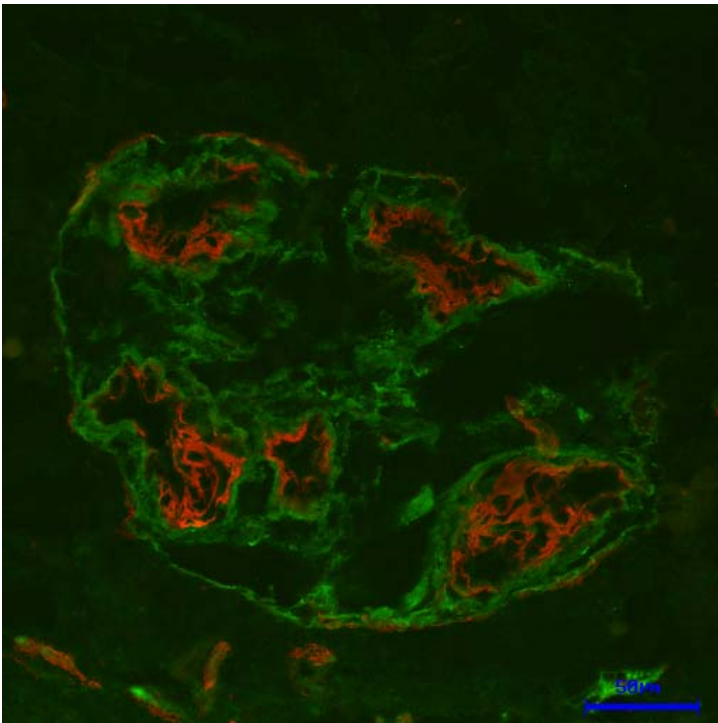


Abbildung 8b

Immunfluoreszenz-Markierung gegen Kollagen I (grün) und Kollagen IV (rot). Gefäßkomplex mit mehreren Kapillaren. Sowohl die einzelnen Gefäße, als auch der gesamte Komplex sind von einer Basalmembran mit Kollagen IV umgeben, die übrige Matrix enthält größere Menge an Kollagen I.

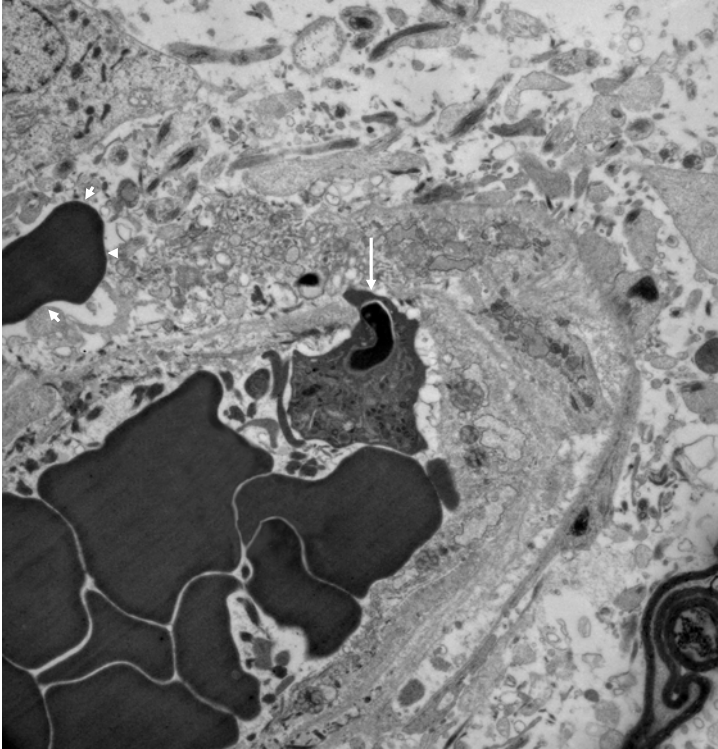


Abbildung 9a

Durchtritt eines Leukozyten durch eine Lücke des Endothels eines Tumorgefäßes (Pfeil). Ein ausserhalb des Gefäßes gelegener Erythrozyt (Pfeilspitzen) weist auf eine Mikroblutung hin.

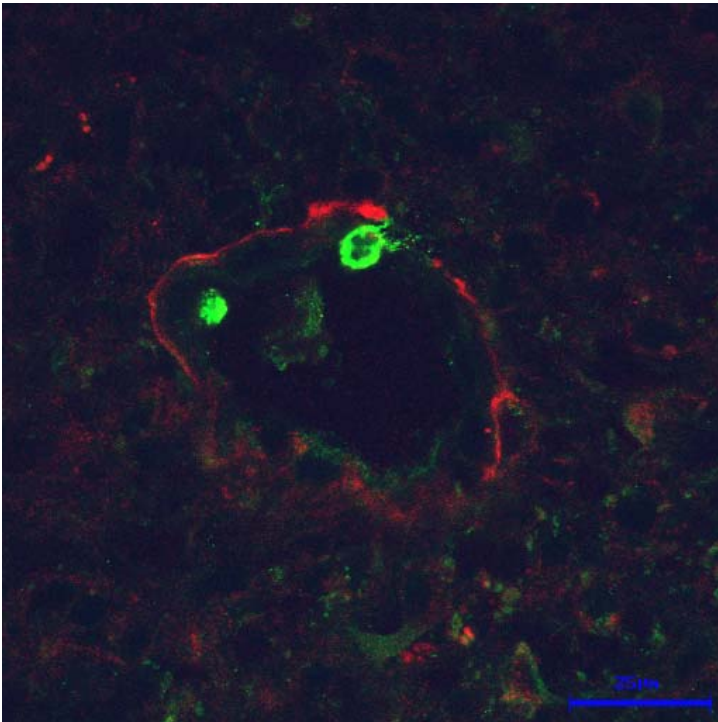
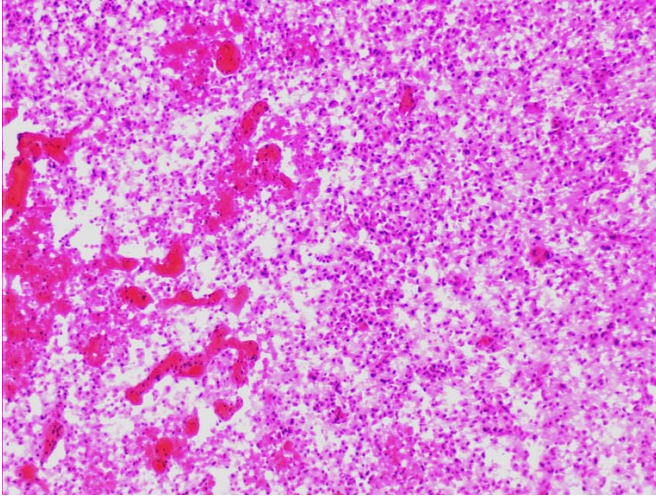


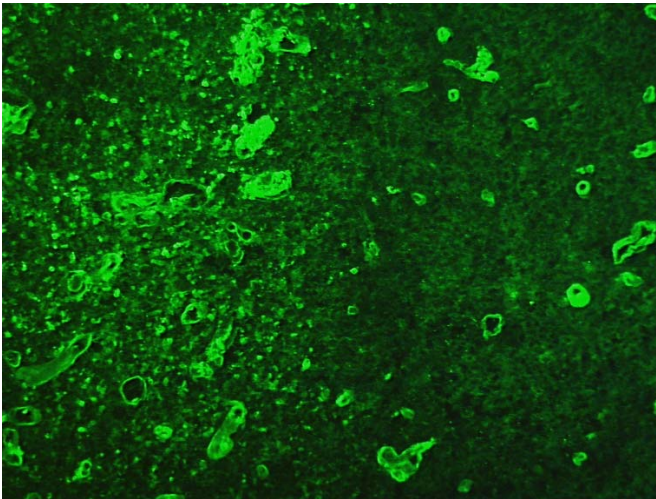
Abbildung 9b

Immunfluoreszenz eines Leukozyten welche ein Tumorgefäß verlässt. Der Leukozyt mit deutlicher Markierung für MMP-9 (grün). Die Perivaskuläre Matrix positiv für TN (rot).

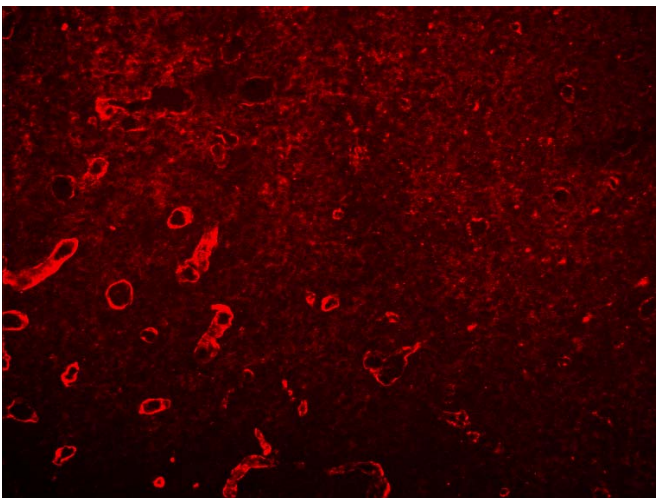


1.1Abbildung 10 a- c

HE-Färbung und Immunfluoreszenz-Markierung gegen Fibronectin (grün) und Tenascin (rot). Im HE-Schnitt deutlich erkennbar eine fokale Nekrose am linken Bildrand.



Die Markierung für Fibronectin zeigt einen vermehrten Hintergrund sowie eine erhöhte Gefäßdichte (auch im HE-Schnitt erkennbar). Die Markierung der einzelnen Gefäße zeigt jedoch keinen quantitativen Unterschied zwischen Nekrose und solidem Tumorgewebe.



Dagegen findet sich ein deutlicher Gradient in der Markierung für Tenascin. Während sich die Gefäße des soliden Tumorgewebes nicht wesentlich von der Umgebenden Matrix unterscheiden, sind die Gefäße innerhalb der Nekrose positiv für TN

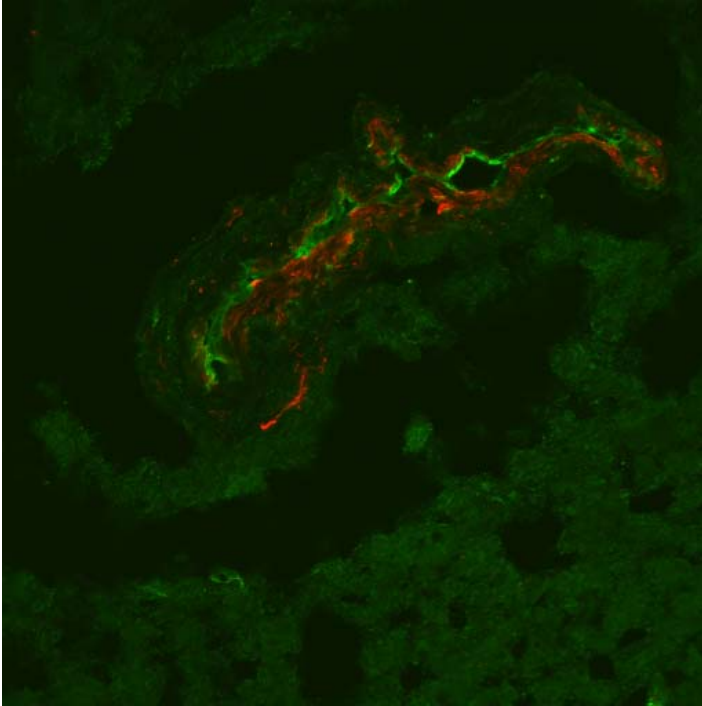


Abbildung 11a

Immunfluoreszenz-Markierung gegen SMA (rot) und Glut-1 (grün). Die Endothelzellen zeigen eine deutlich Markierung für Glut-1 als Zeichen einer intakten Blut-Hirn-Schranke. Sie umgebend finden sich die SMA-positiven Perizyten.

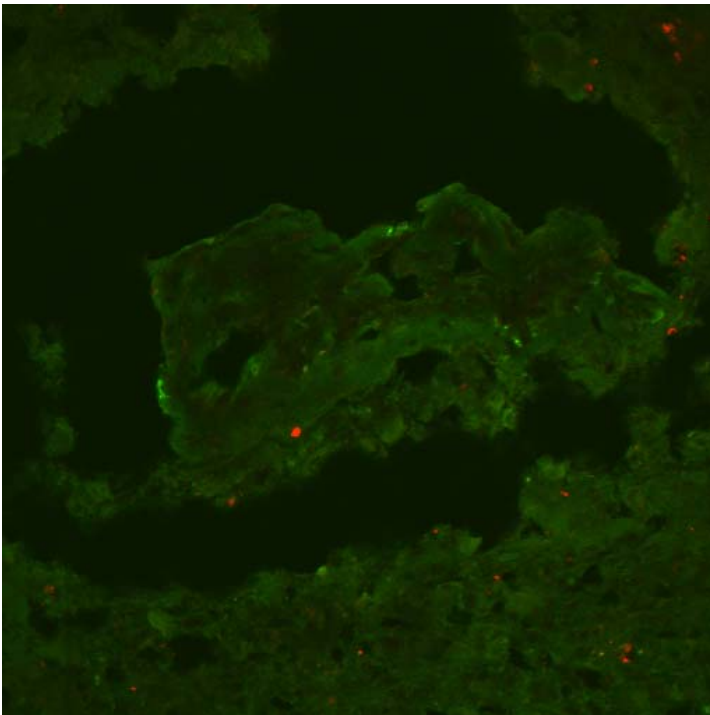


Abbildung 11b

Serienschnitt des Gefäßes aus Abb. 11a. Immunfluoreszenz – Markierung gegen MMP-9 (grün) und MMP-2 (rot). Keines der beiden Proteine hebt sich wesentlich vom Hintergrund ab. Die punktförmigen Markierungen entsprechen Artefakten.

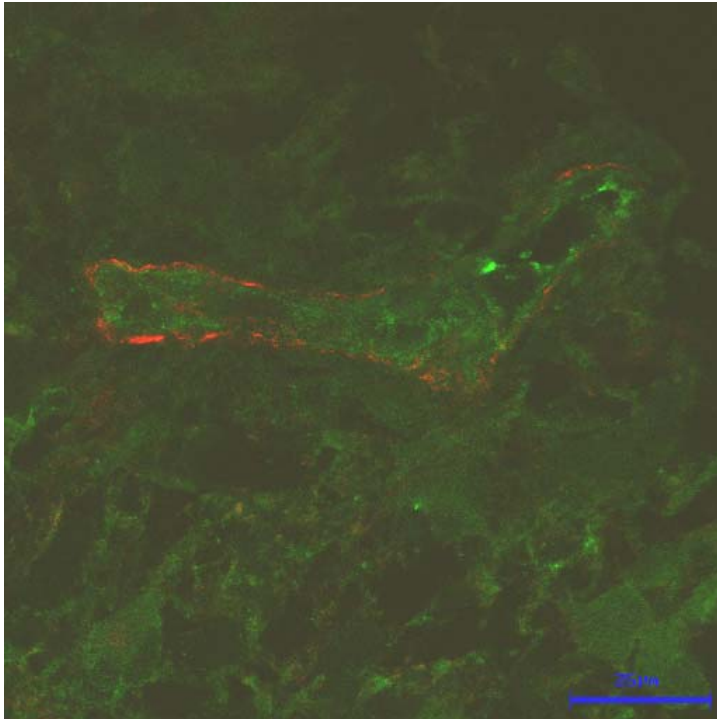


Abbildung 12

Immunfluoreszenz-Markierung gegen Tenascin (rot) und MMP-9 (grün). Die Endothelzellen des Gefäßes zeigen eine Markierung für MMP-9 während die ECM für TN positiv ist.

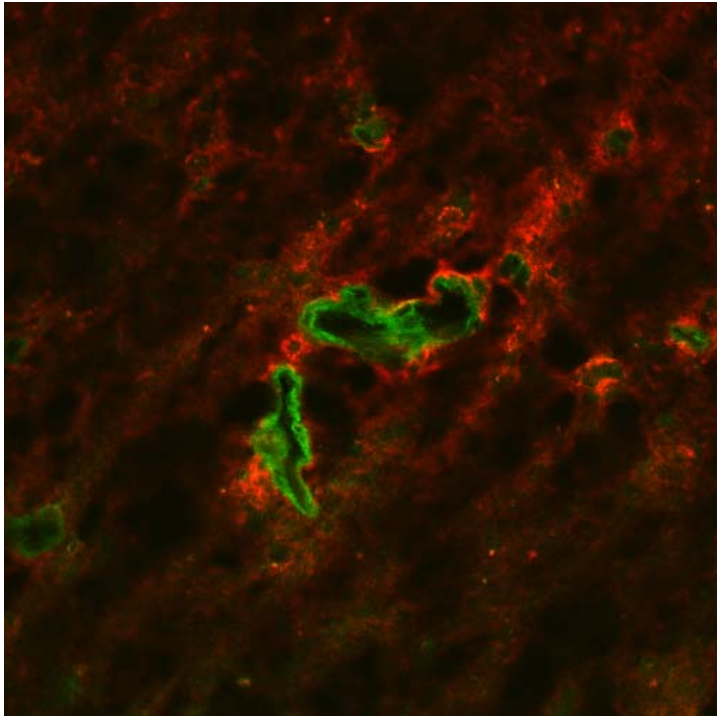


Abbildung 13

Immunfluoreszenz-Markierung gegen Tenascin (rot) und Agrin (grün). Während die endothelialen Anteile der ECM eine deutliche Markierung für Agrin aufweisen, zeigen die tumornahen Anteile der Matrix eine deutliche Markierung für Tenascin.

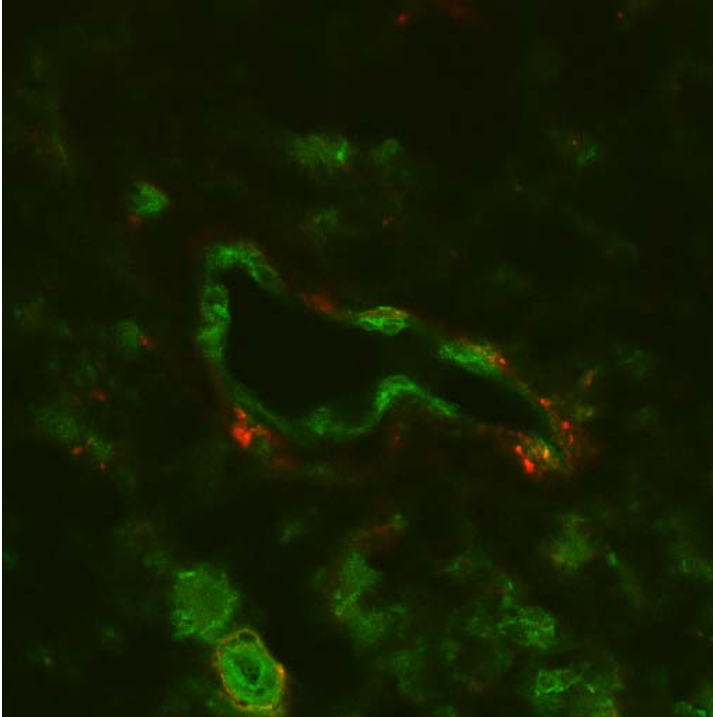


Abbildung 14a

Immunfluoreszenz-Markierung gegen Tenascin (rot) und Agrin (grün). Deutliche Markierung mehrerer Gefäße (Pfeile) aus TU 7 P mit Agrin. Dagegen findet sich nur eine minimale Markierung der ECM für TN.

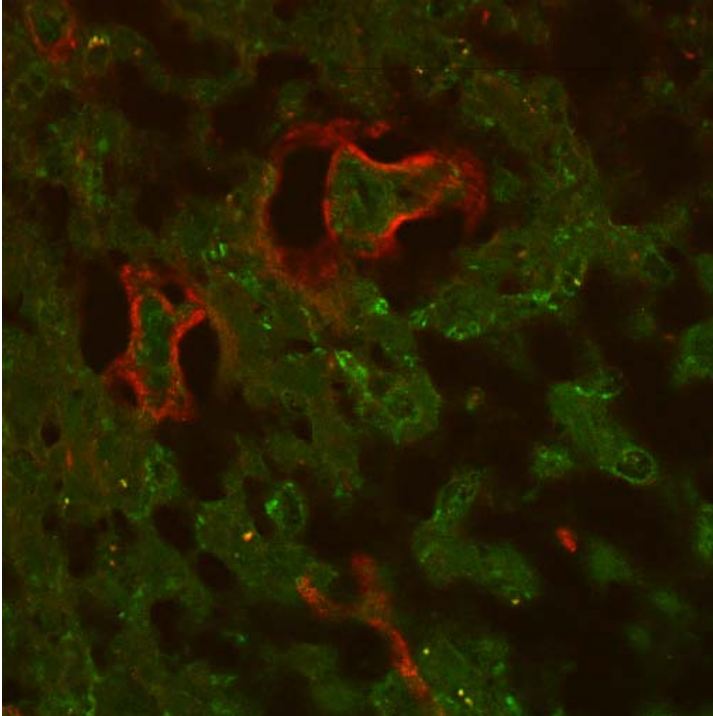


Abbildung 14b

Immunfluoreszenz-Markierung gegen Tenascin (rot) und Agrin (grün). In einem anderen Areal des Tumors aus Abbildung 14a findet sich eine deutliche Markierung der perivaskulären ECM für TN, während die Markierung für Agrin nicht vom Hintergrund abweicht.

7. Literatur

- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J.D. Watson
Molecular Biology of the Cell
Garland Publishing, New York and London 1994
- J. L. Arbiser, M. A. Moses, C. A. Fernandez, N. Ghiso, Y. Cao, N. Klauber, D. Frank, M. Brownlee, E. Flynn, S. Parangi, H. R. Byers und J. Folkman
Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94 (3): 861-866
- O. Arosarena, C. Guerin, H. Brem und J. Laterra
Endothelial differentiation in intracerebral and subcutaneous experimental gliomas
Brain Res. 1994, 640 (1-2): 98-104
- M. Aumailley und N. Smyth
The role of laminins in basement membrane function
J Anat 1998, 193 (Pt 1): 1-21
- A. J. Barber und E. Lieth
Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier
Dev Dyn 1997, 208 (1): 62-74
- L. Bello, G. Carrabba, C. Giussani, V. Lucini, F. Cerutti, F. Scaglione, J. Landre, M. Pluderi, G. Tomei, R. Villani, R. S. Carroll, P. M. Black und A. Bikfalvi
Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo
Cancer Res 2001, 61 (20): 7501-7506
- G. Bellon, T. Caulet, Y. Cam, M. Pluot, G. Poulin, M. Pytlinska und M. H. Bernard
Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas
Acta Neuropathol Berl 1985, 66 (3): 245-252
- G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb und D. Hanahan
Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis
Nat Cell Biol 2000, 2 (10): 737-744
- M. Bertossi, D. Virgintino, E. Maiorano, M. Occhiogrosso und L. Roncali
Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues
Ultrastruct Pathol. 1997, 21 (1): 41-49

- S. Bolz, C. L. Farrell, K. Dietz und H. Wolburg
Subcellular distribution of glucose transporter (GLUT-1) during development of the blood-brain barrier in rats
Cell Tissue Res 1996, 284 (3): 355-365
- M. Bond, R. P. Fabunmi, A. H. Baker und A. C. Newby
Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B
FEBS Lett 1998, 435 (1): 29-34
- A. A. Book, S. Ranganathan, R. Abounader, E. Rosen und J. Laterra
Scatter factor/hepatocyte growth factor gene transfer increases rat blood-glioma barrier permeability
Brain Res 1999, 833 (2): 173-180
- S. S. Brem, R. S. Cotran und M. J. Folkman
Angiogenesis in brain tumors: a quantitative histologic study
Surg Forum 1974, 25 (0): 462-464
- D. J. Brooks, R. P. Beaney, A. A. Lammertsma, K. L. Leenders, P. L. Horlock, M. J. Kensett, J. Marshall, D. G. Thomas und T. Jones
Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability using rubidium-82 and positron emission tomography
J Cereb Blood Flow Metab. 1984, 4 (4): 535-545
- D. J. Carey
Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins
Annu Rev Physiol 1991, 53: 161-177
- B. Carnemolla, P. Castellani, M. Ponassi, L. Borsi, S. Urbini, G. Nicolo, A. Dorcaratto, G. Viale, G. Winter, D. Neri und L. Zardi
Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody
Am J Pathol 1999, 154 (5): 1345-1352
- B. L. Coomber, P. A. Stewart, K. Hayakawa, C. L. Farrell und R. F. Del Maestro
Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect
J Neurooncol. 1987, 5 (4): 299-307

- D. W. Copertino, G. M. Edelman und F. S. Jones
Multiple promoter elements differentially regulate the expression of the mouse tenascin gene
Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94 (5): 1846-1851
- D. J. Cox, G. J. Pilkington und P. L. Lantos
The fine structure of blood vessels in ethylnitrosourea-induced tumours of the rat nervous system: with special reference to the breakdown of the blood-brain barrier
Br J Exp Pathol. 1976, 57 (4): 419-430
- R. Dermietzel, D. Krause, M. Kremer, C. Wang und B. Stevenson
Pattern of glucose transporter (Glut 1) expression in embryonic brains is related to maturation of blood-brain barrier tightness
Dev Dyn. 1992, 193 (2): 152-163
- A. K. Dinda, C. Sarkar, S. Roy, K. Kharbanda, M. Mathur, A. K. Khosla und A. K. Banerji
A transmission and scanning electron microscopic study of tumoral and peritumoral microblood vessels in human gliomas
1993 16 (2): 149-158
- G. Donato, A. Lavano, G. Volpentesta, D. Chirchiglia, C. D. Signorelli und L. Tucci
Expression of tenascin in astrocytic tumours: too much ado about nothing?
J Neurol Neurosurg Psychiatry 1997, 63 (3): 413
- B. Enholm, K. Paavonen, A. Ristimäki, V. Kumar, Y. Gunji, J. Klefstrom, L. Kivinen, M. Laiho, B. Olofsson, V. Joukov, U. Eriksson und K. Alitalo
Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia
Oncogene 1997, 14 (20): 2475-2483
- S. Esser, K. Wolburg, H. Wolburg, G. Breier, T. Kurzchalia und W. Risau
Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro
J Cell Biol, 1998 140 (4): 947-959
- M. Fujimura, Y. Gasche, Y. Morita-Fujimura, J. C. Copin, M. Kawase, J. Massengale und P. H. Chan
Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction
J Cereb Blood Flow Metab 1999, 19 (9): 1020-1028

- H. Gerhardt, und C. Betsholtz
Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis
Cell Tissue Res 2003, 314 (1): 15-23
- D. Z. Gerhart, R. J. LeVasseur, M. A. Broderius und L. R. Drewes
Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry
J Neurosci Res. 1989 22 (4): 464-472
- D. S. Grant, K. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin und H. K. Kleinman
Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro
Cell 1989, 58 (5): 933-943
- C. Guerin, J. Laterra, R. H. Hruban, H. Brem, L. R. Drewes und G. W. Goldstein
The glucose transporter and blood-brain barrier of human brain tumors
Ann Neurol. 1990, 28 758-765
- C. Guerin, J. E. Wolff, J. Laterra, L. R. Drewes, H. Brem und G. W. Goldstein
Vascular differentiation and glucose transporter expression in rat gliomas: effects of steroids
Ann Neurol. 1992a, 31 (5): 481-487
- C. Guerin, J. Laterra, L. R. Drewes, H. Brem und G. W. Goldstein
Vascular expression of glucose transporter in experimental brain neoplasms
Am J Pathol. 1992b, 140 (2): 417-425
- D. Hanahan
Cell Biology - Signaling vascular morphogenesis und maintenance
Science 1997, 277 (5322): 48-50
- D. Hanahan und J. Folkman
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis
Cell 1996, 86 (3): 353-364
- S. I. Harik, R. N. Kalaria, L. Andersson, P. Lundahl und G. Perry
Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions
J Neurosci. 1990, 10 (12): 3862-3872

- S. I. Harik und U. Roessmann
The erythrocyte-type glucose transporter in blood vessels of primary and metastatic brain tumors
Ann Neurol. 1991, 29 487-491
- J. D. Heiss, E. Papavassiliou, M. J. Merrill, L. Nieman, J. J. Knightly, S. Walbridge, N. A. Edwards und E. H. Oldfield
Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor
J Clin Invest 1996, 98 (6): 1400-1408
- C. Hernandez, R. Burgos, A. Canton, J. Garcia-Arumi, R. M. Segura und R. Simo
Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study
Diabetes Care 2001, 24 (3): 516-521
- A. Hirano und T. Matsui
Vascular structures in brain tumors
Hum Pathol. 1975, 6 (5): 611-621
- J. Holash, P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos und S. J. Wiegand
Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF
Science 1999, 284 (5422): 1994-1998
- T. Hoshino
A commentary on the biology and growth kinetics of low-grade and high-grade gliomas
J Neurosurg 1984, 61 (5): 895-900
- Y. Ji, S. K. Powers, J. T. Brown und R. Miner
Characterization of the tumor invasion area in the rat intracerebral glioma
J. Neuro-Oncol. 1996, 30: 189-197
- T. B. Johannesen, J. Norum, K. Lote, D. Scheie und H. Hirschberg
A cost-minimising analysis of standard radiotherapy and two experimental therapies in glioblastoma
Radiother Oncol 2002, 62 (2): 227-231
- F. S. Jones und P. L. Jones
The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling
Dev Dyn 2000, 218 (2): 235-259

- P. L. Jones, J. Crack und M. Rabinovitch
 Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth
 J Cell Biol 1997, 139 (1): 279-293
- R. N. Kalaria, S. A. Gravina, J. W. Schmidley, G. Perry und S. I. Harik
 The glucose transporter of the human brain and blood-brain barrier
 Ann Neurol. 1988, 24 (6): 757-764
- T. S. Kim und Y. B. Kim
 Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma
 J Korean Med Sci. 1999, 14 (3): 263-270
- M. Kirsch, J. Strasser, R. Allende, L. Bello, J. Zhang und P. M. Black
 Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo
 Cancer Res. 1998, 58 (20): 4654-4659
- P. Kleihues, D. N. Louis, B. W. Scheithauer, L. B. Rorke, G. Reifenberger, P. C. Burger und W. K. Cavenee
 The WHO classification of tumors of the nervous system
 J Neuropathol Exp Neurol 2002, 61 (3): 215-225; Disk. 226-229
- P. Kunkel, U. Ulbricht, P. Bohlen, M. A. Brockmann, R. Fillbrandt, D. Stavrou, M. Westphal und K. Lamszus
 Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2
 Cancer Res 2001, 61 (18): 6624-6628
- D. W. LaFleur, J. Chiang, J. A. Fagin, S. M. Schwartz, P. K. Shah, K. Wallner, J. S. Forrester und B. G. Sharifi
 Aortic smooth muscle cells interact with tenascin-C through its fibrinogen-like domain
 J Biol Chem 1997, 272 (52): 32798-32803
- D. W. LaFleur, J. A. Fagin, J. S. Forrester, S. A. Rubin und B. G. Sharifi
 Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of rat tenascin. Platelet-derived growth factor-BB markedly stimulates expression of spliced variants of tenascin mRNA in arterial smooth muscle cells
 J Biol Chem 1994, 269 (32): 20757-20763

- K. Lampert, U. Machein, M. R. Machein, W. Conca, H. H. Peter und B. Volk
Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in
human brain tumors
Am J Pathol. 1998 153 (2): 429-437
- S. P. Leon, R. D. Folkerth und P. M. Black
Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial
brain tumors
Cancer 1996, 77 (2): 362-372
- S. Liebner, A. Fischmann, G. Rascher, F. Duffner, E. H. Grote, H. Kalbacher und
H. Wolburg
Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are
altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme
Acta Neuropathol (Berl) 2000, 100 (3): 323-331
- E. Lieth, A. Barber und T. W. Gardner
Astrocyte expression of brain microvascular agrin-related protein is
induced by endothelial cells.
Mol Biol Cell 1995, 6 337 a
- D. M. Long
Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant
brain tumors
J Neurosurg 1970, 32 (2): 127-144
- S. A. Luse
Electron microscopic studies of brain tumors
Neurology 1960, 10 (10): 881-905
- A. Mäenpää, P. E. Kovanen, A. Paetau, J. Jääskeläinen und T. Timonen
Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in
gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas
Acta Neuropathol (Berl). 1997, 94 (3): 216-225
- P. E. McKeever, S. E. Fligel, J. Varani, J. L. Hudson, D. Smith, R. L. Castle und
J. P. McCoy
Products of cells cultured from gliomas. IV. Extracellular matrix proteins of
gliomas
Int J Cancer 1986, 37 (6): 867-874
- P. E. McKeever, J. Varani, S. M. Papadopoulos, M. Wang und J. P. McCoy
Products of cells from gliomas: IX. Evidence that two fundamentally
different mechanisms change extracellular matrix expression by gliomas
J Neurooncol 1995, 24 (3): 267-280

- U. J. McMahan
The agrin hypothesis
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1990, 55 407-418
- S. Nagamatsu, H. Sawa, A. Wakizaka und T. Hoshino
Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors
J Neurochem 1993, 61 2048-2053
- B. S. Nielsen, M. Sehested, L. Kjeldsen, N. Borregaard, J. Rygaard und K. Dano
Expression of matrix metalloprotease-9 in vascular pericytes in human breast cancer
Lab Invest. 1997, 77 (4): 345-355
- I. Nir, D. Levanon und G. Iosilevsky
Permeability of blood vessels in experimental gliomas: uptake of ^{99m}Tc-glucoheptonate and alteration in blood-brain barrier as determined by cytochemistry and electron microscopy
Neurosurgery 1989, 25 (4): 523-531
- S. Nishio, M. Ohta, M. Abe und K. Kitamura
Microvascular abnormalities in ethylnitrosourea (ENU)-induced rat brain tumors: structural basis for altered blood-brain barrier function
Acta Neuropathol (Berl). 1983, 59 (1): 1-10
- T. Nishioka, Y. Oda, Y. Seino, T. Yamamoto, N. Inagaki, H. Yano, H. Imura, R. Shigemoto und H. Kikuchi
Distribution of the glucose transporters in human brain tumors
Cancer Res. 1992, 52 (14): 3972-3979
- R. M. Nitkin, M. A. Smith, C. Magill, J. R. Fallon, Y. M. Yao, B. G. Wallace und U. J. McMahan
Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ
J Cell Biol 1987, 105 (6 Pt 1): 2471-2478.
- T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse und S. Tsukita
Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice
J Cell Biol 2003, 161 (3): 653-660
- T. Orita, T. Nishizaki, T. Kamiryo, H. Aoki, K. Harada und T. Okamura
The microvascular architecture of human malignant glioma. A scanning electron microscopic study of a vascular cast
Acta Neuropathol (Berl) 1988, 76 (3): 270-274

- R. Paul, S. Lorenzi, U. Koedel, B. Sporer, U. Vogel, M. Frosch und H. W. Pfister
Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis
Ann Neurol 1998, 44 (4): 592-600
- K. H. Plate
Mechanisms of angiogenesis in the brain
J Neuropathol Exp Neurol 1999, 58 (4): 313-320
- K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich, H. D. Mennel und W. Risau
Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms
Int J Cancer 1994, 59 (4): 520-529
- K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich und W. Risau
Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo
Nature 1992, 359 (6398): 845-848
- K. H. Plate und H. D. Mennel
Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors
Exp Toxicol Pathol 1995 47 (2-3): 89-94
- K. H. Plate und W. Risau
Angiogenesis in malignant gliomas
Glia 1995 15 (3): 339-347
- G. Rascher, A. Fischmann, S. Kroger, F. Duffner, E. H. Grote und H. Wolburg
Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin
Acta Neuropathol (Berl) 2002, 104 (1): 85-91
- P. Riva, G. Franceschi, M. Frattarelli, S. Lazzari, N. Riva, G. Giuliani, M. Casi, G. Sarti, G. Guiducci, G. Giorgetti, R. Gentile, M. Santimaria, E. Jermann und H. R. Maeke
Loco-regional radioimmunotherapy of high-grade malignant gliomas using specific monoclonal antibodies labeled with ⁹⁰Y: a phase I study
Clin Cancer Res 1999, 5 (10 Suppl): 3275s-3280s
- S. Roy, und C. Sarkar
Ultrastructural study of micro-blood vessels in human brain tumors and peritumoral tissue
J Neurooncol 1989 7 (3): 283-292

- J. M. Rozental, J. D. Cohen, M. P. Mehta, R. L. Levine, J. M. Hanson und R. J. Nickles
 Acute changes in glucose uptake after treatment: the effects of carmustine (BCNU) on human glioblastoma multiforme
 J Neurooncol 1993, 15 (1): 57-66
- T. Sakai, M. Ohta, Y. Furukawa, Y. Saga, S. Aizawa, H. Kawakatsu und M. Saito
 Tenascin-C induction by the diffusible factor epidermal growth factor in stromal-epithelial interactions
 J Cell Physiol 1995, 165 (1): 18-29
- R. Sawaya, Y. Go, A. P. Kyritsis, J. Uhm, B. Venkaiah, S. Mohanam, Z. L. Gokaslan und J. S. Rao
 Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase during tumor growth in vivo
 Biochem Biophys Res Commun 1998, 251 (2): 632-636
- S. D. Shapiro
 Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences
 Curr Opin Cell Biol 1998, 10 (5): 602-608
- B. G., Sharifi, D. W. LaFleur, C. J. Pirola, J. S. Forrester und J. A. Fagin
 Angiotensin II regulates tenascin gene expression in vascular smooth muscle cells
 J Biol Chem 1992, 267 (33): 23910-23915
- R. R. Shivers, C. L. Edmonds und R. F. Del Maestro
 Microvascular permeability in induced astrocytomas and peritumor neuropil of rat brain. A high-voltage electron microscope-protein tracer study
 Acta Neuropathol (Berl). 1984, 64 (3): 192-202
- P. A. Stewart, K. Hayakawa, C. L. Farrell und R. F. Del Maestro
 Quantitative study of microvessel ultrastructure in human peritumoral brain tissue. Evidence for a blood-brain barrier defect
 J Neurosurg. 1987, 67 (5): 697-705
- P. A. Stewart, K. Hayakawa, E. Hayakawa, C. L. Farrell und R. F. Del Maestro
 A quantitative study of blood-brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model
 Acta Neuropathol (Berl). 1985, 67 (1-2): 96-102

- J. Thyberg und A. Hultgardh-Nilsson
 Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently
 Cell Tissue Res 1994, 276 (2): 263-271
- S. Tsukita, M. Furuse und M. Itoh
 Multifunctional strands in tight junctions
 Nat Rev Mol Cell Biol 2001, 2 (4): 285-293
- P. Tunggal, N. Smyth, M. Paulsson und M. C. Ott
 Laminins: structure and genetic regulation
 Microsc Res Tech 2000, 51 (3): 214-227
- K. A. Venström und L. F. Reichardt
 Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system
 Faseb J 1993, 7 (11): 996-1003
- N. A. Vick, und D. D. Bigner
 Microvascular abnormalities in virally-induced canine brain tumors. Structural bases for altered blood-brain barrier function
 J Neurol Sci. 1972, 17 (1): 29-39
- D. Virgintino, D. Robertson, P. Monaghan, M. Errede, M. Bertossi, G. Ambrosi und L. Roncali
 Glucose transporter GLUT1 in human brain microvessels revealed by ultrastructural immunocytochemistry
 J Submicrosc Cytol Pathol. 1997, 29 (3): 365-370
- D. Vitolo, P. Paradiso, S. Uccini, L. P. Ruco und C. D. Baroni
 Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: Relation to angiogenesis and spread
 Histopathology 1996, 28 (6): 521-528
- A. W. Vorbrod, D. H. Dobrogowska und M. Tarnawski
 Immunogold study of interendothelial junction-associated and glucose transporter proteins during postnatal maturation of the mouse blood-brain barrier
 J Neurocytol 2001, 30 (8): 705-716
- T. H. Vu, and Z. Werb
 Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology
 Genes Dev 2000, 14 (17): 2123-2133

- J. D. Waggener und J. L. Beggs
 Vasculature of Neural Neoplasms
 Adv Neurol. 1976, 15 (L): 27-49
- D. Wang, H. J. Huang, A. Kazlauskas und W. K. Cavenee
 Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase
 Cancer Res 1999, 59 (7): 1464-1472
- H. Wang und J. A. Keiser
 Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1
 Circ Res. 1998, 83 (8): 832-840
- R. O. Weller, M. Foy und S. Cox
 The development and ultrastructure of the microvasculature in malignant Gliomas
 Neuropath. and appl. Neurobiol 1977, 3 307-322
- R. O. Weller und R. L. Griffin
 Transmission and scanning electron microscopy of the microcirculation of gliomas
 Adv Neurol. 1978, 20 (L): 569-575
- P. Wesseling, D. J. Ruiter und P. C. Burger
 Angiogenesis in brain tumors; Pathobiological and clinical aspects
 Journal Of Neuro Oncology 1997, 32 (3): 253-265
- P. Wesseling, J. A. van der Laak, M. Link, H. L. Teepen und D. J. Ruiter
 Quantitative analysis of microvascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy
 Hum Pathol 1998, 29 (4): 352-358
- J. Westermarck und V. M. Kähäri
 Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion
 FASEB 1999, 13 (8): 781-792
- H. Wolburg
 Die Zellen des Nervensystems und ihre Verknüpfungen.
 in J. Pfeiffer und J. M. Schröder: Neuropathologie 2001
 Springer, Heidelberg
 1-

- H. Wolburg, S. Liebner und A. Lippoldt
Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions
Methods Mol Med 2003, 89 51-8966.
- H. Wolburg und A. Lippoldt
Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation
Vascul Pharmacol 2002 38 (6): 323-337
- H. Wolburg, J. Neuhaus, U. Kniessel, B. Krauss, E. M. Schmid, M. Ocalan, C. Farrell und W. Risau
Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes
J Cell Sci 1994, 107 (Pt 5): 1347-1357
- H. Wolburg und W. Risau
Formation of the blood-brain barrier. in
- D. Zagzag, D. R. Friedlander, J. Dosik, S. Chikramane, W. Chan, M. A. Greco, J. C. Allen, K. Dorovini-Zis und M. Grumet
Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro
Cancer Res 1996, 56 (1): 182-189
- D. Zagzag, D. R. Friedlander, D. C. Miller, J. Dosik, J. Cangiarella, M. Kostianovsky, H. Cohen, M. Grumet und M. A. Greco
Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis
Cancer Res 1995, 55 (4): 907-914
- J. J. Zappia und G. T. Wolf
Cervical metastatic glioblastoma multiforme
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1992, 118 (7): 755-756

8. Danksagungen

Ich möchte als Erstes Herrn Prof. Dr. Hartwig Wolburg dafür danken, dass er mir das Thema stellte und mir während der Zeit fachlich und menschlich stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Stefan Liebner danke ich für unzählige Tips bei der praktischen Arbeit und für die immer gute Laune die er in das Labor brachte; Gesa Rascher danke ich für die Hilfe bei der Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie die mir die Arbeit sehr erleichterte; Holger Gerhard für die Hilfe, vor allem in der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder und für das Verständnis und Interesse für Perizyten, das er bei mir wecken konnte.

Jörg-Mario Beiter danke ich für viele interessante Gespräche und schöne Stunden in Labor und Freizeit.

Karen Wolburg-Buchholz, Eva-Maria Knittel und Kristin Möckel die das Labor zusammenhielten.

Auch ausserhalb des Labors gibt es viele Menschen, denen ich danken möchte: Zunächst ist hier meine Frau Katarzyna zu nennen, die mich stets ermutigte und unterstützte, und deren Liebe mich jeden Tag aufs Neue glücklich macht.

Meine Eltern, ohne die ich nie dort angekommen wäre, wo ich jetzt bin, danke ich für die unendliche Hilfe und Liebe. Meinem Bruder Christian danke ich für die Hartnäckigkeit, mit der er mich in Zeiten geringerer Motivation antrieb.

Meinen Schwiegereltern und meiner Schwägerin danke ich für die liebevolle Aufnahme in die Familie.

Meinem Patenonkel Hartmut Vergin, danke ich, dass er mein wissenschaftliches Interesse geweckt und genährt hat.

Leider kann ich hier nicht allen Menschen persönlich danken, die mir vor und während meiner Dissertation geholfen haben. All denen die ich nicht erwähnt habe sage ich deshalb: Vielen Dank!

7. Lebenslauf

geb. am 02. Aug 1992	als Sohn von Michael Fischmann und Ehrentraut Roswitha Fischmann geb. Rossnagel
Aug 1979 – Juli 1983	August Lämmle Grundschule Kusterdingen
Aug. 1983 – Juli 1992	Kepler Gymnasium Tübingen
Juli 1992	Abitur
August 1992 - Okt 1993	Zivildienst Rettungsdienst des Roten Kreuz Tübingen
Jan. 1993 – März 1993	Pflegepraktikum Orthopädische Universitätsklinik Tübingen
April 1994 - Sept. 1996	Studium der Humanmedizin Phillips-Universität Marburg
Okt. 1996 - Nov. 2000	Studium der Humanmedizin Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Okt. 1999 - Jan. 2000	Praktisches Jahr Abteilung für Radiologische Diagnostik Universitätsklinik Tübingen
Feb. 2000 - Okt 2002	Praktisches Jahr University of Durban, Südafrika Department of Surgery (allgemeine Chirurgie) Department of Internal Medicine (Innere Medizin)
23. Nov. 2000	3. Staatsexamen
Jan. 2001 - Juni 2002	Arzt im Praktikum Abteilung für Radiologische Diagnostik Universitätsklinik Tübingen
Seit Juli 2002	Assistenzarzt Abteilung für Radiologische Diagnostik Universitätsklinik Tübingen