

Aus der Abteilung Neuropathologie  
(Prof. Dr. med. Wolfgang Brück)  
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Quantitative Untersuchung der subkortikalen Neurone  
im Multiple-Sklerose-Modell  
der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis  
bei *Callithrix-jacchus*-Marmosetten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Susanne Elisabeth Berger  
aus  
Erlangen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Brück

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Flügel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Multiple Sklerose .....	1
1.1.1	Vorkommen und geographische Verteilung .....	1
1.1.2	Ätiologie .....	1
1.1.3	Klinische Symptome .....	2
1.1.4	Diagnose und Therapie .....	3
1.2	Die Pathologie der Multiplen Sklerose .....	4
1.2.1	Kennzeichen der MS und allgemeine Pathologie.....	4
1.2.2	Histopathologische Veränderungen .....	5
1.2.3	Pathogenese.....	6
1.2.4	Pathologie der grauen Substanz .....	7
1.2.5	Neuronale Veränderungen in der weißen Substanz bei MS .....	9
1.2.6	Charakteristika der Nervenzellen in der weißen Substanz.....	9
1.3	Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) .....	11
1.3.1	Die EAE im Allgemeinen.....	11
1.3.2	Die EAE bei <i>Callithrix-jacchus</i> -Marmosetten (Weißbüschelaffen) .....	13
1.4	Fragestellung .....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Induktion der Marmosetten-EAE.....	16
2.2	Histopathologie .....	17
2.2.1	Aufarbeitung des Gewebes .....	17
2.2.2	Histologische Färbungen.....	17
2.2.2.1	Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung .....	17
2.2.2.2	LFB/PAS-Färbung .....	17
2.2.2.3	Bielschowsky-Silberimprägnation .....	18
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen .....	18
2.2.3.1	Grundlagen.....	18
2.2.3.2	Prinzip der LAB-Methode .....	19
2.2.3.3	Prinzip der APAAP-Methode .....	19
2.2.3.4	Mit Antikörpern detektierte Antigene .....	20
2.2.3.4.1	Myelin-basisches Protein (MBP).....	20
2.2.3.4.2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2).....	20
2.2.3.4.3	Neuronenspezifisches nukleäres Antigen (NeuN) .....	20
2.2.3.4.4	Myeloid-related protein 14 (MRP14) .....	21
2.2.3.5	Vorbehandlung der histologischen Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen .....	21

2.2.3.5.1	Antigendemaskierung .....	21
2.2.3.5.2	Blockade der endogenen Peroxidase .....	22
2.2.3.6	Durchführung der LAB-Methode .....	22
2.2.3.7	Durchführung der Doppelfärbung (LAB- und APAAP-Methode) .....	23
<b>2.3</b>	<b>Auswertung der Histopathologie .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Qualitativ .....	25
2.3.2	Quantitativ .....	26
2.3.2.1	MAP2-Färbung .....	27
2.3.2.2	NeuN/MAP2-Doppelfärbung .....	28
2.3.2.3	MRP14-Färbung .....	28
<b>2.4</b>	<b>Datenauswertung und Statistik .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>30</b>
2.5.1	Histologische Färbungen .....	30
2.5.1.1	Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung .....	30
2.5.1.2	Bielschowsky-Silberimprägnation .....	30
2.5.1.3	Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff(LFB-PAS)-Färbung .....	30
2.5.2	Immunhistochemische Färbungen (LAB- und APAAP-Methode) .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	Untersuchte Marmosetten .....	34
3.2	Morphologische Charakterisierung der Läsionen und der normal erscheinenden weißen Substanz .....	35
3.3	Variable Makrophagendichte in demyelinisierten Läsionen .....	37
3.4	Untersuchung der MAP2-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz .....	38
3.4.1	Ähnliche Morphologie MAP2-positiver Nervenzellen in Kontrollen und in EAE-Tieren .....	38
3.4.2	Ähnliche Dichte MAP2-positiver Nervenzellen in Kontrollen und normal erscheinender weißer Substanz in EAE-Tieren .....	39
3.4.3	Erhöhte Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen in der demyelinisierten weißen Substanz im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren .....	40
3.5	Untersuchung der NeuN-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz .....	41
3.5.1	Ähnliche Morphologie NeuN-positiver Nervenzellen in Kontrollen und in EAE-Tieren .....	41
3.5.2	Ähnliche Dichte NeuN-positiver Zellen in Kontrollen und in normal erscheinender weißer Substanz in den EAE-Tieren .....	42

3.5.3	Ähnliche Dichte der NeuN-positiven Nervenzellen in der demyelinisierten weißen Substanz im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren .....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen in den Läsionen gegenüber der normal erscheinenden weißen Substanz bei gleichwertiger Dichte NeuN-positiver Zellen in beiden Arealen .....	44
4.1.1	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) .....	44
4.1.2	Neuronenspezifisches nukleäres Antigen (NeuN).....	47
4.2	Keine Assoziation MRP14-positiver Makrophagen mit der Dichte MAP2- und NeuN-positiver Zellen .....	49
4.3	Ähnliche Dichte der Nervenzellen in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere und der weißen Substanz der Kontrolltiere.....	50
4.4	Kein eindeutiger Hinweis auf Neurogenese oder neuronalen Verlust in den Läsionen .....	51
4.5	Schlussfolgerung .....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADEM	akute disseminierte Enzephalomyelitis
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP-Methode	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode
APCs	<i>antigen presenting cells</i> (Antigen-präsentierende Zellen)
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund adjuvans</i> (Komplettes Freund'sches Adjuvans)
CNPase	<i>cyclic nucleotide phosphodiesterase</i> (Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FCS	<i>fetal calf-serum</i> (Fetales Kälberserum)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
IgG	Immunglobulin Typ G
LAB	<i>labelled Avidin-Biotin technique</i> (markierte Avidin-Biotin-Technik)
LFB	Luxol-Fast-Blue
LPS	Lipopolysaccharid
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2

MBP	Myelin-basisches Protein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupt Histokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
rMOG	rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
rrMOG	rekombinantes Ratten-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRP14	<i>myeloid-related protein 14</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NAWM	<i>normal appearing white matter</i> (normal erscheinende weiße Substanz)
NeuN	Neuronenspezifisches nukleäres Antigen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOS	NO(Stickstoffmonoxid)-Synthase
PAS	<i>periodic-acid-Schiff</i> (Perjodsäure-Schiff-Reagenz)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	peripheres Nervensystem
POX	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat-Lösung
TBS	TRIS-buffered saline (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TSA	<i>Tyramide Signal Amplifikation</i>
TUNEL	<i>terminal dUTP nick-end labeling</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Vorkommen und geographische Verteilung

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neurologische Erkrankung, die im jungen Erwachsenenalter zu chronischer Behinderung führt. Die höchste Prävalenz der MS besteht in Nordeuropa, Nordamerika und Südastralien, wo etwa 0,1 % der Bevölkerung an MS erkrankt sind. Allein in Deutschland gibt es ca. 120.000 Patienten mit MS. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren.

Die geographische Verteilung der MS ist sehr unterschiedlich. In der äquatorialen Zone ist die Erkrankung selten. Zu den Polen hin nimmt die Häufigkeit der Erkrankung zu, wobei das höchste Erkrankungsrisiko in Nordamerika, Europa und Australien besteht (Kurtzke 1980). Ergebnisse von Migrationsstudien deuten daraufhin, dass das Erkrankungsrisiko von dem geographischen Aufenthaltsort vor der Pubertät geprägt wird. Beispielsweise erkranken Kinder, die vor dem 15. Lebensjahr aus einem Gebiet mit relativ höherem Erkrankungsrisiko (z. B. England) in ein Gebiet mit niedrigem Erkrankungsrisiko (z. B. Südafrika) ziehen, später seltener als Kinder aus dem Ursprungsland. Migrationen nach der Pubertät wirken sich hingegen nicht mehr auf das Erkrankungsrisiko aus, so dass Erwachsene dann das Erkrankungsrisiko ihres Herkunftslandes behalten (Dean und Kurtzke 1971, Dean und Elian 1997). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass ein oder mehrere Umweltfaktoren an der späteren Krankheitsentstehung beteiligt sind (Ascherio und Munger 2007a/b).

### 1.1.2 Ätiologie

Mehr als hundert Jahre nach der Erstbeschreibung der MS durch Charcot ist die genaue Ursache der Erkrankung immer noch unbekannt. Neben Umwelteinflüssen spielen auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Ätiologie der Multiplen Sklerose.

Als Umwelteinflüsse werden Virusinfektionen in der Kindheit, z. B. mit dem Epstein-Barr-Virus, diskutiert. Es gibt auch Hinweise darauf, dass regionale Unterschiede im Vitamin-D-Stoffwechsel eine Rolle spielen könnten (van der Mei et al. 2007, Kragt et al. 2009). Die Konkordanz der Erkrankung bei monozygoten Zwillingen beträgt 30 % und bei dizygoten 5 %. Verwandte ersten Grades eines MS-Patienten haben ein Erkrankungsrisiko von unter 5 %, welches ein 20- bis 40-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung darstellt. Die MS ist keine „klassische“ Erbkrankheit, bei der nur ein Gen eine Rolle spielt, sondern es sind diverse genetische Faktoren beschrieben, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen. Ein Großteil der beschriebenen relevanten Gene ist bei



immunologischen Prozessen beteiligt. Eine bedeutende Rolle wird zum Beispiel den humanen Leukozytenantigenen der Klasse II (HLA II) zugeteilt. Sie sind an der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten beteiligt. Es existieren verschiedene HLA-II-Typen, die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko einhergehen. Diskutiert wird ein erhöhtes Risiko z. B. für das Allel HLA-DRB1\*1501 und seine Haplotypen DRB1\*1501, DQB1\*0602 oder DR2 (Barcellos et al. 2003). Weitere mögliche Kandidatengene sind z. B. mit T-Zell-Rezeptoren (TZR), Interleukinen, Lymphozytenantigenen und Adhäsionsmolekülen assoziiert. Allerdings konnte bisher noch kein genauer Zusammenhang zwischen einem bestimmten Gen und einem erhöhten Erkrankungsrisiko oder einem ungünstigen Verlauf hergestellt werden (Ramagopalan et al. 2008). Zusammenfassend spielen bei der Entstehung der Multiplen Sklerose multiple genetische Faktoren eine Rolle.

### **1.1.3 Klinische Symptome**

Bei der Multiplen Sklerose treten entzündliche Herde an unterschiedlichen Lokalisationen des zentralen Nervensystems (ZNS) auf. Die jeweilige Symptomatik hängt daher von den entsprechenden Läsionsorten ab: Läsionen im Bereich der motorischen Bahnen führen typischerweise zu Paresen und solche im Bereich der sensiblen Bahnen zu Parästhesien. Zerebelläre Herde verursachen oft Extremitäten- und Gangataxie. Entzündliche Veränderungen im Sehnerv (Optikusneuritis) vermindern die Sehschärfe. Herde im Bereich des Hirnstamms können zu Doppelbildern und Dysarthrie führen. Des Weiteren kommt es im Verlauf der Erkrankung bei vielen Patienten zu Blasen- und Sexualstörungen. Auch kognitive Symptome und abnormale Ermüdbarkeit sind bei Patienten mit MS verbreitet.

Zwei wesentliche Verlaufsformen werden bei der MS unterschieden: die schubförmige und die chronisch progrediente Variante. 80-85 % der Patienten weisen zu Beginn der Erkrankung einen schubförmigen Verlauf auf. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass schubartig neue neurologische Ausfälle auftreten, die sich nach einigen Wochen vollständig oder partiell zurückbilden. Die Schübe sprechen initial meist gut auf eine Therapie mit hochdosierten Glukokortikoiden an. Bei dieser Verlaufsform ist zwischen den Schüben keine Krankheitsprogression zu verzeichnen. Allerdings geht diese Verlaufsform bei dem Großteil der Patienten nach einer Krankheitsdauer von 10-20 Jahren in eine sekundär chronisch-progrediente Form über. Dabei kommt es zu einer schleichenden irreversiblen Verschlechterung der neurologischen Symptomatik.

An der schubförmigen Verlaufsform der MS erkranken Frauen ungefähr doppelt so häufig wie Männer, während das Geschlechterverhältnis bei der primär chronisch-progredienten MS relativ ausgeglichen ist. Letztere tritt bei 15-20 % der Patienten auf und ist geprägt durch eine fortschreitende Verschlechterung der Symptomatik von Beginn der Erkrankung an.

Die Lebenserwartung der MS-Patienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung nur wenig verringert. Die Patienten versterben nur in den seltensten Fällen an MS, sondern an sekundären Komplikationen, die sich durch die mangelnde Mobilität ergeben, wie z. B. Infektionen (Bronchopneumonie oder Sepsis nach Dekubitus oder Harnwegsinfektion) oder Lungenembolie nach tiefer Beinvenenthrombose.

#### **1.1.4 Diagnose und Therapie**

Die Diagnose der MS wird anhand klinischer und paraklinischer Kriterien gestellt. Zu den paraklinischen Parametern gehören magnetresonanztomographische, liquorchemische und elektrophysiologische Befunde. Dabei ist der Nachweis der räumlichen und zeitlichen Dissemination der Entmarkungsherde ausschlaggebend.

Die ersten Diagnosekriterien, die so genannten Schumacher-Kriterien von 1965, beruhten vor allem auf klinischen Gesichtspunkten (Schumacher et al. 1965). Diese Kriterien wurden 1983 durch Liquorbefunde ergänzt (Poser et al. 1983). Bei Vorliegen einer autochthonen IgG-Synthese und/oder oligoklonaler IgG-Banden im Liquor ließ sich dann die Diagnose „laborunterstützte sichere Multiple Sklerose“ stellen.

Heutzutage werden zur Diagnose der Multiplen Sklerose die Diagnosekriterien nach McDonald verwendet, die den magnetresonanztomographischen Befunden eine größere Rolle – auch beim Feststellen der zeitlichen Dissemination – zukommen lassen (McDonald et al. 2001). Sie wurden 2005 und 2010 überarbeitet, so dass mittlerweile liquorchemische Befunde nur noch bei der Diagnose der primär progredienten MS eine Rolle spielen (Polman et al. 2005, 2011). Elektrophysiologische Befunde haben keine Bedeutung mehr in der primären Diagnosefindung. Es wird vor allem Wert auf das klinische und magnetresonanztomographische Bild gelegt. Durch das neue System soll eine frühere Diagnosestellung und damit auch Therapieeinleitung ermöglicht werden.

Die MS ist bislang nicht heilbar. Die derzeitige Therapie der MS setzt sich aus drei Komponenten zusammen: Schubtherapie, verlaufsbeeinflussende Langzeittherapie und symptomatische Therapie.

Zur Therapie akuter Schübe werden hochdosierte Glukokortikoide verabreicht. Sie wirken entzündungshemmend, antiödematös und immunsuppressiv. Bei ausbleibendem Therapieerfolg nach Steroidgabe kann eine Plasmapheresetherapie sinnvoll sein.

In der verlaufsmodifizierenden Langzeittherapie der schubförmigen MS werden verschiedene immunmodulatorische Substanzen eingesetzt. Die wichtigsten eingesetzten Immunmodulatoren sind  $\beta$ -Interferone (Betaferon<sup>®</sup>, Rebif<sup>®</sup> und Avonex<sup>®</sup>) und Glatirameracetat (Copaxone<sup>®</sup>).  $\beta$ -Interferone sind ursprünglich körpereigene Gewebshormone, die antiproliferativ und antiviral wirken. Glatirameracetat ist ein Copolymer aus

vier Aminosäuren, das dem Myelin-basischen Protein ähnlich ist. Es bewirkt unter anderem eine Verschiebung von einer zytotoxischen  $T_H1$ -Antwort zu einer eher protektiven  $T_H2$ -Antwort (Sela und Teitelbaum 2001, Arnon und Sela 2003, Schrempf und Ziemssen 2007). Durch den Einsatz dieser Medikamente kann oft eine Reduktion der Schubhäufigkeit um etwa ein Drittel erzielt werden. Wenn trotz dieser Therapie noch gehäuft schwere Schübe auftreten, kann der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri®) eingesetzt werden. Er richtet sich gegen ein Adhäsionsmolekül und hemmt so die Migration von Immunzellen ins ZNS. Unter der Therapie mit Natalizumab wurde sehr selten eine schwere Komplikation in Form einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie beobachtet, die unbehandelt tödlich verläuft. Daher sollte Natalizumab nur nach strenger Indikationsstellung verabreicht werden (Steinman 2005).

Seit 2011 ist in Europa darüber hinaus Fingolimod (Gilenya®) für die hochaktive schubförmige MS zugelassen. Es handelt sich dabei um ein Sphingosin-1-Phosphat-Analogon, das die Lymphozyten in den Lymphknoten zurückhält und so für ein vermindertes Einwandern in das ZNS sorgt (Chiba et al. 1998, Brinkmann et al. 2002, Kappos et al. 2006). Es ist das erste oral zu verabreichende immunmodulatorische Medikament in der Therapie der MS. Zu beachten sind kardiovaskuläre unerwünschte Nebenwirkungen wie ausgeprägte Bradykardie und AV-Blockierungen kurz nach der Einnahme und erhöhte Anfälligkeit für (virale) Infekte (Cohen et al. 2010).

Zur Eskalationstherapie, d. h. bei Versagen der immunmodulatorischen Basistherapie ( $\beta$ -Interferone, Glatirameracetat, Fingolimod), werden Immunsuppressiva wie Azathioprin und Mitoxantron, und in selteneren Fällen auch Cyclophosphamid verwendet.

Das Ansprechen auf verlaufsmodifizierende Medikamente kann bei einzelnen MS-Patienten unterschiedlich sein. Dies ist möglicherweise auf die histopathologische Heterogenität zurückzuführen.

Mit der symptomatischen Therapie wird versucht, den Patienten unter den gegebenen Umständen die bestmögliche Lebensqualität zu gewährleisten. Dazu zählen beispielsweise die physiotherapeutische Behandlung bei Spastik oder die Gabe cholinergischer Substanzen bei Blasenentleerungsstörungen.

## **1.2 Die Pathologie der Multiplen Sklerose**

### **1.2.1 Kennzeichen der MS und allgemeine Pathologie**

Die Multiple Sklerose ist eine chronische Erkrankung des ZNS, die durch entzündlich-demyelinisierende Herde charakterisiert ist. Die MS ist gekennzeichnet durch fokale, scharf

begrenzte entzündliche Entmarkungsherde (Plaques), die mit astrozytärer Gliose und variabler Axondestruktion einhergehen (Prineas 1985, Lassmann 1998).

Die Läsionen sind im gesamten ZNS zu finden. Dabei gibt es bestimmte Prädilektionsstellen wie die Sehnerven, das *Corpus callosum*, den Hirnstamm, das Rückenmark, das Kleinhirn und die periventrikuläre weiße Substanz. Klassischerweise galt die Multiple Sklerose als eine Erkrankung der weißen Substanz, aber neuere Studien weisen daraufhin, dass auch die graue Substanz (z. B. der Kortex und die Kleinhirnrinde) demyelinisierte Herde aufweist. Makroskopisch zeigen die Herde in der weißen Substanz im chronischen Stadium eine graue Farbe und sind verhärtet, woher der Name „Multiple Sklerose“ stammt. Neben den lokal begrenzten Demyelinisierungsherden kann nach längerer Erkrankungsdauer auch eine generelle Atrophie des Gehirns beobachtet werden.

### 1.2.2 Histopathologische Veränderungen

Histologisch sind die Plaques in der weißen Substanz initial gekennzeichnet durch einen Verlust der Myelinscheiden und durch ein entzündliches Infiltrat. Des Weiteren finden sich häufig Hinweise auf eine Schädigung der Axone wie axonale Schwellungen, die auf eine Durchtrennung der Axone hindeuten.

Anhand der histologischen Zusammensetzung können die Läsionen entsprechend ihrer zeitlichen Entstehung in unterschiedliche Aktivitätsstadien eingeteilt werden.

In den früh aktiven Plaques findet sich eine Vielzahl von Entzündungszellen, wie B- und T-Lymphozyten, aktivierte Mikrogliazellen und vor allem Makrophagen, die in ihrem Zytoplasma Myelinabbauprodukte enthalten. Dadurch erscheinen die frühen akuten Läsionen hyperzellulär und ödematös.

Im Laufe der Zeit nehmen die Entzündungszellen in den Läsionen ab. Chronisch inaktive Herde weisen nur noch wenige Entzündungszellen auf und erscheinen hypozellulär. Diese Läsionen zeigen typischerweise eine Fasergliose. Oligodendrozyten – verantwortlich für die Bildung der Myelinscheiden – sind in chronischen Läsionen meist deutlich vermindert.

Chronisch aktive Läsionen bestehen aus einem inaktiven, hypozellulären Zentrum, das von einem hyperzellulären Saum aus Makrophagen umgeben ist, in dem weiterhin Myelin abgebaut werden kann.

Bei so genannten „Shadow-Plaques“ handelt es sich um remyelinisierte Läsionen, die entweder komplett oder partiell remyelinisiert sein können. Sie sind gekennzeichnet durch Nervenfasern, deren Myelinscheiden relativ zum Axondurchmesser dünner sind als bei vergleichbaren gesunden Nervenfasern. In frühen Läsionen kann diese Remyelinisierung den ganzen Herd durchziehen und parallel zur aktiven Entmarkung stattfinden. In chronischen Läsionen kommt es nur stellenweise zu Remyelinisierung. Die neu gebildeten Markscheiden erreichen nie ihre ursprüngliche Dicke, können aber zu einer partiellen oder

vollständigen funktionellen Wiederherstellung führen (Lassmann et al. 1997, Lassmann 1998).

Neurophysiologisch verursacht der Verlust der Myelinscheiden eine Störung der saltatorischen Erregungsleitung, so dass es zur Leitungsverlangsamung der Erregungen kommt. Zwar ist die MS primär eine Erkrankung des Myelins und der Oligodendrozyten, aber es treten auch frühzeitig Schädigungen von Axonen und Neuronen auf (Trapp et al. 1998, Peterson et al. 2001). Durch axonale Durchtrennungen kommt es zum Verlust der Erregungsfortleitung. Zunehmender Axonverlust insbesondere im Bereich der motorischen Bahnen führt daher zu einem Großteil der bleibenden Behinderungen bei den MS-Patienten.

### **1.2.3 Pathogenese**

Die Multiple Sklerose gilt als eine Autoimmunerkrankung, bei deren Entstehung virale Infektionen, Umwelteinflüsse und genetische Faktoren eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 1.1.2). Lange Zeit galt das ZNS aufgrund der besonderen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (BHS) als „blinder Fleck“ des Immunsystems. Inzwischen ist bekannt, dass diese Schranke für einige Elemente des Immunsystems durchlässig ist. Durch die Blut-Hirn-Schranke soll das ZNS vor Krankheitserregern und anderen schädigenden Einflüssen geschützt werden, was insbesondere in Anbetracht des kaum vorhandenen Regenerationsvermögens im ZNS wichtig ist.

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Inflammation und der damit verbundenen Demyelinisierung spielen autoreaktive T-Zellen. Sie können mit Hilfe bestimmter Adhäsionsmoleküle unabhängig von ihrer Antigenpezifität die sonst für Immunzellen kaum durchlässige BHS überwinden (Tan et al. 2002). Die Entzündungskaskade wird in Gang gesetzt, wenn die T-Zellen durch ein entsprechendes Antigen, das an MHC-II-Moleküle gebunden ist, erstmalig aktiviert werden. Nachdem die T-Zellen ihr Zielantigen im ZNS-Gewebe erkannt haben, proliferieren sie und sezernieren proinflammatorische Zytokine, die schließlich zum Zusammenbruch der BHS führen (Westland et al. 1999). Daraufhin können auch B-Zellen, Antikörper und Komplementfaktoren ins ZNS gelangen, die für die Entstehung der charakteristischen demyelinisierenden Plaques eine wichtige Rolle spielen.

Nach neueren Forschungsergebnissen können unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zur Entmarkung führen. Diese Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an früh aktiven MS-Läsionen. Diese früh aktiven Läsionen sind histopathologisch durch Makrophagen mit immunhistochemisch nachweisbaren inkorporierten Abbauprodukten großer Myelinproteine (Myelin-basisches Protein, Proteolipid-Protein) und vor allem auch kleiner Myelinproteine (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, Myelin-assoziiertes Glyko-

protein und CNPase (*cyclic nucleotide phosphodiesterase*) gekennzeichnet. In Autopsiefällen sind meist nur wenige früh aktive Läsionen zu finden. Eine größere detaillierte Studie zu früh aktiven Läsionen erfolgte daher an Biopsiematerial von MS-Patienten.

Diese Studie eines großen Patientenkollektivs konnte mittels immunhistochemischer Methoden vier verschiedene Entmarkungsmuster feststellen (Lucchinetti et al. 2000).

- I. Makrophagen-assoziierte Entmarkung
- II. Makrophagen-assoziierte Entmarkung mit Beteiligung von Immunglobulinen und Komplementfaktoren
- III. Entmarkung mit distaler Oligodendrogliepathie und Oligodendrozytenapoptose
- IV. Primäre Oligodendrozytendegeneration in der periläsionalen weißen Substanz

Die Muster I und II ähneln aufgrund ihrer erhöhten T-Zell- und Makrophagendichte einer Autoimmunreaktion, wobei in Typ-II-Läsionen zusätzlich humorale Faktoren wie Komplement- und Immunglobulinablagerungen nachgewiesen werden können. Bei diesen beiden Gruppen wird primär das Myelin angegriffen. Oligodendrozyten sind in aktiven Bereichen vermindert, treten aber im Plaquezentrum wieder auf. Diese beiden Muster lassen oft eine Remyelinisierung erkennen.

Die Muster III und IV deuten hingegen eher auf eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten hin – entweder innerhalb der Läsion (Typ III) oder in der dem Plaque benachbarten weißen Substanz (Typ IV). Aus dem Untergang der Oligodendrozyten resultiert dann sekundär die Entmarkung. Das Muster IV wurde allerdings ausschließlich an (wenigen) Autopsiefällen mit primär-progredienter MS beobachtet.

Die Läsionsmuster unterscheiden sich von Patient zu Patient, sind jedoch in den multiplen Plaques des gleichen Patienten sehr ähnlich. Die Mehrzahl der untersuchten Patienten weist eine Demyelinisierung vom Typ I und II auf, die durch T-Zellen und Makrophagen – und zusätzlich humorale Faktoren im Fall des Typ II – gekennzeichnet ist. Die früh aktiven Läsionen gehen später in chronische Plaques über, bei denen diese Charakteristika nicht mehr nachweisbar sind, so dass die MS möglicherweise als gemeinsame Endstrecke verschiedener immunologischer Prozesse angesehen werden kann.

#### **1.2.4 Pathologie der grauen Substanz**

Wie bereits erwähnt sind demyelinisierte Läsionen nicht auf die weiße Substanz beschränkt, sondern finden sich auch im Kortex und der tiefen grauen Substanz. Obwohl kortikale Läsionen schon 1962 von Brownell und Hughes beschrieben wurden, fanden sie

lange Zeit wenig Beachtung, weil sie mit Standard-Färbemethoden und den konventionellen MRT-Untersuchungen schwer zu erkennen sind. Mit modernen immunhistochemischen Methoden lassen sich allerdings auch demyelinisierte Läsionen im Neokortex beim Großteil der Patienten autoptisch nachweisen (Kidd et al. 1999, Peterson et al. 2001, Bö et al. 2003).

Je nach Lokalisation werden drei Typen kortikaler Läsionen unterschieden:

Leukokortikale Läsionen (Typ I) betreffen graue und unmittelbar angrenzende subkortikale weiße Substanz. Intrakortikale Läsionen (Typ II) liegen mitten im Kortex und subpiale Läsionen (Typ III) erstrecken sich von der subpialen Oberfläche in den Kortex. Sie sind mit einem Anteil von 50 % die häufigsten kortikalen Läsionen (Peterson et al. 2001).

Im Vergleich zu Herden der weißen Substanz sind kortikale Läsionen zellarm und enthalten deutlich weniger Entzündungszellen, zeigen jedoch auch durchtrennte Dendriten und apoptotische Nervenzellen (Peterson et al. 2001). Wegner et al. zeigten 2006 zudem an Autopsiegewebe von 22 MS-Patienten, dass die Dicke des gesamten Neokortex der Erkrankten gegenüber den Kontrollfällen um 10 % vermindert war. Außerdem war die Zelldichte in kortikalen Läsionen des Frontallappens gegenüber der normal erscheinenden grauen Substanz des MS-Kortex um 10 % reduziert und die Neurone im Mittel etwa 9 % kleiner. Besonders auffällig war auch eine geringere Synapsendichte in neokortikalen Läsionen (Verminderung von Synaptophysin um fast 50 %).

Cifelli et al. zeigten 2002 eine 30-35 %ige Reduktion der Neuronendichte im *Corpus geniculatum laterale*, einem Kerngebiet des Thalamus, bei Patienten mit MS im Vergleich zu gesunden Kontrollfällen. Dieser Neuronenverlust ist vermutlich zum Großteil für die Thalamusatrophie bei MS verantwortlich. Des Weiteren waren die Neurone im *Corpus geniculatum laterale* bei MS-Patienten kleiner als bei gesunden Kontrollfällen. Bei den betroffenen Neuronen handelt es sich um Zellen der parvozellulären Schicht, die dünnere Axone als die der magnozellularen Schicht aufweisen. In der magnozellularen Schicht ließen sich keine derartig deutlichen Veränderungen nachweisen. Das deutet darauf hin, dass Neurone mit kleinem Axondurchmesser vielleicht anfälliger für MS-bedingte Schädigungen sind (Evangelou et al. 2001).

Kortikale demyelinisierte Läsionen sind vor allem nach langer Krankheitsdauer zu finden (Kutzelnigg et al. 2005, Albert et al. 2007). Sie wurden bislang meist mit einem progredienten Krankheitsverlauf assoziiert (Bö et al. 2003, Kutzelnigg et al. 2005, Vercellino et al. 2005). Sie könnten daher eine Rolle in der Krankheitsprogression und bei der Entstehung neuropsychologischer Symptome spielen. Allerdings wurden auch kortikale Läsionen in Biopsiematerial von Patienten mit früher MS beobachtet (Lucchinetti et al. 2011). Kürzlich konnte eine neuere MRT-Studie zeigen, dass kortikale Läsionen sogar bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom, der Erstmanifestation einer MS, nachweisbar

sind (Calabrese et al. 2007). Künftige Studien mit neuen magnetresonanztomographischen Methoden könnten bald Hinweise zur klinischen Relevanz kortikaler Läsionen liefern und damit zum besseren Verständnis der klinisch heterogenen Erkrankung beitragen.

### **1.2.5 Neuronale Veränderungen in der weißen Substanz bei MS**

Es wird also deutlich, dass neurodegenerative Veränderungen eine wichtige Rolle bei der MS spielen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass die Atrophie die weiße und graue Substanz betrifft (Ge et al. 2001, Chard et al. 2002, Sastre-Garriga et al. 2004). Leider sind Untersuchungen zur Nervenzellichte in der grauen Substanz oft schwierig, weil die Neurone in der grauen Substanz sehr dicht gelagert und im Kortex zudem noch in verschiedenen Schichten angeordnet sind. Eine attraktive Alternative stellt daher die Untersuchung von Nervenzellen in der weißen Substanz dar. Läsionen in der weißen Substanz gehen mit einer deutlicheren Matrixvergrößerung mit Astroglieose und einem ausgeprägteren axonalen Verlust einher als beispielsweise kortikale Läsionen. Daher können die möglichen neurodegenerativen Veränderungen bei MS gut anhand der Neurone in der weißen Substanz untersucht werden. Bislang gibt es hierzu nur eine Arbeit, die Neurone in der weißen Substanz an MS-Autopsiefällen untersucht hat (Chang et al. 2008). Diese Untersuchung ergab Hinweise sowohl für neuronalen Verlust als auch für Neurogenese in MS-Läsionen, wobei diese Ergebnisse mit Vorsicht gewertet werden müssen, da die Läsionen mit erhöhter Neuronenzahl zum Großteil von nur einem afroamerikanischen Patienten stammten. Da die Arbeiten von Chang und Kollegen auf Autopsien von MS-Patienten beruhen, liefern sie nur begrenzt Hinweise zur Fragestellung, was mit den Nervenzellen und den neuronalen Vorläuferzellen in der weißen Substanz während des frühen Krankheitsprozesses in aktiv demyelinisierenden Läsionen geschieht. Die vorliegende Arbeit soll diese Frage im Marmosetten-EAE-Modell untersuchen.

### **1.2.6 Charakteristika der Nervenzellen in der weißen Substanz**

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde davon berichtet, dass es zwischen den Faserbahnen der weißen Substanz einzelne Neurone gibt. Von Ramón y Cajal wurden sie 1911 (nachgedruckt 1952) als „interstitielle Neurone“ beschrieben. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um Interneurone, die aus der embryonalen *Subplate*-Zone hervorgehen (Chun und Shatz 1989a/b). Diese sehr prominente, bandförmig zwischen Rindenanlage und Intermediärzone gelegene Schicht entsteht ab der 13. Entwicklungswoche und bildet sich ab der 34. Woche langsam zurück. In dieser Zone findet sich ein auffällig hoher Anteil an Extrazellulärmatrix, in der die *Subplate*-Neurone liegen. Sie entstehen als eine der ersten Neuronengruppen und zeigen Charakteristika von ausgereiften Nervenzellen (z. B. synaptische Verschaltungen), lange bevor die kortikalen



Neurone sich ausdifferenzieren (McConnell et al. 1989, Ghosh et al. 1990, Kostović und Jovanov-Milosević 2008).

In der embryonalen Entwicklung lässt sich diese Zone durch Färbungen mit Antikörpern gegen MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) sichtbar machen (Chun und Shatz 1989 b).

Die Rückbildung der *Subplate*-Zone beginnt beim Menschen im letzten Schwangerschaftsdrittel. Neun Monate nach der Geburt sind fast alle *Subplate*-Neurone vermutlich durch programmierten Zelltod zugrunde gegangen. Nur ein geringer Anteil persistiert in Form von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz (Kostović und Jovanov-Milosević 2008).

Die *Subplate*-Zone scheint eine entscheidende Rolle in der Ausbildung und Ausreifung der thalamokortikalen Bahnen zu spielen. Ohne sie verfehlen die thalamischen Afferenzen ihre Zielneurone im Kortex bzw. die Organisation der eingewachsenen Axone in säulenförmige Verbände bleibt aus (Friauf et al. 1990, Ghosh 1995, Ghosh und Shatz 1992, 1993, Kanold 2004).

In Nagetieren und einigen anderen Spezies, z. B. Flattertieren, liegen die wenigen übrigen *Subplate*-Neurone in einer dünnen Schicht unter der Lamina VI des Kortex. Diese Neurone sind Teil von lokalen aber auch langen kortikokortikalen Verbindungen. In den meisten anderen Lebewesen gibt es sie in dieser Form allerdings nicht, sondern sie liegen nur noch als einzelne Neurone in der weißen Substanz vor (Woo et al. 1991, Reep 2000). Diese subkortikalen Neurone gehören also als Überbleibsel der *Subplate*-Zone zu den ältesten Neuronen des Großhirns. Sie lassen sich immunhistochemisch mit Antikörpern gegen MAP2 und NeuN (Neuronenspezifisches nukleäres Antigen) anfärben und reagieren zudem teilweise mit Antikörpern gegen Somatostatin, Neuropeptid Y und NO-Synthase (NOS). Die letztgenannten Stoffe deuten auf eine Beteiligung der Neurone an der lokalen Regulation des Gefäßtonus hin (Chun und Shatz 1989 a, Okhotin und Kalinichenko 2002, 2003). Darüber hinaus exprimieren die meisten dieser Interneurone Calretinin (Suárez-Solá et al. 2009), ein Kalzium-bindendes Protein, das an der intrazellulären Kalziumhomöostase beteiligt ist (Baimbridge et al. 1992, Clements et al. 2008).

Über die genaue Morphologie der humanen interstitiellen Neurone gibt es keine einheitliche Meinung. Von Meyer et al. wurden sie 1992 als hauptsächlich pyramidale Zellen beschrieben. Kostović und Rakić dagegen fanden 1980 polymorphe subkortikale Neurone und tiefer in der weißen Substanz gelegene fusiforme Nervenzellen. Beide Gruppen fanden die meisten Neurone unterhalb der Lamina VI und eine geringer werdende Dichte mit zunehmender Entfernung von der grauen Substanz. Besonders reichlich sind sie unterhalb des primären Motorkortex zu finden (Meyer et al. 1992). Verschiedene Arbeiten weisen daraufhin, dass die Neurone der weißen Substanz zum Teil in den Kortex projizieren (Meyer et al. 1991, Clancy et al. 2001, Okhotin und Kalinichenko 2002).

Die Charakteristika der Neurone der weißen Substanz scheinen bei Menschen und Affen ähnlich zu sein (Kostović und Rakić 1980), aber eindeutige Angaben zur Morphologie bei Marmosetten gibt es bisher nicht.

In letzter Zeit wird vermutet, dass eine Fehlverteilung oder erhöhte Dichte der verbleibenden *Subplate*-Neurone eine Rolle in der Entstehung von Epilepsie und Schizophrenie spielen könnte. Bei Epilepsie ist die Anzahl der interstitiellen Neurone in der weißen Substanz im Vergleich zu Gesunden erhöht (Meencke 1983, Emery et al 1997). Die Studien zur veränderten Verteilung und Dichte der Neurone bei Schizophrenie sind nicht einheitlich. Akbarian et al. fanden 1996 eine Umverteilung der Neurone von oberflächlichen in tiefere Regionen der weißen Substanz. Dagegen berichteten Eastwood und Harrison 2003 von einer erhöhten Neuronendichte in oberflächlichen Schichten der weißen Substanz. Obwohl die konkreten Ergebnisse der Studien nicht übereinstimmen, zeigen sie alle eine gestörte Verteilung der Neurone in der weißen Substanz. Daher könnte möglicherweise eine pränatal gestörte Entwicklung der *Subplate*-Zone und deren Neurone zur Entstehung der Schizophrenie beitragen (Rioux et al. 2003).

## **1.3 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)**

### **1.3.1 Die EAE im Allgemeinen**

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) kann als Tiermodell der Multiplen Sklerose angesehen werden. Bei der EAE handelt es sich um eine T-Zell vermittelte inflammatorische Autoimmunerkrankung des ZNS. Die EAE kann in verschiedenen Säugetieren induziert werden. Am häufigsten wird sie in Nagetieren ausgelöst, um neue potentielle Therapien zu untersuchen. Je nach Spezies und eingesetztem Immunogen nimmt die Erkrankung entweder einen monophasisch-akuten, chronisch-rezidivierenden oder primär-progredienten Verlauf im Tier. Diese unterschiedlichen Verlaufsformen sollen einen ungefähren Vergleich zu unterschiedlichen Stadien und Verlaufsformen der MS ermöglichen.

Histologisch weist die EAE mehr Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung der akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) als zur MS auf. Bei der ADEM handelt es sich um eine akute entzündlich-demyelinisierende Erkrankung, die durch demyelinisierte perivaskuläre Säume charakterisiert ist. Bei der MS finden sich im akuten Stadium hingegen konfluente Entmarkungen in der weißen Substanz, die nicht nur auf die perivaskulären Säume begrenzt sind. Unter bestimmten Bedingungen kann im EAE-Modell auch kortikale Entmarkung ausgelöst werden. Auch Remyelinisierung, astrozytäre Gliose

und axonale sowie neuronale Schädigungen lassen sich zum Teil beobachten (Uccelli et al. 2003).

Die EAE wird entweder indirekt durch den Transfer von gegen Myelinbestandteile gerichteten autoreaktiven T-Zellen oder direkt durch die Injektion bestimmter Bestandteile des Myelins ausgelöst (aktiv-induziertes EAE-Modell). Letzteres Modell wird in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die am häufigsten zur Immunisierung genutzten Antigene sind das Myelin-basische Protein (MBP), das Proteolipid-Protein (PLP) und das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Zusätzlich muss der Substanz ein die Immunreaktion anregendes Reagenz aus bakteriellen Produkten und Mineralöl zugefügt werden, zum Beispiel das komplette Freund'sche Adjuvans, ein Muramyl-Dipeptid in Mineralöl (Wekerle et al. 1994).

Durch Kontakt der Myelinbestandteile mit entsprechenden CD4-positiven T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen der Tiere kommt es zur Aktivierung und autoklonalen Vermehrung dieser Zellen (Oksenberg et al. 1993, Trotter et al. 1997, Storch et al. 1998, Kuchroo et al. 2002). Diese autoreaktiven T-Zellen passieren die Blut-Hirn-Schranke und lösen nach erneutem Antigenkontakt über MHC-II-Proteine der ortsständigen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) die Entzündungsreaktion aus. Durch die Aktivierung von Makrophagen und Mikrogliazellen kommt es über zytokinvermittelte Oligodendrozyten-schädigung, Myelinphagozytose und antikörper-/komplementvermittelte Toxizität zur Schädigung der Myelinscheiden. B-Zellen sind zwar nicht zwingend notwendig für die Entstehung der EAE, aber fördern die Demyelinisierung (Svensson et al. 2002).

Die EAE ist mittlerweile das meist genutzte Modell zur Erforschung der Neuroinflammation und Neurodegeneration und natürlich insbesondere zur Suche nach neuen Therapieansätzen zur Heilung der MS.

Allerdings ist die EAE als eine von der Multiplen Sklerose abgegrenzte Krankheit zu sehen. Das EAE-Modell weist Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zur MS auf. Ein wesentlicher Unterschied besteht beispielsweise darin, dass die entzündliche Komponente bei der EAE eine wesentlich größere Rolle spielt als bei der MS und der Verlauf oft monophasisch ist. Außerdem sind bei Nagetieren die EAE-Läsionen vorwiegend im Rückenmark zu finden und seltener im Gehirn.

Als weiterer Kritikpunkt ist zu nennen, dass zahlreiche Medikamente, die bei EAE-Tieren therapeutisch wirksam sind, bei Patienten mit MS keinen Effekt zeigten oder sogar zur Verschlimmerung führten (van Oosten et al. 1996, The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1999). Andererseits gibt es auch Therapien, die initial im EAE-Modell erprobt wurden und dann erfolgreich bei MS-Patienten zur Anwendung gekommen sind und weiterhin verwendet werden, wie beispielsweise Glatirameracetat (Copaxone<sup>®</sup>) (Simpson et al. 2002).

### 1.3.2 Die EAE bei *Callithrix-jacchus*-Marmosetten (Weißbüschelaffen)

Ein großer Teil des Wissens über die frühe Pathogenese der MS stammt von Untersuchungen am EAE-Modell. Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich die EAE in Nagetieren in einigen Aspekten deutlich von der MS. Eine der MS ähnelndere Form der EAE kann in den *Callithrix-jacchus*-Marmosetten hervorgerufen werden, was auf die phylogenetische Ähnlichkeit der Marmosetten zum Menschen zurückzuführen ist.

Bei diesen kleinen, 300-400 g schweren Neuweltaffen handelt es sich um eine Primatenart, die zur Gruppe der Krallenaffen (*Callithrichidae*) gehört und im Amazonasdelta (Südamerika) beheimatet ist.

Eine für die Forschung sehr wichtige Besonderheit besteht darin, dass der Nachwuchs der Tiere, meist Zwillinge oder Drillinge, zwar aus einzeln befruchteten Eizellen hervorgeht, aber über ihre miteinander verschmolzenen Plazenten in Verbindung steht. Dadurch sind die Jungtiere genetisch verschieden, aber tolerant gegenüber den aus dem Knochenmark stammenden Zellen der Geschwister (Haig 1999). Durch diesen so genannten Knochenmarkchimärismus ist z. B. der adoptive Transfer von T-Zellpopulationen eines Tiers in dessen Zwilling möglich, ohne eine Fremdreaktion auszulösen (Picus et al. 1985, Genain und Hauser 1997).

Neben den neuroanatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen dem Menschen- und dem Marmosettengehirn liegt ein weiterer Vorteil dieses Modells darin, dass eine starke Homologie zwischen den tierischen und menschlichen Genen für Myelin und für das Immunsystem besteht.

Durch aktive Immunisierung mit humaner weißer Substanz oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) kann eine Form der EAE ausgelöst werden, die der schubförmigen Verlaufsform der MS in vielen Aspekten ähnelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Marmosetten-EAE-Modell verwendet, das durch Injektion der extrazellulären, immunglobulinähnlichen, N-terminalen Domäne von Ratten-MOG (1-1125; rMOG) induziert wurde. MOG ist ein Transmembranprotein, das in der Oligodendrozytenmembran und der äußersten Schicht der Myelinscheide vorkommt (Brunner et al. 1989). Zwar macht MOG nur einen sehr geringen Anteil am gesamten ZNS-Myelin aus, aber durch die leicht zugängliche partiell extrazelluläre Lokalisation von MOG kann nach Injektion von MOG-Peptiden eine starke und gegenüber anderen Myelinproteinen dominierende T- und B-Zellreaktivität ausgelöst werden. Nach Bindung der Antikörper an das spezifische Epitop kommt es zur antikörpervermittelten zellbedingten Zytotoxizität mit Aktivierung von Komplementfaktoren. Die daraufhin einwandernden Makrophagen entfalten durch Produktion von TNF- $\alpha$  und Stickstoffmonoxid eine destruierende Wirkung (Dijkstra et al. 1992, van der Laan et al. 1996). Phagozytierte

Myelinbestandteile, die durch Makrophagen wahrscheinlich in die zervikalen Lymphknoten transportiert werden, lösen dort eine Aktivierung von T- und B-Zellen aus.

Klinische Zeichen der Marmosetten-EAE sind leichte bis mittlere neurologische Ausfälle, die sich – abhängig vom Immunisierungsmodell – zurückbilden oder zur chronischen Behinderung führen können.

Bei rMOG-induzierter EAE bei *Callithrix-jacchus*-Marmosetten zeigen sich etwa ab dem 10. Tag nach Immunisierung erste Symptome und die Krankheit nimmt einen bis zu 10 Wochen anhaltenden schubförmig-progredienten Verlauf (Pomeroy et al. 2008).

Die Topographie der Läsionen ist dem Läsionsverteilungsmuster der MS ähnlich. Auch die Marmosetten-EAE zeigt häufig periventrikuläre Läsionen, wobei die einzelnen meist perivaskulären Herde zu größeren Läsionen konfluieren.

Histopathologisch zeigen sich in den Läsionen der weißen Substanz mononukleäre Infiltrate aus Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten. Außerdem lassen sich Antikörper- und Komplementablagerungen (Merkler et al. 2006) sowie Zytokine, Matrix-Metalloproteasen und eine Myelenzephalon-spezifische Protease nachweisen (Laman et al. 1998). Die Plaques in der Marmosetten-EAE sind ebenfalls gekennzeichnet durch Demyelinisierung und astrozytäre Gliose wie auch die MS-Läsionen. Zum Teil lassen sich auch Remyelinisierung und „Shadow-Plaques“ beobachten (Uccelli et al. 2003).

Eine besonders für die vorliegende Arbeit wichtige Eigenschaft der Marmosetten ist, dass sie als Primaten in der weißen Substanz Neurone aufweisen, die hinsichtlich ihrer Verteilung, Morphologie und immunhistochemischen Eigenschaften den menschlichen Neuronen der weißen Substanz sehr ähnlich sind (Kostović und Rakić 1980, Colombo und Bentham 2006). Somit stellt die Marmosetten-EAE ein geeignetes Modell dar, um Veränderungen dieser Neurone in akuten Läsionen zu untersuchen.

## 1.4 Fragestellung

Durch zahlreiche Studien ist mittlerweile belegt, dass neben dem entzündlichen Prozess auch eine neurodegenerative Komponente eine entscheidende Rolle in der Entstehung und dem Verlauf der MS spielt. Für Studien an humanem Gewebe steht hauptsächlich Autopsiematerial zur Verfügung, das fast ausschließlich von Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium stammt. Da es kaum Biopsiematerial von MS-Patienten gibt, ist es schwierig, Aspekte der frühen Krankheitsphase zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher anhand des *Callithrix-jacchus*-Marmosetten-EAE-Modells die neuronalen Veränderungen in der weißen Substanz in der Frühphase der Erkrankung untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob in den akuten Läsionen der weißen Substanz ein Nervenzellverlust oder Hinweise für Neurogenese nachweisbar sind. Hierzu soll die Nervenzelldichte in akuten Läsionen, in normal erscheinender weißer Substanz im erkrankten Tier und in der weißen Substanz im Kontrolltier ermittelt und verglichen werden. Falls sich Hinweise für eine Neurogenese ergeben, soll darüber hinaus untersucht werden, wie sich die Areale mit erhöhter Neuronendichte hinsichtlich der Zusammensetzung ihres entzündlichen Infiltrats von den anderen Läsionen unterscheiden.

Aufgrund der neuroanatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen dem Menschen- und dem Marmosettengehirn und der starken Homologie zwischen den tierischen und menschlichen Genen für Myelin und für das Immunsystem kann dieses Modell möglicherweise Aufschluss über Vorgänge während der frühen Krankheitsphase der MS liefern.

## 2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde Hirngewebe von 17 *Callithrix-jacchus*-Marmosetten untersucht, die aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen stammten (Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Eberhard Fuchs). Im Deutschen Primatenzentrum wurden die Tiere bei einem regulären Tag/Nacht-Rhythmus (Licht von 7:00 Uhr bis 19:00 Uhr) bei 26 °C Lufttemperatur und 55 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte unter Beachtung der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (86/609/EWG) und wurde durch die Landesregierung Niedersachsen genehmigt.

### 2.1 Induktion der Marmosetten-EAE

Für die vorliegende Arbeit wurden acht gesunde *Callithrix-jacchus*-Marmosetten als Kontrolltiere und neun Versuchstiere mit induzierter experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) untersucht.

Die Induktion der EAE erfolgte nachdem die Tiere mittels Saffan<sup>®</sup> (18 mg/kg, intramuskulär), Valium<sup>®</sup> (0,5 mg/kg, i. m.) und Robinul<sup>®</sup> (0,008 mg/kg, i. m.) betäubt worden waren. Hierzu erhielten die Tiere jeweils eine subkutane Injektion einer Emulsion aus 500-600 µl rekombinantem Ratten-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (rrMOG; 250-300 µg/Tier, gelöst in Kochsalz) und komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA, Difco, USA). Das gentechnisch in *Escherichia coli* hergestellte rekombinante Ratten-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (rrMOG) entspricht der N-terminalen Sequenz von Ratten-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (Aminosäuren 1-125). Das gereinigte Protein wurde in 6 M Harnstoff gelöst und im Anschluss gegen 20 mM Natriumazetatpuffer (3,0) dialysiert. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei -20 °C.

Die Opferung der Tiere erfolgte durch Verabreichung einer Überdosis Xylazin/Ketamin.

Die Körper der *Callithrix-jacchus*-Marmosetten wurden zur Vorbereitung der Präparation mit 200 ml Kochsalzlösung, gefolgt von 400 ml 4 %igem 0,1 M Natrium-Phosphat-gepuffertem Paraformaldehyd (pH 7,4) transkardial perfundiert.

## 2.2 Histopathologie

### 2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes

Nach der Fixierung in 4 %igem 0,1 M Natrium-Phosphat-gepuffertem Paraformaldehyd über Nacht wurden die Gehirne entnommen, zerteilt und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mittels eines Mikrotoms in 1 µm dünne Scheiben für die immunhistochemischen und histologischen Färbungen geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

### 2.2.2 Histologische Färbungen

#### 2.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Schnitte für insgesamt 9 min in Xylol und anschließend für jeweils 2 min in Isoxylol und eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 100 %, 90 %, 70 %, 50 %) gestellt.

Nach Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte für 5-8 min in Mayers Hämalaun gefärbt und nach kurzem Spülen in Aqua dest. in 1 %iger Salzsäure-Alkohol-Lösung differenziert. Um die typische blauviolette Färbung zu erhalten, wurden die Schnitte 10 min in Leitungswasser gespült, wodurch sich der pH-Wert erhöhte und der Farbton umschlug (Bläuen). Nach einem sechsminütigen Eosinbad und kurzem Eintauchen in Aqua dest. folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) und Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt.

Hämalaun färbt alle basophilen Zell- und Gewebsstrukturen (z. B. DNA, raues Endoplasmatisches Retikulum) blau. Eosin dagegen färbt alle azidophilen Strukturen (vor allem die Zytoplasmaproteine) rot. Anhand dieser Färbung erfolgte in der vorliegenden Arbeit die allgemeine Beurteilung der Entzündungszellinfiltration.

#### 2.2.2.2 LFB/PAS-Färbung

Die Schnitte wurden in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und über 24 Stunden bei 60 °C in einer Küvette mit Luxol-Fast-Blue (LFB) inkubiert. Nach Eintauchen in 90 %iges Ethanol wurden die Schnitte in 0,05 %iger Lithiumcarbonat-Lösung differenziert und anschließend in 70 %igem Ethanol und Aqua dest. gewaschen.

Für die Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) wurden die Schnitte 5 min in Perjodsäure gegeben und anschließend 5 min in Leitungswasser und dreimal in Aqua dest. gespült. Nach dreißigminütiger Inkubation in Schiff-Reagenz erfolgte fünfminütiges Spülen in Leitungswasser, zweiminütiges Anfärben in Mayers Hämalaun und Abspülen mit Aqua dest. Nach kurzem Differenzieren in Salzsäure-Ethanol-Lösung und anschließendem



Bläuen in Leitungswasser wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 100 %) und Xylol dehydriert und mit DePex eingedeckt.

Das LFB färbt Myelinscheiden türkisblau, Nissl-Schollen und Kerne tiefblau und Gliazellen bläulich. Durch das Perjodsäure-Schiff-Reagenz werden zusätzlich Polysaccharide magenta-rot angefärbt. Die LFB-PAS-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Demyelinisierung verwendet.

### **2.2.2.3 Bielschowsky-Silberimprägnation**

Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und im Ofen bei 55 °C über Nacht getrocknet. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden sie insgesamt 9 min in Xylol und dann jeweils 2 min in eine absteigende Alkoholreihe getaucht. Die Schnitte wurden nach Spülen mit Aqua dest. 20 min in eine 20 %ige Silbernitratlösung gestellt und im Anschluss erneut mit Aqua dest. gespült. Zur 20 %igen Silbernitratlösung wurde, unter ständigem Schwenken, tropfenweise 32 %iges Ammoniak gegeben, bis sich der anfängliche Niederschlag gerade löste. In dieser Silbernitrat-Ammoniak-Lösung wurden die Präparate 15 min im Dunkeln inkubiert, bis eine bräunliche Färbung erkennbar war. Danach wurden sie in einer 0,1 %igen Ammoniaklösung geschwenkt. Der Silbernitrat-Ammoniak-Lösung wurden drei Tropfen Entwickler zugefügt und die Schnitte darin 3-5 min inkubiert. Die Axone erschienen dann schwarz und der Hintergrund gelb- bis tabakbraun. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und zur Fixation 3 min in 2 %iges Natriumthiosulfat gegeben. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit DePeX eingedeckt.

## **2.2.3 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.2.3.1 Grundlagen**

In der Immunhistochemie wird das Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion genutzt, um über einen spezifischen Antikörper mittels eines dazugehörigen Detektionssystems aus Enzym und Substrat-Chromogen ein bestimmtes Antigen sichtbar zu machen. Der Antikörper, der gegen ein spezifisches Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet. Bei der direkten Methode ist daran direkt das Enzym gebunden, welches das zugefügte Substrat unter Bildung eines Farbstoffes umsetzt. Bei der indirekten Methode bindet an den Primärantikörper zunächst ein Sekundärantikörper, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. An den Sekundärantikörper ist das Enzym gekoppelt, das den Farbstoff umsetzt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, einen biotinylierten Sekundärantikörper einzusetzen. An diesen lagert sich aufgrund der starken Affinität von Avidin zu Biotin dann ein Avidin-gekoppeltes Enzym an, welches schließlich den Farbstoff umsetzt (Zwei-Schritt-Methode).

Die gängigsten Enzyme, die verwendet werden, sind die Peroxidase (Umsetzung von Diaminobenzidin) und die alkalische Phosphatase (Umsetzung von Fast Blue). In der Fluoreszenzmikroskopie tritt an die Stelle der Enzyme ein Fluoreszenzfarbstoff.

In der vorliegenden Arbeit wurde die „markierte Avidin-Biotintechnik“ (Labelled Avidin-Biotin technique = LAB) und die Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Methode) verwendet.

### 2.2.3.2 Prinzip der LAB-Methode

Zur Durchführung der „markierten Avidin-Biotintechnik“ (LAB) wird zunächst das Präparat mit dem Primärantikörper, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, inkubiert. Der Primärantikörper erkennt mit seinem variablen  $F_{ab}$ -Teil spezifisch das entsprechende Epitop. Im zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper dazugegeben, der mit seinem  $F_{ab}$ -Teil die  $F_c$ -Region des Primärantikörpers erkennt und bindet. Dementsprechend muss der Sekundärantikörper unbedingt gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet sein.

Anschließend wird (Meerrettich-)Peroxidase-markiertes Avidin (oder Streptavidin) zugefügt, das sich aufgrund seiner sehr starken Affinität zu Biotin (Dissoziationskonstante  $10^{-19}$  M) an den biotinylierten Sekundärantikörper anlagert. Somit dient das Biotin als Brücke zwischen Antikörper und Enzym (Guesdon et al. 1979). Als Substrat dient zum Beispiel das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das von der Peroxidase oxidiert wird, wodurch ein braunes Reaktionsprodukt entsteht. In dieser Reaktion wird zusätzlich  $H_2O_2$  zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt.

### 2.2.3.3 Prinzip der APAAP-Methode

Bei der APAAP(Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase)-Methode wird ein löslicher Enzym-/Anti-Enzym-Immunkomplex eingesetzt. Dieser setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: zum einen aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und zum anderen aus einem gegen dieses Enzym gerichteten Antikörper.

Im ersten Schritt bindet der unkonjugierte Primärantikörper an das entsprechende Epitop. Der unkonjugierte Sekundärantikörper wiederum bindet mit einem  $F_{ab}$ -Arm an den  $F_c$ -Teil des Primärantikörpers. In einem dritten Schritt wird der lösliche Enzym-Immunkomplex dazugegeben. Der im Komplex verwendete Antikörper wird vom zweiten  $F_{ab}$ -Arm des Sekundärantikörpers gebunden. Daher muss er unbedingt aus derselben Spezies stammen wie der verwendete Primärantikörper. Durch die enzymatische Umsetzung der zugegebenen Substrat-Chromogenlösung wird das nachzuweisende Antigen sichtbar gemacht. Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat, hier Naphtholphosphatester, zu Phenolkomponenten und Phosphaten um. Die Phenole reagieren mit farblosen

Diazoniumsalzen (Chromogene) zu unlöslichen Azofarbstoffen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Chromogen Fast Blue verwendet, das ein intensiv blaues Farbprodukt bildet.

In dieser Methode wirkt der im Überschuss zugefügte Sekundärantikörper mit seinen beiden F<sub>ab</sub>-Armen als Bindeglied zwischen Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex. Er wird daher auch als „Brückenantikörper“ bezeichnet.

#### **2.2.3.4 Mit Antikörpern detektierte Antigene**

##### **2.2.3.4.1 Myelin-basisches Protein (MBP)**

Das Myelin-basische Protein (MBP) ist ein Protein der Markscheiden, das von Oligodendrozyten gebildet wird. Es hat einen Anteil von 30 % am Gesamtmyelin des ZNS. Die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen MBP wird angewandt, um demyelinisierte Areale sowohl im Kortex als auch in der weißen Substanz darzustellen.

##### **2.2.3.4.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)**

Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) gehört zusammen mit Tau-Protein zu den häufigsten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen im Nervensystem. Es unterstützt die Mikrotubuli bei der Stabilisierung des Zytoskeletts. Durch alternatives Spleißen gehen aus dem MAP2-Gen drei Isoformen hervor, MAP2A, 2B, 2C. MAP2A und 2B haben ein hohes Molekulargewicht und kommen vor allem in den Dendriten und Zellkörpern der Neurone vor. MAP2C ist, wie Tau, ein kleines Molekül, das überwiegend während der Embryonalzeit in Nervenzellkörpern, Dendriten und zusätzlich in Axonen und Gliazellen gefunden wird (Goedert et al. 1991).

In den vorliegenden immunhistochemischen Färbungen wurden Antikörper gegen die Isoformen MAP2A und MAP2B verwendet.

##### **2.2.3.4.3 Neuronenspezifisches nukleäres Antigen (NeuN)**

Das Neuronenspezifische nukleäre Antigen (NeuN) ist ein lösliches Kernprotein in Vertebraten, das in den meisten neuronalen Zelltypen vorkommt. Erst kürzlich wurde es als FOX-3-Genprodukt der Familie der FOX-1-Gene zugeteilt, die für RNA-bindende Proteine kodieren, die am alternativen Spleißen beteiligt sind (Kim et al. 2009). Es bindet *in vitro* an DNA in Nervenzellen, aber seine genaue Funktion ist noch unbekannt. Es ist immunhistochemisch in postmitotischen Zellen nachweisbar, die eine neuronale Differenzierung aufweisen. Aus unbekanntem Gründen kann es allerdings nicht in Purkinjezellen, Korb- und Sternzellen, sowie Mitralzellen und Photorezeptorzellen detektiert werden (Mullen et al. 1992, Wolf et al. 1996, Sarnat et al. 1998, Weyer und Schilling 2003). In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen NeuN lassen sich in der Regel vor allem Neuronenspezifisches nukleäres Antigen im Zellkern, aber auch im

Zytoplasma, insbesondere bei den Marmosetten, darstellen. Dabei ist die Färbung im Zytoplasma blasser. Es bleibt unklar, ob das Protein auch eine Funktion im Zytoplasma hat oder nur dort produziert wird, bevor es in den Kern gelangt (Mullen et al. 1992).

#### **2.2.3.4.4 Myeloid-related protein 14 (MRP14)**

Bei MRP14 (auch Calgranulin oder Protein S100-A9) handelt es sich um ein Kalziumbindendes Protein aus der S100-Familie. Es wird von hämatogen eingewanderten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in frühen Reifestadien exprimiert (Zwadlo et al. 1986, Lagasse und Clerc 1988). In Zellkulturen zeigen Makrophagen die höchste Konzentration an MRP14 an Tag 3 und 4. In reifen, ortsständigen und ruhenden Makrophagen ist es nicht detektierbar (Odink et al. 1987, Goebeler et al. 1993). Daher dient MRP14 in der histopathologischen Untersuchung der MS dem Nachweis frühester Stadien entzündlicher und demyelinisierender Aktivität sowie der Einwanderung hämatogener Makrophagen (Brück et al. 1995).

#### **2.2.3.5 Vorbehandlung der histologischen Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen**

Die 1 µm dünnen Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Präparate viermal 10 min in Xylol und nach kurzem Eintauchen in Isopropanol/Xylol in eine absteigende Ethanolreihe gegeben. Dafür wurden die Schnitte jeweils für 2-4 min in 100 %iges und dann für je 2 min in 90 %iges, 70 %iges, 50 %iges Ethanol und zum Schluss in Aqua dest. gestellt.

##### **2.2.3.5.1 Antigendemaskierung**

Durch die Formalinfixierung des Gewebes kann es zum Verlust der Immunreaktivität einiger Antigene kommen. Formaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine durch die Bildung von Hydroxymethylenbrücken. Wenn davon die Aminosäuren innerhalb des Epitops betroffen sind, kommt es zur irreversiblen Zerstörung der Epitopstruktur. In diesem Fall kann die Immunreaktivität auch durch antigendemaskierende Vorbehandlungen nicht wiederhergestellt werden. Alleinige Konformationsänderungen aufgrund von Quervernetzungen der Aminosäuren in der Umgebung des Epitops können allerdings oft rückgängig gemacht werden. Dies geschieht durch den Einsatz proteolytischer Enzyme oder durch hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Zitratpuffer.

Für die Verwendung von Antikörpern gegen MRP14 erfolgte die Antigendemaskierung durch eine Protease. Dazu wurden 25 mg Protease in 60 ml Aqua bidest. auf 37 °C erwärmt, die Schnitte darin für 10 min inkubiert und anschließend mit Aqua bidest gespült.

Für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung und Rehydrierung in Plastikküvetten mit Zitratpuffer (10 mM; pH 6) gegeben. In einem handelsüblichen Mikrowellengerät wurden die Schnitte fünfmal für jeweils 3 min erhitzt. Um die dabei verdampfende Flüssigkeit in den Küvetten zu ersetzen, wurde abwechselnd mit Zitratpuffer und Aqua bidest. aufgefüllt. Nach 30-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte dreimal mit Aqua dest. und einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Durch diese Vorbehandlung wurden Formalin-Protein-Quervernetzungen gelöst, Kalzium-Ionen komplexiert und die Konformation des Epitops wiederhergestellt. Aufschluss über die verwendeten Antikörper und die notwendige Vorbehandlung liefert Tabelle 1.

#### **2.2.3.5.2 Blockade der endogenen Peroxidase**

Bei der Anwendung der LAB-Methode kann es zu einer unspezifischen Braunfärbung bei der Entwicklung kommen. Dies wird durch die endogene Peroxidaseaktivität im Gewebe verursacht. Sie bewirkt eine Freisetzung molekularen Sauerstoffs aus Peroxiden (z. B.  $H_2O_2$ ) und ist eine generelle Eigenschaft aller Hämproteine, wie beispielsweise des Hämoglobins und Myoglobins sowie der Zytochrome (Granulozyten, Monozyten) und Katalasen.

Um sicherzustellen, dass an der Farbentwicklung nur die Avidin-gekoppelte Peroxidase beteiligt ist, müssen die endogenen Peroxidasen rechtzeitig blockiert werden. Durch Vorbehandlung mit einem Überschuss an  $H_2O_2$  bei gleichzeitigem Fehlen eines Elektronendonors (z. B. dem Chromogen) kann deren Aktivität unterdrückt werden.

#### **2.2.3.6 Durchführung der LAB-Methode**

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und die entsprechenden Schritte zur Antigendemaskierung durchgeführt. Zur Vermeidung einer unspezifischen Braunfärbung folgte danach die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Dazu wurden die Schnitte 20 min in 3 %iger  $H_2O_2$ -Lösung (50 ml pro Küvette) im Kühlschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Puffer gespült.

Zur Blockade unspezifischer Protein-Protein-Bindungen wurden 100  $\mu$ l 10 %ige FCS/PBS-Lösung (*fetal calf-serum/phosphate-buffered saline*) auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern, lagern die Schnitte dabei – wie auch bei den folgenden Inkubationen – in einer feuchten Kammer.

Nach Abschütteln der FCS/PBS-Lösung wurden je 100  $\mu$ l Primärantikörper verdünnt in 10 %igem FCS (Verdünnung siehe Tabelle 1) auf die Objektträger gegeben und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Im Falle der MAP2-immunhistochemischen Färbung wurde zur Verstärkung des Signals der Primärantikörper erneut 1:400 mit FCS angesetzt und hiervon wieder je 100 µl auf die Schnitte pipettiert. Auch darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Mit Anti-MBP- und Anti-MRP14-Antikörpern genügte eine einmalige Inkubation über Nacht. Nach dreimaligem Spülen mit PBS-Puffer wurden 100 µl des entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpers (Spezies und Verdünnung siehe Tabelle 1) in 10 %iger FCS/PBS-Lösung zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS-Puffer wurde jeweils 100 µl Peroxidase-markierte Streptavidin/FCS-Lösung (POX) (Verdünnung 1:1000) auf die Präparate gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer erfolgte dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer.

Für die Entwicklung der Schnitte wurde im Falle der MBP- und der MAP2-Färbung das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Zur Herstellung der DAB-Lösung wurden 25 mg DAB in 50 ml PBS gelöst und mit 20 µl 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt. Die Präparate wurden in eine Küvette mit DAB-Lösung gestellt und durch Probemikroskopieren in kurzen Abständen die Dauer bis zur optimalen Anfärbung ermittelt. Bei der Verwendung von MAP2-Antikörpern dauerte die Entwicklung in der Regel weniger als 2 min. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gestellt.

Die Entwicklung der MRP14-Schnitte erfolgte mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC). Zur Herstellung dieser Lösung wurden von der AEC-Stammlösung, bestehend aus 12,5 g AEC gelöst in 250 ml Dimethylformamid, 4 ml mit 56 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2 filtriert und 20 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid zugegeben.

Um den Kern-Zytoplasma-Kontrast besser darzustellen, wurden die Schnitte nach kurzem Spülen mit Aqua dest. für 20 Sekunden in Mayers Hämalaun gegeben. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurden sie kurz in 1 %iger Salzsäure-Alkohol-Lösung differenziert. Durch 5-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte gebläut. Die MRP14-Schnitte wurden an dieser Stelle direkt mit dem wässrigen Eindeckmedium Immu Mount eingedeckt.

Die Schnitte der anderen Färbungen wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) dehydriert, in Xylol getaucht und abschließend mit DePeX eingedeckt.

#### **2.2.3.7 Durchführung der Doppelfärbung (LAB- und APAAP-Methode)**

Für die Doppelfärbung wurden die LAB-Methode und die APAAP-Methode kombiniert angewandt. Die Schwierigkeit der Doppelfärbung von MAP2 und NeuN bestand darin, dass nur zwei monoklonale Primärantikörper, die beide aus der Spezies Maus stammten, zur Verfügung standen. Um die beiden Antikörper für die Doppelfärbung einsetzen zu können, wurde daher die Färbung mit dem ersten Primärantikörper (anti-NeuN) mit Tyramid amplifiziert und dann mit der LAB-Methode durch DAB sichtbar gemacht. Die Färbung mit

dem zweiten Primärantikörper (anti-MAP2) wurde durch die APAAP-Methode und die Umsetzung von Fast Blue entwickelt.

Zunächst erfolgte am Tag 1 an den entparaffinierten Schnitten die Antigendemaskierung und Blockade der endogenen Peroxidase. Auf die Schnitte wurden je 100 µl einer 1 %igen Lösung aus TSA<sup>TM</sup>-Blocking-Reagenz (aus dem „*Tyramide Signal Amplification (TSA<sup>TM</sup>)-Kit*“ und PBS gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Diese und auch die folgenden Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurde der gegen NeuN gerichtete Primärantikörper in 1 %iger TSA<sup>TM</sup>-Blocking-Lösung 1:1000 verdünnt, je 100 µl auf die Präparate gegeben und die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Tag 2 wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit PBS für 1 Stunde mit je 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers, 1:200 verdünnt in TSA<sup>TM</sup>-Blocking-Reagenz, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden je 100 µl HRP(*horseradish*-Peroxidase)-markiertes Streptavidin (1:200 verdünnt in PBS) auf die Schnitte pipettiert und Deckgläser aufgelegt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen mit PBS wurde biotinyliertes Tyramid 1:200 mit Verstärkungspuffer (beides aus dem „*Tyramide Signal Amplification (TSA<sup>TM</sup>)-Kit*“) und einer sehr kleinen Menge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,005 %ig) verdünnt und zur Signalverstärkung je 150 µl auf die Schnitte gegeben. Nach Spülung mit PBS wurde mit DAB entwickelt.

Im Anschluss folgte als zweiter Schritt der Doppelmarkierung die MAP2-Färbung mittels der APAAP-Methode. Zur Blockade unspezifischer Protein-Protein-Bindungen wurden die Schnitte 1 Stunde bei Raumtemperatur mit je 100 µl Mausserum (1:50 verdünnt in PBS) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden am Tag 2 je 100 µl des gegen MAP2-gerichteten Primärantikörpers (1:200 verdünnt) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde am Tag 3 noch einmal wiederholt. Am Tag 4 wurden die Präparate mit TBS (TRIS-buffered saline) gewaschen und für 30 min mit je 100 µl anti-Maus-Antikörper (1:50 verdünnt) inkubiert. Nach erneuter Spülung mit TBS wurden je 100 µl des Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Komplexes, 1:50 verdünnt, auf die Schnitte gegeben und die Präparate 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurden die Präparate mit TBS gewaschen und mit Fast Blue für 35 min entwickelt. Mit Hämalaun wurden die Schnitte sehr kurz (2 sec) gegengefärbt und abschließend mit Immu Mount eingedeckt.

**Tabelle 1:** Verwendete Antikörper, deren Verdünnung und Vorbehandlung des Gewebes

Primär-antikörper	Klonalität	Herkunftsspezies	Methode	Verdünnung	Vorbehandlung der Schnitte	Sekundärantikörper
anti-MAP2	monoklonal	Maus	LAB	1:400 <sup>1</sup>	Zitratpuffer in MW*	biotinylierter Schaf-anti-Maus-AK
anti-MAP2	monoklonal	Maus	APAAP	1:200 <sup>2</sup>	Zitratpuffer in MW*	Kaninchen-anti-Maus-AK
anti-NeuN	monoklonal	Maus	LAB	1:1000 <sup>3</sup>	Zitratpuffer in MW*	biotinylierter Schaf-anti-Maus-AK
anti-MBP	polyklonal	Kaninchen	LAB	1:500 <sup>1</sup>	∅	biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-AK
anti-MRP14	monoklonal	Maus	LAB	1:500 <sup>1</sup>	Protease	biotinylierter Kaninchen-anti-Maus-AK

<sup>1</sup> Verdünnung in 10 %iger FCS/PBS-Lösung; <sup>2</sup> Verdünnung in Lösung aus PBS, Tween, BSA und FCS; <sup>3</sup> Verdünnung in 1 %iger *TSA-Blocking*-Lösung; \* Mikrowelle

## 2.3 Auswertung der Histopathologie

### 2.3.1 Qualitativ

Mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurden entzündliche Infiltrate identifiziert. Auf LFB/PAS-gefärbten Schnitten wurden demyelinisierte Areale und normal erscheinende weiße Substanz detektiert. Die Bielschowsky-Silberimprägnation diente zur Einschätzung der axonalen Dichte. Die Bielschowsky-Silberimprägnation zeigte in den Läsionen ein distendiertes axonales Gerüst, d. h. die Axone sind weitestgehend erhalten, aber erscheinen durch die Entzündungszellen auseinander gedrängt.

Anhand dieser histologischen Färbungen wurden anfangs Schnitte von 15 Tieren mit EAE durchgesehen. Neun von diesen 15 Tieren wurden dann aufgrund ihres Befallsmusters für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Diese neun ausgesuchten erkrankten Tiere zeigten jeweils mindestens auf einer Schnittebene in einer Großhirnhemisphäre akute demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz und in der korrespondierenden Hemisphäre weitgehend normal erscheinende weiße Substanz. Auf diese Weise war ein direkter Vergleich der Bereiche „Läsion“ und „normal erscheinende weiße Substanz“ in einer Region innerhalb eines Tieres möglich. Es wurde mindestens ein Schnitt pro Tier anhand dieser Kriterien für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgesucht. Die Kontrolltiere wiesen in beiden Hemisphären normal erscheinende weiße Substanz auf. An diesen Schnitten der erkrankten Tiere und der Kontrollen wurden daraufhin auch die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.



### 2.3.2 Quantitativ

Die Quantifizierung der Neurone in der weißen Substanz erfolgte anhand zweier unterschiedlicher neuronaler Marker. Zunächst wurden die MAP2-positiven Nervenzellen bestimmt. Anschließend wurden die NeuN-positiven Neurone auf doppelgefärbten (anti-MAP2- und anti-NeuN) Präparaten gezählt.

Die quantitative Auswertung erfolgte in drei verschiedenen Regionen: (1) gesunde weiße Substanz, (2) in demyelinisierten Läsionen der EAE-Tiere und (3) in der normal erscheinenden myelinisierten weißen Substanz der EAE-Tiere. Die Auszählung erfolgte jeweils in der komplett zur Verfügung stehenden Fläche dieser drei verschiedenen Regionen, wobei folgende Einschränkung beachtet wurde: Das Problem beim Auszählen der Nervenzellen besteht darin, dass die Neurone in der weißen Substanz nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern in der unmittelbaren Grenze zum Kortex eine deutlich höhere Dichte aufweisen (Abb. 1 B). Um eine Beeinflussung der Nervenzelldichte durch die unmittelbare subkortikale Zone zu vermeiden, wurden die Zählungen in der vorliegenden Arbeit in der zentral gelegenen weißen Substanz mit einem Sicherheitsabstand zum Kortex von mindestens 500 µm durchgeführt. Mittels der MAP2-Färbung wurde die Grenze zum Kortex identifiziert, da sich in dieser Färbung Perikaryen und Dendriten im Kortex kräftig anfärben (Abb. 1 A). Die weiße Substanz erscheint hingegen blass (Abb. 1 C). Von der Stelle, an der die Dendritendichte abnimmt (Abb. 1, gestrichelte Linie), wurde in der vorliegenden Arbeit ein Sicherheitsabstand von mindestens 500 µm gehalten (Abb. 1 B). Die Zählungen wurden nur außerhalb dieses Übergangsbereichs, in der übrigen weißen Substanz (Abb. 1 C, unterhalb der gepunkteten Linie) durchgeführt. Das *Corpus callosum* wurde nicht untersucht.

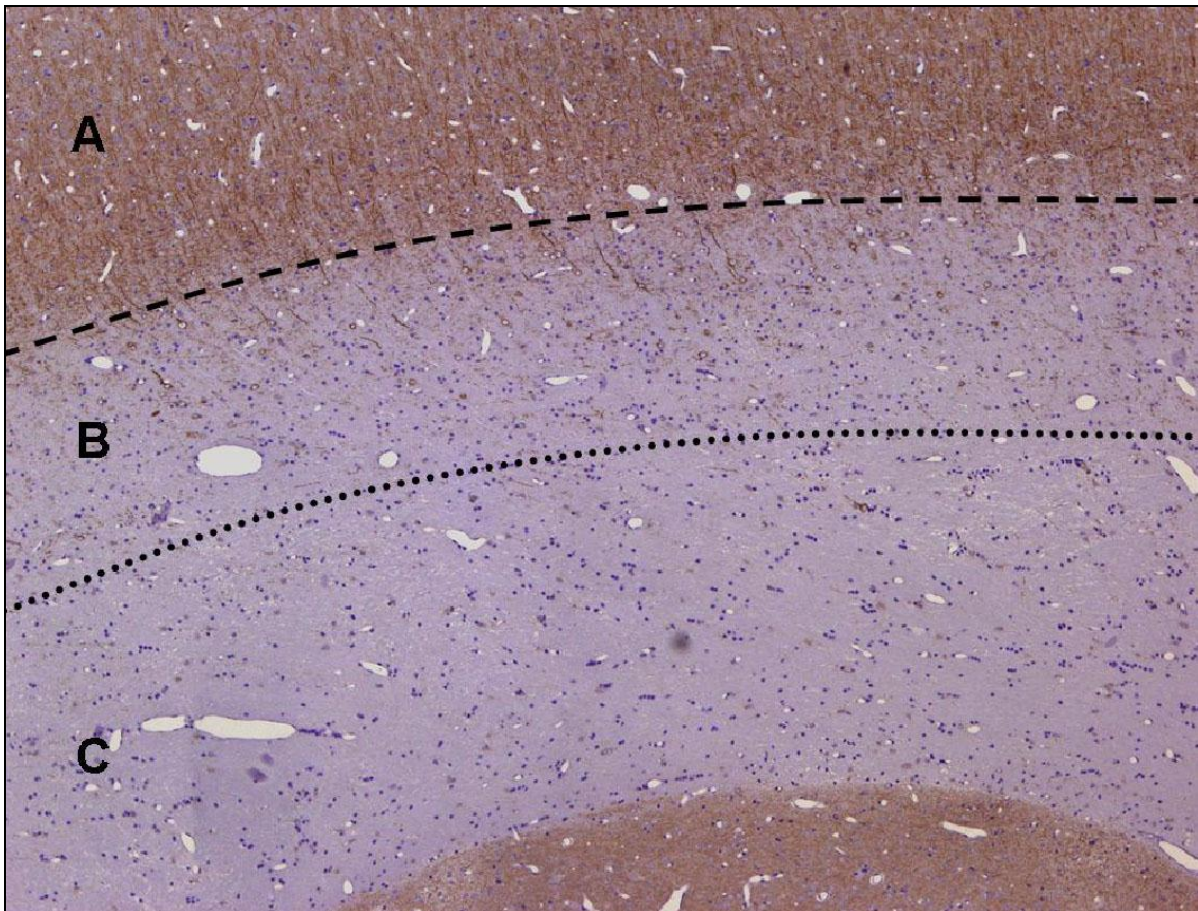
Die Auszählung der MAP2- bzw. NeuN-positiven Zellen wurde in den drei zu unterscheidenden Regionen folgendermaßen durchgeführt:

In den Kontrollfällen wurde in beiden Hemisphären separat die Anzahl der positiven Zellen in der weißen Substanz bestimmt. In den erkrankten Tieren wurden die Läsionen anhand der HE- und LFB-PAS-Färbungen identifiziert (s. o.). Auf den immunhistochemischen Hämalaun-gegengefärbten Schnitten stellten sich die Läsionen morphologisch durch eine erhöhte Zelldichte und eine ödematös mikrozystisch aufgelockerte Gewebematrix dar. Wie beschrieben nahmen die Läsionen meist die komplette weiße Substanz einer Hemisphäre ein.

Die normal erscheinende weiße Substanz der korrespondierenden Hemisphäre stellte sich in den LFB-PAS-Färbungen als myelinisiert dar. In der HE-Färbung zeigte sich eine regelrechte Zelldichte und in der Bielschowsky-Silberimprägnation eine normale axonale Dichte. In wenigen Fällen zeigten sich in der normal erscheinenden weißen Substanz kleine

demyelinisierte Läsionen. Falls dies der Fall war, wurde bei der Auszählung zu den Läsionen ein Mindestabstand von 250  $\mu\text{m}$  gehalten.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Gitterokulars bei 400facher Vergrößerung, wobei jeweils die positiven Zellen pro Gesichtsfeld und die Anzahl der gezählten Gesichtsfelder notiert wurde. Das Zählgitter ist in 10x10 Felder unterteilt und umfasst in der 400fachen Vergrößerung insgesamt eine Fläche von 62.500  $\mu\text{m}^2$ . Die Auszählungen erfolgten in allen Bereichen zweimal. Mit den errechneten Mittelwerten wurden dann die durchschnittlich nachweisbaren MAP2- oder NeuN-positiven Zellen pro 10  $\text{mm}^2$  berechnet.



**Abb. 1:** MAP2-immunohistochemische Färbung: Übersichtsaufnahme von normaler weißer Substanz und Kortexgrenze **A:** Kortex; **B:** Übergangsbereich, der von der Auszählung ausgeschlossen ist; **C:** untersuchter Bereich der weißen Substanz; **gestrichelte Linie:** ab hier Abnahme der Dendriten- und Neuronendichte.

### 2.3.2.1 MAP2-Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurden nur MAP2-positive Zellen gezählt, die eine kräftige braune Färbung im Zytoplasma erkennen ließen, die den Zellkern mindestens zur Hälfte umgab. Zusätzliche Merkmale der MAP2-positiven Nervenzellen waren das Vorhandensein eines Nukleolus und mindestens eines sichtbaren Dendriten.

### 2.3.2.2 NeuN/MAP2-Doppelfärbung

In der NeuN/MAP2-Doppelfärbung sind NeuN-positive Strukturen braun und MAP2-positive Strukturen leuchtend blau dargestellt. Da NeuN ein Kernprotein ist, färbt sich der Kern braun an, z. T. erscheint die Kernstruktur dabei körnig inhomogen. In einigen Fällen ist zusätzlich ein einheitlich brauner Zytoplasmasaum um den Kern erkennbar.

MAP2-positive/NeuN-negative Neurone sind durch einen leuchtend blauen Zellkörper mit mindestens einem Dendritenabgang gekennzeichnet. Der Kern, in dem oft ein Nukleolus sichtbar ist, erscheint aufgrund der Gegenfärbung blassblau.

Bei NeuN/MAP2-doppelt-positiven Zellen erscheint das braune Zytoplasma von Blau überlagert. Der Kern zeigt sich durch die NeuN-Färbung rein braun, da MAP2 nur in Perikaryen und Dendriten vorkommt. Allerdings lässt sich in den meisten Fällen nicht eindeutig bestimmen, ob die Zelle zusätzlich auch MAP2-positiv ist, da hier die Braunfärbung aufgrund der NeuN-Immunreaktivität sehr dunkel ist.

Aufgrund der schlechten Abgrenzbarkeit zwischen NeuN-positiven/MAP2-negativen und doppelt-positiven Neuronen, wurden in der Auszählung diese beiden Gruppen zusammengefasst und nur NeuN-positive Zellen von NeuN-negativen/MAP2-positiven Zellen unterschieden.

### 2.3.2.3 MRP14-Färbung

In der MRP14-Färbung erscheinen Läsionen aufgrund der erheblichen Makrophagenaktivität leuchtend rot. Dabei ist das Zytoplasma der großkugeligen Makrophagen meist schaumig blassrot und der randständige Kern in sehr kräftigem Rot angefärbt. Bei einigen Zellen erscheint auch der gesamte Zellkörper kräftigrot, wobei es sich hierbei um Granulozyten handelte, die nicht gezählt wurden.

Auch hier erfolgte die Auszählung zweimal. Mit Hilfe eines Gitterokulars bei 400facher Vergrößerung wurden in den auch für die MAP2- und NeuN-Färbungen ausgewählten Schnitten die Läsionen untersucht. In einer Fläche entsprechend 20 Gesichtsfeldern wurde die Anzahl MRP14-positiver Makrophagen bestimmt und mit den Mittelwerten aus den beiden Auszählungen die Dichte pro mm<sup>2</sup> in den jeweiligen Schnitten errechnet.

## 2.4 Datenauswertung und Statistik

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Mikroskop vom Typ *BX-41* und einem standardisierten Gitterokular ausgewertet (beides *Olympus Deutschland GmbH*, Hamburg). Die Fotodokumentation erfolgte mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen 12,5 Megapixel-Kamera (*Olympus Typ DP/71*) und der dazugehörigen Bildanalysesoftware *analySIS*<sup>®</sup> (*Soft Imaging System GmbH*, Münster).

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von *SPSS Statistics 12.0* (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) analysiert. Zur Prüfung der ermittelten Werte auf signifikante Unterschiede zwischen der Zelldichte in demyelinisierten Läsionen und in normal erscheinender weißer Substanz im EAE-Tier wurde der gepaarte t-Test angewendet. Der Vergleich der Zelldichte in normal erscheinender weißer Substanz im EAE-Tier mit der Zelldichte im Kontrolltier erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit *GraphPad Prism 4* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) erstellt.

## 2.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

### 2.5.1 Histologische Färbungen

#### 2.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

- Mayers Hämalaunlösung
- Eosin  
Es wurde 1 %iges Eosin in 70 %igem Ethanol gelöst

#### 2.5.1.2 Bielschowsky-Silberimprägnation

- Silbernitrat (20 %):  
Es wurden 20 mg  $\text{AgNO}_3$  in 100 ml Aqua dest. gelöst.
- Entwicklerlösung:  
20 ml Formalin wurden in 100 ml Aqua dest. gegeben. Anschließend wurden 1 Tropfen konzentrierte Salpetersäure und 0,5 g Zitronensäure zugegeben.
- Natriumthiosulfat:  
5 g Natriumthiosulfat wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

#### 2.5.1.3 Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff(LFB-PAS)-Färbung

- LFB-Lösung:  
1 g LFB wurde in 1000 ml 96 %igem Alkohol gelöst und über Nacht bei 57 °C in den Wärmeschrank gestellt.
- Lithiumkarbonat-Lösung:  
0,5 g Lithiumkarbonat wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Perjodsäure
- Schiff-Reagenz
- Salzsäure-Alkohol-Lösung:  
0,25 ml rauchende Salzsäure wurden in 100 ml 70 %igem Ethanol gegeben.

### 2.5.2 Immunhistochemische Färbungen (LAB- und APAAP-Methode)

- Protease  
25 mg Protease in 60 ml Aqua bidest. Für 10 min auf 37 °C erwärmt
- Zitratpuffer:  
In 1000 ml Aqua dest. wurden 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat gelöst. Der pH wurde mit 1M Natronlauge (NaOH) auf pH=6 eingestellt.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung:  
Für die Blockade der endogenen Peroxidase wurden 5 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in

45 ml PBS gelöst.

- phosphate-buffered saline(PBS)- Puffer:  
9,55 g PBS wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst.
- fetal calf-serum (FCS):  
FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für eine Stunde in einem Wasserbad auf 60 °C erhitzt.
- FCS/PBS-Lösung:  
Es wurden FCS und PBS im Verhältnis FCS:PBS = 1:10 verdünnt.
- Streptavidin-Peroxidase-Konjugat(POX)-Lösung:  
Die Lösung wurde mit 10 %igem FCS/PBS in einem Verdünnungsverhältnis von POX:FCS/PBS = 1:1000 angesetzt.
- „Tyramide Signal Amplification (TSA<sup>TM</sup>)“- Blocking-Reagenz:  
TSA<sup>TM</sup>-Blocking-Reagenz in PBS (1 %ig)
- „Tyramide Signal Amplification (TSA<sup>TM</sup>)“-Verstärkungspuffer:  
biotinyliertes Tyramid 1:200 in Verstärkungspuffer
- Streptavidin-horseradish-Peroxidase(HRP)-Lösung:  
1:200 verdünnt in PBS
- Mausserum:  
1:50 verdünnt in PBS
- TRIS-buffered saline(TBS)-Puffer:  
TRIS-Stammlösung: Zu 300 ml Aqua dest. 121,14 g TRIS, 400 ml 1M HCl und 170 g NaCl geben. Mit 1M HCl pH auf 7,5 einstellen, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und bei 4° C lagern.  
Für TBS: 50 ml TRIS-Stammlösung mit 950 ml Aqua dest. verdünnen.
- Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex:  
1:50 verdünnt in Lösung aus 10 ml PBS, 10 µl Tween, 200 mg BSA, 100 µl FCS
- 3,3'-Diaminobenzidin(DAB)-Lösung:  
Es wurden 25 mg DAB in 50 ml PBS-Puffer gelöst. Zur Optimierung wurde die Lösung für 15 Minuten auf einen Magnetrührer gestellt und anschließend filtriert. Abschließend wurden 20 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol(AEC)-Lösung:  
Stammlösung: 12,5 g 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 250 ml Dimethylformamid lösen und dunkel aufbewahren.  
Gebrauchslösung: 4 ml AEC-Stammlösung mit 56 ml 0,1M Acetatpuffer pH 5,2 filtrieren und 20 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid dazugeben.
- 0,1M Acetatpuffer pH 5,2:

Lsg. A: 5,75 ml Eisessig in 1 l Aqua bidest.

Lsg. B: 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat in 1 l Aqua bidest.

300 ml von Lösung A mit 700 ml von Lösung B mischen und den pH auf 5,2 einstellen.

– Fast Blue-Lösung:

49 ml TRIS pH 8,2, 1 ml Naphthol, 50 µl Levamisol und 25 mg Fast Blue Salz filtrieren und sofort verwenden

**Tabelle 2:** Bezugsquellen der Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Ammoniumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CFA (komplettes Freund'sches Adjuvans)	Difco, Lawrence, Kansas, USA
Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
DePeX	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
EosinG	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fast-Blue (MAP2 b. Doppelm.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>fetal calf-serum</i> (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Formalin	Merck KGaA, Darmstadt
Glyzerin	Merck KGaA, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Immu Mount	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Karlsruhe
Levamisol	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Lithiumkarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Luxol Fast Blue	BDH, Pool, England

Mayers Hämalaun-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Perjodsäure	Merck KGaA, Darmstadt
<i>phosphat-buffered-saline</i> (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Salzsäure, rauchend	Merck KGaA, Darmstadt
Schiff-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Silbernitrat	neoLab Migge, Heidelberg
Tween	Merck KGaA, Darmstadt
„Tyramide Signal Amplification (TSA™)-Kit“	Perkin Elmer Life Science GmbH, Rodgau
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt

**Tabelle 3:** Bezugsquellen der Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunftsspezies	Bestell-Nr.	Hersteller
anti-MBP	Kaninchen	AO623	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
anti-MAP2A/B	Maus	HM5-249P	LabVision Neomarkers, Fremont, California, USA
anti-NeuN	Maus	MAB 377	Millipore GmbH, Schwalbach
anti-MRP14	Maus	BM 4026B	Acris Antibodies GmbH, Herford

**Tabelle 4:** Bezugsquellen der Sekundärsysteme

Bezeichnung	Konjugiert mit	Kat.-Nr.	Hersteller
Streptavidin	Peroxidase	E2886	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
„Tyramide Signal Amplification (TSA™)-Kit“	Biotin	T30955	Invitrogen GmbH, Frankfurt
Schaf-anti-Maus-AK (LAB) MAP2/NeuN/MRP14	Biotin	RPN1001	Amersham, GE Healthcare, München
Ziege-anti-Kaninchen-AK MBP	Biotin	111065144	Dianova GmbH, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus-AK (APAAP)	Alkalische Phosphatase	D0651	Dako Deutschland GmbH, Hamburg



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchte Marmosetten

In der vorliegenden Arbeit wurden neun Tiere mit EAE und acht Kontrolltiere ausgewertet. Wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben, wurde jeweils mindestens eine Region entsprechend einem Schnittpräparat von den neun Tieren mit EAE anhand des Befallsmusters für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Mit Hilfe der histologischen Färbungen (HE, LFB/PAS und Bielschowsky; siehe Material und Methoden, 2.3.1) wurden Schnitte ausgesucht, die in einer Großhirnhemisphäre akute demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz zeigten, aber in der korrespondierenden Hemisphäre weitgehend normal erscheinende weiße Substanz aufwiesen. So konnte ein direkter Vergleich zwischen „Läsion“ und „normal erscheinender weißer Substanz“ (*normal appearing white matter* – NAWM) innerhalb einer Region stattfinden. Ergänzende Informationen zu den Tieren und den jeweiligen Schnittpräparaten sind in den Tabellen 5 und 6 zu finden. In den Kontrolltieren wurden auf den ausgewerteten Schnitten die Nervenzellen in der weißen Substanz gezählt. In den erkrankten Tieren wurde in den analysierten Regionen (Schnitten) die Nervenzelldichte in der weißen Substanz jeweils in der normal erscheinenden weißen Substanz und in den Läsionen ermittelt.

**Tabelle 5:** ausgewertete Kontrolltiere

Tier	Z-Nummer	Analysierte Regionen pro Tier	Geschlecht	Alter in Monaten
I	346/05*	2	?	1
II	347/05	1	m	119
III	691/08**	4	m	123
IV	1390/07	2	m	58
V	1391/07	2	m	48
VI	1392/07	1	w	33
VII	1393/07	1	m	25
VIII	1395/07	1	w	32

\* in der NeuN/MAP2-Färbung nicht auswertbar

\*\* in der NeuN/MAP2-Färbung nur 3 Regionen auswertbar

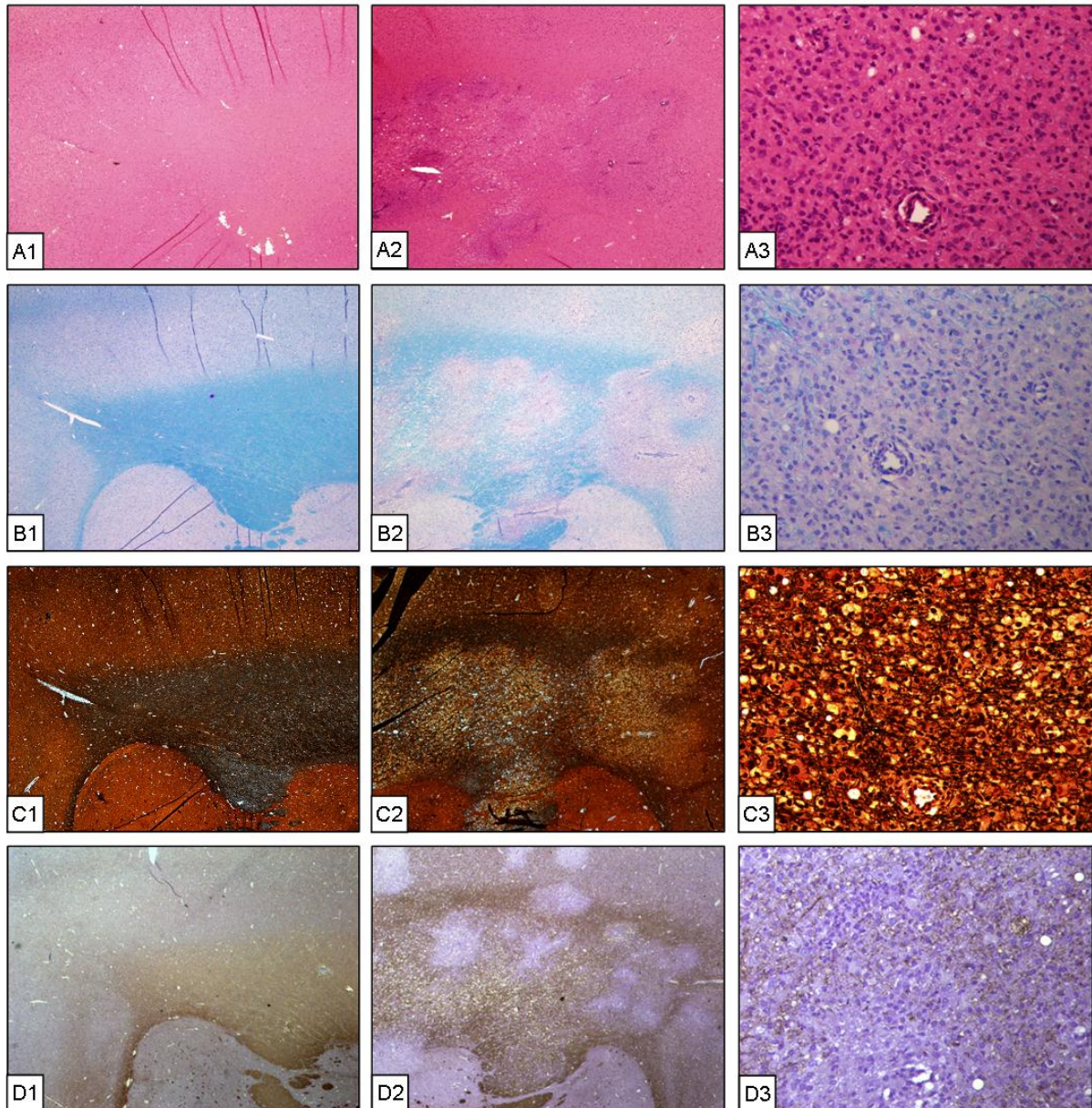
**Tabelle 6:** ausgewertete EAE-Tiere

Tier	Z-Nummer	Analysierte Regionen pro Tier	Geschlecht	Alter in Monaten	Krankheitsdauer in Tagen
1	499/05	2	m	37	43
2	501/04-502/04	2	m	53	57
3	693/08	1	w	46	27
4	696/08	1	w	49	42
5	699/08	1	w	48	47
6	701/08	1	m	47	39
7	703/08	1	m	29	31
8	711/05	1	m	105	79
9	1000/03-1001/03	3	w	30	57

### 3.2 Morphologische Charakterisierung der Läsionen und der normal erscheinenden weißen Substanz

In der HE-Färbung zeigten alle untersuchten erkrankten Tieren mindestens in einer Großhirnhemisphäre ausgedehnte, relativ scharf begrenzte Läsionen in der weißen Substanz. Diese Areale wirkten mikrozystisch aufgelockert und wiesen eine erhöhte Zelldichte auf. Es zeigten sich in den Entzündungsherden zahlreiche schaumzellige Makrophagen und reaktive Astrozyten mit bauchigem eosinophilen Zytoplasma. Des Weiteren ließen sich in den Läsionen fokal perivaskuläre Infiltrate aus lymphomonocytyären Zellen erkennen. Wie bereits erwähnt fand sich in der anderen Großhirnhemisphäre relativ normal erscheinende weiße Substanz.

Die LFB/PAS-Färbung zeigte das Ausmaß der Demyelinisierung in der weißen Substanz. Während sich normal erscheinende weiße Substanz in dieser Färbung aufgrund ihres regelrechten Myelingehts kräftig türkis anfärbt, erscheinen demyelinisierte Areale und auch Anteile der grauen Substanz blassrosa. Entsprechend den in der HE-Färbung ödematös aufgelockerten Arealen mit erhöhter Zelldichte fanden sich in diesen Bereichen die stärksten Zeichen der Demyelinisierung. Die meist um Gefäße zentrierten entmarkten Areale waren sehr ausgedehnt und konfluierend. Dennoch ließen sich teilweise auch in fast komplett demyelinisierten Bereichen noch vereinzelte stehen gebliebene Myelinfasern nachweisen. Auch in dieser Färbung waren in den Läsionen zahlreiche schaumzellige Makrophagen zu erkennen.



**Abb. 1** Morphologische Charakteristika der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) und der Läsionen im EAE-Tier: **A1**: NAWM (20fache Vergrößerung); **A2**: Läsion (20fache Vergrößerung); **A3**: Läsion (200fache Vergrößerung) – HE-Färbung; dementsprechend **B1-3**: LFB-PAS-Färbung; **C1-3**: Bielschowsky-Silberimprägnation; **D1-3**: Anti-MBP-Immunhistochemie

Zur Darstellung der Demyelinisierung wurde des Weiteren eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen das Myelin-basische Protein durchgeführt. Auch mit dieser Färbung zeigten sich in allen untersuchten kranken Tieren überwiegend perivaskulär lokalisierte und miteinander konfluierende Entmarkungherde in der weißen Substanz. In den meisten Läsionen waren in den Makrophagen MBP-positive Myelinabbauprodukte identifizierbar, was auf eine aktive Demyelinisierung hindeutet. Es war jedoch nicht möglich,

eine Auszählung dieser Makrophagen durchzuführen, weil sie sich nicht immer deutlich voneinander und von verbliebenen Myelinresten abgrenzen ließen.

In der Versilberung nach Bielschowsky zeigten sich Nervenfasern schwarz und der Hintergrund gelbbraun. In den Schnittpräparaten der erkrankten Tiere war in den Läsionen der weißen Substanz eine im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz relativ verminderte Axondichte erkennbar. Die noch vorhandenen Nervenfasern erschienen durch die infiltrierenden Entzündungszellen auseinandergedrängt.

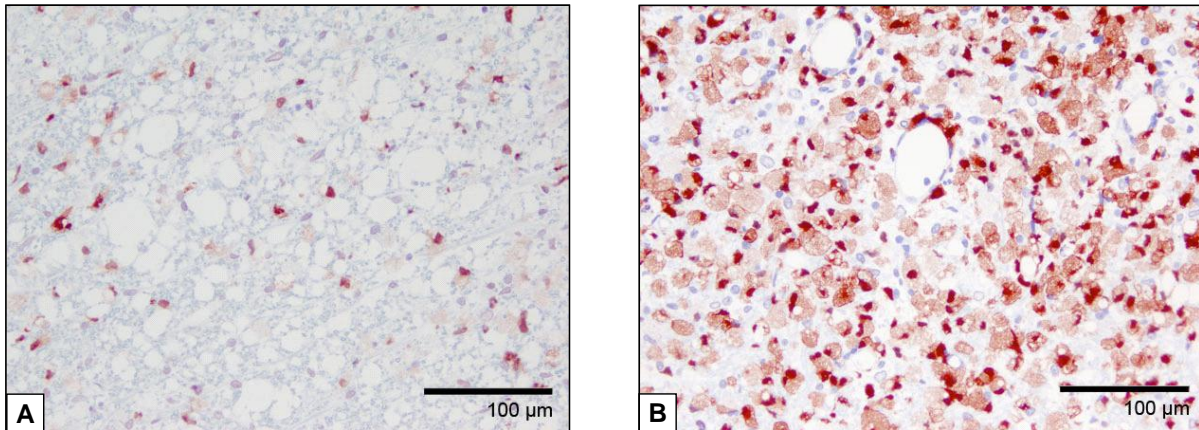
Die normal erscheinende weiße Substanz in den erkrankten Tieren glich im histologischen Bild weitgehend der weißen Substanz in den gesunden Kontrolltieren.

### 3.3 Variable Makrophagendichte in demyelinisierten Läsionen

Um die Entzündungsaktivität der untersuchten Läsionen in der weißen Substanz zu quantifizieren, wurden die Schnittpräparate der erkrankten Tiere mit Antikörpern gegen *myeloid-related protein 14* (MRP14) immunhistochemisch gefärbt. MRP14 ist ein Kalziumbindendes Protein der S100-Familie und wird hauptsächlich in den frühen Reifestadien von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Es dient somit als ein akuter Makrophagenaktivierungsmarker. Da in dieser Färbung auch Granulozyten ein positives Signal zeigen, wurden nur MRP14-positive Zellen gewertet, die auch morphologische Charakteristika von Makrophagen aufwiesen. MRP14-positive Zellen, die eine annähernd runde Form und einen randständigen Kern hatten und deren Zytoplasma aufgelockert erschien, wurden als Makrophagen gewertet. Das Zytoplasma der Granulozyten erschien dagegen gleichmäßig und sehr kräftig gefärbt, die Form der Zellen war nicht rund und der Durchmesser der Zellen war kleiner.

Die Dichte der MRP14-positiven Zellen variierte in den untersuchten Läsionen pro Tier zwischen 45 Zellen/mm<sup>2</sup> und 593 Zellen/mm<sup>2</sup>. Die durchschnittliche Dichte MRP14-positiver Zellen in den Läsionen lag bei 221 Zellen/mm<sup>2</sup> (Mittelwert 221 Zellen/mm<sup>2</sup>, Median 168/mm<sup>2</sup>) (siehe Abbildung 2). Es bestand keine Korrelation zwischen der Dichte MRP14-positiver Zellen und der Krankheitsdauer der Tiere. Allerdings zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Alter und Krankheitsdauer der erkrankten Tiere (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,734; p=0,024).





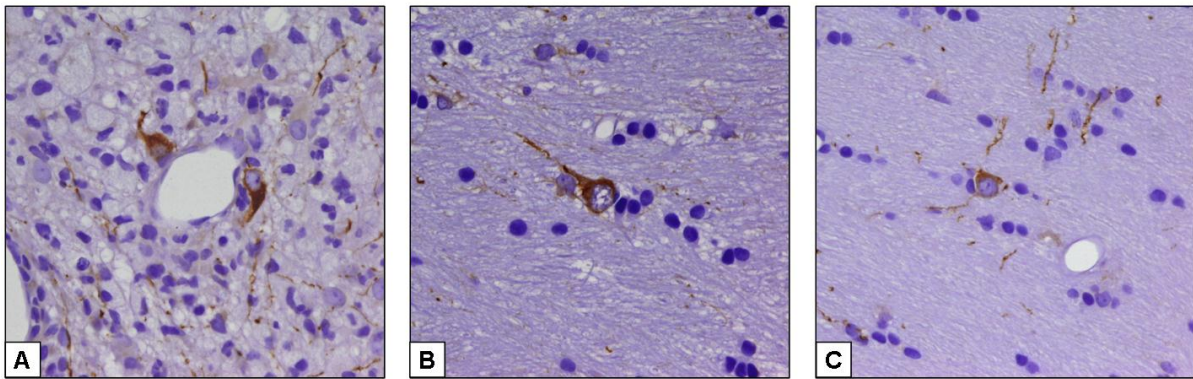
**Abb. 2:** Die Läsionen unterschieden sich hinsichtlich der Dichte MRP-14 positiver Makrophagen. **A:** Läsion mit wenig MRP14-positiven Makrophagen und **B:** Läsion mit viel MRP14-positiven Makrophagen (200fache Vergrößerung).

### 3.4 Untersuchung der MAP2-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz

#### 3.4.1 Ähnliche Morphologie MAP2-positiver Nervenzellen in Kontrollen und in EAE-Tieren

Um die MAP2-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz zu untersuchen, wurde die immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen MAP2 durchgeführt. MAP2 gehört zu den häufigsten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen des Nervensystems und kommt vor allem in den Dendriten und Zellkörpern von Neuronen vor.

Morphologisch ähnelten sich MAP2-positive Nervenzellen in den drei untersuchten Regionen: demyelinisierter weißer Substanz (EAE), normal erscheinender weißer Substanz (EAE-NAWM) und weißer Substanz der Kontrolltiere (siehe Abbildung 3). Die MAP2-positiven Nervenzellen ließen eine kräftig braune Färbung des Zytoplasmas erkennen. Zusätzliche Merkmale der MAP2-positiven Nervenzellen waren das Vorhandensein eines Nukleolus und mindestens eines sichtbaren Dendriten.

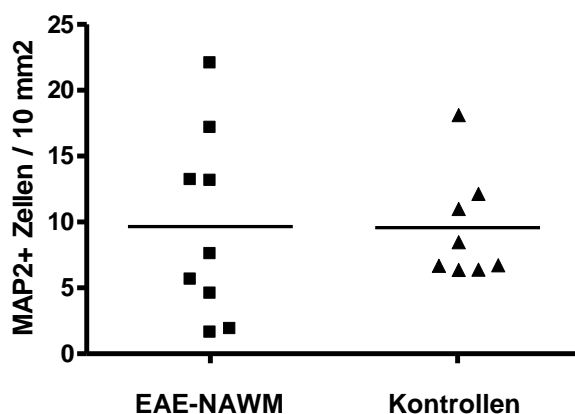


**Abb. 3:** Ähnliche Morphologie MAP2-positiver Zellen in Läsion (A), EAE-NAWM (B) und weißer Substanz der Kontrolltiere (C) (400fache Vergrößerung).

### 3.4.2 Ähnliche Dichte MAP2-positiver Nervenzellen in Kontrollen und normal erscheinender weißer Substanz in EAE-Tieren

Im nächsten Schritt wurde zunächst untersucht, ob es Unterschiede in der Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz der Kontrollen im Vergleich zu normal erscheinender weißer Substanz der EAE-Tiere gibt. Hierzu wie in sämtlichen folgenden Analysen wurden die Auszählungen mit einem Mittelwert pro Tier zusammengefasst, da in einigen Tieren (Tiere I, III, IV, V sowie 1, 2, 9) mehrere Regionen ausgezählt wurden.

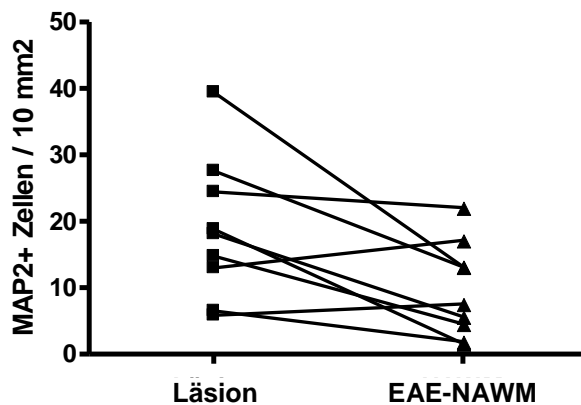
Insgesamt zeigte sich eine geringe Dichte MAP2-positiver Nervenzellen in sämtlichen Tieren. Die Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen war ähnlich in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere ( $10 \pm 7$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>) und in der weißen Substanz der Kontrolltiere ( $10 \pm 4$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>) ( $p=0,083$ ) (siehe Abbildung 4).



**Abb. 4:** Ähnliche Dichte MAP2-positiver Zellen in EAE-NAWM und weißer Substanz der Kontrollen  
 EAE-Tiere:  $10 \pm 7$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
 Kontrolltiere:  $10 \pm 4$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
 $p=0,083$

### 3.4.3 Erhöhte Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen in der demyelinisierten weißen Substanz im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren

In den EAE-Tieren zeigte sich in den Läsionen eine signifikant erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen im Vergleich zur gegenüberliegenden normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM). Mit durchschnittlich  $19 \pm 11$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup> war die Dichte in den Läsionen um 90 % höher als die durchschnittliche Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz ( $10 \pm 7$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>) ( $p=0,023$ ) (siehe Abbildung 5).



**Abb. 5: Erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen in Läsionen**  
Läsion:  $19 \pm 11$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
NAWM:  $10 \pm 7$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
 $p=0,023$

Diese Ergebnisse bestätigten sich auch, wenn für die Auswertung der MAP2-positiven Zellen in den EAE-Tieren sämtliche Einzelwerte der einzelnen analysierten Regionen (d. h. mehrfache Werte pro Tier) analysiert wurden. Bei der Analyse all dieser Einzelwerte zeigten sich ebenfalls signifikant erhöhte MAP2-positiv Zellen in den Läsionen im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz ( $17$  MAP2-positiv Zellen /10 mm<sup>2</sup> in Läsionen ( $n=13$ ) im Vergleich zu  $10$  MAP2-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup> in normal erscheinender weißer Substanz ( $n=13$ );  $p = 0,03$ ).

Um zu untersuchen, ob die Dichte der MAP2-positiven Zellen pro Tier von der Entzündungsaktivität beeinflusst wird, wurde die Anzahl MAP2-positiver Zellen mit der Dichte MRP14-positiver Makrophagen korreliert. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter ( $r=0,033$ ;  $p=0,932$ ).

### 3.5 Untersuchung der NeuN-positiven Nervenzellen in der weißen Substanz

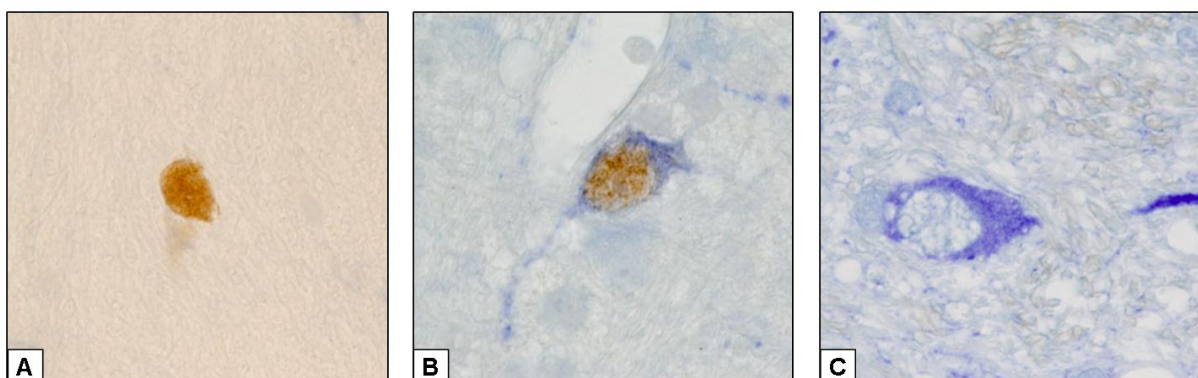
#### 3.5.1 Ähnliche Morphologie NeuN-positiver Nervenzellen in Kontrollen und in EAE-Tieren

Zur weiteren Differenzierung wurde die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Neuronenspezifisches nukleäres Antigen (NeuN) und Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) durchgeführt.

Da es sich bei NeuN um ein Kernprotein handelt, zeigten die Zellkerne eine deutliche, in diesem Falle braune Färbung. Zum Teil war auch das Zytoplasma angefärbt, meist in einem blässeren Braun. MAP2-positive Strukturen ließen sich an einer intensiven Blaufärbung erkennen, wobei die Zellkerne durch die Gegenfärbung blassblau oder bei zusätzlicher NeuN-Positivität braun erschienen.

Der Großteil der detektierten Nervenzellen in der weißen Substanz erwies sich als NeuN-positiv, wobei nicht in allen Fällen zwischen NeuN-positiven/MAP2-negativen und NeuN-positiven/MAP2-positiven Nervenzellen unterschieden werden konnte. Daher wurden für die quantitative Auswertung als zuverlässiges Kriterium nur NeuN-positive Nervenzellen gezählt. Bei den nachweisbaren NeuN/MAP2-doppelt-positiven Zellen erschien das braune Zytoplasma blau überlagert. Der Kern zeigte sich durch die NeuN-Färbung rein braun, da MAP2 nur in Perikaryen und Dendriten vorkommt.

Ganz vereinzelt zeigten sich MAP2-positive/NeuN-negative Neurone, die durch einen leuchtend blauen Zellkörper, meist mit einem Dendritenabgang, gekennzeichnet waren. Der Kern, in dem oft ein Nukleolus sichtbar war, erschien aufgrund der Gegenfärbung blassblau (siehe Abbildung 6).



**Abb. 6:** Morphologie und Färbeverhalten der Neurone der weißen Substanz in der immunhistochemischen Doppelmarkierung mit Anti-NeuN- und Anti-MAP2-Antikörpern (100fache Vergrößerung) **A:** NeuN-positives/MAP2-negatives Neuron; **B:** NeuN-positives/MAP2-positives Neuron; **C:** MAP2-positives/NeuN-negatives Neuron

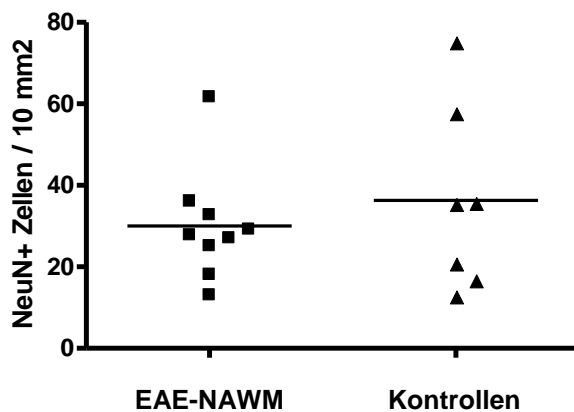


### 3.5.2 Ähnliche Dichte NeuN-positiver Zellen in Kontrollen und in normal erscheinender weißer Substanz in den EAE-Tieren

Auch hier wurden die Ergebnisse von mehreren analysierten Regionen zu einem Mittelwert pro Tier zusammengefasst.

MAP2-positive/NeuN-negative Zellen fanden sich nur vereinzelt (ca. 1-2 Zellen pro betroffener Hemisphäre bzw. gesunder weißer Substanz; max. 4 Zellen) und in einigen Tieren gar nicht.

Die Auszählung der NeuN-positiven Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der durchschnittlichen Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren ( $30 \pm 14$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$ ) und der durchschnittlichen Dichte in der weißen Substanz der Kontrolltiere ( $36 \pm 23$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$ ) ( $p=0,87$ ) (Abbildung 7). Allerdings fiel auf, dass die Dichte der NeuN-positiven Nervenzellen in sämtlichen Arealen deutlich höher war als die Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen.



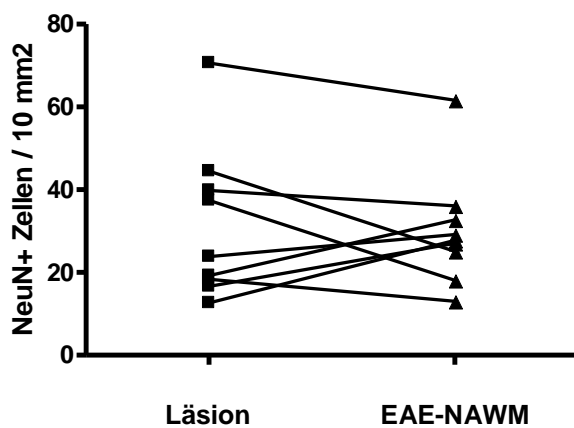
**Abb. 7: Ähnliche Dichte NeuN-positiver Zellen in EAE-NAWM und weißer Substanz der Kontrollen**  
 EAE-Tiere:  $30 \pm 14$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$   
 Kontrolltiere:  $36 \pm 23$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$   
 $p=0,87$

### 3.5.3 Ähnliche Dichte der NeuN-positiven Nervenzellen in der demyelinisierten weißen Substanz im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren

Mit dem Antikörper gegen MAP2 zeigte sich eine erhöhte Nervenzelldichte in der demyelinisierten weißen Substanz im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren. Im Gegensatz hierzu ergab die Auswertung der NeuN-positiven Nervenzellen in den EAE-Tieren eine ähnliche Dichte NeuN-positiver Nervenzellen in demyelinisierten Läsionen ( $31 \pm 19$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$ ) und normal erscheinender weißer Substanz ( $30 \pm 14$  NeuN-pos. Zellen/ $10 \text{ mm}^2$ ;  $p=0,76$ ) (Abbildung 8). Insgesamt fiel

auch hier auf, dass die Dichte der NeuN-positiven Nervenzellen in sämtlichen Arealen deutlich höher war als die Dichte der MAP2-positiven Nervenzellen. In den Läsionen bestand eine positive Korrelation zwischen der Dichte MAP2-positiver und NeuN-positiver Zellen (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,817;  $p=0,007$ ), in der NAWM und in den Kontrollen jedoch nicht.

Um zu untersuchen, ob die Dichte der NeuN-positiven Zellen von der Entzündungsaktivität beeinflusst wird, wurde die Anzahl NeuN-positiver Zellen mit der Dichte MRP14-positiver Makrophagen korreliert. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter ( $r=-0,046$ ;  $p=0,637$ )



**Abb. 8: Ähnliche Dichte NeuN-positiver Zellen in Läsionen und EAE-NAWM**  
Läsion:  $31 \pm 19$  NeuN-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
NAWM:  $30 \pm 14$  NeuN-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>  
 $p=0,76$

## 4 Diskussion

Die Untersuchungen der Neurone in der weißen Substanz bei Marmosetten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) ergaben insgesamt eine geringe neuronale Dichte in der weißen Substanz. Die Morphologie der Nervenzellen war in den drei untersuchten Regionen (demyelinisierte weiße Substanz, normal erscheinende weiße Substanz (*normal appearing white matter* – NAWM) im EAE-Tier und der weißen Substanz der Kontrolltiere) ähnlich.

Die Dichte der MAP2-positiven Zellen war in den Läsionen etwa doppelt so hoch wie die Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere. Hingegen gab es keine Unterschiede zwischen der Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere und der weißen Substanz der Kontrolltiere.

Die Auszählung der NeuN-positiven Zellen ergab eine ähnliche Dichte in Läsionen und in normal erscheinender weißer Substanz in den EAE-Tieren. Ebenso zeigte sich eine ähnliche Dichte NeuN-positiver Nervenzellen in der weißen Substanz der Kontrolltiere.

Die Anzahl der NeuN-positiven Neurone in der weißen Substanz war im Allgemeinen in allen drei untersuchten Regionen höher als die der MAP2-positiven Neurone.

### 4.1 Erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen in den Läsionen gegenüber der normal erscheinenden weißen Substanz bei gleichwertiger Dichte NeuN-positiver Zellen in beiden Arealen

Die MAP2-positiven Zellen waren mit einer durchschnittlichen Dichte von  $19 \pm 11$  MAP2-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup> in den Läsionen signifikant erhöht gegenüber der Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz ( $10 \pm 7$  MAP2-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup>) ( $p=0.023$ ).

Die Dichte NeuN-positiver Zellen war in Läsionen und normal erscheinender weißer Substanz dagegen ähnlich (Läsion:  $31 \pm 19$  NeuN-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup>; NAWM:  $30 \pm 14$  NeuN-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup>;  $p=0,76$ ).

Es stellt sich die Frage, warum mehr MAP2-positive Zellen in den demyelinisierten Arealen gegenüber den nicht betroffenen Arealen nachweisbar sind und warum NeuN-positiv Neurone in Läsionen und in normal erscheinender weißer Substanz etwa gleich häufig zu finden sind.

#### 4.1.1 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)

MAP2 gehört zu den häufigsten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und kommt vor allem, aber nicht ausschließlich, im Nervensystem vor.

Durch alternatives Spleißen gehen aus dem MAP2-Gen drei Isoformen hervor, MAP2A, 2B, 2C (Goedert et al. 1991, Chung WJ et al. 1996). MAP2A und MAP2B weisen ein hohes Molekulargewicht (280 kDa) auf und kommen vor allem in den Dendriten und Zellkörpern der Neurone vor. MAP2C ist ein kleines Molekül (70 kDa), das überwiegend während der Embryonalzeit in Nervenzellkörpern, Dendriten und zusätzlich in Axonen und Gliazellen gefunden wird. Es ist in reifen Neuronen nicht mehr zu finden und scheint von MAP2A ersetzt zu werden. MAP2B lässt sich in allen Entwicklungsstadien und bei Erwachsenen nachweisen (Goedert et al. 1991).

Möglicherweise ist die niedermolekulare Form vor allem für die Ausbildung von Dendritenfortsätzen wichtig, während die Stabilisierung und Aufrechterhaltung bereits vorhandener Dendriten durch MAP2A und MAP2B reguliert wird. Genaue Regulationsmechanismen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

Auch Oligodendrozyten und Mikrogliazellen können MAP2 geringgradig exprimieren. In Oligodendrozyten ist aber die Isoform MAP2C vorherrschend (Müller et al. 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper detektieren diese oligodendrogliale Form jedoch nicht, sondern nur die Formen mit dem hohen Molekulargewicht MAP2A und MAP2B.

Über verschiedene Bindungsstellen stabilisiert MAP2 polymerisiertes Tubulin und verknüpft es mit anderen Filamenten. In seiner Anwesenheit ist die Festigkeit der Mikrotubuli um das drei- bis vierfache erhöht (Felgner et al. 1997). Seine Aktivität ist allerdings abhängig vom Phosphorylierungsgrad, der durch verschiedene Proteinkinasen und Phosphatasen an verschiedenen Stellen im Molekül reguliert wird. *In vitro* weist phosphoryliertes MAP2 keine fördernde Wirkung mehr auf den Zusammenschluss der Mikrotubuli auf (Jameson und Caplow 1981, Murthy und Flavin 1983, Yamamoto et al. 1988). *In vivo* scheint der Effekt von der phosphorylierten Region abhängig zu sein und führt entweder zu einer höheren oder geringeren Affinität des MAP2 zu den Mikrotubuli (Brugg und Matus 1991, Ebner et al. 1999).

An embryonalen neuronalen Vorläuferzellen wurde *in vitro* der Einfluss von MAP2 auf das Aussprossen und die Weiterentwicklung von Neuriten getestet. Die aus Ratten gewonnenen embryonalen zerebellären Neurone und kortikalen Neurone wurden *in vitro* mit MAP2-*Antisense*-Oligonukleotiden behandelt. Daraufhin blieb das Aussprossen von Neuriten im Gegensatz zur Kontrollgruppe aus. Die behandelten Zellen waren kleiner und runder und schwächer angefärbt in der Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen MAP2. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigten sich vergleichsweise wenige Mikrotubuli, die nicht organisiert erschienen (Caceres et al. 1992, Sharma et al. 1994).

MAP2 bindet nicht nur an Mikrotubuli, sondern auch an Mitochondrien. Purifizierte Mitochondrien aus Ratten wiesen an ihrer Membran gebundenes MAP2 auf. Daraufhin

wurden *in-vitro*-Untersuchungen durchgeführt, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass MAP2 mit einer Domäne, die sich von den Mikrotubuli-Bindungsstellen unterscheidet, an die Mitochondrien bindet. Diese entsprechende Bindungsstelle am Mitochondrium wird von einem Teil des Kanal-bildenden Proteins (Porin) der äußeren Membran gebildet (Linden und Karlsson 1996, Linden et al. 1989). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass MAP2 an der Verknüpfung der Mitochondrien am Zytoskelett und vielleicht auch an deren Transport durch die Zelle verantwortlich ist.

Mitochondrien reagieren sehr früh auf ischämische und auch entzündliche Zustände mit Veränderung ihrer Form, ihres Enzymgehalts und ihres Membranpotentials (Juhler 1987, Solenski et al. 2002, Li N et al. 2010). Vielleicht liegt auch hier eine Ursache für die erhöhte Anzahl MAP2-positiver Nervenzellen in den Läsionen der weißen Substanz. Möglicherweise wird MAP2 vermehrt exprimiert oder es dissoziiert von seiner Bindungsstelle an der Mitochondrienmembran. In jüngster Zeit konnte zudem gezeigt werden, dass Neurone in MS-Läsionen Störungen der Atmungskette und der mitochondrialen DNA aufweisen. Dies könnte sogar eine führende Ursache der fortschreitenden Neurodegeneration bei MS darstellen (Campbell et al. 2010).

Darüber hinaus zeigte sich bei der Ratte eine erhöhte Dichte an MAP2 in Phäochromozytomzellen mit besonders starkem Neuritenwachstum im Vergleich zu Phäochromozytomzellen mit regelrechtem Neuritenwachstum (Sano et al. 1990). Auch weitere Studien stützen die These, dass MAP2 eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Differenzierung und die Plastizität von Neuronen spielt (Johnson und Jope 1992). Möglicherweise spielen diese Mechanismen auch eine Rolle bei der Detektion vermehrter MAP2-positiver Neurone in Läsionen in der vorliegenden Arbeit. Eine verstärkte Anfärbbarkeit der Neurone mit anti-MAP2-Antikörpern zeigte sich auch in der Penumbra, der Grenzzone um einen zentral gelegenen Infarkt. Das wurde als Hinweis auf vermehrtes Aussprossen von Dendriten und gesteigerte Umstrukturierung der Synapsen gewertet, was eventuell auch auf die geschädigten Neurone im vorliegenden EAE-Modell zutrifft (Li Y et al. 1998).

Ebenso zeigte sich nach einmaliger mittelschwerer traumatischer Hirnschädigung an Ratten im Bereich angrenzend an das direkt geschädigte Areal eine vermehrte MAP2-Immunreaktivität in betroffenen Neuronen. Auch nach wiederholter leichter mechanischer Hirnschädigung kam es zu einer vermehrten Ansammlung von MAP2 in Perikaryen verletzter Neurone. Diese Akkumulation von MAP2 wurde allerdings auf einen gestörten axonalen Transport in den geschädigten Neuronen zurückgeführt (Kanayama et al. 1997).

In nekrotischem Gewebe wie der Infarktzone ließ sich hingegen ein Verlust der MAP2-Immunreaktivität nachweisen. Dies untersuchten Li Y et al. 1998 am Gehirn der Ratte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach zweistündiger fokaler Ischämie. Eine verminderte

MAP2-Immunreaktivität in geschädigtem Gewebe war auch nach traumatischer Hirnschädigung in Mäusen nachweisbar, wobei sich diese verminderte MAP2-Positivität in betroffenen, aber nicht zugrunde gegangenen Neuronen detektieren ließ (Huh et al. 2003).

All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen in den Läsionen nicht auf Neurogenese zurückzuführen ist. Sie scheint vielmehr auf eine reaktive Veränderung der Neurone auf die entzündliche Umgebung hinzuweisen.

Da sich in den Läsionen nahezu alle MAP2-positiven Zellen in der MAP2/NeuN-Doppelfärbung auch mit dem Antikörper für NeuN positiv anfärbten, handelt es sich bei den MAP2-positiven Zellen sicher um neuronale Zellen. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den MAP2-positiven Zellen eventuell auch um oligodendrogliale oder mikrogliale Zellen handeln könnte.

#### **4.1.2 Neuronenspezifisches nukleäres Antigen (NeuN)**

Das Neuronenspezifische nukleäre Antigen (NeuN) dient als Marker für postmitotische Nervenzellen. Dabei färbt es vor allem den Zellkern und in geringerem Maße bei einigen Spezies auch das Zytoplasma an. Es ist ein lösliches Kernprotein, das zur Familie der FOX-1-Genprodukte gehört und auch als FOX-3-Genprodukt bezeichnet wird. Es bindet *in vitro* an DNA und ist wohl am alternativen Spleißen von prä-mRNA des nicht-muskulären Myosins beteiligt. Das Gen für die schwere Kette des nicht-muskulären Myosins beinhaltet das Exon N30. Dieses Exon ist zwar in der mRNA neuronaler Zellen enthalten, aber fehlt in der mRNA aller übrigen Zellen. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass unter Anwesenheit von FOX-3/NeuN das Exon N30 häufiger in der mRNA enthalten bleibt (Kim et al. 2009).

Es wird darüber hinaus diskutiert, ob NeuN auch für das Aussprossen von Neuriten benötigt wird. So zeigten zerebelläre Körnerzellen mit steigender NeuN-Immunreaktivität auch eine vermehrte Aussprossung von Neuriten (Weyer und Schilling 2003).

Es sind zwei Isoformen von NeuN bekannt, von denen die leichtere ein Molekulargewicht von 46 kDa und die schwerere von 48 kDa aufweist. Sie kommen beide im Zellkern und Zytoplasma vor, wobei die Form mit dem höheren Molekulargewicht im Zytoplasma vorherrschend ist. Im Zellkern sind beide zu gleichen Anteilen vertreten, kommen aber nur in den Bereichen des aufgelockerten Chromatins vor und fehlen im dicht gepackten, nicht aktiven Teil des Chromatins (Lind et al. 2005).

Auch das Protein NeuN besitzt unterschiedliche Phosphorylierungsstellen, wobei der Phosphorylierungsgrad die Detektion durch den Antikörper beeinflusst. Beispielsweise sind

nach vorheriger Dephosphorylierung die entscheidenden Epitope so verändert, dass die anti-NeuN-Antikörper in der Regel nicht mehr daran binden können (Lind et al. 2005).

Sowohl nach traumatischer als auch nach ischämischer Hirnschädigung zeigte sich in einigen Studien eine verminderte NeuN-Immunreaktivität im Infarktgebiet sowie den angrenzenden Bereichen bzw. in der vom Trauma betroffenen Hemisphäre. Davoli und Kollegen untersuchten Gehirnproben von Ratten nach temporärer fokaler Ischämie und fanden 24 h nach Reperfusion stark verminderte NeuN-Expressivität bei gegensätzlich stark vermehrter TUNEL(*terminal dUTP nick-end labeling*)-Aktivität. Die TUNEL-Färbung zeigt DNA-Fragmentation an und gilt somit als Hinweis auf Apoptose. Daher wurde der Verlust an NeuN-Positivität hier als neuronaler Verlust gewertet (Davoli et al. 2002). Auch Igarashi et al. verwendeten 2001 anti-NeuN-Antikörper zum Nachweis von verminderter Nervenzell-dichte in Hippocampus und Thalamus nach traumatischer Hirnschädigung in Mäusen. Eine verminderte NeuN-Immunreaktivität kann unter Umständen als irreversibler Verlust von Neuronen gewertet werden. Allerdings ist Vorsicht geboten bei einer solchen uneingeschränkten Interpretation der reduzierten NeuN-Reaktivität (Ünal-Çevik et al. 2004). In Mäusen nach milder zerebraler Ischämie fanden sie eine deutliche Reduktion der NeuN-Positivität in Nervenzellen sowohl im Infarktzentrum als auch in der Penumbra. In der Penumbra zeigten diese Zellen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zwar Zeichen früher ischämischer Schädigung, wie ein geschrumpftes Zytoplasma und verdichtete Kerne, aber keinen irreversiblen Zerfall. Die Hoechst-33258-Färbung bestätigte, dass diese Nervenzellen noch über eine intakte Kernmembran verfügten. Der verminderten Anfärbbarkeit liegt hier vermutlich eher eine verminderte Synthese oder veränderte Antigenität von NeuN in geschädigten, aber noch intakten Neuronen zugrunde. Tatsächlich führte eine spezielle Antigendemaskierung zu einem Anstieg der NeuN-Positivität in der Penumbra. Verlust von NeuN-Immunreaktivität sollte demnach nur mit Vorsicht als Indikator für neuronalen Verlust genutzt werden (Ünal-Çevik et al. 2004).

McPhail et al. untersuchten 2004 an Mäusen und Ratten die Folgen axonaler Schädigung auf die NeuN-Expression. Sie unterschieden dabei die Reaktionen im peripheren Nervensystem (PNS) von denen im zentralen Nervensystem (ZNS). Dafür wurde der Hauptast des *Nervus facialis* (PNS-Modell) distal des Austritts aus dem *Foramen stylomastoideum* durchtrennt und ein 3-5 mm langes Segment entfernt. Drei Tage darauf kam es zu einem fast kompletten Verlust der NeuN-Aktivität in den Motoneuronen des Fazialis-Kerngebiets im Hirnstamm. Die alleinige Quetschung führte hingegen nur zu einem vorübergehenden Verlust, der sich aber bis zum 28. Tag nach der Verletzung wieder normalisierte. Auch hier bestätigte sich also, dass eine verminderte NeuN-Aktivität nicht notwendigerweise auf einen irreversiblen Nervenzellverlust hindeutet, sondern verletzte Neurone die Expression von NeuN reversibel herunter regulieren und sich durchaus wieder

erholen können. Interessanterweise zeigte sich keine wesentliche Abnahme der NeuN-Immunreaktivität in den Nervenzellen des *Nucleus ruber* nach Durchtrennung des *Tractus rubrospinalis* auf Höhe C3/C4 des Rückenmarks.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich keine verminderte Immunreaktivität in geschädigten Arealen nachweisen. Dies spricht gegen einen neuronalen Verlust in den akuten Läsionen. Die Nervenzellen in der weißen Substanz erscheinen hinsichtlich ihrer NeuN-Synthese bzw. Antigenität relativ resistent gegenüber den Entzündungsprozessen in diesem Modell. Möglicherweise führt die Entzündungsaktivität in den akuten Läsionen zu keiner wesentlichen direkten Schädigung der Neurone. Diese Beobachtungen der vorliegenden Arbeit an Läsionen im Modell der EAE unterscheiden sich von der beschriebenen Abnahme der NeuN-Aktivität in chronischen MS-Läsionen (Chang et al. 2008). Möglicherweise ist der Verlust NeuN-positiver Zellen in chronischen MS-Läsionen auf die neurodegenerativen Prozesse in fortgeschrittenen Krankheitsstadien der Multiplen Sklerose zurückzuführen.

#### **4.2 Keine Assoziation MRP14-positiver Makrophagen mit der Dichte MAP2- und NeuN-positiver Zellen**

Bei MRP14 (*myeloid-related protein 14*) handelt es sich um ein Kalzium-bindendes Protein aus der S100-Familie. Es wird von hämatogen eingewanderten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in frühen Reifestadien exprimiert (Zwadlo et al. 1986, Lagasse und Clerc 1988). In Zellkulturen aus Knochenmarkzellen zeigt sich die höchste Konzentration von MRP14 an Tag 3 und 4. Bei den markierten Zellen handelt es sich vornehmlich um Granulozyten, Monozyten und Makrophagen verschiedener Reifungsstufen. Hingegen ist kein MRP14 in ausgereiften, ortsständigen (z. B. Alveolar- oder Peritonealmakrophagen) und ruhenden Makrophagen sowie Vorläuferzellen detektierbar (Odink et al. 1987, Goebeler et al. 1993). Daher kann MRP14 bei der histopathologischen Untersuchung der MS zum Nachweis frühester Stadien entzündlicher und demyelinisierender Aktivität sowie der Einwanderung hämatogener Makrophagen verwendet werden (Brück et al. 1995).

In humanen MS-Läsionen sind MRP14-positiv Makrophagen fast ausschließlich in den früh aktiven Läsionen zu finden und zwar vorrangig in den aktiv demyelinisierenden Anteilen am Rand der Läsion angrenzend zur umgebenden weißen Substanz (Brück et al. 1995, 1996). In den vorliegenden EAE-Läsionen schienen die MRP14-positiven Zellen über den gesamten Bereich der einzelnen Läsionen gleichmäßig verteilt, wenn auch die Dichte von Läsion zu Läsion variierte. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Dichte



MRP14-positiver Zellen und dem Alter bzw. der Erkrankungsdauer der Tiere. Dies ist vermutlich auf die Heterogenität der Läsionen zurückzuführen.

### **4.3 Ähnliche Dichte der Nervenzellen in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere und der weißen Substanz der Kontrolltiere**

Die Dichte der Nervenzellen war ähnlich in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere und in der weißen Substanz der Kontrolltiere. Die Auszählungen ergaben in Tieren mit EAE im Vergleich zu Kontrollen eine ähnliche Dichte MAP2- ( $10 \pm 7$  verglichen mit  $10 \pm 4$  MAP2-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup>) und NeuN-positiver Zellen ( $30 \pm 14$  verglichen mit  $36 \pm 23$  NeuN-positiven Zellen/10 mm<sup>2</sup>).

Beide Färbungen zeigten also ein ähnliches Ergebnis. Hierbei fällt allerdings – ebenso wie bei den Dichtewerten der Läsionen – auf, dass stets eine höhere Anzahl NeuN-positiver Nervenzellen im Vergleich zu MAP2-positiven Zellen nachweisbar war.

Das Verhältnis von NeuN- zu MAP2-positiven Zellen lag in der normal erscheinenden weißen Substanz der EAE-Tiere bei 3:1 und in der weißen Substanz der Kontrolltiere bei 3,6:1. Durch die erhöhte Anzahl MAP2-positiver Zellen in den Läsionen bei nahezu konstanter Menge NeuN-positiver Zellen zeigte sich hier ein Verhältnis von etwa 1,5:1.

Warum es in allen drei Regionen mehr NeuN-positive Zellen gab als MAP2-positiven Zellen bleibt unklar. Beide Marker sind als zuverlässige neuronale Marker etabliert, jedoch besteht Unklarheit darüber, welcher dieser beiden Marker in der Entwicklung von Nervenzellen früher exprimiert wird. Chang et al. gingen bei ihren Untersuchungen an MS-Läsionen der weißen Substanz davon aus, dass NeuN früher exprimiert wird als MAP2. Leider gaben sie in ihrer Arbeit keine absoluten Zahlen zur Dichte NeuN- bzw. MAP2-positiver Zellen an. Sie interpretierten die in ihren Untersuchungen entdeckten NeuN-positiven/MAP2-negativen Zellen als unreife Nervenzellen. Diese Zellen waren vornehmlich in den chronischen Läsionen mit erhöhter Zelldichte zu finden. Daher deuteten sie diese Konstellation als Neurogenese (Chang et al. 2008).

Allerdings gibt es auch zahlreiche Hinweise darauf, dass bereits neuronale Vorläuferzellen mit anti-MAP2-Antikörpern detektierbar sind (Honig et al. 1996, Piper et al. 2001, Gingras et al. 2007) und NeuN typischerweise in postmitotischen Neuronen fortgeschrittener Reifestadien nachweisbar ist (Sarnat et al. 1998, Kim et al. 2009). Die erhöhte MAP2-Dichte in den akuten Läsionen der vorliegenden Arbeit wäre dann eventuell als Neurogenese zu werten. Da allerdings generell deutlich weniger MAP2-positiven Zellen als NeuN-positiven Zellen gezählt wurden, ist eher davon auszugehen, dass die Immunreaktivität von MAP2 im entzündlichen Milieu herauf reguliert wird. Als Mechanismen für diese Hochregulation von

MAP2 kommen in erster Linie eine Akkumulation von MAP2 im Zellkörper und eine Dissoziation des MAP2 von Mikrofilamenten oder Mitochondrien und die damit verbundene erhöhte Antigenität in Betracht.

Warum in der vorliegenden Arbeit generell deutlich mehr Nervenzellen für NeuN als für MAP2 positiv waren, ist nicht eindeutig zu erklären. In Untersuchungen zu neuronalen Veränderungen im Alter fiel eine verminderte MAP2-Immunreaktivität bei alten im Vergleich zu jungen Tieren auf. Chauhan und Siegel verglichen 1997 die Expression von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen in drei Monate alten und 24 Monate alten Ratten. Im parietalen Kortex und Hippocampus der älteren Tiere zeigte sich eine deutlich verminderte MAP2-Immunreaktivität gegenüber den jungen Tieren. Im Zerebellum blieb die Expression der Mikrotubuli-assoziierten Proteine hingegen konstant. Zu ähnlichen Ergebnissen mit verminderter MAP2-Aktivität im Hippocampus von Ratten und Mäusen kamen auch di Stefano et al. (2001) und Himeda et al. (2005). Andererseits gibt es auch Berichte über erhöhte MAP2-Immunreaktivität bei älteren Mäusen und Rhesusaffen im Vergleich zu jungen Tieren (Benice et al. 2006, Haley et al. 2010). Untersuchungen an Vorderhornzellen des lumbalen Rückenmarks von Schäferhunden ergaben jedoch bei älteren Tieren (10-12 Jahre) auch eine verminderte MAP2-Immunreaktivität im Vergleich zu 1-2 Jahre alten Tieren. Interessanterweise blieb die NeuN-Expressivität hingegen konstant (Hwang et al. 2011). Aufgrund der Diskrepanz dieser Ergebnisse zueinander bleibt die Ursache der unterschiedlichen Dichten MAP2-positiver und NeuN-positiver Zellen weiter unklar. Die vorliegende Arbeit deutet allerdings darauf hin, dass die Dichte NeuN-positiver Zellen und somit vermutlich auch die Nervenzellintegrität in der frühen Phase der Entzündung weitgehend unbeeinträchtigt bleibt.

#### **4.4 Kein eindeutiger Hinweis auf Neurogenese oder neuronalen Verlust in den Läsionen**

Ziel der vorliegenden Arbeit war am Marmosetten-EAE-Modell die Läsionen der weißen Substanz hinsichtlich einer möglichen Neurogenese oder neuronalem Verlust zu untersuchen. Damit sollten Erkenntnisse für akute demyelinisierte Läsionen in frühen Krankheitsstadien der Multiplen Sklerose gewonnen werden.

Die MAP2-positiven Zellen waren in den demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz etwa doppelt so häufig nachweisbar wie in der normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren und auch in der weißen Substanz der Kontrolltiere (Läsion:  $19 \pm 11$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>; EAE-NAWM:  $10 \pm 7$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>; Kontrolltiere:  $10 \pm 4$  MAP2-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>).

Da jedoch die Dichte der NeuN-positiven Nervenzellen in den drei untersuchten Regionen konstant war, ergeben sich keine eindeutigen Hinweise für eine Neurogenese in den Läsionen. Allerdings zeigte sich auch kein neuronaler Verlust im Bereich der demyelinisierten Areale im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz und der Kontrollen (Läsion:  $31 \pm 19$  NeuN-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>; EAE-NAWM:  $30 \pm 14$  NeuN-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>; Kontrolltiere:  $36 \pm 23$  NeuN-pos. Zellen/10 mm<sup>2</sup>).

Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich von den Untersuchungen von Chang und Kollegen an Autopsiegewebe von MS-Patienten, bei denen sie einerseits Hinweise für neuronalen Verlust in einer Gruppe von MS-Läsionen und andererseits auch Anhalt für Neurogenese in einer anderen Gruppe von MS-Läsionen fanden (Chang et al. 2008). Da Chang et al. ihre Untersuchungen an Autopsiematerial von MS Patienten durchführten, ist davon auszugehen, dass chronischere Läsionen als in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Im fortgeschrittenen Stadium stehen wahrscheinlich die neurodegenerativen Prozesse im Vordergrund – wie axonale Durchtrennung und Verlust von Neuronen – wie sie auch von Chang et al. berichtet wurden.

Sie untersuchten die Neurone der weißen Substanz an Autopsiematerial von neun MS-Patienten und vier Kontrollfällen. Anhand der Verteilung von Myelinproteinen und MHC-II-positiven Zellen wurden die demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz in sieben akute und 59 chronische unterteilt. In zwei Drittel der demyelinisierten subkortikalen Läsionen (7/7 akuten und 44/59 chronischen Läsionen) fanden die Autoren eine verminderte Dichte MAP2-positiver Nervenzellen im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz. Die verbliebenen Neurone zeigten geschrumpfte Perikaryen und unterbrochene MAP2-positive Dendriten. In den übrigen 15 von 59 chronischen Läsionen war die Anzahl der MAP2-positiven Zellen um 72 % erhöht. In einer zweiten Färbung mit einem Antikörper gegen NeuN zeigte sich sogar eine um 130 % erhöhte Nervenzelldichte in diesen Läsionen. In MAP2/NeuN-Doppelmarkierungen fiel bei Chang et al. auf, dass sich in den Läsionen mit erhöhter Neuronendichte eine Gruppe von Zellen nachweisen ließ, die NeuN-positiv und MAP2-negativ war. In normal erscheinender weißer Substanz waren hingegen die Zellen in der Regel doppelt positiv. Wie bereits erwähnt deuteten die Autoren diese NeuN-positiven/MAP2-negativen Zellen als postmitotische, aber noch unreife Interneurone, die als möglicher Hinweis auf Neurogenese in MS-Läsionen interpretiert wurden. Diese Ergebnisse müssen jedoch mit Vorsicht gewertet werden, da die Läsionen mit erhöhter Neuronenzahl zum Großteil nur von einem Patienten afroamerikanischer Herkunft stammten.

Da die Arbeiten von Chang und Kollegen auf Autopsien von MS-Patienten beruhen, liefern sie nur begrenzt Hinweise zur Fragestellung, was mit den Nervenzellen und den neuronalen Vorläuferzellen in der weißen Substanz während des frühen Krankheitsprozesses in aktiv demyelinisierenden Läsionen geschieht.

Die vorliegende Arbeit hat diese Frage am Marmosetten-EAE-Modell untersucht und konnte die Ergebnisse von Chang et al. für die frühen aktiven Läsionen im Tiermodell nicht bestätigen. Allerdings zeigte sich eine erhöhte Dichte MAP2-positiver Zellen in den Läsionen. Als Mechanismen für diese Hochregulation von MAP2 kommen in erster Linie eine Akkumulation von MAP2 im Zellkörper und eine Dissoziation des MAP2 von Mikrofilamenten oder Mitochondrien und die damit verbundene erhöhte Antigenität in Betracht. Die Anzahl der NeuN-positiven Nervenzellen blieb in allen drei Regionen (demyelinisierende Läsion der weißen Substanz, normal erscheinende weiße Substanz und weiße Substanz der Kontrolltiere) konstant. Dies spricht dafür, dass die Nervenzellen relativ resistent scheinen gegenüber dem entzündlichen Milieu der frühen Krankheitsphase. Als Reaktion auf ischämische und traumatische Hirnschädigungen wurde hingegen eine Herunterregulierung der NeuN-Expressivität beschrieben (McPhail et al. 2004, Ünal-Çevik et al. 2004). Die Entzündungsprozesse in der vorliegenden Arbeit scheinen jedoch keinen Einfluss darauf zu nehmen. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung hippokampaler Strukturen von Mäusen nach Lipopolysaccharid(LPS)-induzierter systemischer Entzündung. LPS ist Bestandteil gramnegativer Bakterienwände und wurde systemisch appliziert, um eine generalisierte Entzündungsreaktion hervorzurufen. Diese wurde anhand vermehrter Cyclooxygenase-2-Immunreaktivität nachgewiesen. Trotz deutlicher Entzündungsreaktion und Aktivierung von Mikroglia, blieben die NeuN-positiven Zellen im Hippokampus unverändert. Auch mit Anti-Fluoro-Jade-B-Antikörpern war keine neuronale Degeneration in diesem Tiermodell festzustellen (Chung et al. 2010).

Der Nachweis von neuronalem Verlust bei Multipler Sklerose erfolgte bisher fast ausschließlich an Autopsiematerial und vorwiegend in der grauen Substanz. Es handelte sich also um weit fortgeschrittene Krankheitsstadien. Jedoch zeigten auch Studien am EAE-Modell in Mäusen und Ratten, das eher die frühen Phasen der MS widerspiegelt, axonale Schädigung und Verlust (Papadopoulos et al. 2006, Berard et al. 2010). Auch am Marmosetten-EAE-Modell wurde neuronale Dichteminderung in kortikalen Läsionen beschrieben. Immunhistochemische Färbungen mit anti-NeuN-Antikörpern ergaben eine um 22,2 % verminderte Nervenzelldichte in leukokortikalen Läsionen im Vergleich zur normal erscheinenden grauen Substanz (Pomeroy et al. 2010). Im Gegensatz dazu scheinen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Neurone der weißen Substanz relativ resistent gegen entzündliche Einflüsse zu sein. Es handelt sich hierbei um Interneurone, von denen die meisten Calretinin exprimieren (Suárez-Solá et al. 2009). Calretinin zählt zu den Kalzium-bindenden Proteinen und sorgt für die intrazelluläre Kalziumhomöostase und reguliert Kalzium-abhängige Signalwege (Baimbridge et al. 1992, Clements et al. 2008). Verschiedene Studien erbrachten Hinweise, dass Calretinin-positive Zellen außergewöhnlich unempfindlich gegen schädigende Einflüsse sind. So wurde in Autopsiematerial

von Alzheimer-Patienten im präfrontalen und temporalen Kortex eine deutliche Dichteminderung von Pyramidenzellen bei konstanter Dichte Calretinin-positiver Interneurone im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Hof et al. 1993). Auch auf Exzitotoxizität, ausgelöst zum Beispiel durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), scheinen Interneurone, hier im Hippocampus, weniger zu reagieren (Avignone et al. 2005). Exzitotoxizität wird auch als ein möglicher pathophysiologischer Mechanismus bei MS diskutiert. Tatsächlich wurde an Autopsiematerial von MS-Patienten eine verminderte Dichte Parvalbumin-positiver Interneurone bei unveränderter Dichte Calretinin-positiver Neurone gefunden (Clements et al. 2008). Leichte fokale Ischämie in Mäusen ergab ebenso eine gleich bleibende Dichte verschiedener Interneurone im Striatum bei gleichzeitig nachweisbarem deutlichen Verlust von Projektionsneuronen (Katchanov et al. 2003). Allerdings waren Araki et al. der Meinung, dass die Interneurone nicht akut geschädigt werden, aber im Verlauf nach dem ischämischen Ereignis verzögert zugrunde gehen (Araki et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit könnte es also sein, dass die untersuchten Neurone im akuten Krankheitsstadium noch relativ unbeschadet sind. Lediglich die erhöhte MAP2-Dichte in den Läsionen könnte auf beginnenden neuronalen Stress hindeuten. Dieser Stress könnte sich durch Akkumulation aufgrund gestörten axonalen Transports oder Dissoziation des MAP2 von Mikrotubuli und Mitochondrien äußern. Dass mitochondriale Veränderungen bei der MS eine Rolle spielen, wird in jüngster Zeit angenommen (Campbell et al. 2010). Die mitochondriale Dysfunktion wird sogar als Ursache für die Entstehung und das Fortschreiten der Neurodegeneration diskutiert. In der inneren Körnerzellschicht und subkortikal fand sich eine gestörte Expression von mitochondrialer DNA (mtDNA), sowie Deletionen in einzelnen mitochondrialen Genen am Autopsiegewebe von MS Patienten. Vor allem die Gene der an der Atmungskette beteiligten Proteine waren betroffen, so dass eine verminderte Zellatmung die Folge war. Somit steht den Nervenzellen weniger Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung, welches als Energielieferant dient. Ob es primär durch die Entzündung zur mitochondrialen Störung kommt oder sekundär durch Demyelinisierung mit konsekutiv erhöhtem Energiebedarf zur Überschreitung der mitochondrialen Kapazität bleibt unklar (Kalman und Leist 2003, Campbell et al. 2010, Dutta et al. 2011).

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Chang et al. wurde in der vorliegenden Arbeit kein subkortikaler neuronaler Verlust festgestellt. Es zeigte sich lediglich ein am ehesten reaktiver Anstieg der MAP2-positiven Neurone in den Läsionen.

Die untersuchten Neurone gehören höchstwahrscheinlich zu den Calretinin-positiven Interneuronen. Diese gelten als besonders widerstandsfähig gegen verschiedene Arten der

Schädigung. Möglicherweise liegt darin die relative Resistenz der Neurone gegenüber dem entzündlichen Milieu der akuten Läsionen begründet.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Die bisherigen Untersuchungen zum Verlust der Neurone der weißen Substanz fanden an Autopsiematerial von MS-Erkrankten statt. Somit spiegelten sie die Begebenheiten in weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien wider. Die vorliegende Arbeit sollte dagegen anhand des Marmosetten-EAE-Modells Kenntnisse über die frühe Phase der Erkrankung bringen.

Sie lieferte weder Hinweise für einen neuronalen Verlust noch Anhalt für eine Neurogenese in den frischen demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz in Marmosetten mit EAE. Es zeigte sich zwar eine erhöhte Anzahl MAP2-positiver Neurone in den Läsionen, diese liegt aber am ehesten in einer Überexpression oder Akkumulation von MAP2 in bereits vorhandenen Neuronen begründet. Eventuell dissoziiert MAP2 aufgrund äußerer Reize von den Filamenten und Mitochondrien und es kommt zu gesteigerter Anfärbbarkeit. Möglicherweise ist dies ein erstes Zeichen von neuronaler Dysregulation aufgrund der entzündlichen Umgebung in den Läsionen. Allerdings war die Dichte der NeuN-positiven Zellen in den Läsionen, der normal erscheinenden weißen Substanz im EAE-Tier und in der weißen Substanz der Kontrollen konstant. Entgegen den Ergebnissen aus Untersuchungen an Autopsiematerial spricht dies für eine relative Resistenz der Nervenzellen gegenüber dem entzündlichen Milieu in der frühen Krankheitsphase.

## 5 Zusammenfassung

Bei Menschen, Primaten und Katzen ist die weiße Substanz des Gehirns besonders stark ausgeprägt. Dieser Bereich besteht hauptsächlich aus myelinisierten Nervenfasern, aber es sind auch einige Nervenzellen – sogenannte Nervenzellen der weißen Substanz – darin zu finden. Bei diesen handelt es sich vermutlich um Interneurone, die unter anderem an der Gefäßregulation beteiligt sind. Aufgrund ihrer geringen Dichte lassen sie sich im Vergleich zu den zahlreichen eng gelegenen Nervenzellen der grauen Substanz sehr gut untersuchen.

Kürzlich ergab eine Studie an MS-Autopsiefällen Hinweise auf Verlust dieser Neurone, aber auch auf Neurogenese in einem Teil der chronischen Läsionen der weißen Substanz.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die neuronale Dichte in akuten demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz von Marmosetten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) zu untersuchen. Insbesondere sollte geprüft werden, ob sich Hinweise für eine verminderte oder erhöhte Nervenzelldichte in den Läsionen ergeben. Hierzu wurde die Nervenzelldichte in drei verschiedenen Regionen bestimmt: in Läsionen, in der normal erscheinenden weißen Substanz (*normal appearing white matter* – NAWM) der EAE-Tiere und in der weißen Substanz der Kontrolltiere.

Es wurde Hirngewebe von acht Kontrolltieren und von neun Tieren mit MOG-induzierter EAE untersucht. Das Ausmaß der Demyelinisierung wurde anhand histologischer Färbungen und immunhistochemischer Färbungen gegen Myelin-basisches Protein bestimmt. Für die Auszählung der Neurone wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper gegen MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) und Doppelmarkierungen mit den Antikörpern gegen MAP2 und NeuN (Neuronenspezifisches nukleäres Antigen) durchgeführt. Außerdem wurden die Läsionen mit Antikörpern gegen MRP14 (*myeloid-related protein 14*) hinsichtlich eingewanderter Makrophagen früher Reifestadien untersucht.

Aus den Untersuchungen ergab sich eine ähnliche Morphologie der markierten Zellen in den drei untersuchten Regionen (Läsion, NAWM, Kontrollen). In den EAE-Tieren war die Dichte der MAP2-positiven Zellen in den Läsionen signifikant erhöht gegenüber der normal erscheinenden weißen Substanz, während sich hingegen eine konstante Dichte NeuN-positiver Nervenzellen in diesen Arealen zeigte.

Zwischen der normal erscheinenden weißen Substanz in den EAE-Tieren und der weißen Substanz in den Kontrollen war bei beiden Antikörpern kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Zelldichte festzustellen. Allerdings waren insgesamt in allen drei Regionen wesentlich mehr NeuN-positive Zellen zu finden als MAP2-positive. Die Dichte MAP2- bzw.

NeuN-positiver Neurone korrelierte nicht mit der Anzahl MRP14-positiver Makrophagen in den Läsionen.

Der deutliche neuronale und axonale Verlust, wie er in Vorarbeiten in chronischen MS-Läsionen der weißen Substanz beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In einem Teil der chronischen Läsionen, die allerdings zum größten Teil von nur einem Patienten stammten, fanden sich zudem Hinweise auf Neurogenese. Auch das trifft für die akuten Läsionen im Marmosetten-EAE-Modell nicht zu. Zwar zeigten die MAP2-Färbungen eine signifikant erhöhte Neuronenzahl in den Läsionen gegenüber der normal erscheinenden weißen Substanz. Da sich dieses Ergebnis in den NeuN/MAP2-Doppelfärbungen aber nicht bestätigte, ist allerdings nicht von einer tatsächlichen Neurogenese auszugehen. Vermutlich kam es in den Nervenzellen zu einer vermehrten Expression von MAP2 oder das Protein dissoziierte vermehrt von seinen Bindungsstellen an Mikrotubuli und Mitochondrien. Da es in jüngster Zeit Hinweise gab, dass die mitochondriale Dysfunktion an der Pathogenese der MS beteiligt ist, könnte dies als erstes Zeichen einer beginnenden Beeinträchtigung der Nervenzellen zu werten sein.

Allerdings weist die konstante Dichte NeuN-positiver Zellen in allen drei untersuchten Regionen auf eine weitgehende Resistenz der Neurone gegen das frühentzündliche Milieu hin. Die meisten bisherigen Arbeiten befassten sich mit Neuronen der grauen Substanz. In der vorliegenden Arbeit wurden Neurone der weißen Substanz untersucht. Diese gehören vermutlich zu den Calretinin-positiven Interneuronen, die als ausgesprochen widerstandsfähig gegen äußere Reize gelten.

Aufgrund der phylogenetischen Ähnlichkeit der *Callithrix-jacchus*-Marmosetten zum Menschen ist die in diesen Tieren hervorgerufene EAE der MS besonders ähnlich. Dieses Modell liefert Erkenntnisse zur Pathogenese vor allem in den frühen Krankheitsphasen der MS. Es bestehen allerdings auch wesentliche Unterschiede, so dass die Erkrankungen keinesfalls gleichgesetzt werden können. Die EAE in Marmosetten nimmt in der Regel einen kurzen Krankheitsverlauf, in dem die Entzündung im Vordergrund steht. Im Gegensatz dazu verläuft die MS chronisch über viele Jahre mit schleichender Verschlechterung der neurologischen Symptomatik, möglicherweise bedingt durch eine zunehmende neurodegenerative Komponente.

Die vorliegende Arbeit ergab keinen Verlust der Neurone in der weißen Substanz im Marmosetten-EAE-Modell. Diese Nervenzellen erscheinen hier relativ resistent gegenüber der entzündlich-demyelinisierenden Aktivität in den Läsionen. Es bedarf künftiger Untersuchungen an frühen MS-Läsionen, um zu klären, ob diese Nervenzellen nicht auch in frühen Stadien der MS eine vergleichbare Resistenz aufweisen.



## 6 Literaturverzeichnis

Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hetrick WP, Bunney WE, Jr., Jones EG (1996): Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 53, 425-436

Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17, 129-138

Araki T, Kato H, Liu XH, Itoyama Y, Kogure K, Kato K (1994): Delayed damage of striatal interneurons after cerebral ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* 176, 17-20

Arnon R, Sela M (2003): Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. *J Mol Recognit* 16, 412-421

Ascherio A, Munger KL (2007a): Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61, 288-299

Ascherio A, Munger KL (2007b): Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 61, 504-513

Avignone E, Frenguelli BG, Irving AJ (2005): Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur J Neurosci* 22, 3077-3090

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992): Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15, 303-308

Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P (2003): HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 72, 710-716

Benice TS, Rizk A, Kohama S, Pfankuch T, Raber J (2006): Sex-differences in age-related cognitive decline in C57BL/6J mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity. *Neuroscience* 137, 413-423

Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S (2010): Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia* 58, 434-445

Bö L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mork SJ (2003): Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 723-732

Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P (2002): The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277, 21453-21457

- Brownell B, Hughes JT (1962): The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25, 315-320
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788-796
- Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H (1996): Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 195, 588-600
- Brugg B, Matus A (1991): Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J Cell Biol* 114, 735-743
- Brunner C, Lassmann H, Waehnelde TV, Matthieu JM, Linington C (1989): Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52, 296-304
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992): Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9, 607-618
- Calabrese M, de Stefano N, Atzori M, Bernardi V, Mattisi I, Barachino L, Morra A, Rinaldi L, Romualdi C, Perini P (2007): Detection of cortical inflammatory lesions by double inversion recovery magnetic resonance imaging in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 64, 1416-1422
- Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK, Krishnan KJ, Reynolds R, Howell O, Lassmann H, Turnbull DM, Mahad DJ (2010): Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 69, 481-492
- Chang A, Smith MC, Yin X, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD (2008): Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. *Brain* 131, 2366-2375
- Charcot M (1868): Histologie de la sclerose en plaques. *Gazette Hopitaux* 141, 554-558
- Chard DT, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH (2002): Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 125, 327-337
- Chauhan N, Siegel G (1997): Age-dependent organotypic expression of microtubule-associated proteins (MAP1, MAP2, and MAP5) in rat brain. *Neurochem Res* 22, 713-719
- Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y (1998): FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 160, 5037-5044
- Chun JJ, Shatz CJ (1989a): Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J Comp Neurol* 282, 555-569

- Chun JJ, Shatz CJ (1989b): The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. *J Neurosci* 9, 1648-1667
- Chung DW, Yoo KY, Hwang IK, Kim DW, Chung JY, Lee CH, Choi JH, Choi SY, Youn HY, Lee IS (2010): Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 30, 531-541
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC (1996): MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J Neurochem* 66, 1273-1281
- Cifelli A, Arridge M, Jezzard P, Esiri MM, Palace J, Matthews PM (2002): Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 52, 650-653
- Clancy B, Silva-Filho M, Friedlander MJ (2001): Structure and projections of white matter neurons in the postnatal rat visual cortex. *J Comp Neurol* 434, 233-252
- Clements RJ, McDonough J, Freeman EJ (2008): Distribution of parvalbumin and calretinin immunoreactive interneurons in motor cortex from multiple sclerosis post-mortem tissue. *Exp Brain Res* 187, 459-465
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G (2010): Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 402-415
- Colombo JA, Bentham C (2006): Immunohistochemical analysis of subcortical white matter astroglia of infant and adult primate brains, with a note on resident neurons. *Brain Res* 1100, 93-103
- Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, Ng GY, Xu D (2002): Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience* 115, 125-136
- Dean G, Kurtzke JF (1971): On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3, 725-729
- Dean G, Elian M (1997): Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63, 565-568
- de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415-5423
- Di Stefano G, Casoli T, Fattoretti P, Gracciotti N, Solazzi M, Bertoni-Freddari C (2001): Distribution of map2 in hippocampus and cerebellum of young and old rats by quantitative immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 49, 1065-1066

Dijkstra CD, De Groot CJ, Huitinga I (1992): The role of macrophages in demyelination. *J Neuroimmunol* 40, 183-188

Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaldo MV, Young EA, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD (2011): Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 69, 445-454

Eastwood SL, Harrison PJ (2003): Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Mol Psychiatry* 8, 769-769, 821-831

Ebneth A, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999): Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 44, 209-224

Emery JA, Roper SN, Rojiani AM (1997): White matter neuronal heterotopia in temporal lobe epilepsy: a morphometric and immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 1276-1282

Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM (2001): Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 124, 1813-1820

Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997): Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol* 138, 1067-1075

Friauf E, McConnell SK, Shatz CJ (1990): Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. *J Neurosci* 10, 2601-2613

Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Nyul LG, Kolson DL (2001): Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis: fractional volumetric analysis of gray matter and white matter. *Radiology* 220, 606-610

Genain CP, Hauser SL (1997): Creation of a model for multiple sclerosis in *Callithrix jacchus* marmosets. *J Mol Med (Berl)* 75, 187-197

Ghosh A (1995): Subplate neurons and the patterning of thalamocortical connections. *Ciba Found Symp* 193, 150-172

Ghosh A, Shatz CJ (1992): Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255, 1441-1443

Ghosh A, Shatz CJ (1993): A role for subplate neurons in the patterning of connections from thalamus to neocortex. *Development* 117, 1031-1047

Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990): Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347, 179-181

Gingras M, Champigny MF, Berthod F (2007): Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J Cell Physiol* 210, 498-506

Goebeler M, Roth J, Henseleit U, Sunderkotter C, Sorg C (1993): Expression and complex assembly of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 during differentiation of murine myelomonocytic cells. *J Leukoc Biol* 53, 11-18

Goedert M, Crowther RA, Garner CC (1991): Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci* 14, 193-199

Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S (1979): The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27, 1131-1139

Haig D (1999): What is a marmoset? *Am J Primatol* 49, 285-296

Haley GE, Kohama SG, Urbanski HF, Raber J (2010): Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus. *Age (Dordr)* 32, 283-296

Himeda T, Mizuno K, Kato H, Araki T (2005): Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech Ageing Dev* 126, 673-677

Hof PR, Nimchinsky EA, Celio MR, Bouras C, Morrison JH (1993): Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 152, 145-148

Honig LS, Herrmann K, Shatz CJ (1996): Developmental changes revealed by immunohistochemical markers in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* 6, 794-806

Huh JW, Raghupathi R, Laurer HL, Helfaer MA, Saatman KE (2003): Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *J Neurotrauma* 20, 975-984

Hwang IK, Yoo DY, Yoo KY, Choi JH, Lee HJ, Lee CH, Moon SM, Lee YL, Shin HC, Won MH (2011): Microtubule associated protein 2 and choline acetyltransferase immunoreactivity in the lumbar spinal cord of young adult and aged dogs. *Res Vet Sci* 91, e10-e15

Igarashi T, Huang TT, Noble LJ (2001): Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase. *Exp Neurol* 172, 332-341

Jameson L, Caplow M (1981): Modification of microtubule steady-state dynamics by phosphorylation of the microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3413-3417

Johnson GV, Jope RS (1992): The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* 33, 505-512

Juhler M (1987): Simultaneous determination of regional cerebral blood flow, glucose metabolism, and pH in acute experimental allergic encephalomyelitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 578-584

Kalman B, Leist TP (2003): A mitochondrial component of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Neuromolecular Med* 3, 147-158

Kanayama G, Takeda M, Morihara T, Miyamae Y, Shinozaki K, Nishikawa T, Niigawa H, Nishimura T (1997): Temporal and regional profiles of cytoskeletal protein accumulation in the rat brain following traumatic brain injury. *Psychiatry Clin Neurosci* 51, 157-165

Kanold PO (2004): Transient microcircuits formed by subplate neurons and their role in functional development of thalamocortical connections. *Neuroreport* 15, 2149-2153

Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW (2006): Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355, 1124-1140

Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003): Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 13, 452-464

Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T (1999): Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122, 17-26

Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009): Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284, 31052-31061

Kostović I, Jovanov-Milosević N (2008): Subplate zone of the human brain: historical perspective and new concepts. *Coll Antropol* 32 Suppl 1, 3-8

Kostović I, Rakić P (1980): Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* 9, 219-242

Kragt J, van AB, Killestein J, Dijkstra C, Uitdehaag B, Polman C, Lips P (2009): Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler* 15, 9-15

Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB (2002): T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20, 101-123

Kurtzke JF (1980): Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology* 30, 61-79

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705-2712

Lagasse E, Clerc RG (1988): Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 8, 2402-2410

Laman JD, van Meurs M, Schellekens MM, de Boer M, Melchers B, Massacesi L, Lassmann H, Claassen E, Hart BA (1998): Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). *J Neuroimmunol* 86, 30-45

Lassmann H: Pathology of multiple sclerosis; in: *McAlpine`s Multiple Sclerosis*; ed. A Compston, G Ebers, H Lassmann, I McDonald, B Matthews, and H Wekerle. Churchill Livingstone, London 1998, 323-358

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, Rodriguez M (1997): Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 3, 133-136

The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (1999): TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53, 457-465

Li N, Wang Y, Zen QY (2010): [Research of cerebral mitochondrial dysfunction in septic rats]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 26, 379-381

Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M (1998): Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29, 1972-1980

Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K (2005): Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 79, 295-302

Linden M, Karlsson G (1996): Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 833-836

Linden M, Nelson BD, Leterrier JF (1989): The specific binding of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) to the outer membrane of rat brain mitochondria. *Biochem J* 261, 167-173

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717

Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C (2011): Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 2188-2197

- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989): Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245, 978-982
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H-P, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127
- McPhail LT, McBride CB, McGraw J, Steeves JD, Tetzlaff W (2004): Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Exp Neurol* 185, 182-190
- Meencke HJ (1983): The density of dystopic neurons in the white matter of the gyrus frontalis inferior in epilepsies. *J Neurol* 230, 171-181
- Merkler D, Schmelting B, Czeh B, Fuchs E, Stadelmann C, Brück W (2006): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset reflects the immunopathology of pattern II multiple sclerosis lesions. *Mult Scler* 12, 369-374
- Meyer G, Gonzalez-Hernandez T, Galindo-Mireles D, Castaneyra-Perdomo A, Ferres-Torres R (1991): The efferent projections of neurons in the white matter of different cortical areas of the adult rat. *Anat Embryol (Berl)* 184, 99-102
- Meyer G, Wahle P, Castaneyra-Perdomo A, Ferres-Torres R (1992): Morphology of neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Exp Brain Res* 88, 204-212
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211
- Müller R, Heinrich M, Heck S, Blohm D, Richter-Landsberg C (1997): Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* 288, 239-249
- Murthy AS, Flavin M (1983): Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase. *Eur J Biochem* 137, 37-46
- Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C (1987): Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330, 80-82
- Okhotin VE, Kalinichenko SG (2002): [Interstitial cells of subcortical white matter, their connections, neurochemical specialization, and the role in histogenesis of the cortex]. *Morfologija* 121, 7-26
- Okhotin VE, Kalinichenko SG (2003): Subcortical white matter interstitial cells: their connections, neurochemical specialization, and role in the histogenesis of the cortex. *Neurosci Behav Physiol* 33, 177-194



Oksenberg JR, Panzara MA, Begovich AB, Mitchell D, Erlich HA, Murray RS, Shimonkevitz R, Sherritt M, Rothbard J, Bernard CCA (1993): Selection for T-cell receptor V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68-70

Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R (2006): Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp Neurol* 197, 373-385

Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400

Picus J, Aldrich WR, Letvin NL (1985): A naturally occurring bone-marrow-chimeric primate. I. Integrity of its immune system. *Transplantation* 39, 297-303

Piper DR, Mujtaba T, Keyoung H, Roy NS, Goldman SA, Rao MS, Lucero MT (2001): Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. *J Neurosci Res* 66, 356-368

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-846

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302

Pomeroy IM, Jordan EK, Frank JA, Matthews PM, Esiri MM (2008): Diffuse cortical atrophy in a marmoset model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 437, 121-124

Pomeroy IM, Jordan EK, Frank JA, Matthews PM, Esiri MM (2010): Focal and diffuse cortical degenerative changes in a marmoset model of multiple sclerosis. *Mult Scler* 16, 537-548

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231

Prineas JW: The neuropathology of multiple sclerosis; in: *Demyelinating Diseases*; ed. JC Koetsier. Elsevier Science Publishers Amsterdam 1985, 213-257

Ramagopalan SV, DeLuca GC, Morrison KM, Herrera BM, Dyment DA, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Degenhardt A, Pugliatti M (2008): Analysis of 45 candidate genes for disease modifying activity in multiple sclerosis. *J Neurol* 255, 1215-1219

Ramón y Cajal S (1911): *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Vol. II, Maloine, Paris (reprinted Madrid 1952), 519-598

Reep RL (2000): Cortical layer VII and persistent subplate cells in mammalian brains. *Brain Behav Evol* 56, 212-234

Rioux L, Nissanov J, Lauber K, Bilker WB, Arnold SE (2003): Distribution of microtubule-associated protein MAP2-immunoreactive interstitial neurons in the parahippocampal white matter in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160, 149-155

Sano M, Katoh-Semba R, Kitajima S, Sato C (1990): Changes in levels of microtubule-associated proteins in relation to the outgrowth of neurites from PC12D cells, a forskolin- and nerve growth factor-responsive subline of PC12 pheochromocytoma cells. *Brain Res* 510, 269-276

Sarnat HB, Nochlin D, Born DE (1998): Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev* 20, 88-94

Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, Ramió-Torrentà L, Miller DH, Thompson AJ (2004): Grey and white matter atrophy in early clinical stages of primary progressive multiple sclerosis. *Neuroimage* 22, 353-359

Schrempf W, Ziemssen T (2007): Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 6, 469-475

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL (1965): Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122, 552-568

Sela M, Teitelbaum D (2001): Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2, 1149-1165

Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B (1994): Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* 27, 234-247

Simpson D, Noble S, Perry C (2002): Glatiramer acetate: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs* 16, 825-850

Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan AL, Helm GA (2002): Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke* 33, 816-824

Steinman L (2005): Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4, 510-518

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465-471

Suárez-Solá ML, González-Delgado FJ, Pueyo-Morlans M, Medina-Bolívar OC, Hernández-Acosta NC, González-Gómez M, Meyer G (2009): Neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Front Neuroanat* 3, 7

Svensson L, Abdul-Majid KB, Bauer J, Lassmann H, Harris RA, Holmdahl R (2002): A comparative analysis of B cell-mediated myelin oligodendrocyte glycoprotein-experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis in B cell-deficient mice reveals an effect on demyelination. *Eur J Immunol* 32, 1939-1946

Tan KH, Purcell WM, Heales SJ, McLeod JD, Hurst RD (2002): Activated T cells mediate direct blood-brain barrier endothelial cell death and dysfunction. *Neuroreport* 13, 2587-2591

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl J Med* 338, 278-285

Trotter JL, Damico CA, Cross AH, Pelfrey CM, Karr RW, Fu XT, McFarland HF (1997): HPRT mutant T-cell lines from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein peptides. *J Neuroimmunol* 75, 95-103

Uccelli A, Giunti D, Capello E, Roccatagliata L, Mancardi GL (2003): EAE in the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Int MS Journal* 10, 6-12

Ünal-Çevik I, Kiliç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004): Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 1015, 169-174

van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA, Dijkstra CD (1996): Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 70, 145-152

van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, Butzkueven H, McMichael AJ (2007): Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol* 254, 581-590

van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH (1996): Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47, 1531-1534

Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P (2005): Grey matter pathology in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 1101-1107

Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM (2006): Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67, 960-967

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994): Animal models. *Ann Neurol* 36, S47-S53

Westland KW, Pollard JD, Sander S, Bonner JG, Linington C, McLeod JG (1999): Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. *Brain* 122, 1283-1291

Weyer A, Schilling K (2003): Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73, 400-409

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I (1996): NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44, 1167-1171

Woo TU, Beale JM, Finlay BL (1991): Dual fate of subplate neurons in a rodent. *Cereb Cortex* 1, 433-443

Yamamoto H, Saitoh Y, Fukunaga K, Nishimura H, Miyamoto E (1988): Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J Neurochem* 50, 1614-1623

Zwadlo G, Schlegel R, Sorg C (1986): A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol* 137, 512-518

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit, unter seiner Leitung in der Abteilung Neuropathologie im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Göttingen eine Promotionsarbeit durchzuführen.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Dr. med. Christiane Theodossiou-Wegner, die mein Dissertationsvorhaben hervorragend betreute. Sie stand mir stets mit Anregungen, Motivation, Rat und Antworten auf meine Fragen zur Seite.

Vielen Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. med. Fuchs vom Deutschen Primatenzentrum Göttingen für die freundliche Überlassung der Tierpräparate.

Frau Brigitte Maruschak und Frau Uta Scheidt danke ich für die sehr gute Einführung in histologische und immunhistochemische Färbemethoden. Mein besonderer Dank gilt Frau Jasmin Held für die großartige Unterstützung bei den Färbungen des Marmosettengewebes.

Auch allen nicht genannten Mitarbeitern der Abteilung Neuropathologie des Zentrums Pathologie und Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Göttingen danke ich für ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.