

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

Quantitative Untersuchung der Oligodendrozyten im
Kortex von *Callithrix-jacchus*-Marmosetten mit
Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Andrea Christina Vondran
aus
Hannover

Göttingen 2013

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. A. Flügel

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Multiple Sklerose	9
1.1.1 Klinik	9
1.1.2 Diagnostik	10
1.1.3 Therapie.....	11
1.2 Pathogenese der MS	12
1.2.1 Epidemiologie	12
1.2.2 Ätiologie	12
1.3 Pathologie der MS	14
1.3.1 Heterogenität früh-aktiver Läsionen	16
1.3.2 Oligodendrozytenpathologie	17
1.3.3 Kortikale MS-Läsionen.....	20
1.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in Callithrix-jacchus-Marmosetten	21
2 Fragestellung	24
3 Materialien & Methoden	25
3.1 Induktion der EAE in Marmosetten	25
3.2 Auswahl der Tiere und der Schnittpräparate	26
3.3 Histologische Techniken	26
3.3.1 Einbettung und Anfertigen der Schnitte	26
3.3.2 Immunhistochemische Färbungen	27
3.3.3 Prinzip der Doppelfärbung	28
3.4 Durchführung der Doppelfärbung	29
3.4.1 DAB-Methode	29
3.4.2 APAAP-Methode.....	32
3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	33
3.6 Datenauswertung und Statistik	35
3.7 Verwendete Reagenzien	37
4 Ergebnisse	40
4.1 Ausgewertete Tiere und Morphologie der Läsionen	40

4.2 Reduktion von Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex.....	42
4.2.1 Reduktion der p25-positiven Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen	42
4.2.2 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen	45
4.3 Erhöhter Quotient von p25-positiven zu NogoA-positiven Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen im Vergleich zum myelinisierten Kortex.....	47
4.4 Keine Assoziation zwischen Entzündungszellen und Oligodendrozytendichte in kortikalen Läsionen.....	48
4.5 Keine Assoziation zwischen Erkrankungsdauer und kortikalen Entzündungszellen.....	53
5 Diskussion.....	55
5.1 Reduzierte Dichte von Oligodendrozyten in demyelinisierten kortikalen Läsionen.....	55
5.2 Signifikant verändertes Verhältnis von p25- zu NogoA-positiven Zellen in Läsionen	59
5.3 Kein Einfluss des zellulären Infiltrats auf die Oligodendrozytendichte	61
6 Zusammenfassung	64
7 Literaturverzeichnis.....	66

Abkürzungsverzeichnis

Zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit wurden in der Literatur gebräuchliche englische Begriffe und Abkürzungen ohne Übersetzung übernommen.

APAAP-Methode	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans
CNP	Zyklische Nukleotidphosphodiesterase
DAB	3-3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
FKS	Fetales Kälberserum
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin G
L	Läsion
L(S)AB	<i>“Labelled (Strept-)Avidin-Biotin technique”</i> (markierte (Strept-)Avidin-Biotintechnik)
LFB	Luxol Fast Blue
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRP-14	<i>“Myeloid-Related Protein 14”</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NAC	<i>“Normal appearing cortex”</i> (Normal erscheinender Kortex)
PAS	<i>“Periodic acid-Schiff reaction“</i> (Reaktion mit Perjodsäure und Schiff'schem-Reagenz)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PLP	Proteolipidprotein
rMOG	rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten- Glykoprotein
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
WS	Weiße Substanz
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistochemische Färbung p25-positiver Oligodendrozyten im normal erscheinenden Kortex und in intrakortikalen Läsionen.	43
Abbildung 2: Reduktion p25-positiver Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen	44
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung NogoA-positiver Oligodendrozyten im normal erscheinenden Kortex und in intrakortikalen Läsionen.	46
Abbildung 4: Reduktion NogoA-positiver Zellen in kortikalen Läsionen	47
Abbildung 5: Erhöhter Anteil p25-positiver Zellen pro NogoA-positiver Zellen in kortikalen Läsionen	48
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung CD3-positiver T-Zellen innerhalb einer kortikalen Läsion.	50
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung CD20-positiver B-Zellen im normal erscheinenden Kortex und innerhalb einer kortikalen Läsion....	51
Abbildung 8: Durchschnittliche Dichte der untersuchten Entzündungszellen innerhalb der kortikalen Läsionen	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörperkombinationen für die Doppelfärbungen	29
Tabelle 2: Verdünnung und Spezifikation der verwendeten Primärantikörper	30
Tabelle 3: Sekundärantikörper (Firma Dako Deutschland GmbH, Hamburg)	31
Tabelle 4: Übersicht der Schnittpräparate, an denen in der Färbung gegen den Antikörper p25 und NogoA die Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen und im normal erscheinenden Kortex ausgezählt wurden.....	34
Tabelle 5: Bezugsquellen der Reagenzien	38
Tabelle 6: Bezugsquellen der Primärantikörper	39
Tabelle 7: Bezugsquellen von Geräten und Einwegmaterialien	39
Tabelle 8: Auflistung der untersuchten Areale, Erkrankungsdauer und Läsionen der neun Versuchstiere, die jeweils sowohl demyelinisierten als auch normal erscheinenden Kortex in den tiefen kortikalen Schichten in der analysierten Region aufwiesen.	41
Tabelle 9: Spearman-Korrelationswerte der Oligodendrozytendichte mit der Dichte der untersuchten Entzündungszellen.....	53
Tabelle 10: Spearman-Korrelationswerte der Erkrankungsdauer der Versuchstiere mit der Dichte der untersuchten Entzündungszellen.....	54

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), die auch als Enzephalomyelitis disseminata bezeichnet wird, ist eine chronische entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS).

Die ersten Beschreibungen ihrer klinischen Symptome, sowie die ersten histologischen Zeichnungen stammen von Carswell (1838) aus England sowie von Cruveilhier aus Frankreich (Cruveilhier 1829; Carswell 1838). Die erste Dokumentation, die den Zusammenhang zwischen Klinik und Pathologie der MS beschrieb, stammte vom Neurologen Martin Charcot. 1868 beschrieb er in der von ihm als „*Sclérose en plaque*“ bezeichneten Erkrankung die histopathologischen Hauptmerkmale: Entmarkung, Entzündung und Gliose (Charcot 1868).

1.1.1 Klinik

Die MS ist klinisch durch das Auftreten zeitlich und räumlich disseminierter Läsionen charakterisiert. Die Symptome hängen von der Lokalisation der Entzündungsherde ab. Als klinische Defizite treten häufig Seh-, Gleichgewichts- und Sensibilitätsstörungen sowie Paresen auf. Kognitive Defizite sind bei mehr als 40% der MS-Patienten nachweisbar (Rao et al. 1991). Wesensveränderungen (Rao et al. 1991) können ebenfalls auftreten. Zu Beginn der Erkrankung treten die Symptome bei etwa 85% schubartig auf (schubförmig verlaufende MS). Die mit den Schüben verbundenen klinischen Defizite bilden sich im Frühstadium der Erkrankung typischerweise vollständig oder teilweise zurück.

Ein Schub ist charakterisiert durch das Auftreten neurologischer Symptome, die mindestens 24 Stunden andauern, sofern vorher ein stabiles Intervall von mindestens einem Monat ohne Auftreten neuer Symptome vorausgegangen ist und ein infektiöser Prozess oder eine Erkrankung anderer Genese als Ursache für die Symptome ausgeschlossen werden kann.

Ein Großteil der Patienten mit primär schubförmigem Verlauf geht schließlich in die sekundär chronisch progrediente Verlaufsform der MS über. Die Phase der Progression ist durch die Akkumulation zunehmender Behinderung charakterisiert. Dieses Voranschreiten der Erkrankung kann stufenweise mit Auftreten von Schüben stattfinden oder chronisch schleichend erfolgen.

Etwa 15% der Patienten zeigen eine primär progrediente Verlaufsform der MS: Bei diesen Patienten schreitet die Erkrankung von Beginn an fort und führt zur kontinuierlichen Akkumulation von bleibender Behinderung. Bei dieser Verlaufsform steht klinisch meist eine zunehmende Paraparese mit kontinuierlicher Verschlechterung der Gehfähigkeit im Vordergrund.

Patienten, die erstmalig einen isolierten Schub erleiden, werden als Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom bezeichnet. Die Optikusneuritis stellt hierbei die häufigste Manifestation eines klinisch isolierten Syndroms dar. Bei einem Teil der Patienten, die klinisch und magnetresonanztomographisch keine Hinweise auf weitere Läsionen an anderen Stellen des ZNS zeigen und einen unauffälligen Liquorbefund aufweisen, bleibt es bei dieser einmaligen Episode. Patienten, die allerdings in der MRT weitere Herde und/oder oligoklonale Banden im Liquor zeigen, haben ein erhöhtes Risiko eine schubförmige MS zu entwickeln (Lublin und Reingold 1996).

1.1.2 Diagnostik

Die MS ist durch eine räumliche und zeitliche Dissemination der entzündlich-demyelinisierenden Läsionen charakterisiert. Die traditionelle Diagnosestellung beruhte vor allem auf klinischen Befunden, wobei die Diagnose einer definitiven MS erst nach Auftreten von zwei klinischen Schüben unter Berücksichtigung von liquorchemischen (oligoklonale IgG-Banden im Liquor), neurophysiologischen (evozierte Potenziale) und magnetresonanztomographischen (MRT) Befunden erfolgte (Poser et al. 1983).

Diese von Poser definierten Kriterien wurden vor kurzem durch die so genannten McDonald-Kriterien ersetzt (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2011). Nach den neuen Kriterien kann die Diagnose einer MS bereits nach einem Schub gestellt werden, wenn sich in der initialen MRT eine zeitliche und räumliche Dissoziation der Läsionen zeigt (Polman et al. 2011). Die Liquordiagnostik unterstützt hierbei die Diagnose. Zusätzlich wurde ein Leitfaden für die Diagnostik der primär-fortschreitenden MS-Form erstellt (McDonald et al. 2001).

1.1.3 Therapie

Bislang gibt es für die MS keine kurative Therapie. Allerdings gibt es verschiedene immunmodulatorische und immunsuppressive Therapien, die vor allem die Schubrate reduzieren. Neben diesen immunmodulatorischen Therapien gibt es noch die Therapie des akuten Schubs.

Während eines akuten Schubs besteht die derzeitige Standardtherapie in der hochdosierten Gabe von intravenösem Methylprednisolon (1000 mg Methylprednisolon über 3-5 Tage). Durch die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide soll u. a. die Blut-Hirn-Schranke, die während akuter Schübe in den Läsionen gestört ist, wieder hergestellt werden und damit das Ausmaß und die Dauer der Schübe reduziert werden. Bei wiederholtem Nichtansprechen auf die Glukokortikoidtherapie ist eine Plasmapheresebehandlung indiziert (Gold und Rieckmann 2007).

Zur Langzeitbehandlung eignen sich krankheitsmodifizierende Therapieschemata, welche das Auftreten von Schüben um etwa 30% reduzieren. Als immunmodulatorische Therapien stehen einerseits Interferone (Extavia®, Betaferon®, Avonex®, Rebif®) und Glatiramerazetat (Copaxone®) zur Verfügung (Sela und Teitelbaum 2001; Bayas und Gold 2003). Alle genannten Medikamente werden subkutan bzw. intramuskulär im Fall von Avonex injiziert. Die Interferone wirken dabei über verschiedene modulatorische Effekte auf die humorale und zelluläre Immunantwort (Yong 2002). Allerdings gibt es bisher keine eindeutigen Daten, die einen Effekt dieser Medikamente auf das Voranschreiten der Behinderung zeigen.

Bei Versagen der immunmodulatorischen Therapien oder aggressiven

Verläufen kommt eine Eskalationstherapie mit Natalizumab (Tysabri®), Fingolimod (Gilenya®) oder Mitoxantron (Morrissey et al. 2005) in Betracht. Neben der akuten Schubtherapie und den immunmodulatorischen Behandlungen gibt es auch noch symptomatische Therapien, die zur Verbesserung von Spastik, Schmerzen, Blasendysfunktion, Depression und Fatigue dienen.

1.2 Pathogenese der MS

1.2.1 Epidemiologie

Die MS ist die häufigste, chronische neurologische Erkrankung, die zu Behinderungen im jungen bis mittleren Erwachsenenalter führt. Von der Erkrankung sind 0,05-0,15% der kaukasischen Bevölkerung betroffen, wobei das Alter zu Erkrankungsbeginn typischerweise zwischen 20 und 40 Jahren liegt. Frauen sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Männer (Noseworthy et al. 2000). Die Prävalenz der MS variiert nach einem geographischen Verteilungsmuster, wobei vom Äquator ausgehend jeweils ein Ansteigen in Richtung der beiden Pole zu verzeichnen ist. Am höchsten ist die Prävalenz in Nordeuropa, dem südlichen Australien und in Teilen Nordamerikas (Kurtzke 1980). In Regionen mit einem großen Bevölkerungsanteil von Menschen nordeuropäischer Abstammung ist die MS besonders häufig zu finden. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 100-120 Erkrankten pro 100.000 Einwohner. Somit gehört Deutschland, vor allem im Vergleich zum mitteleuropäischen Durchschnitt von 30-60 Erkrankten pro 100.000 Einwohner, zu einem Land mit hoher Prävalenz.

1.2.2 Ätiologie

Die genaue Ätiologie der MS ist nicht abschließend geklärt, aber epidemiologische Studien weisen daraufhin, dass neben geographischen Einflüssen auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen.

Zwillingsstudien belegen eine genetische Prädisposition für die MS. Die

Konkordanz für eineiige Zwillinge beträgt 30% und die für zweieiige Zwillinge oder einen anderen Geschwisterteil etwa 5% (Ebers et al. 1986; Sadovnick et al. 1996).

In genetischen Untersuchungen konnten außerdem unterschiedliche Ergebnisse zwischen verschiedenen Populationen gefunden werden (Kira et al. 1996). Dies zeigt, dass verschiedene Faktoren bei der Pathogenese der MS eine Rolle spielen und von einer Interaktion von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren auszugehen ist (Sadovnick et al. 1996). In genetischen Studien wurde gezeigt, dass bei der MS nicht ein einzelnes Gen für die Entstehung der Erkrankung ursächlich ist, sondern dass vielmehr ein polygenes Vererbungsmuster vorliegt (Dyment et al. 2004). Bei den bisher identifizierten Kandidatengenomen handelt es sich vorwiegend um Gene, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen. Eine Assoziation mit der MS konnte für die Allele HLA-Dw2 und -DR2 des humanen Leukozytenantigens (HLA) Klasse II gezeigt werden. Die HLA-Subtypen DRB1*1501, DQA1*0102 und DQB1*0602 gehen mit einem zwei- bis vierfach erhöhten Risiko für die Entstehung einer MS einher (Dyment et al. 2004). Weitere Kandidaten sind die Gene, die für die Interleukinrezeptoren wie für die Untereinheiten der Rezeptoren für Interleukin 2 und 7 kodieren (Hafler et al. 2007; Weber et al. 2008).

Eine umfangreiche Genomuntersuchung bei mehr als 9000 MS-Patienten und über 17.000 gesunden Kontrollprobanden ergab über 50 Gene, die mit MS assoziiert sind. Innerhalb des für die HLA-Subtypen kodierenden DRB1-Gens konnten bereits bekannte Risikoallele näher identifiziert werden. Die Studie bestätigte vorwiegend immunologisch relevante Gene. Neben den immunologischen Faktoren konnten in dieser Studie jedoch auch Umweltfaktoren wie z.B. Vitamin D (CYP27B1, CYP24A1) identifiziert werden. Auch gab es eine Assoziation mit therapeutischen Zielstrukturen wie VCAM1 (Natalizumab und Tysabri®) und IL2RA (Daclizumab). Allerdings konnten keine genetischen Faktoren identifiziert werden, die mit dem Krankheitsverlauf oder Schweregrad der Erkrankung assoziiert waren (Sawcer et al. 2011).

Migrationsstudien deuten zudem auf den Einfluss exogener Faktoren hin. In diesen Studien wurde untersucht, wie sich das Erkrankungsrisiko verändert, wenn ein Individuum von einem Gebiet mit hoher Prävalenz in ein Gebiet mit niedriger Prävalenz einwandert oder umgekehrt. Es konnte gezeigt werden, dass das Alter zum Zeitpunkt der Umsiedlung für das Erkrankungsrisiko eine Rolle spielt. So übernehmen Jugendliche vor der Pubertät das Erkrankungsrisiko des jeweiligen Einwanderungslandes, wohingegen Personen, die zum Zeitpunkt der Migration älter als 15 Jahre waren, das Erkrankungsrisiko ihres jeweiligen Herkunftslandes beibehalten (Gale und Martyn 1995).

Virale und auch bakterielle Infektionen werden als weitere Umweltfaktoren diskutiert, die bei der Entstehung einer MS eine Rolle spielen. Als mögliche Kandidaten werden unter anderem das Epstein-Barr-Virus (EBV), das humane Herpesvirus 6 (Ascherio und Munch 2000), Masernviren (Burgoon et al. 1999) und Chlamydia pneumoniae (Sriram et al. 1998) genannt.

1.3 Pathologie der MS

Die MS ist charakterisiert durch entzündlich-demyelinisierende Läsionen im ZNS. Die Läsionen weisen eine meist scharf begrenzte Demyelinisierung auf, die durch Myelin- und/oder Oligodendrozytenverlust gekennzeichnet ist. Des Weiteren zeigen die Herde je nach Alter der Läsion ein unterschiedliches Ausmaß von Entzündungsaktivität. Weitere Merkmale von MS-Läsionen sind die Astrogliose und eine Reduktion der axonalen Dichte. MS-Plaques finden sich bevorzugt in der periventrikulären weißen Substanz, dem Rückenmark, dem Sehnerv, dem Hirnstamm und dem Kleinhirn. Neben Läsionen in der weißen Substanz sind auch Herde in der grauen Substanz häufig (Bo et al. 2003b).

Während ihrer Entwicklung durchlaufen Läsionen in der weißen Substanz verschiedene Aktivitätsstadien, die bestimmte histopathologische Muster aufweisen. Je nach Aktivität einer Läsion lassen sich unterschiedliche Myelindegradationsprodukte in den Makrophagen nachweisen, wobei die folgenden Myelinproteine untersucht werden: Das *Proteolipidprotein* (PLP), Myelin-Basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

(MOG), die Zyklische Nukleotidphosphodiesterase (CNP) und das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG). In der Stadienteilung nach Brück und Kollegen wird neben diesen in Makrophagen inkorporierten Myelinabbauprodukten (PLP, MBP, MOG, CNP und MAG) auch der frühe Makrophagenaktivierungsmarker MRP-14 zur Charakterisierung von verschiedenen Stadien verwendet (Bruck et al. 1995; Bruck et al. 1996; Lucchinetti et al. 1996).

Anhand des Vorhandenseins oder Fehlens dieser Marker werden die Läsionen in früh-aktive, spät-aktive und demyelinisierte/inaktive Stadien eingeteilt (Lucchinetti et al. 1999).

Früh-aktive Läsionen zeigen neben einem parenchymalen Ödem und entmarkten Myelinscheiden vor allem ein dichtes parenchymatöses und perivaskuläres Infiltrat aus Makrophagen und auch einigen T-Lymphozyten. Bei den Makrophagen handelt es sich typischerweise um früh aktivierte Makrophagen, die MRP-14 exprimieren. Diese enthalten LFB-positive Myelinabbauprodukte sowie sämtliche immunhistochemisch anfärbbare Myelinabbauprodukte (PLP, MBP, MOG, CNP und MAG). Die Anzahl der Oligodendrozyten ist typischerweise reduziert. Außerdem können axonale Schwellungen und Durchtrennungen beobachtet werden (Bitsch et al. 2000).

Spät-aktive Läsionen zeigen im Vergleich zu früh-aktiven Läsionen einen deutlich fortgeschrittenen Myelinabbau, wobei in diesen Läsionen lediglich Makrophagen mit inkorporierten MBP- und PLP-positiven Abbauprodukten nachweisbar sind. Mit dem Marker MRP-14 lassen sich kaum noch früh-aktivierte Makrophagen erkennen.

Inaktive demyelinisierte Läsionen weisen weniger Makrophagen auf, die dann nur noch PAS-positive Abbauprodukte enthalten. Manche Autoren verwenden in ihrer Einteilung auch chronisch-aktive Läsionen. Hierbei handelt es sich um Läsionen, in deren Randbereich sich weiterhin Ansammlungen von Makrophagen befinden und ein langsam ablaufender Myelinabbau stattfinden kann (Bruck et al. 1995).

Etwa 40% der Läsionen in der weißen Substanz weisen Zeichen der Remyelinisierung auf (Barkhof et al. 2003). Komplette remyelinisierte Läsionen werden als „*Shadow plaques*“ bezeichnet. Das neugebildete Myelin besteht aus dünneren Myelinscheiden und erscheint unregelmäßiger angeordnet als in der normal erscheinenden weißen Substanz. Die Intensität der Remyelinisierung korreliert in Läsionen der weißen Substanz mit einer höheren Oligodendrozytendichte (Bruck et al. 2003).

1.3.1 Heterogenität früh-aktiver Läsionen

Nach Lucchinetti und Kollegen können früh-aktive Läsionen in vier verschiedene charakteristische Läsionsmuster eingeteilt werden. Diese Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an Biopsie- und Autopsiegewebe von MS-Patienten. Bei ihren Untersuchungen zeigte sich, dass früh-aktive Läsionen bei ein und demselben Patienten stets das gleiche charakteristische Läsionsmuster zeigen (intraindividuelle Homogenität), aber dass sich diese Läsionsmuster durchaus zwischen den Patienten unterscheiden (interindividuelle Heterogenität).

Nach Lucchinetti et al. werden die folgenden vier charakteristischen Läsionsmuster unterschieden (Lucchinetti et al. 2000):

Subtyp-I- und -II-Läsionen sind charakterisiert durch eine scharf begrenzte Läsion mit zahlreichen Makrophagen und T-Zellen, wobei die Subtyp-II-Läsionen im Gegensatz zu Subtyp-I-Läsionen charakteristische Ablagerungen von Immunglobulinen (meist IgG) und dem aktivierten Komplementkomplex C9neo aufweisen.

Subtyp-III-Läsionen erscheinen nur unscharf begrenzt. Charakteristisch für diese Läsionen ist ein Verlust von Oligodendrozyten, wobei sich typischerweise apoptotische Oligodendrozyten nachweisen lassen. Daneben zeigt sich ein deutlicher Verlust von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) bei relativem Erhalt von Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Es wird diskutiert, ob hypoxische Prozesse bei der Entstehung dieses

Läsionsmusters eine Rolle spielen.

Subtyp IV wurde bisher nur in Autopsien von Patienten mit primär progredienter MS gefunden. Er zeichnet sich durch einen von DNA-Fragmentierung gekennzeichneten periläsionalen Oligodendrozytenverlust aus.

Die Arbeiten von anderen Autoren sahen allerdings keine Hinweise für die Heterogenitätshypothese, sondern eher für homogene MS-Läsionen (Prineas et al. 1993), die während der Läsionsentstehung verschiedene pathologische Stadien durchlaufen. Allerdings wurden in diesen Publikationen nicht ausschließlich früh-aktiv demyelinisierende Läsionen untersucht, so dass diese Arbeiten nicht direkt vergleichbar sind. Das von Prineas beschriebene früheste Stadium einer MS-Läsion weist hinsichtlich der Oligodendrozytenapoptose interessanterweise ähnliche Charakteristika auf wie Typ-III-Läsionen.

1.3.2 Oligodendrozytenpathologie

Es wird angenommen, dass die reifen, myelinproduzierenden Oligodendrozyten das Ziel der immunologischen und zur Demyelinisierung führenden Reaktion der MS sind (Bruck et al. 1994; Lucchinetti et al. 1999). Der Verlust der Oligodendrozyten könnte außerdem ein initiales Zeichen für die Entstehung einer Läsion darstellen (Barnett und Prineas 2004). Trotz dieser destruktiven Prozesse können parallel ablaufende Reparaturmechanismen vor allem in aktiven Läsionen beobachtet werden. In Läsionen mit andauernder aktiver Demyelinisierung finden sich oft Zeichen der Remyelinisierung (Prineas et al. 1993).

Für die Remyelinisierung von Läsionen sind neugebildete remyelinisierende Oligodendrozyten verantwortlich, die aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ) differenzieren. Die höchste Dichte an Vorläuferzellen befindet sich in der subventrikulären Zone (Nait-Oumesmar et al. 1999), aber es lassen sich in den meisten anderen ZNS-Regionen ebenfalls

Oligodendrozytenvorläuferzellen in geringerer Dichte nachweisen. Die Oligodendrozytenvorläuferzellen werden entweder von der subventrikulären Zone oder vom periläsionalen ZNS-Gewebe in die Läsionen rekrutiert (Franklin et al. 1997). Sie wandern in die demyelinisierten Areale ein, wo sie zu myelinproduzierenden Oligodendrozyten differenzieren. Während ihrer Differenzierung formen sich die Zellen zuerst zu prä-myelinisierenden Oligodendrozyten um, die das demyelinisierte Axon umgeben, bevor sie in der nächsten Reifungsstufe Myelinproteine produzieren, die das Axon umwickeln. Normalerweise ist die Dicke der Myelinscheide proportional zum Axondurchmesser, so dass dicke Axone dicke Myelinscheiden aufweisen. Remyelinisierte Axone weisen aber deutlich dünnere und kürzere Myelinscheiden im Vergleich zum präexistenten Myelin auf (Franklin 2002). Zu welchem Anteil die Einwanderung von Vorläuferzellen zur Remyelinisierung beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt (Franklin 2002). Während die unreifen Vorläuferzellen stark positiv für die Transkriptionsfaktoren Nkx2.2 und Olig2 sind, zeigen die myelinproduzierenden Zellen der nächsten Reifestufe nur noch eine geringe Aktivität von Olig2 und exprimieren zudem den Oligodendrozytenmarker NogoA.

Wie erwähnt werden nach Lucchinetti et al. aktiv demyelinisierende MS-Läsionen in vier charakteristische Subtypen unterteilt. Darüber hinaus können akute und auch chronische MS-Läsionen je nach Vorhandensein oder Fehlen von Oligodendrozyten zwei Typen zugeordnet werden: Oligodendrozyten-Subtyp I ist durch das Vorkommen von Oligodendrozyten charakterisiert, während in Oligodendrozyten-Subtyp II keine Oligodendrozyten oder Remyelinisierungsvorgänge mehr zu finden sind (Lucchinetti et al. 1999). Oligodendrozytenvorläuferzellen und myelinproduzierende Oligodendrozyten sind in allen Oligodendrozyten-Subtyp-I-Läsionen früher MS-Stadien und der umgebenden weißen Substanz eindeutig nachweisbar. In chronischen MS-Läsionen hingegen, sind diese zwar noch vorhanden, ihre Anzahl jedoch deutlich reduziert (Targett et al. 1996; Wolswijk 2002; Kuhlmann et al. 2008). Für die gestörte Remyelinisierung scheinen verschiedene Ursachen verantwortlich zu sein.

Da die fehlende Remyelinisierung hauptsächlich in chronischen MS-Läsionen zu finden ist, scheint der Grad der Remyelinisierung grundsätzlich davon abhängig zu sein, in welchem Stadium der Erkrankung eine Läsion entsteht (Targett et al. 1996). Neben dem Krankheitsstadium werden drei Mechanismen für das Fehlen der Remyelinisierung in chronischen Läsionen diskutiert: Erstens wird diskutiert, dass es zu einem Verbrauch von suffizienten Vorläuferzellen kommt (Linnington et al. 1992). Mögliche Gründe für eine fehlende Reserve von Vorläuferzellen sind zum einen ein Mangel an Zellen durch ständig wiederkehrende Zyklen von Demyelinisierung und Remyelinisierung und zum anderen ein tatsächlicher Mangel dieser Zellen, der durch Auto-Antikörper gegen Myelinproteine zustande kommen könnte (Li et al. 2002). Ein zweiter möglicher Mechanismus besteht darin, dass die vorhandenen Vorläuferzellen weniger sensitiv auf die Rekrutierung ansprechen oder die Konzentrationen der Faktoren, die für die Rekrutierung verantwortlich sind, vermindert sind (Lucchinetti et al. 1999).

Drittens könnte auch eine Behinderung der Differenzierung von Vorläuferzellen ursächlich für das Scheitern der Remyelinisierung verantwortlich sein. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass dieser dritte Mechanismus wohl die entscheidende Rolle für das Versagen der Remyelinisierung spielt. Die Arbeiten verschiedener Autoren konnten zeigen, dass in chronischen MS-Läsionen zwar Vorläuferzellen nachweisbar sind, aber keine Differenzierung zu myelinproduzierenden Oligodendrozyten mehr erfolgt (Chang et al. 2002; Kuhlmann et al. 2008).

Neben dem generellen Unterschied der Remyelinisierung in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium besteht auch ein Unterschied zwischen der Remyelinisierungskapazität von Läsionen der weißen Substanz im Vergleich zu kortikalen Läsionen. 72% der kortikalen MS-Läsionen zeigen Anzeichen von Remyelinisierung, während dagegen nur 40% der Läsionen der weißen Substanz Zeichen der Remyelinisierung aufweisen (Albert et al. 2007). Mögliche Gründe für diesen Unterschied der Remyelinisierungskapazität von Läsionen in der grauen und weißen Substanz sind einerseits die Größe der Läsionen und andererseits die unterschiedliche Oligodendrozytendichte. Kortikale Läsionen sind in der Regel kleiner, was wiederum die

Wiedereinwanderung von myelinisierenden Zellen vereinfachen könnte. Andererseits ist es denkbar, dass die Myelinproduktion von Oligodendrozyten in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich reguliert ist (Albert et al. 2007). Schließlich sind kortikale Läsionen auch weniger destruktiv als solche in der weißen Substanz.

1.3.3 Kortikale MS-Läsionen

Kortikale MS-Läsionen sind bereits vor einiger Zeit von Neuropathologen beschrieben worden (Brownell und Hughes 1962). Allerdings gerieten diese Beschreibungen in Vergessenheit, da die Läsionen in der grauen Substanz mit den histologischen Standardfärbungen in der Regel übersehen werden und diese Läsionen auch in bildgebenden Verfahren schlecht nachweisbar sind.

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnte jedoch nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der neokortikalen Läsionen in einigen Patienten sogar größer ist als die Läsionslast in der weißen Substanz (Bo et al. 2003b). Besonders häufig sind kortikale Läsionen bei progressiver MS zu finden. Außerdem konnten in Autopsien bei mehr als 90% der Patienten mit chronischer MS kortikale Läsionen nachgewiesen werden (Wegner et al. 2006). Das Vorhandensein neurodegenerativer Prozesse und apoptotischer Neurone gibt Hinweise darauf, dass die Größe kortikaler Läsionen mit dem Behinderungsgrad der Patienten assoziiert ist (Peterson et al. 2001; Bo et al. 2003b). Auffallend ist, dass kortikale Läsionen im Vergleich zu Läsionen der weißen Substanz eine deutliche geringere Entzündungsreaktion aufweisen.

Die kortikalen MS-Läsionen werden je nach ihrer Lokalisation in drei verschiedene Typen unterteilt:

Bei etwa einem Drittel der kortikalen Läsionen handelt es sich um leukokortikale Läsionen (Typ-I-Läsionen), die sich angrenzend an eine subkortikale Läsion in der weißen Substanz befinden.

Intrakortikale (Typ II) Läsionen sind typischerweise kleine Läsionen, die oft um kleinere Gefäße im Neokortex gelegen sind. Sie überschreiten weder die Hirnoberfläche, noch die Grenze zur subkortikalen, weißen Substanz. Sie machen etwa 18% aller kortikalen Läsionen aus (Peterson et al. 2001).

Bei etwa 50% der kortikalen Läsionen handelt es sich um subpiale (Typ III) Läsionen (Peterson et al. 2001; Wegner et al. 2006). Sie reichen von der an die Pia mater grenzenden Oberfläche bis in den Kortex hinein. Bei einigen Patienten erstrecken sich diese Läsionen bandförmig über mehrere Gyri hinweg. Teilweise erscheinen sie jedoch auch als keilförmig an der Hirnoberfläche gelegene Läsionen.

Wie bereits erwähnt zeigen kortikale MS-Läsionen möglicherweise eine bessere Remyelinisierungskapazität als Läsionen der weißen Substanz. Da die meisten Daten auf Untersuchungen an Autopsiegewebe basieren, gibt es wenige Hinweise zu den pathologischen Veränderungen früher kortikaler MS-Läsionen. Die Dynamik der MS-Pathogenese und klinisch-pathologische Korrelationen lassen sich *in vivo* nur mit großen Schwierigkeiten untersuchen. Daher sind Tiermodelle der MS eine wertvolle Ergänzung, um mehr über die Pathogenese der MS zu erfahren.

1.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in *Callithrix-jacchus*-Marmosetten

Post-mortem-Studien der MS sind dadurch limitiert, dass Autopsiegewebe in der Regel von Patienten im chronischen Stadium der Erkrankung stammt.

Die heutigen Erkenntnisse zur Pathogenese der MS in frühen Stadien beruhen im Wesentlichen auf dem Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Bei der EAE handelt es sich um eine überwiegend T-Zell-vermittelte entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Die EAE wird meist in kleinen Nagetieren wie Mäusen und Ratten induziert. Die EAE ist das bis heute meist verwendete Tiermodell. Mit Hilfe dieses Tiermodells konnten bereits in der heutigen MS-Therapie

etablierte Medikamente wie Glatirameracetat entwickelt werden.

Die EAE kann auf verschiedene Weisen induziert werden und wurde bisher bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und anderen nicht-menschlichen Primaten beschrieben. Eine Möglichkeit der Induktion besteht in der Inokulation von Myelin oder Myelinproteinen zusammen mit einem inkompletten Immunadjuvans aus bakteriellen Produkten und Mineralöl, wie zum Beispiel dem Freund'schen Adjuvans (Brok et al. 2001). Meist wird die EAE aktiv durch eine Immunisierung mit Myelinantigenen, wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), dem basischen Myelinprotein (MBP) oder dem Proteolipid-Protein (PLP) induziert (Wekerle et al. 1994).

Die EAE bei Nagetieren ist nur begrenzt mit der MS vergleichbar, da die Erkrankung im Tiermodell auf Läsionen im Rückenmark beschränkt ist und meist monophasisch abläuft. Die EAE bei *Callithrix-jacchus*-Marmosetten (Weißbüschelaffen, Krallenäffchen) weist hingegen in Bezug auf klinische und neuropathologische Merkmale die größte Übereinstimmung mit der MS auf (Genain und Hauser 2001) und gibt Hinweise darauf, dass T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der EAE spielen. Für die Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Erkrankungen spielt es eine wichtige Rolle, dass zwischen Menschen und *Callithrix-jacchus*-Marmosetten eine große Homologie zwischen den Myelin- und den Immunsystem kodierenden Genen herrscht (Bontrop et al. 1999).

Callithrix-jacchus-Marmosetten sind kleine, 300-500 g schwere, aus dem Amazonasdelta (Südamerika) stammende Neuweltaffen. Diese Affenart ist einerseits besonders anfällig für eine durch aktive Immunisierung mit verschiedenen Myelinproteinen hervorgerufene EAE. Andererseits kann in diesen Tieren auch eine EAE durch passiven Transfer von autoreaktiven T-Zellen, die gegen Myelinproteine gerichtet sind, induziert werden. Die Pathogenese und das klinische Bild der EAE sind dabei abhängig von dem zur Immunisierung verwendeten Antigen. Tiere, die mit dem Myelin-Basischen Protein (MBP) immunisiert wurden, entwickeln nach 10-14 Tagen eine EAE. Die Erkrankung bei diesen MBP-immunisierten Tieren zeigt jedoch mehr Ähnlichkeiten mit der akut disseminierten Enzephalomyelitis als mit der

MS, da es lediglich zur perivaskulären Entmarkung kommt. Die Tiere entwickeln einen monophasischen Krankheitsverlauf und bei der neuropathologischen Untersuchung zeigen sich anschließend wenig demyelinisierte Läsionen mit dominierenden perivaskulären Infiltraten, die überwiegend aus Makrophagen und T-Zellen bestehen. Nach Immunisierung mit Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) zeigen sich hingegen auch im Tierexperiment großflächige Demyelinisierungen (Storch et al. 1998) wie bei der MS. Das MOG-Protein ist an der äußeren Oberfläche der Myelinschichten lokalisiert. Diese ausgedehnten Demyelinisierungen sind womöglich darauf zurückzuführen, dass neben T-Lymphozyten auch MOG-spezifische Antikörper eine Rolle spielen. Die demyelinisierten Läsionen enthalten außerdem sowohl Immunglobuline als auch Einlagerungen von Komplementfaktoren. Dies sind Charakteristika, die auch bei Patienten mit dem MS-Subtyp II gefunden werden (Raine et al. 1999; Lucchinetti et al. 2000).

Die EAE in Marmosetten weist auch hinsichtlich der Lokalisation der Läsionen große Ähnlichkeit zur MS auf. In diesem Modell kommt es sowohl zu Läsionen im Gehirn als auch im Rückenmark und die meisten Tiere weisen ausgedehnte Läsionen im Sehnerv auf. Zudem zeigen diese Tiere kortikale Läsionen entsprechend den drei Läsionstypen, die bei der MS nachweisbar sind (Pomeroy et al. 2005; Merkler et al. 2006a). Die akuten kortikalen Läsionen weisen mehr Entzündungszellen auf als chronische kortikale Läsionen bei der MS. Allerdings ist die Entzündungsreaktion der kortikalen EAE-Läsionen deutlich geringer als in den Läsionen der weißen Substanz. Bislang gibt es keine umfassenden Untersuchungen zur Oligodendrozytenpathologie kortikaler EAE-Läsionen in den Marmosetten.

2 Fragestellung

Da die meisten Untersuchungen zur Pathologie von kortikalen MS-Läsionen an Autopsiegewebe durchgeführt wurden, geben sie nur Hinweise auf die Merkmale später kortikaler Läsionen. Bislang ist unklar, wie die frühe Pathologie kortikaler MS Läsionen aussieht und wie die Oligodendrozyten je nach Alter der Läsionen beeinträchtigt werden. Untersuchungen am EAE-Marmoset-Tiermodell sind daher eine wertvolle Alternative, um Erkenntnisse über die Oligodendrozytenpathologie früher kortikaler Läsionen zu gewinnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, die Oligodendrozytenpathologie in frühen, kortikalen Läsionen im EAE-Marmoset-Tiermodell zu untersuchen. Dabei soll geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß sich die Dichte von Oligodendrozyten in demyelinisierten kortikalen Läsionen vom normal erscheinenden Kortex unterscheidet. Hierzu soll die Dichte der Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen NogoA und p25 untersucht werden, wobei die Oligodendrozytendichte in den tiefen kortikalen Schichten im demyelinisierten und normal erscheinenden myelinisierten Kortex bestimmt wird.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob die Oligodendrozytendichte durch die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats beeinflusst wird. Hierzu wird die Dichte der Makrophagen, Plasmazellen, T-Zellen und B-Zellen bestimmt und mit der Oligodendrozytendichte korreliert.

Diese Untersuchungen im Marmoset-Tiermodell sollen zu einem besseren Verständnis der kortikalen Demyelinisierung in frühen Krankheitsstadien der MS beitragen.

3 Materialien & Methoden

3.1 Induktion der EAE in Marmosetten

Die Experimente und Gewebsuntersuchungen wurden an Marmosetten (*Callithrix jacchus*) durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus einer Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums der Universität Göttingen. Die Haltung erfolgte paarweise in einem regulären Tag/Nacht-Rhythmus (Licht von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr) bei einer Raumtemperatur von 26°C und 55% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Durchführung der Versuche erfolgte in Übereinstimmung mit der Richtlinie des *European Communities Council Directive* vom 24. November 1986 (86/EEC) und unter Zustimmung der Landesregierung von Niedersachsen.

Für die Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wurde das zum N-terminalen Ende der MOG-Sequenz bei der Ratte (Aminosäure 1-125) korrespondierende Ratten-Myelin-Oligodendrozytenprotein (rMOG) rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde in 6 M Harnstoff gelöst, mit 20 mM Natriumacetat (pH 3.0) dialysiert, um einen löslichen Ansatz zu erhalten und anschließend bei -20°C gelagert. Die Marmosetten wurden mit einer intramuskulären Injektion von Saffan (18 mg/kg), Valium® (0.5 mg/kg) und Robinul® (0.008 mg/kg) narkotisiert. Anschließend erhielten sie 500-600 µL in Freund'schem Adjuvans (CFA, Difco, Detroit, Michigan, USA) emulgiertes rMOG (250-300 µg/Tier, gelöst in Kochsalz) als subkutane Injektion.

Klinisch entwickelten die Tiere drei bis acht Tage nach der Immunisierung mit rMOG erste klinische Symptome.

Nach Überlebenszeiten von 4-8 Wochen wurden die Tiere mit einer Überdosis Xylazin/Ketamin narkotisiert und transkardial mit 200 ml Kochsalzlösung, gefolgt von 400 ml Fixationsmedium, welches in 4%igem 0.1M Natriumphosphat gepuffertes Paraformaldehyd (pH 4.7) enthält,

perfundiert. Nach der Perfusion wurden das Gehirn und Rückenmark entnommen und über Nacht in frischer Fixierlösung nachfixiert.

3.2 Auswahl der Tiere und der Schnittpräparate

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Oligodendrozyten in tiefen kortikalen Läsionen und im normal erscheinenden Kortex zu untersuchen. Hierzu wurden entsprechende Läsionen in neun Versuchstieren (5 männliche und 4 weibliche Marmosetten; jeweils ein Schnittpräparat pro Tier) ausgesucht, nachdem zuvor 46 Großhirnschnitte von 24 Tieren durchgesehen worden waren. Die Präparate waren so ausgewählt worden, dass auf jedem Schnitt mindestens ein myelinisiertes und ein demyelinisiertes Areal in tiefen kortikalen Schichten erkennbar war. Zur Beurteilung der Lokalisation und des Vorhandenseins von Läsionen wurden sämtliche Schnitte mit dem gegen das Myelin-Basisches Protein gerichteten Antikörper gefärbt. Durch das Fehlen des MBPs konnten die Läsionen in den tiefen kortikalen Schichten detektiert werden. Der normal erscheinende myelinisierte Kortex zeichnete sich durch das gleichmäßige Vorhandensein von MBP aus.

Die ausgewählten Schnitte wiesen in den tiefen kortikalen Schichten sowohl eine Läsionsfläche als auch eine Fläche von normal erscheinendem Kortex von jeweils mindestens 0,625 mm² auf (entsprechend 10 Gesichtsfeldern in der 400x Vergrößerung).

3.3 Histologische Techniken

3.3.1 Einbettung und Anfertigen der Schnitte

Nachdem die Gehirne in Formalin fixiert worden waren, erfolgte die Einbettung in Paraffin. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden von den Paraffinblöcken mittels Mikrotom 1 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Anschließend wurden diese auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen dienen dazu, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, Enzymen und Chromogenen unterschiedliche Antigene anzufärben und somit sichtbar zu machen.

Bei dieser Methode unterscheidet man die direkte und die indirekte Färbung. Bei der direkten Färbung ist ein Enzym direkt an den verwendeten Antikörper gebunden. Durch Zugabe eines Chromogens wird die Enzym-Substrat-Reaktion induziert und die Färbung vollzogen.

Bei der indirekten Färbung enthält ein Sekundärantikörper das die Reaktion katalysierende Enzym. Alternativ zu der Enzymkopplung kann der Sekundärantikörper auch biotinyliert sein. Biotinylierte Antikörper zeigen eine starke Affinität zu Avidin, welches seinerseits an ein katalysierendes Enzym gebunden ist. Häufig für diese Methoden verwendete Enzyme sind die Peroxidase und die Alkalische Phosphatase (Boenisch 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die „markierte Streptavidin-Biotin-Technik“ (**L**abelled **S**trept-**A**vidin-**B**iotin technique = LSAB oder auch DAB-Methode) als auch die **A**lkalische-**P**hosphatase-**a**nti-**A**lkalische-**P**hosphatase-Methode (APAAP-Methode) verwendet.

Die verwendeten Antikörper wurden in einer Doppelfärbung jeweils mit MBP (Myelin-Basisches Protein) gegengefärbt.

DAB-Methode

Die DAB-Methode besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

Im ersten Schritt wird das Präparat mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach anschließendem Waschen erfolgt die Inkubation zusammen mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Im dritten Schritt erfolgt nach einem Waschvorgang die Zugabe des Avidin-Peroxidase-Konjugats (oder auch Streptavidin), welches aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an den Sekundärantikörper bindet. Durch Zugabe der Substrat-Chromogenlösung 3,3`Diaminobenzidin (DAB) kommt es zu einer chemischen Reaktion, bei der ein braunes Produkt entsteht. Zur Vermeidung einer unspezifischen Braunfärbung müssen die Präparate vor

der Durchführung der DAB-Methode zur Blockade der endogenen Peroxidase mit H_2O_2 vorbehandelt werden.

APAAP-Methode

Bei der APAAP (Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase)-Methode wird ein Enzym-Anti-Enzym-Immunkomplex eingesetzt. Dieser setzt sich aus dem Enzym alkalische Phosphatase und dem dagegen gerichteten Antikörper zusammen.

Die Durchführung der Methode besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt bindet ein unkonjugierter Antikörper an das entsprechende Epitop. Im zweiten Schritt wird ein unkonjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt. Dieser bindet mit einem Fab-Arm an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Im dritten Schritt wird der lösliche Enzym-Immunkomplex dazugegeben. Der im Komplex enthaltene Antikörper bindet an den zweiten Fab-Arm des Sekundärantikörpers. Durch die enzymatische Umsetzung der zugegebenen Substrat-Chromogenlösung wird das nachzuweisende Antigen sichtbar gemacht. Dabei setzt die alkalische Phosphatase das Substrat, hier Naphtholphosphatester, zu Phenolkomponenten und Phosphat um. Die Phenole reagieren dann mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) zu unlöslichen Azofarbstoffen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Chromogen *Fast Blue* verwendet, das ein intensiv blaues Farbprodukt bildet.

3.3.3 Prinzip der Doppelfärbung

Eine Doppelfärbung war in der vorliegenden Arbeit erforderlich, um die Dichte von Zellen (Oligodendrozyten, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen) in kortikalen Läsionen und die Dichte von Oligodendrozyten im normal erscheinenden Kortex bestimmen zu können.

Hierzu erfolgte zunächst die Färbung mit Hilfe eines für die jeweiligen Zellen (reife Oligodendrozyten, T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen) spezifischen Antikörpers nach der DAB-Methode. Im Anschluss wurde nach dem Prinzip der APAAP-Methode die Färbung gegen das MBP durchgeführt, um unter dem Mikroskop Läsionen und myelinisierten Kortex voneinander unterscheiden zu können. Neben dieser Differenzierung diente die Färbung

mit dem Antikörper gegen MBP auch der Detektion von Makrophagen, die durch Inkorporation von MBP-positiven Myelinabbauprodukten gekennzeichnet waren.

Die angewandten Färbemethoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Antikörperkombinationen für die Doppelfärbungen

Antikörperkombinationen (und durch die Antikörper detektierte Strukturen sowie Zellen)
MBP (Myelin) und NogoA (reife Oligodendrozyten)
MBP (Myelin) und p25 (reife Oligodendrozyten)
MBP (Myelin) und CD3 (T-Lymphozyten)
MBP (Myelin) und CD20 (B-Lymphozyten)
MBP (Myelin) und IgG (Plasmazellen)

3.4 Durchführung der Doppelfärbung

Vorbehandlung der Schnitte

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden die Präparate viermal 10 Minuten in Xylol inkubiert. Nach dreiminütiger Inkubation in Isoxylol erfolgte eine absteigende Ethanolreihe, beginnend mit zweimal drei Minuten 100% Isopropanol, gefolgt von je drei Minuten in 90%-, 70%- und 50%igem Isopropanol. Am Ende wurde mit Aqua dest. gespült.

3.4.1 DAB-Methode

Antigendemaskierung und Blockierung der endogenen Peroxidase

Nach der Entparaffinierung in einer absteigenden Ethanolreihe wurden alle, bis auf die für die CD20-Färbung vorgesehenen Präparate, zunächst mit Zitratpuffer von pH 6 bei 800 Watt in der Mikrowelle vorbehandelt. Beginnend mit Zitratpuffer wurden die Präparate in einer Küvette abwechselnd mit Aqua dest. fünfmal für je drei Minuten in die Mikrowelle gestellt, anschließend dreimal mit Aqua dest. gespült und danach in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gestellt. Dieser Prozess diente der Antigendemaskierung und

führte somit zu einer besseren Detektierbarkeit der gewünschten Antigene. Zur Vermeidung einer unspezifischen Braunfärbung während des Färbvorgangs erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase. Hierzu wurden die Präparate bei 4°C für 20 Minuten in 50 ml PBS-Puffer mit 3%igem H₂O₂-Anteil inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gespült.

Antikörper-Inkubation

Zur Blockade von unspezifischen Bindungen zwischen Proteinen wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer für 20 Minuten in 100 µl 10%iger FKS/PBS-Lösung (Fetales Kälberserum/PBS) inkubiert.

Nach Dekantieren der FKS/PBS-Lösung wurden 100 µl des jeweiligen Primärantikörpers (siehe Tabelle 2) auf den vorbehandelten Objektträger gegeben und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Tabelle 2: Verdünnung und Spezifikation der verwendeten Primärantikörper

Primär-antikörper	Detektion von	Klonalität	Verdünnung	Spezifikation	Hersteller/Quelle
Anti-CD3	T-Zellen	Mono-klonal	1:50	Ratte-anti-human	AbD Serotec, Düsseldorf
Anti-CD20	B-Zellen	Mono-klonal	1:100	Maus-anti-human	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
IgG	Plasmazellen	Polyklonal	1:250	Kaninchen-anti-human	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Anti-NogoA (11C7)	Oligodendrozyten	Mono-klonal	1:15000	Maus-anti-human	Von Prof. Dr. M.E. Schwab, Zürich, Schweiz, bereitgestellt
Anti-p25	Oligodendrozyten	Polyklonal	1:500	Kaninchen-anti-human	Von Prof. P. H. Jensen, Aarhus, Dänemark, bereitgestellt
Anti-MBP	Myelin	Polyklonal	1:500	Kaninchen-anti-human	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

Am nachfolgenden Tag erfolgte nach dreimaligem Spülen mit PBS bei Raumtemperatur die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden in 10%igem FKS verdünnten, sekundären, biotinylierten Antikörper (Schaf-anti-Maus, Kaninchen-anti-Ratte) (siehe Tabelle 3). Darauf folgte das dreimalige Spülen mit PBS-Puffer.

Tabelle 3: Sekundärantikörper (Firma Dako Deutschland GmbH, Hamburg)

Spezifikation	Klonalität	Verdünnung	Inkubation
Biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte	Polyklonal	1:100	60 Minuten
Biotinylierter Schaf-anti-Maus	Monoklonal	1:200	60 Minuten
Ziege-anti-Kaninchen	Polyklonal	1:500	60 Minuten

Zugabe des konjugierten Avidin-Peroxidasekomplexes

In diesem Schritt wurden auf die mit Antikörper behandelten Schnitte 100 µl Peroxidase-markierte Streptavidin/FKS-Lösung (POX) im Verhältnis 1:1000 pipettiert. Darauf folgt eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einem dreimaligen Spülvorgang mit PBS.

Entwicklung der Schnitte

Die Entwicklung der Schnitte erfolgte in einer DAB-Lösung. Zur Herstellung der Lösung wurden 1 ml DAB und 49 ml PBS gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 20 µl 30%igem H₂O₂. Die nun entstandene Lösung wurde in die Küvette mit den Präparaten gefüllt. Um ein optimales Färbeergebnis zu erhalten, wurden die Schnitte zwischendurch mikroskopiert. Nach Beendigung des Entwicklungsvorgangs wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült und in Aqua dest. gestellt.

3.4.2 APAAP-Methode

Zur Durchführung der Doppelfärbung wurden die Schnitte im Anschluss an die DAB-Methode mit dem Primärantikörper gegen MBP inkubiert. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers wurden die Schnitte mit Hilfe der APAAP-Methode entwickelt und mit „*Fast Blue*“ gefärbt.

Auf die Objektträger wurden hierzu 100 µl des polyklonalen MBP-Antikörpers der Firma Dako Deutschland GmbH, Hamburg (in 10%igem FKS auf 1:500 verdünnt) aufgetragen. Die Präparate wurden mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sie mit TBS (Trisgepufferte Salzlösung pH 7,5) gespült und es erfolgte die Inkubation wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben, wobei als Sekundärantikörper der in Tabelle 3 angegebene Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet wurde.

Nach Ablauf der Inkubationszeit für den APAAP-Komplex erfolgte die Entwicklung mit Hilfe von *Fast Blue*. Die Entwicklungslösung (49 ml TRIS pH 8,2; 1 ml Naphthol-AS-Mix, 50 µl Levamisollösung, 25 mg *Fast-Blue*-Salz) wurde für 90-120 Minuten auf die Präparate gegeben.

Gegenfärben und Bläuen

Nach der Entwicklung wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült und für 20 Sekunden in Mayers Hämalaun gegeben. Hierdurch konnte eine verbesserte Darstellung des Kern-Zytoplasma-Kontrastes erreicht werden. Anschließend wurden die Präparate erneut mit Aqua dest. gespült und kurz in Salzsäure-Alkohol-Lösung gegeben. Das Bläuen erfolgte nach kurzem Spülen unter fließendem, kaltem Wasser für 5 Minuten in einem Leitungswasserbad.

Dehydrierung und Eindecken der Schnitte

Die Dehydrierung erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 100%). Im Anschluss wurden sie in Xylol getaucht und eingedeckt.

3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Quantifizierung der Anzahl von Oligodendrozyten wurde diese in tiefen kortikalen Läsionen und vergleichend im normal erscheinenden Kortex untersucht. Kortikale Läsionen waren durch das komplette Fehlen von MBP gekennzeichnet, während normal erscheinender Kortex einen regelrechten MBP-Gehalt aufwies. Insgesamt wurden 22 Läsionen in neun Versuchstieren (jeweils ein Schnittpräparat pro Tier) ausgesucht, nachdem zuvor 46 Großhirnschnitte von 24 Tieren durchgesehen worden waren.

Die ausgewählten Schnitte wiesen in den tiefen kortikalen Schichten sowohl eine Läsionsfläche als auch eine Fläche von normal erscheinendem Kortex von jeweils mindestens $0,625 \text{ mm}^2$ auf (entsprechend 10 Gesichtsfeldern in der 400x Vergrößerung).

Die Auszählung der für NogoA- und p25-positiven Oligodendrozyten erfolgte sowohl innerhalb kortikaler Läsionen als auch im normal erscheinenden Kortex. Als NogoA-positive Zellen wurden dabei alle Zellen gezählt, die eine ring- oder halbringförmige bräunliche Färbung durch diesen Antikörper aufwiesen. Wie bereits erwähnt wurden die Begrenzungen der kortikalen Läsionen durch die Doppelfärbung mit dem Antikörper gegen MBP sichtbar gemacht.

In acht von insgesamt neun Präparaten konnte die Mindestanzahl an Gesichtsfeldern erreicht werden. Da jedoch beim Anfertigen jedes Präparates eine neue Schnittebene entsteht und die Läsionsareale auch kleiner werden können, konnte bei einem Fall (Fall 6, s. Tabelle 8) nur noch eine Gesamtfläche von mindestens $0,375 \text{ mm}^2$ ausgezählt werden. Dieser Fall wurde auch mit in die Statistik aufgenommen. Mit dem Antikörper gegen NogoA wurde durchschnittlich pro Fall eine kortikale Läsionsfläche von $1,779 \text{ mm}^2$ und Fläche von normal erscheinendem Kortex von $1,51 \text{ mm}^2$ ausgewertet.

Die Färbung mit dem Antikörper gegen p25 konnte auf dem Gewebe des Falls 4, s. Tabelle 4 nicht etabliert werden, so dass in der Färbung mit dem Antikörper gegen p25 insgesamt nur acht von neun Fällen untersucht werden konnten. Im Durchschnitt wurde mit dem Antikörper gegen p25 eine

Läsionsfläche von 1,22 mm² und normal erscheinender Kortex mit einer Fläche von 1,78 mm² ausgewertet.

Tabelle 4: Übersicht der Schnittpräparate, an denen in der Färbung gegen den Antikörper p25 und NogoA die Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen und im normal erscheinenden Kortex ausgezählt wurden.

Fall	Geschlecht/Alter	p25	NogoA
1	M, 37 Monate	X	X
2	M, 38 Monate	X	X
3	W, 49 Monate	X	X
4	W, 49 Monate	-	X
5	M, 33 Monate	X	X
6	W, 48 Monate	X	X
7	W, 59 Monate	X	X
8	M, 29 Monate	X	X
9	M, 38 Monate	X	X

X: Fälle, in denen in der angewandten Färbung die Auszählung von Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen und im normal erscheinenden Kortex möglich war.

-: Fälle, in denen die Färbemethode nicht etabliert werden konnte.

Neben der Anzahl der Oligodendrozyten wurde auch eine Analyse des entzündlichen Infiltrats in tiefen, kortikalen Läsionen vorgenommen. Hierfür wurden nur entzündliche Zellen, die sich im Hirngewebe, also nicht innerhalb von Gefäßen befanden, gezählt. Als perivaskuläres Infiltrat wurden alle antikörperpositiven Entzündungszellen definiert, die sich mit einem maximalen Abstand von bis zu drei Zellreihen unmittelbar um das Gefäß befanden. Diese Zellen wurden nicht gezählt.

Bei den analysierten entzündlichen Zellen handelte es sich um MBP-positve Makrophagen, CD3-positve T-Zellen, CD20-positve B-Zellen und IgG-positve Plasmazellen.

Die Makrophagen sind durch die Inkorporation MBP-positiver Myelinabbauprodukte und eine schaumzellartige Struktur gekennzeichnet. Eine Anfärbung des Zellkerns oder anderer Zellorganellen fand durch die hier angewandte Färbung nicht statt. Makrophagen sind vor allem an den

Rändern von Läsionen zu finden.

CD3-positive T-Zellen und CD20-positive B-Zellen besitzen einen schmalen Zytoplasmasaum. In dem gefärbten Präparat wurden solche Zellen gezählt, die sich durch einen schmalen, ringförmig gefärbten Zytoplasmasaum auszeichneten.

Als für IgG-positive Plasmazellen wurden große, dunkel gefärbte Zellen mit einem exzentrisch gelegenen Zellkern gezählt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Mikroskop des Typs *BX-51* der Firma Olympus Deutschland GmbH, Hamburg.

Sämtliche Auszählungen erfolgten in 400facher Vergrößerung mit Hilfe eines 10x10 Felder (ein Gesichtsfeld) großen Gitterokulars der Firma Olympus Deutschland GmbH, Hamburg. Zur Bestimmung der Zelldichte pro Quadratmillimeter wurde die Summe aller pro Läsion bzw. normal erscheinender weißen Substanz gezählten Zellen durch die Anzahl der Gesichtsfelder dividiert und anschließend mit 16 multipliziert.

3.6 Datenauswertung und Statistik

Die Fotodokumentation geeigneter Präparate erfolgte durch eine 3,3-Megapixel-CCD-Kamera vom Typ *Color View II*, die an das Mikroskop angeschlossen wurde. Bei der Dokumentation wurde außerdem die zugehörige *Software analySIS®* (*Soft Imaging System GmbH, Münster*) verwendet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS (SPSS 12, Chicago IL). Der statistische Zusammenhang zwischen der Oligodendrozytenzahl in tiefen, kortikalen Läsionen und im normal erscheinenden Kortex wurde mit einem gepaarten T-Test überprüft. Mit Spearman-Korrelationskoeffizienten wurde analysiert, ob die Dichte an entzündlichen Zellen die Dichte der Oligodendrozyten beeinflusst und ob die Dichte an T-Zellen mit der Dichte anderer Entzündungszellen korreliert. Da die Erkrankungsdauer und das Alter der Versuchstiere jeweils normalverteilte Werte darstellten, wurde eine Assoziation dieser beiden Parameter mittels Pearson-Korrelation untersucht. Die statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert $< 0,05$ definiert.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit *GraphPad Prism 4* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*).

3.7 Verwendete Reagenzien

Immunhistochemische Färbungen

Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)- Puffer:

9,55 g PBS gelöst in 100 ml Aqua bidest.

Fetales Kälberserum (FKS):

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde FKS für eine Stunde in einem 60°C warmen Wasserbad erhitzt.

FKS/PBS-Lösung:

FKS und PBS wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zitrat-Puffer:

2,1 g Zitronensäure-Monohydrat wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Durch Titration mit Natronlauge wurde der pH-Wert auf 6 eingestellt.

H₂O₂-Lösung:

Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden 5 ml 30%iges H₂O₂ in 45 ml PBS gelöst.

Avidin-Peroxidase-Konjugat (POX)-Lösung:

Die Lösung wurde mit 10%igem FKS/PBS in einem Verhältnis von POX:FKS/PBS=1:1000 angesetzt.

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung:

25 mg DAB wurden in 50 ml PBS-Puffer gelöst. Nach 15 minütigem Rühren mit dem Magnetrührer wurden 20 µl 30%iges H₂O₂ hinzugefügt.

AP-Substrat (1 l):

Lösung A: 0,1 M Tris (12,114 g Tris in 900 ml Aqua bidest.; mit 60 ml 1 M HCl auf pH= 8,2 einstellen; Mit Aqua bidest. auf 980 ml auffüllen.

Lösung B: 200 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat in 20 ml N,N-Dimethylformamid lösen.

Lösung C: 1 ml 1 M Levamisol (0,2408 g Levamisol in 1 ml Aqua bidest.)

Fast-Blue-Entwicklungslösung:

25 mg Fast-Blue-Salz in AP-Substrat (49 ml Lösung A + 1 ml Lösung B + 50 µl Lösung C) mischen, filtrieren und sofort verwenden.

Tabelle 5: Bezugsquellen der Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Levamisol	MP Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich
Fast Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Naphthol-AS-MX-Phosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure	
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 6: Bezugsquellen der Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunftsspezies	Artikelnummer	Hersteller
CD3	Ratte	MCA 1477	AbD Serotec, Düsseldorf
CD20	Maus	M 0755	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
IgG	Kaninchen	A0423	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
MBP	Kaninchen	062301	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
NogoA (11C7)	Maus		Von Prof. Dr. M.E. Schwab, Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt.
P25	Kaninchen		Von Prof. P. H. Jensen, Aarhus, Dänemark, zur Verfügung gestellt

Tabelle 7: Bezugsquellen von Geräten und Einwegmaterialien

Artikel	Hersteller
CCD Kamera	Color View II, Soft imaging System®
Deckgläser	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
Filter	Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel
Glaswaren	Glaswerk Wertheim, Wertheim a. Main
Aquamount	Lerner Laboratories, Pittsburgh
Licht-Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom	Leica
Mikrowelle	Samsung
Objektträger	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Glasküvetten	Eppendorf AG, Hamburg
Wärmeschrank	Memmert

4 Ergebnisse

4.1 Ausgewertete Tiere und Morphologie der Läsionen

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Oligodendrozyten in frühen kortikalen Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex in Marmosetten mit EAE. Hierzu sollte die Oligodendrozytendichte in den tiefen Schichten des demyelinisierten Kortex mit der des umgebenden normal erscheinenden Kortex verglichen werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Oligodendrozytendichte in diesen kortikalen Läsionen durch die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats beeinflusst wird. Außerdem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Versuchstiere und der Erkrankungsdauer sowie zwischen der Erkrankungsdauer der Versuchstiere und der Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats besteht.

Die Detektion der demyelinisierten Areale erfolgte in den neun Versuchstieren (5 männliche und 4 weibliche Marmosetten) mit einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen das basische Myelinprotein (MBP). Bei den Läsionen in den tiefen kortikalen Schichten handelte es sich vorwiegend um leukokortikale (s. Abbildungen 1 und 3), aber auch intrakortikale Läsionen. Auf den MBP-gefärbten Schnittpräparaten zeigten sich jeweils demyelinisierte und myelinisierte Areale. Insgesamt konnten auf diesen Schnittpräparaten 22 kortikale Läsionen identifiziert werden, die ebenso wie der normal erscheinende Kortex hinsichtlich der Oligodendrozytendichte ausgewertet wurden (s. Tabelle 8). Die Auszählungen erfolgten bei 6 von 9 Tieren im frontalen Kortex (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Auflistung der untersuchten Areale, Erkrankungsdauer und Läsionen der neun Versuchstiere, die jeweils sowohl demyelinisierten als auch normal erscheinenden Kortex in den tiefen kortikalen Schichten in der analysierten Region aufwiesen.

Fall	Geschlecht (M/W) und Alter in Monaten (M)	Untersuchte kortikale Region	Erkrankungsdauer in Tagen	Anzahl der ausgewerteten kortikalen Läsionen
1	M, 37 M	frontotemporal [#]	43	1
2	M, 38 M	frontotemporal [#]	31	5
3	W, 49 M	frontotemporal [#]	42	1
4*	W, 49 M	temporal	47	1
5	M, 33 M	frontal	27	2
6	W, 48 M	parietal	47	1
7	W, 59 M	okzipital	42	5
8	M, 29 M	frontal	31	4
9	M, 39 M	temporal	26	2
				22

*Fall 4 wurde von der Bestimmung der p25-positiven Oligodendrozyten ausgenommen, da die Färbung mit dem Antikörper p25 nicht auf dem Gewebe dieses Falls etabliert werden konnte.

[#]Die ausgezählten Areale lagen auch in den frontotemporalen Schnittpräparaten jeweils im frontalen Kortex.

Die untersuchten Läsionen zeichneten sich durch scharfe Ränder zum normal erscheinenden Kortex aus (Abbildung 1). Die kleineren Läsionen wiesen häufig eine perivaskuläre Lage auf, wie sie für intrakortikale Läsionen typisch ist. Im überwiegenden Teil der Läsionen waren Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Myelinabbauprodukten nachweisbar (Abbildung 1). In den meisten kortikalen Läsionen fanden sich in perivaskulären Infiltraten und im Bereich des Läsionsrands zahlreiche schaumzellige

Makrophagen mit MBP-positiven Abbauprodukten. Es konnten jedoch auch einige diffus in der Läsion verteilte Makrophagen mit MBP-positiven Abbauprodukten nachgewiesen werden. Hingegen ließen sich in einigen demyelinisierten kortikalen Läsionen auch keine Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Abbauprodukten mehr nachweisen.

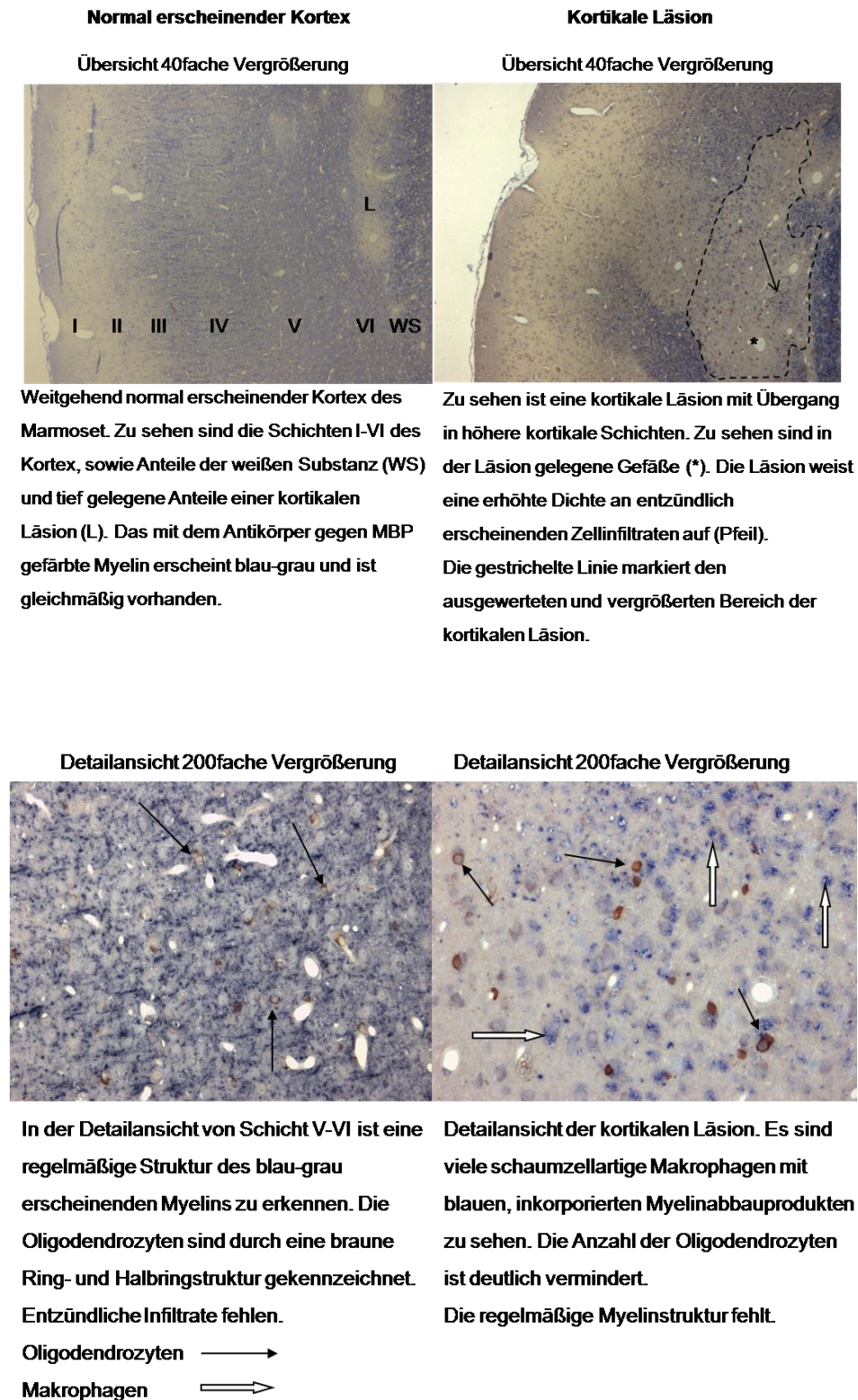
4.2 Reduktion von Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex

Um zu untersuchen, inwieweit die Oligodendrozyten in demyelinisierten kortikalen Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex reduziert sind, wurde die Anzahl der Oligodendrozyten in myelinisierten und demyelinisierten tieferen kortikalen Schichten mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Oligodendrozyten (anti-NogoA und anti-p25) quantifiziert.

4.2.1 Reduktion der p25-positiven Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen

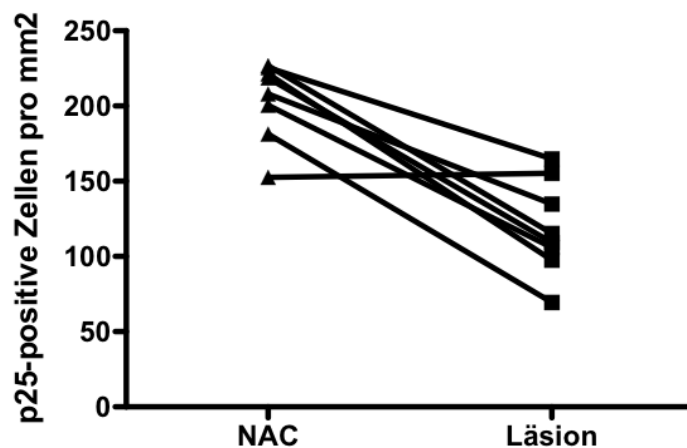
Als nächstes erfolgte die Auszählung p25-positiver Zellen. Auch diese wurde jeweils in den demyelinisierten und normal erscheinenden, myelinisierten, tiefen, kortikalen Schichten der neun Schnittpräparate durchgeführt, die von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren stammten. Um demyelinisierte und myelinisierte Areale zu unterscheiden, wurden doppeltgefärbte Schnittpräparate verwendet, die sowohl für Myelin (MBP) als auch Oligodendrozyten (p25) markiert wurden. Der Fall 4 konnte nicht ausgewertet werden, da die Färbung mit p25 auf diesem Fall nicht etabliert werden konnte. In allen demyelinisierten Arealen waren bei der Auswertung weiterhin p25- positive Zellen zu erkennen. Die Dichte an p25-positiven Zellen innerhalb der Läsionen erschien im Vergleich zum normal myelinisierten Kortex jedoch reduziert (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Immunhistochemische Färbung p25-positiver Oligodendrozyten im normal erscheinenden Kortex und in intrakortikalen Läsionen. Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen p25-positive Oligodendrozyten (braun) und MBP (blau) zum Nachweis von kortikalen Läsionen und normal erscheinendem markierten Kortex.



Im normal erscheinenden Kortex dieser Präparate konnten im Durchschnitt pro mm^2 204 ± 26 p25-positive Zellen nachgewiesen werden. In den vorhandenen Läsionen derselben Präparate ließen sich 119 ± 31 Zellen pro mm^2 erkennen und damit zeigte sich eine Reduktion der p25-positiven Zellen von 42%. Mit einem p-Wert von $< 0,001$ zeigte diese Untersuchung eine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Reduktion p25-positiver Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen



Die Dichte der p25-positiven Zellen ist in kortikalen Läsionen (119 ± 31 Zellen pro mm^2) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex (204 ± 26 Zellen pro mm^2) signifikant reduziert ($p < 0,001$).

4.2.2 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen

Zunächst erfolgte die Auszählung der NogoA-positiven Zellen. Diese wurde jeweils in den demyelinisierten und normal erscheinenden, myelinisierten, tiefen, kortikalen Schichten der neun Schnittpräparate durchgeführt, die von jeweils unterschiedlichen Versuchstieren stammten. Um demyelinisierte und myelinisierte Areale zu unterscheiden, wurden doppeltgefärbte Schnittpräparate verwendet, die sowohl für Myelin (MBP) als auch Oligodendrozyten (NogoA) markiert wurden.

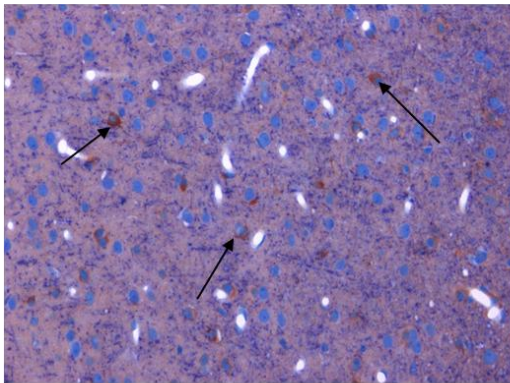
Bei der Auswertung der Schnittpräparate waren in allen demyelinisierten Arealen weiterhin NogoA-positive Zellen zu erkennen, wobei die Dichte an NogoA-positiven Zellen in den Läsionen im Vergleich zum myelinisierten Kortex vermindert erschien (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung NogoA-positiver Oligodendrozyten im normal erscheinenden Kortex und in intrakortikalen Läsionen. Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen NogoA-positive Oligodendrozyten (braun) und MBP (blau) zum Nachweis von kortikalen Läsionen und normal erscheinendem bemerkten Kortex.

Normal erscheinender

Kortex

Detailansicht 200fache Vergrößerung



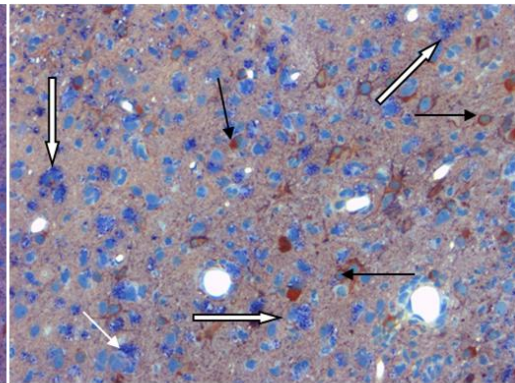
In der Detailansicht von Schicht V-VI ist eine regelmäßige, blaue Myelinstruktur zu erkennen. Oligodendrozyten sind durch braune Ring- und Halbringstrukturen gekennzeichnet und zahlreich vorhanden. Entzündliche Infiltrate fehlen.

Oligodendrozyten —————>

Makrophagen —————>

Kortikale Läsion

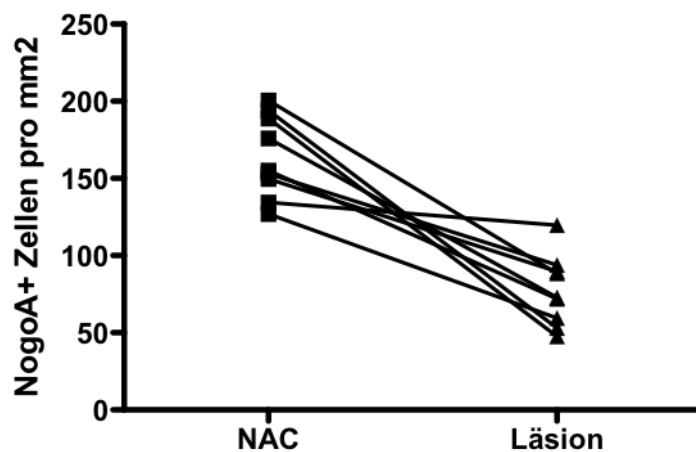
Detailansicht 200fache Vergrößerung



Detailansicht der kortikalen Läsion. Zu sehen sind schaumzellartige Makrophagen mit blauen, inkorporierten Myelinabbauprodukten, sowie eine deutlich verminderte Anzahl an braunen Oligodendrozyten. Die regelmäßige, blaue Myelinstruktur fehlt.

Im normal erscheinenden Kortex zeigten sich 164 ± 27 NogoA-positive Zellen pro mm^2 . In kortikalen Läsionen lag diese Dichte bei 77 ± 23 Zellen pro mm^2 . Somit ergab sich hier eine quantitative Reduktion der Oligodendrozytendichte von 53% im demyelinisierten Kortex. Mit einem p-Wert von $< 0,001$ zeigte diese Untersuchung eine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Reduktion NogoA-positiver Zellen in kortikalen Läsionen



Die Dichte der NogoA-positiven Zellen ist in kortikalen Läsionen (77 ± 23 Zellen pro mm^2) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex (164 ± 27 Zellen pro mm^2) signifikant reduziert ($p < 0,001$).

4.3 Erhöhter Quotient von p25-positiven zu NogoA-positiven Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen im Vergleich zum myelinisierten Kortex

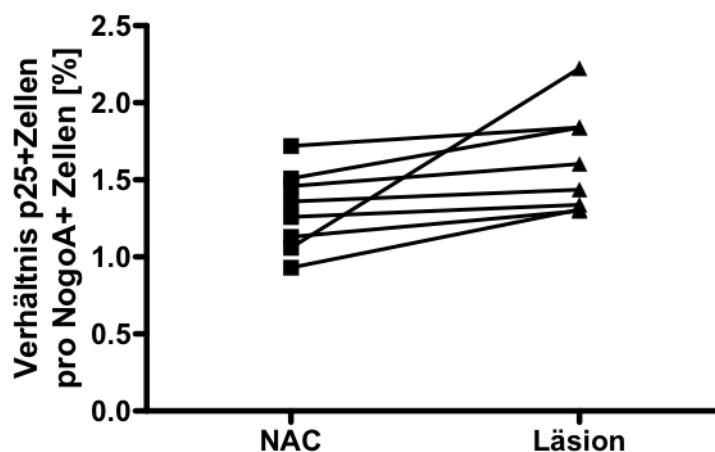
Um zu überprüfen, ob das Verhältnis von NogoA-positiven zu p25-positiven Oligodendrozyten in Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex verändert ist, wurden die Auszählungen dieser Zellen miteinander verglichen und ein Quotient von NogoA- zu p25-positiven Zellen gebildet.

Sowohl im demyelinisierten als auch im normal erscheinenden Kortex

erschien die Dichte an p25-positiven Zellen größer als die NogoA-positiver Zellen.

Beim Vergleich des Quotienten zeigte sich ein signifikant erhöhter Quotient von p25- zu NogoA-positiven Zellen in der Läsion ($1,54 \pm 1,4$) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex ($1,24 \pm 0,97$; $p < 0,05$) (siehe Abbildung 5). Das heißt, in den Läsionen lagen noch mehr p25-positive Zellen im Verhältnis zu NogoA-positiven Zellen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex vor.

Abbildung 5: Erhöhter Anteil p25-positiver Zellen pro NogoA-positiver Zellen in kortikalen Läsionen



Es zeigte sich ein signifikant erhöhter ($p < 0,05$) Quotient von p25- zu NogoA-positiven Zellen in der Läsion ($1,54 \pm 1,4$) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex ($1,24 \pm 0,97$).

4.4 Keine Assoziation zwischen Entzündungszellen und Oligodendrozytendichte in kortikalen Läsionen

Um zu untersuchen, ob die Oligodendrozytendichte in kortikalen Läsionen vom entzündlichen Infiltrat beeinflusst wird, wurde die Dichte von Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Abbauprodukten, CD3-positiven T-Zellen, CD20-positiven B-Zellen und IgG-positiven Plasmazellen bestimmt.

In allen Läsionen ließen sich Makrophagen mit inkorporierten, MBP-positiven Myelinabbauprodukten nachweisen (siehe Abbildungen 1 und 3), somit handelte es sich bei diesen Herden im weitesten Sinne um aktive Läsionen. Allerdings variierte die Dichte der Makrophagen mit inkorporierten Myelinabbauprodukten deutlich in den Läsionen der verschiedenen Tiere (d.h. 9 Zellen bis 283 Zellen pro mm^2). Es konnte weder ein statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Makrophagen und der von NogoA-positiven Zellen innerhalb kortikaler Läsionen ($r = -0,183$; $p = 0,637$), noch ein Zusammenhang der Makrophagendichte mit der Dichte p25-positiver Zellen innerhalb kortikaler Läsionen ($r = 0,048$; $p = 0,911$) nachgewiesen werden.

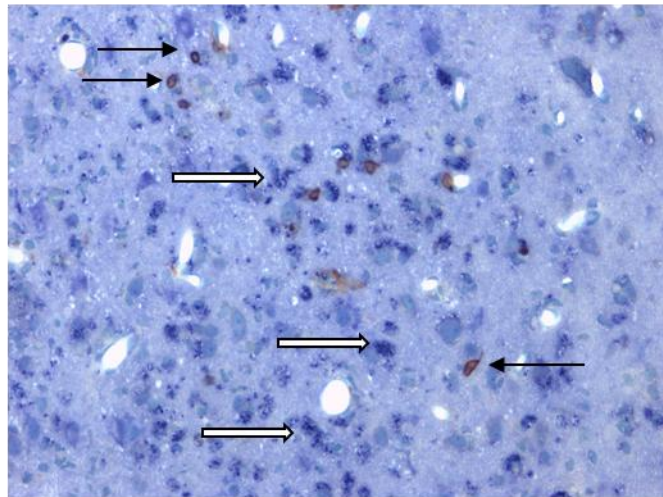
Allerdings korrelierte die Dichte an T-Zellen sehr gut mit der Dichte der Makrophagen ($r = 0,75$; $p = 0,02$). Für die B-Zellen ($r = 0,494$; $p = 0,177$) und die Plasmazellen ($r = 0,475$; $p = 0,197$) ergab sich keine Korrelation zu dem Makrophageninfiltrat.

CD3- und CD20-positive Zellen befanden sich vorwiegend als perivaskuläres Infiltrat in geringer Zahl innerhalb kortikaler Läsionen (siehe Abbildungen 6 und 7). CD3-positive Zellen waren dabei etwas häufiger nachweisbar als CD20-positive Zellen. In Läsionsanteilen fanden sich nur vereinzelt CD20-positive Zellen. Entsprechend der nur sehr geringen Anzahl der CD20-positiven Zellen innerhalb kortikaler Läsionen, waren IgG-positive Plasmazellen in den meisten Läsionen nicht nachweisbar. Waren Plasmazellen vorhanden, so handelte es sich meist um vereinzelte perivaskuläre Plasmazellen. Innerhalb des Parenchyms traten nur sehr vereinzelt Plasmazellen auf.

Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung CD3-positiver T-Zellen innerhalb einer kortikalen Läsion.

Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen CD3-positive T-Zellen (braun) und MBP (blau) zum Nachweis CD3-positiver Zellen in der kortikalen Läsion.

**Kortikale Läsion
in 200facher Vergrößerung**

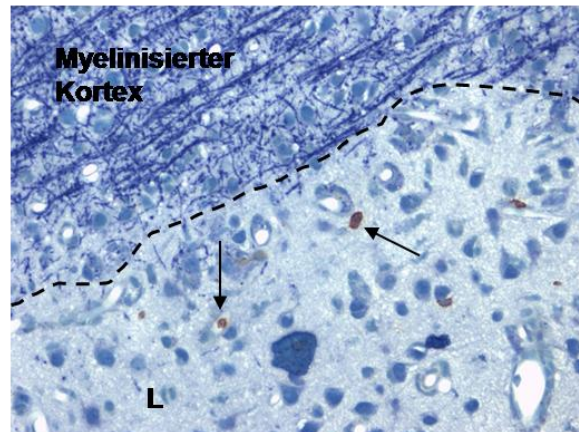


In der Detailansicht kortikaler Läsionen finden sich regelmäßig intraparenchymal gelegene Gruppierungen CD3-positiver T-Lymphozyten. Diese sind als braun gefärbte Ringstrukturen zu erkennen. Zusätzlich besteht ein dichtes Infiltrat von schaumzelligen Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Myelinabbauprodukten.

CD3-positive Lymphozyten —————▶
Makrophagen =————▶

Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung CD20-positiver B-Zellen im normal erscheinenden Kortex und innerhalb einer kortikalen Läsion. Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen CD20-positive B-Zellen (braun) und MBP (blau) zum Nachweis von B-Zellen in der kortikalen Läsionen sowie Detektion des normal erscheinenden Kortex.

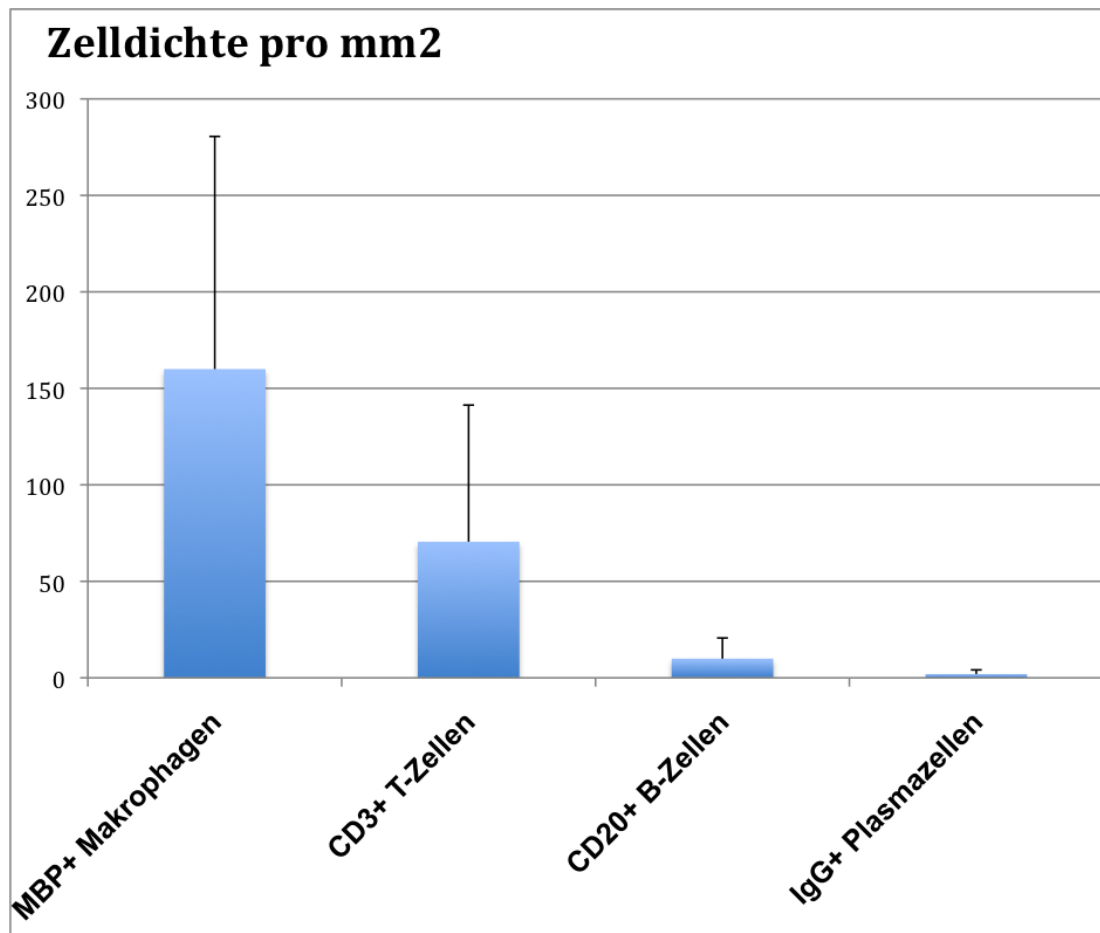
**Kortikale Läsion
in 200facher Vergrößerung**



Der markierte Bereich zeigt eine zum myelinisierten Kortex abgegrenzte, kortikale, myelinfreie Läsion (L), in der vereinzelt CD20-positive B-Lymphozyten (Pfeil) sichtbar sind. Diese sind durch eine goldbraune Ringstruktur charakterisiert.

Die quantitativen Daten zeigen, dass es sich beim überwiegenden Teil der Entzündungszellen um MBP-positive Makrophagen (160 ± 121 pro mm^2) gefolgt von T-Zellen (71 ± 71 pro mm^2), B-Zellen (10 ± 11 pro mm^2) und Plasmazellen (2 ± 2 pro mm^2) handelt (s. Abbildung 8).

Abbildung 8: Durchschnittliche Dichte der untersuchten Entzündungszellen innerhalb der kortikalen Läsionen



Die Dichte der T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen zeigte keine Korrelation mit der Dichte der p25- bzw. NogoA-positiven Oligodendrozyten (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Spearman-Korrelationswerte der Oligodendrozytendichte mit der Dichte der untersuchten Entzündungszellen

	NogoA-positive Oligodendrozyten	P25-positive Oligodendrozyten
Makrophagen	r = -0,183 p = 0,637	r = 0,048 p = 0,911
T-Zellen	r = 0,033 p = 0,932	r = 0,214 p = 0,610
B-Zellen	r = -0,092 p = 0,814	r = -0,286 p = 0,493
Plasmazellen	r = -0,576 p = 0,104	r = -0,252 p = 0,548

Die Tabelle gibt die Spearman-Korrelationswerte wieder.

Allerdings korrelierte eine höhere T-Zell-Dichte signifikant mit einer höheren Dichte sämtlicher untersuchter Entzündungszellen wie mit MBP-positiven Makrophagen ($r = 0,75$; $p = 0,02$), B-Zellen ($r = 0,711$; $p = 0,032$) und Plasmazellen ($r = 0,695$; $p = 0,038$).

4.5 Keine Assoziation zwischen Erkrankungsdauer und kortikalen Entzündungszellen

Um zu überprüfen, ob das Alter der Versuchstiere einen Einfluss auf die Erkrankungsdauer hat, wurden diese Parameter einander gegenübergestellt. Die neun Versuchstiere waren zwischen 29 und 59 Monaten (Mittelwert 42,3 Monate) alt. Mit 5 männlichen und 4 weiblichen Tieren herrschte zudem ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Die individuelle Erkrankungsdauer der Tiere umfasste einen Zeitraum von 26-47 Tagen

(Mittelwert 37,3 Tage). Das Alter der Versuchstiere korrelierte dabei positiv mit der Erkrankungsdauer ($r = 0,687$; $p < 0,05$).

Um mögliche Einflüsse der Erkrankungsdauer auf das entzündliche Infiltrat zu untersuchen, wurde überprüft, ob die Dichte des entzündlichen Infiltrats innerhalb kortikaler Läsionen von der Erkrankungsdauer der Versuchstiere abhängig ist. Dabei zeigte sich, dass die Dichte keiner der untersuchten Entzündungszellen von der Erkrankungsdauer der Versuchstiere beeinflusst wird (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Spearman-Korrelationswerte der Erkrankungsdauer der Versuchstiere mit der Dichte der untersuchten Entzündungszellen

	Makrophagen	T-Zellen	B-Zellen	Plasmazellen
Erkrankungsdauer	$r = -0,34$ $p = 0,931$	$r = -0,042$ $p = 0,914$	$r = -0,089$ $p = 0,82$	$r = -0,103$ $p = 0,792$

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dichte der Oligodendrozyten in kortikalen, demyelinisierten Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden, myelinisierten Kortex in Marmosetten mit EAE signifikant reduziert ist. Dieses Ergebnis konnte mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen Oligodendrozyten (anti-NogoA und anti-p25) bestätigt werden. Außerdem war ein erhöhter Anteil p25-positiver im Vergleich zu NogoA-positiven Zellen in kortikalen Läsionen nachweisbar. In den kortikalen, demyelinisierten Läsionen gab es keine Assoziation zwischen der Dichte der noch vorhandenen Oligodendrozyten und der Dichte der Entzündungszellen (Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen). Bei den Tieren korrelierte die Erkrankungsdauer zwar mit ihrem Alter, aber nicht mit der jeweiligen Dichte der Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen oder Plasmazellen.

5.1 Reduzierte Dichte von Oligodendrozyten in demyelinisierten kortikalen Läsionen

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Marmosetten mit EAE eine signifikante Reduktion der NogoA- und der p25-positiven Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen in den tiefen kortikalen Schichten im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex gezeigt werden. NogoA-positive Oligodendrozyten waren um 53% und p25-positive Oligodendrozyten um 42% gegenüber dem normal erscheinenden Kortex reduziert.

Es werden drei verschiedene Formen kortikaler Läsionen unterschieden. Subpiale Läsionen (Typ-III-Läsionen) sind am häufigsten und machen etwa 50 % aller kortikalen Läsionen aus. Sie erstrecken sich von der kortikalen Oberfläche typischerweise bis in die kortikalen Schichten III-IV. Sie weisen die geringste entzündliche Aktivität auf (Peterson et al. 2001). 18% aller kortikalen Läsionen sind sehr kleine intrakortikale Läsionen (Typ II Läsionen), die typischerweise perivaskulär innerhalb des Neokortex liegen (Peterson et al. 2001; Wegner et al. 2006). Bei einem Drittel der Läsionen handelt es sich

um leukokortikale Typ-I-Läsionen, die unmittelbar an subkortikale Läsionen der weißen Substanz angrenzen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswertung kortikaler Läsionen innerhalb der tiefen kortikalen Schichten, bei denen es sich entweder um Typ-I- oder Typ-II-Läsionen handelte. Subpiale Typ-III-Läsionen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht ausgewertet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Einklang mit Voruntersuchungen anderer Autoren, die ebenfalls einen Verlust von Oligodendrozyten in kortikalen Läsionen bei Marmosetten mit EAE beobachten konnten.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine 42-53%-ige Reduktion der Oligodendrozyten in demyelinisierten Läsionen. Auch Merkler et al. wiesen eine 50%ige Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten innerhalb kortikaler Läsionen in Marmosetten mit MOG-induzierter EAE nach (Merkler et al. 2006b). Deren Ergebnis ist vergleichbar mit der hier beobachteten Reduktion von 53%. Dort erfolgte die Quantifizierung der NogoA-positiven Oligodendrozyten in den Schichten III-V des Kortex, also auch in höher gelegenen kortikalen Anteilen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die Reduktion der Oligodendrozyten durch die Zusammensetzung der Entzündungszellen beeinflusst wird. In der Arbeit von Merkler et al. wurde der Fokus hingegen auf die Entwicklung der Läsionen in Abhängigkeit der Zeit gelegt.

Während in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten von 53% und p25-positiver Oligodendrozyten von 42% beobachtet wurde, zeigte sich bei in einer Arbeit von Pomeroy et al. hingegen eine geringgradigere Reduktion der Oligodendrozytenzahl um 33% innerhalb demyelinisierter, leukokortikaler Läsionen (Pomeroy et al. 2010). Auch bei Pomeroy et al. erfolgte die Auswertung der Oligodendrozytendichte in den in den tiefen kortikalen Schichten.

Drei Faktoren kommen prinzipiell für den geringeren oligodendroglialen Verlust bei Pomeroy et al. (-33%) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit (bis zu -53%) in Betracht:

Erstens wurden bei Pomeroy et al. ausschließlich leukokortikale Läsionen untersucht. Da leukokortikale und intrakortikale Läsionen teilweise fließend

ineinander übergangen, wurde in der vorliegenden Arbeit keine strikte Unterscheidung dieser beiden Läsionen vorgenommen. Folglich erfolgte die Untersuchung in der vorliegenden Arbeit an leukokortikalen und intrakortikalen Läsionen.

Zweitens könnte der in der vorliegenden Arbeit ausgeprägtere Verlust der Oligodendrozyten auf die Verwendung anderer Antikörper gegen Oligodendrozyten zurückzuführen sein. In der Studie von Pomeroy et al. wurde der Antikörper anti-CA2 verwendet, während in der hier vorliegenden Arbeit die Antikörper NogoA und p25 eingesetzt wurden.

Drittens quantifizierten Pomeroy et al. die Oligodendrozyten nach einer anderen Methode. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte eine manuelle Auszählung der Oligodendrozyten anhand festgelegter Kriterien zur Identifizierung der Zellen. Pomeroy et al. quantifizierten die Oligodendrozyten hingegen mit Hilfe einer computerassistierten, semi-automatischen Methode anhand des Farbsignals (Pomeroy et al. 2010).

Außerdem gab es zwischen den beiden Arbeiten Unterschiede bezüglich der Vergleichsstruktur des normal erscheinenden Kortex. Während bei Pomeroy et al. jede Läsion mit einem identischen Kortexareal eines nicht an EAE erkrankten Tieres verglichen wurde, erfolgte in dieser Arbeit ein Vergleich mit einem normal erscheinenden Kortexareal desselben Tieres (Pomeroy et al. 2010).

Die minimale Erkrankungsdauer der Versuchstiere war ähnlich in der Arbeit von Pomeroy et al. (26-70 Tage) und der vorliegenden Arbeit (26-47 Tage).

Die meisten bisherigen Untersuchungen zu frühen Läsionen bei der EAE wurden an Läsionen der weißen Substanz durchgeführt. Diese sind durch eine deutlich größere Menge an Oligodendrozyten und Myelin gekennzeichnet. Dementsprechend kommt es hier zu einer deutlich stärkeren Ausprägung der Entzündungsreaktion mit teils destruktiver Komponente (Bo et al. 2003a; Merkler et al. 2006a). Voruntersuchungen an Mäusen zeigten durchschnittlich 1250 NogoA-positive Zellen/mm² in der normal erscheinenden weißen Substanz. Im Vergleich dazu zeigten sich bei Mäusen mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis 293 NogoA-positive Zellen/mm² in Läsionen der weißen Substanz (Kuhlmann et al. 2007). Dies entspricht einer Reduktion der Zelldichte von 77% und zeigt

damit einen deutlich ausgeprägteren Verlust der NogoA-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu dem hier ermittelten Verlust von 53% innerhalb kortikaler Läsionen. Die deutlich stärkere Reduktion in Läsionen der weißen Substanz könnte mit der stärkeren Entzündungsreaktion und ohnehin höheren Dichte von Oligodendrozyten im Bereich der weißen Substanz begründet sein. Die Ergebnisse von Kuhlmann et al. weisen allerdings auch Parallelen zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit auf. Denn in den tiefen kortikalen Schichten kommt es wie auch in der weißen Substanz zu einer entzündlichen Reaktion, die durch Invasion von Entzündungszellen, Verlust von Oligodendrozyten und Zeichen früher Remyelinisierung gekennzeichnet ist (Merkler et al. 2006c). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die bei der EAE nachgewiesenen histologischen Merkmale verschiedener Läsionen Parallelen zu frühen Läsionen bei der MS aufweisen. So zeigten sich sowohl bei MS (Peterson et al. 2001) als auch bei der EAE in Marmosetten (Pomeroy et al. 2005) ausgeprägtere entzündliche Infiltrate in Läsionen der weißen als in der grauen Substanz sowie ein dominierender Anteil von T-Lymphozyten und Makrophagen in den entzündlichen Infiltraten.

In einer Untersuchung von Goldschmidt et al. konnte gezeigt werden, dass Läsionen von Patienten mit früher MS oft frühe Remyelinisierungsprozesse aufweisen (Prineas et al. 1993; Goldschmidt et al. 2009).

Auch in anderen Arbeiten zur MS wurde Oligodendrozyten in geringer Zahl innerhalb demyelinisierender Läsionen nachgewiesen (Raine et al. 1981; Prineas et al. 1993). Diese geringe Oligodendrozytendichte kann Hinweise darauf geben, dass bestimmte Populationen von Oligodendrozyten der immunologischen Reaktion zunächst entgehen. Diese Zellen könnten somit eine Gruppe von Oligodendrozyten darstellen, die zur Remyelinisierung von frühen Läsionen führen können. Anzeichen für eine Remyelinisierung früher MS-Läsionen im Sinne von nachweisbaren MBP-positiven Myelinstrukturen konnten bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt werden (Prineas et al. 1993; Goldschmidt et al. 2009). Mit Hilfe von Markern für Oligodendrozytenvorläuferzellen wie Olig2 oder Nkx2.2 konnten in diesen Studien auch neu eingewanderte Oligodendrozytenvorläuferzellen in frühen, humanen Läsionen dargestellt werden. Die Dichte dieser neu

eingewanderten Vorläuferzellen lässt dann Rückschlüsse auf das Regenerationspotenzial der entsprechenden Läsionen zu (Kuhlmann et al. 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte diese Zellpopulation jedoch nicht nachgewiesen werden, da der Marker Olig2 zur Markierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen auf dem vorhandenen Material nicht etabliert werden konnte. Auch ergaben sich am vorliegenden Material keine eindeutigen Hinweise auf eine Remyelinisierung.

Innerhalb chronischer MS-Läsionen nimmt mit dem Alter der Läsionen auch die Anzahl der potenziell zur Remyelinisierung führenden Oligodendrozytenvorläuferzellen ab. In späten Stadien der Erkrankung sind somit typischerweise zellarme, demyelinisierte Läsionen zu finden (Bruck et al. 2003). Die Anzahl reifer Oligodendrozyten ist hierbei stark reduziert und auch Oligodendrozytenvorläuferzellen sind kaum noch zu finden (Kuhlmann et al. 2008).

5.2 Signifikant verändertes Verhältnis von p25- zu NogoA-positiven Zellen in Läsionen

Um zu überprüfen, ob das Verhältnis von NogoA-positiven zu p25-positiven Oligodendrozyten in Läsionen im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex verändert ist, wurden die Auszählungen dieser Zellen miteinander verglichen und ein Quotient von p25- zu NogoA-positiven Zellen gebildet. Beim Vergleich des Quotienten zeigte sich ein signifikant erhöhter Quotient von p25- zu NogoA-positiven Zellen in den Läsionen ($1,54 \pm 1,4$) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex ($1,24 \pm 0,97$) ($p < 0,05$).

NogoA wird vorwiegend von reifen, myelinproduzierenden Oligodendrozyten exprimiert (Kuhlmann et al. 2007). Diese finden sich vor allem in der weißen Substanz. In der grauen Substanz sind sie ebenfalls in geringerer Menge zu finden. In einer Studie konnten außerdem zahlreiche NogoA-positive Oligodendrozyten in remyelinisierenden, frühen MS-Läsionen der weißen Substanz nachgewiesen werden. In chronischen Läsionen waren hingegen nur wenige zu finden (Kuhlmann et al. 2008). Parallel hierzu konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass es auch bei Mäusen mit MOG-

induzierter EAE im zeitlichen Verlauf zu einer deutlichen Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten kommt (Kuhlmann et al. 2007). Die Anzahl NogoA-positiver Oligodendrozyten scheint demnach mit zunehmendem Alter der Läsionen bzw. dem Fortschreiten der Erkrankung abzunehmen. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte, dass durch das Ausschalten von NogoA mit Hilfe von siRNA eine funktionelle Wiederherstellung sowie axonale Reparatursprozesse und Wachstum bei Mäusen mit MOG35-55 Peptid induzierter EAE initiiert werden können (Yang et al. 2010). Somit könnten weitere Untersuchungen zur Unterdrückung des NogoA-Proteins im ZNS einen wertvollen Beitrag zur Erforschung zentraler Reparatursprozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen leisten. In Mäusen ist NogoA neben der Expression in Oligodendrozyten auch als negativer Regulator an der Inhibition des Wachstums von Nervenfasern und der synaptischen Plastizität beteiligt (Delekate et al. 2011).

Bei p25 handelt es sich um ein Protein, das Bestandteil des zerebralen Tubulins ist. *In vitro* fördert es die Polymerisation von Tubulin und inhibiert den mitotischen Spindelapparat (Lindersson et al. 2005). Es ist hauptsächlich in Oligodendrozyten lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Vorläuferzellen zu myelinisierenden oligodendroglialen Zellen (Skjoerringe et al. 2006). Außerdem wird vermutet, dass es als Bestandteil des basischen Myelinproteins durch Interaktion mit Tubulin die Myelinisierung selbst fördert.

Neben p25-positiven Oligodendrozyten wurden in dieser Arbeit auch NogoA-positiv Oligodendrozyten untersucht. Diese waren sowohl im normal erscheinenden Kortex als auch innerhalb kortikaler Läsionen in einer geringeren Menge vorhanden als p25-positive Oligodendrozyten. Bisher gibt es nur wenige Daten zur Expression von NogoA bei demyelinisierenden Tiermodellen wie der EAE (Kuhlmann et al. 2007). In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass NogoA im humanen und im ZNS von Mäusen sowie in demyelinisierten ZNS-Arealen ein sehr sensibler Marker zur Darstellung von Oligodendrozyten ist. P25 ist ein zur Differenzierung von Oligodendrozyten essentielles Protein. Es wird bereits in geringer Konzentration von Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert und sein Expressionslevel steigt mit zunehmender Ausreifung der oligodendroglialen

Zellen (Lehotzky et al. 2010). NogoA-positiv sind hingegen eher reife oder fast ausgereifte Oligodendrozyten. Somit wäre es denkbar, dass der Antikörper gegen p25 mehr reifende Oligodendrozyten als der Antikörper gegen NogoA detektiert. Dafür spräche auch die geringere Zahl NogoA-positiver Zellen im normal erscheinenden Kortex.

5.3 Kein Einfluss des zellulären Infiltrats auf die Oligodendrozytendichte

Um zu untersuchen, ob die Oligodendrozytendichte in kortikalen Läsionen vom entzündlichen Infiltrat beeinflusst wird, wurde die Dichte der Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Abbauprodukten, der CD3-positiven T-Zellen, der CD20-positiven B-Zellen und der IgG-positiven Plasmazellen bestimmt. Es konnte kein Einfluss der Dichte der Makrophagen auf die Dichte der NogoA- bzw. p25-positiven Zellen innerhalb kortikaler Läsionen nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte eine höhere T-Zell-Dichte signifikant mit einer höheren Dichte sämtlicher untersuchter infiltrierender Zellen wie mit der Dichte der MBP-positiven Makrophagen, der B-Zellen und der Plasmazellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden kortikale Läsionen bei Marmosetten mit EAE zur Untersuchung herangezogen. Der Vorteil dieses Tiermodells besteht darin, dass vor allem Läsionen in frühen Läsionsstadien untersucht werden können. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei humanem Autopsiematerial meist um chronische MS-Läsionen. Akute MS-Läsionen sind dort hingegen kaum vorhanden. In verschiedenen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Läsionen bei Marmosetten mit EAE starke Ähnlichkeiten zur MS aufweisen (Genain und Hauser 2001). Diese betreffen sowohl die Morphologie der Läsionen, als auch die Zusammensetzung des entzündlichen Zellinfiltrats (Pomeroy et al. 2005). Die EAE in Marmosetten ähnelt der MS von allen vorhandenen Tiermodellen am meisten und ist daher gut geeignet, um Hinweise für die Pathogenese früher MS-Läsionen zu liefern.

Da es sich bei der EAE um eine überwiegend T-Zell-vermittelte Erkrankung

handelt, deckt sich die Beobachtung einer positiven Korrelation der T-Zelldichte mit den übrigen Zellen des entzündlichen Infiltrats mit dem bereits bekannten Pathomechanismus dieses Tiermodells. Auch in einer anderen Untersuchung konnte bereits gezeigt werden, dass CD3-positive T-Zellen neben Makrophagen einen großen zellulären Anteil des entzündlichen Infiltrats bilden (Pomeroy et al. 2005). In einer weiteren Untersuchung zur Analyse des entzündlichen Infiltrats in Marmosetten mit EAE konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass CD3-positive T-Zellen sowie MRP-14-positive Makrophagen den größten Anteil des entzündlichen Infiltrats innerhalb der weißen Substanz und kortikaler Läsionen bilden (Merkler et al. 2006a).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei den 9 Versuchstieren durchschnittlich 71 ± 71 CD3-positive T-Zellen pro mm^2 . In der Arbeit von Merkler et al. wurden nur 3 Marmosetten mit EAE untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb kortikaler Läsionen eine sehr ähnliche T-Zelldichte von durchschnittlich 77 CD3-positiven T-Zellen pro mm^2 .

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich durchschnittlich 160 ± 121 MBP-positive Makrophagen pro mm^2 in kortikalen Läsionen. Merkler et al. sahen in den drei untersuchten Tieren eine durchschnittliche Dichte von 426 MRP-14-positiven Makrophagen pro mm^2 . MRP-14 markiert früh-aktivierte Makrophagen. Der Grund für die geringere Dichte der Makrophagen in der vorliegenden Arbeit liegt am ehesten darin, dass die hier nachgewiesenen Makrophagen mit inkorporierten MBP-positiven Abbauprodukten eine Untergruppe früh-aktivierter MRP-14-positiver Makrophagen darstellen.

Zusammenfassend ähneln die vorliegenden Ergebnisse zu den Entzündungszellen den Beobachtungen von Merkler et al., wobei beide Arbeiten überwiegend Makrophagen und T-Zellen in den entzündlichen Infiltraten nachwies. Auch bei der MS konnte in frühen aktiv-demyelinisierenden Läsionen gezeigt werden, dass bei einem Großteil der Patienten die Bildung von Läsionen in der weißen Substanz T-Zell-vermittelt stattfindet (Lucchinetti et al. 2000; Stadelmann et al. 2005). Zusammenfassend bestätigt die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Korrelation der T-Zelldichte mit anderen entzündlichen Zellen in kortikalen Läsionen bei Marmosetten mit EAE, dass es sich bei der Pathogenese

kortikaler Läsionen in den tiefen kortikalen Schichten also ebenfalls um eine T-Zell-vermittelte Reaktion handelt.

Die Dichte CD20-positiver B-Zellen und aktivierter Plasmazellen war auch in anderen Arbeiten nur gering (Merkler et al. 2006c). Diese waren, wie auch in dieser Arbeit, vorwiegend perivaskulär angeordnet. Zudem zeigte sich eine Koexpression mit IgG und dem aktivierten Komplementfaktor C9neo, wobei diese Veränderungen auf eine Rolle von Antikörpern und Komplement hinweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich sehr wenige IgG-positive Plasmazellen nachgewiesen.

Die vorliegenden Ergebnisse der charakterisierten Entzündungszellen in kortikalen Läsionen sind in Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie früher kortikaler MS-Läsionen (Lucchinetti et al. 2011). Darin konnte gezeigt werden, dass kortikale Läsionen auch bei biopsierten Patienten mit früher MS nachweisbar sind (Lucchinetti et al. 2011). In den kortikalen Läsionen dieser frühen MS-Läsionen konnten ebenfalls CD3-positive T-Zellen und Makrophagen bei 82% bzw. 66% der kortikalen Läsionen detektiert werden, CD20-positive B-Zellen fanden sich hingegen nur in 27% der kortikalen Läsionen und waren analog zu den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit auch größtenteils perivaskulär nachweisbar (Lucchinetti et al. 2011). Oligodendrozyten waren auch in der Arbeit von Lucchinetti et al. innerhalb früher kortikaler MS-Läsionen reduziert, wurden aber nicht quantitativ untersucht.

Um weitere Erkenntnisse zur Pathogenese früher, kortikaler MS-Läsionen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem untersucht, in wie weit die Dichte der Oligodendrozyten mit der Dichte des entzündlichen Infiltrats korrelierte. Hier ergab sich jedoch kein Hinweis für eine Korrelation. Auch korrelierte die Dichte der jeweiligen Entzündungszellen nicht mit der Erkrankungsdauer der Versuchstiere.

Das Alter der Versuchstiere zeigte hingegen eine positive Korrelation mit der Erkrankungsdauer ($r = 0,687$; $p < 0,05$). Dieser Effekt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Immunisierung der Versuchstiere nahezu im selben Alter vorgenommen wurde.

6 Zusammenfassung

Histopathologische Untersuchungen der MS sind meist dadurch limitiert, dass Autopsiegewebe in der Regel von Patienten im chronischen Stadium der Erkrankung stammt. Daher liegen bisher nur wenige Ergebnisse über die Oligodendrozytenpathologie in frühen kortikalen Läsionen bei Patienten mit MS vor. Die bisherigen Erkenntnisse zur Pathogenese der MS in frühen Stadien beruhen im Wesentlichen auf dem Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Im Gegensatz zur EAE bei Nagetieren ähnelt das Verteilungsmuster der EAE bei *Callithrix-jacchus*-Marmosetten dem der MS. Bei beiden Erkrankungen lassen sich kortikale Läsionen nachweisen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Oligodendrozytenpathologie in frühen, kortikalen Läsionen im EAE-Marmoset-Tiermodell. Hierzu wurde Hirngewebe von 9 Marmosetten mit EAE untersucht. Auf immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen Myelin-Basisches Protein (MBP) wurden die demyelinisierten Areale und die Anteile von normal erscheinendem Kortex für die Auswertungen identifiziert. Die Dichte der p25- bzw. NogoA-positiven Oligodendrozyten wurde in den tiefen kortikalen Schichten im demyelinisierten und normal erscheinenden Kortex bestimmt. Des Weiteren wurde die Dichte myelinphagozytierender Makrophagen, CD3-positiver T-Zellen, CD20-positiver B-Zellen und IgG-positiver Plasmazellen in den Läsionen bestimmt, um zu testen, ob diese Entzündungszellen die Dichte der Oligodendrozyten in den Läsionen beeinflussen.

Die Dichte der Oligodendrozyten war in den Läsionen in den tiefen kortikalen Schichten im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex signifikant reduziert. Die NogoA-positiven Zellen waren in den Läsionen um 53% vermindert (77 ± 23 Zellen pro mm^2) verglichen zum umgebenden myelinisierten Kortex (164 ± 27 Zellen; $p < 0,001$). Mit dem Antikörper gegen p25 zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Oligodendrozyten um 42% in den demyelinisierten tiefen kortikalen Schichten im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex (119 ± 31 Zellen pro mm^2 im Vergleich zu 204

± 26 Zellen pro mm^2 ; $p < 0,001$). Der Quotient von p25- zu NogoA-positiven Oligodendrozyten war in den Läsionen ($1,54 \pm 1,4$) im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex ($1,24 \pm 0,97$; $p < 0,05$) signifikant erhöht.

Die quantitative Auswertung der Entzündungszellen in den Läsionen ergab, dass es sich beim überwiegenden Teil der infiltrierenden Zellen um myelinphagozytierende Makrophagen (160 ± 121 pro mm^2) gefolgt von T-Zellen (71 ± 71 pro mm^2), B-Zellen (10 ± 11 pro mm^2) und Plasmazellen (2 ± 2 pro mm^2) handelte. In den Läsionen gab es keine Korrelation zwischen der Dichte der Entzündungszellen (Myelinphagozytierende Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen) und der Dichte der p25- bzw. NogoA-positiven Oligodendrozyten. Allerdings korrelierte eine höhere T-Zell-Dichte signifikant mit einer höheren Dichte sämtlicher untersuchter Entzündungszellen (Myelinphagozytierende Makrophagen: $r = 0,75$; $p = 0,02$, B-Zellen: $r = 0,711$; $p = 0,032$, Plasmazellen: $r = 0,695$; $p = 0,038$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikante Reduktion NogoA- und p25-positiver Oligodendrozyten in den demyelinisierten tiefen kortikalen Schichten im Vergleich zum normal erscheinenden Kortex. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die oligodendrogliale Dichte bereits früh in den demyelinisierten tiefen kortikalen Schichten stark reduziert ist. Der Myelin- und Oligodendrozytenverlust wird am ehesten durch die T-Zell-vermittelte Antikörper/Komplement-Reaktion in diesem Tiermodell verursacht. Auch bei der MS kommt es zum Verlust der Oligodendrozyten in demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es bei Marmosetten mit EAE bereits in einem frühen Krankheitsstadium zum Verlust kortikaler Oligodendrozyten in demyelinisierten kortikalen Läsionen kommt. Da die EAE in Marmosetten das Tiermodell mit der größten Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung MS ist, legen diese Ergebnisse nahe, dass es auch in frühen kortikalen MS-Läsionen zur oligodendroglialen Schädigung kommt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Pathogenese der kortikalen Entmarkung besser zu verstehen und therapeutische Ansätze zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

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

Ascherio A, Munch M (2000): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11, 220-224

Barkhof F, Bruck W, De Groot C J, Bergers E, Hulshof S, Geurts J, Polman C H, van der Valk P (2003): Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance. *Arch Neurol* 60, 1073-1081

Barnett M H, Prineas J W (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458-468

Bayas A, Gold R (2003): Lessons from 10 years of interferon beta-1b (Betaferon/Betaseron) treatment. *J Neurol* 250 Suppl 4, IV3-8

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 1174-1183

Bo L, Vedeler C A, Nyland H, Trapp B D, Mork S J (2003a): Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler* 9, 323-331

Bo L, Vedeler C A, Nyland H I, Trapp B D, Mork S J (2003b): Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 723-732

Boenisch T: Färbemethoden; in: Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden; Naish S; 3. Auflage; Dako Corporation, Carpinteria. Kalifornien, USA, 1997, 22-27

Bontrop R E, Otting N, de Groot N G, Doxiadis G G (1999): Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates. *Immunol Rev* 167, 339-350

Brok H P, Bauer J, Jonker M, Blezer E, Amor S, Bontrop R E, Laman J D, Hart B A (2001): Non-human primate models of multiple sclerosis. *Immunol Rev* 183, 173-185

Brownell B, Hughes J T (1962): The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25, 315-320

Bruck W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003): Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206, 181-185

Bruck W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar H A, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788-796

Bruck W, Schmied M, Suchanek G, Bruck Y, Breitschopf H, Poser S, Piddlesden S, Lassmann H (1994): Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35, 65-73

Bruck W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel H H, Kretzschmar H A, Lassmann H (1996): Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 195, 588-600

Burgoon M P, Owens G P, Smith-Jensen T, Walker D, Gilden D H (1999): Cloning the antibody response in humans with inflammatory central nervous system disease: analysis of the expressed IgG repertoire in subacute

sclerosing panencephalitis brain reveals disease-relevant antibodies that recognize specific measles virus antigens. *J Immunol* 163, 3496-3502

Carswell R (1838): *Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. Longman, London

Chang A, Tourtellotte W W, Rudick R, Trapp B D (2002): Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346, 165-173

Charcot J (1868): Histologie de la sclerose en plaques. *Gazette Hopitaux* 141, 554-558

Cruveilhier J (1829): *Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées*. J.-B. Baillière

Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, Schwab M E, Korte M (2011): NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2569-2574

Dyment D A, Ebers G C, Sadovnick A D (2004): Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3, 104-110

Ebers G C, Bulman D E, Sadovnick A D, Paty D W, Warren S, Hader W, Murray T J, Seland T P, Duquette P, Grey T, et al. (1986): A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 315, 1638-1642

Franklin R J (2002): Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-714

Franklin R J, Gilson J M, Blakemore W F (1997): Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *J Neurosci Res* 50, 337-344

Gale C R, Martyn C N (1995): Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47, 425-448

Genain C P, Hauser S L (2001): Experimental allergic encephalomyelitis in the New World monkey *Callithrix jacchus*. *Immunol Rev* 183, 159-172

Gold R, Rieckmann P (2007): Recent advances in the pathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nervenarzt* 78 Suppl 1, 15-24; quiz 25

Goldschmidt T, Antel J, König F B, Brück W, Kuhlmann T (2009): Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72, 1914-1921

Hafler D A, Compston A, Sawcer S, Lander E S, Daly M J, De Jager P L, de Bakker P I, Gabriel S B, Mirel D B, Ivinson A J, et al. (2007): Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357, 851-862

Kira J, Kanai T, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T (1996): Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40, 569-574

Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131, 1749-1758

Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, Owens T, Brück W (2007): Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 238-246

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

Lehotzky A, Lau P, Tokesi N, Muja N, Hudson L D, Ovadi J (2010): Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation. *Glia* 58, 157-168

Li G, Crang A J, Rundle J L, Blakemore W F (2002): Oligodendrocyte progenitor cells in the adult rat CNS express myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *Brain Pathol* 12, 463-471

Lindersson E, Lundvig D, Petersen C, Madsen P, Nyengaard J R, Hojrup P, Moos T, Otzen D, Gai W P, Blumbergs P C, et al. (2005): p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem* 280, 5703-5715

Linnington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassman H (1992): Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 40, 219-224

Lublin F D, Reingold S C (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999): A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122 (Pt 12), 2279-2295

Lucchinetti C, Bruck 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 C F, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H (1996): Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-274

Lucchinetti C F, Popescu B F, Bunyan R F, Moll N M, Roemer S F, Lassmann H, Bruck W, Parisi J E, Scheithauer B W, Giannini C, et al. (2011): Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 2188-2197

McDonald W I, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H P, Lublin F D, McFarland H F, Paty D W, Polman C H, Reingold S C, et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127

Merkler D, Boscke R, Schmelting B, Czeh B, Fuchs E, Bruck W, Stadelmann C (2006a): Differential macrophage/microglia activation in neocortical EAE lesions in the marmoset monkey. *Brain Pathol* 16, 117-123

Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Bruck W, Stadelmann C (2006b): A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain* 129, 1972-1983

Merkler D, Schmelting B, Czeh B, Fuchs E, Stadelmann C, Bruck W (2006c): 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

Morrissey S P, Le Page E, Edan G (2005): Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Int MS J* 12, 74-87

Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren A B (1999): Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11, 4357-4366

Noseworthy J H, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker B G (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952

Peterson J W, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp B D (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400

Polman C H, Reingold S C, Banwell B, Clanet M, Cohen J A, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302

Pomeroy I M, Jordan E K, Frank J A, Matthews P M, Esiri M M (2010): Focal and diffuse cortical degenerative changes in a marmoset model of multiple sclerosis. *Mult Scler* 16, 537-548

Pomeroy I M, Matthews P M, Frank J A, Jordan E K, Esiri M M (2005): Demyelinated neocortical lesions in marmoset autoimmune encephalomyelitis mimic those in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2713-2721

Poser C M, Paty D W, Scheinberg L, McDonald W I, Davis F A, Ebers G C, Johnson K P, Sibley W A, Silberberg D H, Tourtellotte W W (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231

Prineas J W, Barnard R O, Kwon E E, Sharer L R, Cho E S (1993): Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33, 137-151

Raine C S, Cannella B, Hauser S L, Genain C P (1999): Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46, 144-160

Raine C S, Scheinberg L, Waltz J M (1981): Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. *Lab Invest* 45, 534-546

Rao S M, Leo G J, Bernardin L, Unverzagt F (1991): Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 41, 685-691

Sadovnick A D, Ebers G C, Dyment D A, Risch N J (1996): Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 347, 1728-1730

Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer C C, Patsopoulos N A, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt S E, et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214-219

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

Skjoerringe T, Lundvig D M, Jensen P H, Moos T (2006): P25alpha/Tubulin polymerization promoting protein expression by myelinating oligodendrocytes of the developing rat brain. *J Neurochem* 99, 333-342

Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998): Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. *Neurology* 50, 571-572

Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, Guseo A, Lucchinetti C F, Leel-Ossy L, Ordinario A T, Bruck W, Lassmann H (2005): Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo's type of multiple sclerosis. *Brain* 128, 979-987

Storch M K, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-694

Targett M P, Sussman J, Scolding N, O'Leary M T, Compston D A, Blakemore W F (1996): Failure to achieve remyelination of demyelinated rat axons following transplantation of glial cells obtained from the adult human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22, 199-206

Weber F, Fontaine B, Cournu-Rebeix I, Kroner A, Knop M, Lutz S, Muller-Sarnowski F, Uhr M, Bettecken T, Kohli M, et al. (2008): IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes Immun* 9, 259-263

Wegner C, Esiri M M, Chance S A, Palace J, Matthews P M (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 Suppl, S47-53

Wolswijk G (2002): Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125, 338-349

Yang Y, Liu Y, Wei P, Peng H, Winger R, Hussain R Z, Ben L H, Cravens P D, Gocke A R, Puttaparthi K, et al. (2010): Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease. *Ann Neurol* 67, 498-507

Yong V W (2002): Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 59, 802-808

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. med. Ch. Theodossiou-Wegner für die Überlassung des Themas und ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Dissertation. Ohne ihre stets konstruktiven, fachkundigen Anregungen sowie ihr großes Engagement wäre mir die Abfassung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. med. W. Brück danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Abteilung für Neuropathologie in der Universitätsklinik Göttingen durchführen zu dürfen.

Frau J. Reichl danke ich für die große Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und für ihre kompetenten Ratschläge bei Fragen zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen.

Prof. Dr. M.E. Schwab (Zürich) und Prof. P. H. Jensen (Aarhus) danke ich für der Bereitstellung der Antikörper gegen NogoA und p25.

Allen Mitarbeitern/Innen der Abteilung Neuropathologie der Universitätsklinik Göttingen danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgemeinschaft während der Durchführung meiner Arbeit.