

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

**Untersuchungen zur Pathogenese subpialer kortikaler
Läsionen bei Multipler Sklerose und bei Marmosetten
mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Katharina Neid
aus
Brandenburg an der Havel

Göttingen 2014

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer |
| I. Berichterstatter/in: | Prof. Dr. med. W. Brück |
| II. Berichterstatter/in: | Prof. Dr. med. A. Flügel |
| III. Berichterstatter/in: | Prof. Dr. hum. biol. M. Schön |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 15.07.2015 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | v |
| Abbildungsverzeichnis | vi |
| Tabellenverzeichnis | viii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Multiple Sklerose (MS)..... | 1 |
| 1.1.1 Klinik..... | 1 |
| 1.1.2 Diagnostik | 2 |
| 1.1.3 Therapie..... | 3 |
| 1.2 Pathogenese der MS..... | 5 |
| 1.2.1 Epidemiologie | 5 |
| 1.2.2 Ätiologie..... | 5 |
| 1.2.3 Immunpathogenese..... | 7 |
| 1.3 Pathologie der MS..... | 8 |
| 1.3.1 MS-Läsionen der weißen Substanz | 8 |
| 1.3.2 MS-Läsionen der grauen Substanz..... | 9 |
| 1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in Callithrix-jacchus-Marmosetten | 11 |
| 1.4.1 Kortikale Pathologie in Marmosetten mit EAE..... | 12 |
| 2 Fragestellung..... | 14 |
| 3 Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Histologisches Material..... | 16 |
| 3.2 Gewebepreparation | 19 |
| 3.3 Immunhistochemie..... | 20 |
| 3.3.1 Prinzipien der Immunhistochemie..... | 20 |
| 3.3.2 Durchführung immunhistochemischer Färbemethoden | 21 |
| 3.3.2.1 ABC-Methode..... | 23 |
| 3.3.2.2 APAAP-Methode | 24 |
| 3.4 Morphometrische Auswertung und Auszählung der Zellen | 26 |
| 3.4.1 Analyse meningealer Entzündung über subpial entmarkten Läsionen in Marmosetten mit EAE..... | 26 |
| 3.4.2 Analyse der Dichte von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer MS..... | 27 |
| 3.5 Statistische Auswertung | 28 |
| 4 Ergebnisse | 29 |
| 4.1 Analyse meningealer Entzündung über subpial entmarkten Läsionen in Marmosetten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) | 29 |
| 4.1.1 Nachweis subpial entmarkter und bemerkter Kortexareale bei EAE | 29 |
| 4.1.2 Erhöhte Dichte meningealer T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex | 30 |
| 4.1.3 Erhöhte Dichte meningealer Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex | 32 |
| 4.1.4 Keine erhöhte Dichte meningealer B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex .. | 34 |
| 4.2 Verminderung von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer Multipler Sklerose..... | 40 |
| 4.2.1 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten in den subpial demyelinisierten Schichten bei MS | 41 |
| 4.2.2 Reduktion der stark angefärbten Olig2-positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen in den subpial demyelinisierten Schichten bei MS | 45 |
| 4.2.3 Ausgeprägtere Reduktion der NogoA-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu den stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen | 49 |
| 5 Diskussion..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 Assoziation meningealer Entzündung mit subpialer Entmarkung im Tiermodell der EAE bei Marmosetten | 51 |
| 5.1.1 T-Zell-dominierte meningeale Entzündung bei subpialer Entmarkung | 52 |
| 5.1.2 Rolle humoraler Faktoren für die subpiale Entmarkung | 53 |
| 5.1.3 Limitationen | 55 |
| 5.1.4 Zusammenfassung | 56 |
| 5.2 Verminderung der Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer MS | 56 |
| 5.2.1 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten | 57 |
| 5.2.2 Reduktion stark angefärbter Olig2-positiver Oligodendrozytenvorläuferzellen | 58 |
| 5.2.3 Ausgeprägtere Reduktion der Oligodendrozyten im Vergleich zu den Vorläuferzellen..... | 59 |
| 5.2.4 Limitationen | 61 |
| 5.2.5 Zusammenfassung | 61 |
| 6 Zusammenfassung | 63 |
| Anhang | 65 |
| Literaturverzeichnis | 68 |
| Danksagung..... | 82 |
| Lebenslauf | 83 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| ABC- Komplex | Avidin-Biotin-Komplex |
| APAAP | Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DPZ | Deutsches Primatenzentrum |
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| EDSS | <i>expanded disability status scale</i> |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| MBP | Myelin-Basisches Protein |
| MOG | Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |
| PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PLP | Proteolipid-Protein |
| PP-MS | <i>primary-progressive MS</i> |
| PR-MS | <i>progressive-relapsing MS</i> |
| rMOG | rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein |
| RR-MS | <i>relapsing-remitting MS</i> |
| SP-MS | <i>secondary-progressive MS</i> |
| TBS | <i>tris-buffered saline</i> |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Übersicht myelinisierter und demyelinisierter Kortexareale bei EAE | 30 |
| Abbildung 2: Meningeale CD3-positive T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE | 31 |
| Abbildung 3: Signifikant erhöhte Dichte meningealer CD3-positiver T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex | 32 |
| Abbildung 4: Meningeale IgG-positive Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE | 33 |
| Abbildung 5: Signifikant erhöhte Dichte meningealer IgG-positiver Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex | 34 |
| Abbildung 6: Meningeale CD20-positive B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE | 35 |
| Abbildung 7: Ähnliche Dichte meningealer CD20-positiver B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex | 36 |
| Abbildung 8: Meningeale Entzündungszellpopulationen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE | 37 |
| Abbildung 9: Korrelation zwischen meningealen CD3- und CD20-positiven Lymphozyten über demyelinisierten Hirnarealen bei Marmosetten mit EAE | 38 |
| Abbildung 10: Übersicht entmarkter und bemerkter Kortexareale bei chronischer MS | 41 |
| Abbildung 11: Reduktion NogoA-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS | 42 |
| Abbildung 12: Reduktion NogoA-positiver Zellen in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS | 43 |
| Abbildung 13: Reduktion NogoA-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS | 44 |
| Abbildung 14: Reduktion NogoA-positiver Zellen in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS | 45 |
| Abbildung 15: Reduzierte – allerdings noch nachweisbare - stark angefärbte Olig2-positive Zellpopulation in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS | 46 |
| Abbildung 16: Reduzierte – allerdings noch nachweisbare – stark angefärbte Olig2-positive Zellpopulation in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS | 47 |
| Abbildung 17: Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS | 48 |

Abbildung 18: Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Zellen in der oberflächlichen Schicht III bei MS 49

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Klinische Daten der Kontrolltiere | 17 |
| Tabelle 2: Klinische Daten der EAE-Tiere | 17 |
| Tabelle 3: Klinische Daten der humanen Kontrollen | 18 |
| Tabelle 4: Klinische Daten der Autopsien von MS-Patienten | 19 |
| Tabelle 5: Vorbehandlungsmethoden zur Antigendemaskierung | 22 |
| Tabelle 6: Für Marmosetten-Gewebe verwandte Primär-Antikörper | 25 |
| Tabelle 7: Für Human-Gewebe verwendete Primär-Antikörper | 25 |
| Tabelle 8: Verwendete Sekundärsysteme..... | 26 |
| Tabelle 9: Durchschnittliche Dichte meningealer Entzündungszellen angrenzend an subpiale Entmarkung sowie angrenzend an myelinisierten Kortex bei EAE..... | 39 |
| Tabelle 10: Durchschnittliche Dichte meningealer Entzündungszellen angrenzend an myelinisierten Kortex bei Kontrollfällen | 40 |
| Tabelle 11: Durchschnittliche Dichte Olig2 ⁺⁺ -positiver Vorläuferzellen sowie NogoA-positiver Oligodendrozyten in den kortikalen Schichten bei MS und in Kontrollen | 50 |
| Tabelle 12: Kurtzke-Skala (<i>expanded disability status scale</i> , EDSS) zur Beurteilung des Behinderungsgrades bei MS..... | 65 |
| Tabelle 13: Aktuelle Diagnoseleitlinien der Multiplen Sklerose | 66 |

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose (MS)

Die auch als Enzephalomyelitis disseminata bezeichnete Entmarkungskrankheit Multiple Sklerose (MS) umfasst einen heterogenen Formenkreis chronisch entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen des zentralen Nervensystems.

Die ersten Beschreibungen der klinischen Symptomatik sind durch die Trias Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache sowie die Darstellung der histopathologischen Hauptmerkmale Entmarkung, Entzündung und Gliose charakterisiert und gehen auf den französischen Neurologen J.M. CHARCOT zurück (CHARCOT 1868).

1.1.1 Klinik

Da die Entmarkungsherde (Läsionen, Plaques) als histopathologische Korrelate der MS in allen Regionen zentralnervöser weißer und grauer Substanz lokalisiert sein können (PETERSON *et al.* 2001; BØ *et al.* 2003a; BØ *et al.* 2003b; KUTZELNIGG *et al.* 2005; ALBERT *et al.* 2007), ist die Symptomatik dieser Erkrankung außerordentlich vielgestaltig. Die Symptome können zeitlich und räumlich unabhängig voneinander auftreten. Es wird von einer Dissemination der MS-Symptomatik gesprochen (NOSEWORTHY *et al.* 2000).

Die durch CHARCOT erstmalig beschriebene Symptom-Trias, die vor allem durch Schädigung des Kleinhirns oder Hirnstamms entsteht, wird nur in seltenen Fällen als Erstmanifestation beobachtet. Häufige Frühsymptome sind die einseitige Optikusneuritis, Parästhesien sowie eine belastungsabhängige Schwäche der Beine (WEINSHENKER 1998; NOSEWORTHY *et al.* 2000). Im späteren Verlauf kommt es häufig zu einer zerebellären Ataxie, Dysarthrie, spastischen Paresen, psychiatrischen Symptomen sowie Blasen- und Mastdarmstörungen (NOSEWORTHY *et al.* 2000), wobei die Heterogenität der klinischen Symptomatik bei jeglicher Verlaufsform hervorgehoben sein soll. Symptome wie Aphasie, Apraxie oder epileptische Anfälle, welche auf kortikale Läsionen hinweisen könnten, treten deutlich seltener auf (THOMPSON *et al.* 1993; ZAREI *et al.* 2003). Befinden sich Läsionen in neuroanatomisch nicht-eloquenten Hirnarealen, so bleiben die dazugehörigen Symptome aus. Diese Läsionen erscheinen klinisch „stumm“ (GILBERT und SADLER 1983).

Zur Quantifizierung des Ausmaßes an körperlichen Einschränkungen ist die KURTZKE-Skala (*expanded disability status scale*, EDSS) ein verbreitetes Werkzeug (vergleiche Tabelle 12 im Anhang, KURTZKE 1983). Die Skala berücksichtigt Beeinträchtigungen acht funktioneller Systeme. Höhere Werte sind vorwiegend durch eine motorische Beeinträchtigung der Beine, d.h. eingeschränkte Gehfähigkeit, bedingt.

Klinisch beginnt die MS bei 85-90% der Betroffenen mit einem schubförmigen Verlauf (*relapsing-remitting*; RR-MS). Ein Schub ist dabei als das Auftreten neuer oder das Wiederaufflammen bereits bekannter klinischer Symptome, die länger als 24 Stunden anhalten, definiert. Als weitere Kriterien gelten die Abwesenheit von Fieber oder Infektionen. Zudem muss definitionsgemäß ein Zeitintervall von ≥ 30 Tagen zum Beginn vorausgegangener Schübe festzustellen sein. Die klinischen Symptome entwickeln sich akut oder subakut innerhalb von wenigen Tagen bis zu zwei Wochen. Die meist nach sechs bis acht Wochen einsetzende Remission kann vollständig oder unvollständig sein.

Von der schubförmigen Verlaufsform ist eine progrediente, mit schleichender Zunahme neurologischer Ausfälle und ohne Schübe charakterisierte Form abzugrenzen. Diese zeigt sich bei etwa 10-15% der Erkrankten von Beginn an (*primary-progressive MS*; PP-MS) (NOSEWORTHY *et al.* 2000) oder entwickelt sich sekundär bei 50% der MS-Patienten nach 10-15 Jahren aus einem schubförmigen Krankheitsverlauf (*secondary-progressive MS*; SP-MS). Ist von Erkrankungsbeginn an eine chronische Progredienz mit Schüben und relativ zum Schub vollständigen oder auch unvollständigen Remissionen verbunden, wird von einer progredient-schubförmigen Verlaufsform (*progressive-relapsing MS*; PR-MS) gesprochen.

1.1.2 Diagnostik

Aufgrund vielgestaltiger Initialsymptome kann die Diagnose der Multiplen Sklerose auch heutzutage im Einzelfall noch schwierig sein. Da bisher kein spezifischer Test zur Verfügung steht, beruht die Diagnostik auf Beobachtungen der zeitlichen und räumlichen Dissemination von entzündlich-entmarkten Herden im zentralen Nervensystem.

Grundlage des Nachweises der MS-Läsionen bilden die bildgebenden Verfahren, insbesondere die Magnetresonanztomographie (MRT), die liquorchemische Diagnostik und die Elektrophysiologie (evozierte Potentiale). Bei Verdacht auf MS ist die MRT mit einer Sensitivität von $> 90\%$ die Methode der Wahl (NOSEWORTHY *et al.* 2000). Frische Entmarkungsherde zeichnen sich durch eine verstärkte Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität

mit intensiver Kontrastmittelaufnahme aus. Sie zeigen sich in der T1-Wichtung hypointens und in der T2-Wichtung hyperintens (BAKSHI *et al.* 2004). Dabei korreliert das Ausmaß kernspintomographisch nachgewiesener Läsionen nicht notwendigerweise mit dem Schweregrad der klinischen Symptomatik.

Die Computertomographie ist weniger sensitiv. Ihr kommt, außer zum Ausschluss von Differentialdiagnosen, keine diagnostische Bedeutung bei der Abklärung der MS zu.

Die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose erfolgte ursprünglich nach einem Klassifikationssystem von POSER *et al.* 1983, bei welchem eine „klinisch sichere MS“, eine „laborunterstützte sichere MS“ und eine „klinisch wahrscheinliche MS“ unterschieden wurden. Diese Einteilung wurde 2001 durch ein neu entwickeltes Klassifikationssystem von McDONALD *et al.* ersetzt und 2011 von POLMAN und Kollegen revidiert. Dadurch wurde die Diagnosestellung erleichtert. Seit 2001 nimmt die bildgebende Diagnostik (MRT) neben dem klinischen Erscheinungsbild sowie der Liquordiagnostik und den evozierten Potentialen eine maßgebliche Rolle bei der Diagnosestellung der MS ein. Eine Übersicht der aktuellen Diagnoseleitlinien gibt die Tabelle 13 im Anhang.

1.1.3 Therapie

Eine kausale Therapie der Multiplen Sklerose steht derzeit noch nicht zur Verfügung, sodass eine Heilung bei jetzigem Forschungsstand nicht möglich ist. Die Wahl der Therapie richtet sich bislang vor allem nach der klinischen Verlaufsform der Erkrankung. Ziele der Therapie sind das Erreichen einer schnellen Remission akuter Schübe, deren Prophylaxe, die Unterbindung beziehungsweise Verlangsamung der Krankheitsprogression sowie die Stabilisierung funktioneller Einschränkungen bei eingetretenen dauerhaften Ausfällen.

Im akuten Schub sind hochdosierte Glukokortikoide (Methylprednisolon intravenös vgl. MILLIGAN *et al.* 1987 und GRAUER *et al.* 2001 oder oral vgl. SELLEBJERG *et al.* 1998) das Mittel der Wahl. Sie können Dauer und Schwere akuter Symptome reduzieren, indem sie die Migration von Immunzellen in das ZNS unterdrücken, die T-Zellaktivierung supprimieren, den programmierten Zelltod aktivierter Immunzellen unterstützen sowie zytotoxische Effekte von NO und TNF- α vermindern. Darüber hinaus stabilisieren Glukokortikoide die Blut-Hirn-Schranke (SLOKA und STEFANELLI 2005).

Bei Versagen der Glukokortikoid-Therapie kann ein Plasmaaustausch vorgenommen werden, worauf nach SCHILLING *et al.* 2006 71% der Patienten nach durchschnittlich drei Zyklen ein gutes bis sehr gutes Ansprechen zeigten.

In der Langzeittherapie und Schubprophylaxe der MS kommen immunmodulatorische und immunsupprimierende Substanzen zum Einsatz. Immunmodulatoren wie β -Interferon [Interferon β 1-b (Betaferon®), Interferon β 1-a (Rebif® bzw. Avonex®)] (BAYAS und GOLD 2003) und Glatirameracetat (Copaxone®) (SELA und TEITELBAUM 2001; WOLINSKY 2006) stellen Basistherapeutika dar und finden vor allem Anwendung in der Behandlung der schubförmig verlaufenden MS. Auch bei sekundär chronisch-progredienten Verlaufsformen wurden mit β -Interferon-Präparaten Erfolge erzielt (CORBOY *et al.* 2003). Mitoxantron ist mittlerweile ebenfalls als Basistherapeutikum bei SP-MS zugelassen.

Neue und stärker wirksame orale Basistherapeutika für die schubförmige MS sind Teriflunomid (Aubagio®) und Dimethylfumarat (Tecfidera®). Alemtuzumab (Lemtrada®) (COLES 2013) steht seit Kurzem als intravenöse Therapie für die schubförmige MS bei Erwachsenen zur Verfügung. Die genannten immunmodulatorischen Substanzen wirken sich positiv auf die Schubrate und Schubintensität aus und verringern die Anzahl neuer Kontrastmittel-anreichernder Läsionen in der MRT.

Als Reservemedikament für die Basistherapie der schubförmigen Verlaufsform kommen Azathioprin (GOODIN *et al.* 2002) sowie - in Einzelfällen - die Behandlung mit Immunglobulinen (SØRENSEN *et al.* 2002; STANGEL und GOLD 2005) in Betracht. Für die primär progrediente Verlaufsform der Multiplen Sklerose ist derzeit keine effektive Therapie bekannt (LEARY und THOMPSON 2005).

Zeigen bei anhaltender oder zunehmender Krankheitsaktivität aufgeführte Therapieansätze keine hinreichende Wirkung, so wird eine Therapieeskalation durchgeführt. Dafür steht die Antikörpergabe mit Natalizumab (Tysabri®), die Therapie mit dem oralen Wirkstoff Fingolimod (Gilenya®), das Immunsuppressivum Mitoxantron (MORRISSEY *et al.* 2005) sowie das Zytostatikum Cyclophosphamid (KIESEIER und JEFFERY 2010) zur Verfügung. Das von Patient zu Patient unterschiedliche Ansprechen auf verschiedene Therapieschemata liegt möglicherweise in der histopathologischen Heterogenität der MS begründet (BITSCH und BRÜCK 2002; BRÜCK *et al.* 2002).

Neben der immunmodulatorischen und immunsuppressiven Therapie spielt die symptomatische Therapie eine wesentliche Rolle im multimodalen Therapiekonzept der MS.

Ihr Ziel ist die Verbesserung von Symptomen wie Spastik, Schmerzen, Fatigue, Blasenfunktionsstörungen, kognitiven Störungen und Depression. Die Krankengymnastik stellt eine weitere Grundlage der Basisversorgung von MS-Patienten, besonders derer mit Gehbehinderung und/oder Koordinationsstörungen, dar.

1.2 Pathogenese der MS

1.2.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose ist mit einer Prävalenz von 149/100 000 Einwohnern (HEIN und HOPFENMÜLLER 2000) und einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 3-5/100 000 Einwohnern in der Bundesrepublik Deutschland eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, die zu Behinderung im jungen Erwachsenenalter führt.

Frauen erkranken doppelt so häufig wie Männer an der schubförmigen Verlaufsform der MS. Die primär chronisch-progrediente Verlaufsform betrifft beide Geschlechter jedoch gleich häufig (COTTRELL *et al.* 1999).

Die weltweite Verteilung der Erkrankungshäufigkeiten zeigt große Unterschiede. Sie steigt mit zunehmendem Abstand vom Äquator in Nord- und Südrichtung an (KURTZKE 1980). Die höchste Dichte an Erkrankten findet sich im Norden Europas, dem Süden Australiens und in der Mitte Nordamerikas, wo 0,1% der Einwohner an MS leiden.

Bisher werden genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse und deren Interaktion als Ursachen für die weltweiten Prävalenzunterschiede diskutiert. Insgesamt scheint die Prävalenz und Inzidenz der MS zuzunehmen, wobei jedoch die veränderten Diagnosekriterien und längere Überlebenszeiten der Erkrankten die Statistik beeinflussen (KOCH-HENRIKSEN und SØRENSEN 2010).

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bisher nicht bekannt. Zurzeit wird eine multifaktorielle Genese auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition und eines bislang nicht identifizierten exogenen Auslösers diskutiert, in der das Immunsystem eine wesentliche autodestruktive Rolle zu spielen scheint (HEDSTRÖM *et al.* 2011; SAWCER *et al.* 2011; SOSPEDRA und MARTIN 2005; GOLD *et al.* 2006). Zusätzlich zeigen histopathologische Studien, dass MS-Läsionen in einigen Fällen auch auf eine erhöhte Vulnerabilität der

Oligodendrozyten zurückzuführen sind. Im Gesamtbild handelt es sich damit bei der MS möglicherweise nicht um eine einzelne heterogene Erkrankung, sondern um unterschiedliche Entitäten ähnlich klinischer Symptomatik (LUCCHINETTI *et al.* 2000; LASSMANN *et al.* 2001; BRÜCK *et al.* 2002).

Ergebnisse epidemiologischer Studien zeigen ein zwanzig- bis vierzigfach erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber der Normalbevölkerung unter Verwandten ersten Grades und lassen somit kaum Zweifel an einem Effekt genetischer Faktoren (SADOVNICK *et al.* 1988). Die Konkordanzrate der MS ist bei monozygoten Zwillingen mit 31%, verglichen mit der bei dizygoten Zwillingen bzw. Geschwistern, um das Sechsfache erhöht (SADOVNICK *et al.* 1993). Seit 1973 ist zudem bekannt, dass das Vorhandensein des HLA-DR2-Allels das Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken, um das Zwei- bis Vierfache erhöht (JERSILD *et al.* 1973; OLERUP und HILLERT 1991). Das Allel findet sich bei 70% der MS-Patienten und 25% der Normalbevölkerung. Eine 2011 veröffentlichte umfangreiche Genomstudie bei MS-Patienten und Kontrollprobanden bestätigte vorwiegend immunologisch relevante Gene, die mit der MS assoziiert sind. Es konnten jedoch keine genetischen Faktoren identifiziert werden, die mit dem Schweregrad oder dem Krankheitsverlauf der MS assoziiert waren (SAWCER *et al.* 2011).

Neben den genetischen Einflüssen legen Migrationsstudien nahe, dass auch die Umweltfaktoren des Herkunftslandes eine Rolle spielen. Vermutet wird die Exposition gegenüber einem unbekanntem regionalen Agens (z.B. Virus) in Kindheit und Jugend (ALTER und OKIHIRO 1971; COMPSTON 1999). Die Exposition mit Sonnenstrahlung sowie ein veränderter Vitamin D-Haushalt (SAWCER *et al.* 2011) wurden ebenfalls als beeinflussende Faktoren diskutiert. Mutmaßungen über die Beteiligung verschiedenster Erreger wie *Chlamydia pneumoniae* (STRATTON und SRIRAM 2003), humanes Herpesvirus 6 (CLARK 2004), Masern (GRONNING *et al.* 1993), Varizellen (MARRIE und WOLFSON 2001) und Epstein-Barr-Virus (HAAHR *et al.* 2004; CEPOK *et al.* 2005; ALOISI *et al.* 2010) an der Entstehung von MS sind kontrovers und immer noch Thema der aktuellen Forschung.

1.2.3 Immunpathogenese

Die Pathologie der Multiplen Sklerose ist durch Entzündung, Entmarkung, axonalen Schaden, neuronalen Verlust sowie Gliose gekennzeichnet. Die Läsionen betreffen sowohl die weiße als auch die graue Substanz des ZNS.

Bisherige Forschungsergebnisse legen, insbesondere bei den drei verschiedenen Läsionstypen der grauen Substanz, unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen nahe (KUTZELNIGG *et al.* 2005; BØ *et al.* 2007).

Es wird davon ausgegangen, dass sowohl zelluläre als auch humorale autoimmunne Mechanismen bei der Destruktion des Gewebes eine Rolle spielen. Vieles spricht dafür, dass autoreaktive T-Zellen, die gegen Myelin-Bestandteile und/oder Oligodendrozyten gerichtet sind, eine grundlegende Rolle in der Pathogenese der MS spielen (ZHANG und RAUS 1994; CRAWFORD *et al.* 2004). Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass im peripheren Blut von MS-Patienten T-Zell-Linien gegen myelinspezifische Autoantigene, wie MBP (Myelin-Basisches Protein) und PLP (Proteolipid-Protein), nachgewiesen werden konnten (OZAWA *et al.* 1994).

Untersuchungen an Tiermodellen wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) demonstrieren, dass autoreaktive T-Zellen (CD4-positive als auch CD8-positive) eine inflammatorische Entmarkung des zentralen Nervensystems hervorrufen können (HUSEBY 2001; SUN *et al.* 2000). Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von T-Lymphozyten an der Genese der MS ist die Tatsache, dass die für MHC I- (HLA-A3) und MHC II- (HLA-DR, HLA-DQ) kodierenden Gene jeweils Risikofaktoren für das Erkranken an MS darstellen (NAITO *et al.* 1972; FOGDELL *et al.* 1995).

Sowohl aus dem ZNS stammende Antigene (DE VOS *et al.* 2002) als auch kreuzreaktive Antigene (TALBOT *et al.* 1996) könnten die Lymphozyten in der Peripherie aktivieren, die daraufhin, die in der akuten Krankheitsphase durchlässige Blut-Hirn-Schranke überwinden (MINAGAR und ALEXANDER 2003; LASSMANN *et al.* 2007).

Auch autoreaktive Antikörper - und somit das humorale Immunsystem - scheinen an der Pathogenese der MS-Läsionen der weißen und grauen Substanz beteiligt zu sein. Die erhöhte intrathekale Synthese von Immunglobulinen und die daraus resultierende Anwesenheit von oligoklonalem IgG im Liquor von MS-Patienten stellen eine grundlegende immunologische Pathologie der MS dar (ARCHELOS und HARTUNG 2000). Die Beobachtung, dass subpiale Entmarkungsherde häufig im Bereich von Sulci und dem Gyrus cinguli auftreten, unterstützt die Hypothese, dass im Liquor befindliche Mediatoren eine Rolle spielen könnten (PETERSON *et al.* 2001).

Sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz beinhalten die entzündlichen MS-Infiltrate B-Zellen (FROHMAN *et al.* 2006). Mehrere Forschungsgruppen beobachteten follikelartige subpiale Ansammlungen von B-Zellen bei Autopsiefällen mit sekundär progressiver MS (SERAFINI *et al.* 2004; MAGLIOZZI *et al.* 2007, 2010). Auch Plasmazellen, die dem letzten Stadium der Differenzierung der B-Zellreihe entsprechen, akkumulieren in chronischen MS-Läsionen und im Liquor (OZAWA *et al.* 1994). Für eine humorale Mitbeteiligung sprechen neben den pathologischen Befunden auch klinische Beobachtungen. So zeigen einige Patienten ein gutes therapeutisches Ansprechen auf eine Plasmapherese (KEEGAN und NOSEWORTHY 2002). Außerdem kann mit anti-CD20 monoklonalen Antikörpern (Rituximab[®]) ein partieller Erfolg bei der schubförmig verlaufenden MS verzeichnet werden (KEEGAN und NOSEWORTHY 2002; HAUSER *et al.* 2008).

Trotz diesen Entdeckungen, ist immer noch unklar, welche pathogenetische Rolle Autoantikörper in der Erkrankungsentstehung– und Aufrechterhaltung haben.

1.3 Pathologie der MS

1.3.1 MS-Läsionen der weißen Substanz

Läsionen der weißen Substanz sind mit histologischen Standardtechniken gut nachweisbar und werden aufgrund ihrer zuverlässigen Detektion in der MRT als diagnostisches Kriterium herangezogen (SCHREIBER *et al.* 2001; TAYLOR *et al.* 2004).

Die entmarkten Areale sind vorzugsweise im Rückenmark, periventrikulär, juxtakortikal, im Kleinhirn und im Sehnerv zu finden. Es handelt sich um scharf begrenzte Entmarkungsherde, die in der floriden Erkrankungsphase durch ausgeprägte parenchymale und perivaskuläre lymphomonozytäre Infiltrate, beginnenden Oligodendrozytenverlust und eine aktive Demyelinisierung charakterisiert sind. Astrozyten zeigen in akuten Läsionen kaum Veränderungen. Während dieser aktiven Entmarkung lassen sich Makrophagen mit inkorporierten Abbauprodukten verschiedener Myelinproteine histologisch detektieren.

Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es entweder zu einem vollständigen Myelinverlust in der Läsion oder auch zur Regeneration von Myelinscheiden (Remyelinisierung). Axone sind in den Läsionen weiterhin nachweisbar (LASSMANN 1998), auch wenn sich in frühen Läsionen eine deutliche axonale Schwellung sowie Schädigung (BITSCH *et al.* 2000; KUHLMANN *et al.* 2002) und in chronischen Plaques ein relativer

axonaler Verlust zeigt. Weitere pathologische Merkmale fortgeschrittener Entzündungsstadien sind die Fasergliose, die geringe Anzahl oder Abwesenheit von Makrophagen (LASSMANN *et al.* 1994) sowie die Reduktion oder der Verlust reifer Oligodendrozyten (WOLSWIJK 2000).

Bei einem Teil der Patienten mit MS scheint der programmierte Zelltod von Oligodendrozyten das initiale Ereignis bei der Entstehung neuer MS-Läsionen zu sein. Daher wird eine erhöhte Vulnerabilität von Oligodendrozyten als ein Grund für die Demyelinisierung diskutiert (BRÜCK *et al.* 2002).

Bekannt ist, dass in späten Krankheitsstadien der MS in Läsionen der weißen Substanz die Anzahl der myelinbildenden reifen Oligodendrozyten stark abnimmt (WOLSWIJK 2000), Oligodendrozytenvorläuferzellen jedoch nachweisbar bleiben (KUHLMANN *et al.* 2008). Dies weist auf eine Störung der Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen hin. Hervorzuheben ist, dass sich pathologische Veränderungen im Gehirn von MS-Patienten nicht nur in den bisher beschriebenen fokalen Läsionen der weißen Substanz abspielen. Pathologische Studien zeigen, dass die sogenannte normal erscheinende weiße Substanz sowie die graue Substanz in den globalen Entzündungsprozess mit einbezogen werden. KUTZELNIGG und Kollegen beschrieben 2005 sowohl eine erhöhte mikrogliale Aktivität, als auch einen beachtlichen axonalen Schaden in der Histologie normal erscheinender weißer Substanz.

1.3.2 MS-Läsionen der grauen Substanz

Die Existenz kortikaler Läsionen bei Multipler Sklerose ist schon seit langer Zeit bekannt (BROWNELL und HUGHES 1962; LUMSDEN 1971). Trotzdem standen sie bis vor wenigen Jahren kaum im Blickfeld weiterer Forschungen, da ihre Detektion sowohl in der Bildgebung als auch mit konventionellen Färbemethoden Schwierigkeiten bereitete (SCHREIBER *et al.* 2001; TAYLOR *et al.* 2004). Die Ausdehnung und Häufigkeit kortikaler Läsionen wurde daher in der Vergangenheit unterschätzt. Jüngste Studien an Autopsien von MS-Patienten zeigten, dass bei über 90% der Erkrankten Läsionen der grauen Substanz vorliegen (WEGNER *et al.* 2006; ALBERT *et al.* 2007). Der mediane Anteil von demyelinisiertem Kortex in progressiven Stadien der Krankheit beträgt 12,5-14%.

Es konnten drei unterschiedliche Arten kortikaler Läsionen voneinander abgegrenzt werden: Leukokortikale (Typ I) Läsionen, welche die graue Substanz umfassen und einen Anteil in der subkortikalen weißen Substanz haben; intrakortikale (Typ II) Läsionen, die lediglich innerhalb des Neokortex liegen sowie subpiale (Typ III) Läsionen, welche von der

pialen Oberfläche bis in die Hirnrinde reichen (PETERSON *et al.* 2001). Die subpialen (Typ III) Läsionen machen mit 51% jedoch den größten Anteil an der demyelinisierten kortikalen Gesamtfläche bei chronischer MS aus (WEGNER *et al.* 2006). Im Vergleich der drei Läsionstypen untereinander findet sich die stärkste Ausprägung an Inflammation und Gliose bei leukokortikalen Läsionen (PETERSON *et al.* 2001).

Eine besonders ausgedehnte kortikale Demyelinisierung findet sich nach ALBERT und Kollegen bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von über zehn Jahren (ALBERT *et al.* 2007). Außerdem gehen große Läsionen der grauen Substanz meist mit progredienten Krankheitsverläufen (primär-progrediente und sekundär-progrediente MS) einher, während sich bei der schubförmigen Verlaufsform weniger kortikale Läsionen nachweisen lassen (BØ *et al.* 2003b; KUTZELNIGG *et al.* 2005).

Insgesamt legt die hohe Prävalenz und Ausdehnung der kortikalen Läsionen nahe, dass sie eine bedeutende Rolle in der Erkrankungsprogression und der Entstehung von neuropsychologischen Symptomen spielen könnten.

Ein Merkmal langjähriger kortikaler Entmarkung ist ihre Hypozellularität. Im Vergleich mit korrespondierenden chronischen Läsionen der weißen Substanz finden sich in der grauen Substanz weniger T-Zell- und B-Zell-Infiltrate, eine geringere Mikroglia-Aktivität sowie eine geringere Ausprägung der Astroglie (PETERSON *et al.* 2001; BØ *et al.* 2003a). In Gegenüberstellung mit chronischen Läsionen der weißen Substanz zeigen kortikale Läsionen keinen Hinweis auf Komplementablagerungen (BRINK *et al.* 2005) und keinen Hinweis auf Funktionsstörungen der Blut-Hirn-Schranke (VAN HORSSSEN *et al.* 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in lang bestehenden kortikalen Läsionen eine Tendenz zur schnellen Beseitigung der Inflammation sowie eine starke Neigung zur Remyelinisierung besteht (ALBERT *et al.* 2007).

Gerade die Pathogenese der subpialen Läsionen wirft derzeit noch viele Fragen auf. Pathologische Studien der letzten Jahre beschäftigen sich daher mit der Fragestellung, ob kortikale Demyelinisierung mit der Infiltration von meningealen Entzündungszellen assoziiert ist (SERAFINI *et al.* 2004; MAGLIOZZI *et al.* 2007, 2010; KOOI *et al.* 2009).

Die Forschungsergebnisse sind kontrovers. MAGLIOZZI *et al.* 2007 konnten eine Assoziation von B-Zell-Ansammlungen mit subpialer Entmarkung beobachten. In den Meningen von Patienten mit sekundär-progredienter MS wiesen sie Anhäufungen CD20-positiver B-Zellen nach, welche als ektoper Follikel charakterisiert wurden. Die Follikel waren

häufig entlang von Sulci und in deren Tiefe lokalisiert, selten jedoch oberflächlich verteilt in den Meningen. In der Studie ließen sich keine Follikel bei Patienten ohne subkortikale Entmarkung nachweisen. Das Auftreten der Follikel konnte mit einer starken Entzündungsreaktion, extensiver Zerstörung von kortikalen neuronalen Strukturen sowie mit schnell fortschreitenden neurologischen Defiziten und frühem Tod in Verbindung gebracht werden (MAGLIOZZI *et al.* 2007).

Dem stehen Ergebnisse von KOOI *et al.* 2009 entgegen. Sie konnten keinerlei Assoziation zwischen meningealer Inflammation und dem Ausmaß an subpialer Demyelinisierung bei der chronischen MS finden. Die Forschungsergebnisse zeigten keinen Unterschied zwischen subpialen Läsionen und benachbarter bemerkter Hirnrinde hinsichtlich des Ausmaßes oder der Zusammensetzung meningealer Zellinfiltrate. Darüber hinaus ergaben ihre Beobachtungen keinerlei Hinweise auf follikelartige Strukturen. Die kontroversen Ergebnisse von MAGLIOZZI *et al.* 2007 und KOOI *et al.* 2009 bei MS-Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien machen deutlich, dass insbesondere die Pathogenese subpialer kortikaler Läsionen immer noch unklar ist und weiterhin intensiver Forschung bedarf.

1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in Callithrix-jacchus-Marmosetten

Das am häufigsten verwendete Tiermodell im Bereich der MS-Forschung ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. Anhand dieses Modells können verschiedene neuropathologische und neurobiologische Aspekte der Multiplen Sklerose reproduziert werden (GOLD *et al.* 2006).

Das Hirn der Marmosetten zeigt große neuroanatomische und funktionelle Ähnlichkeit mit dem menschlichen Hirn (STEPHAN und MANOLESCU 1980). Außerdem ähneln sich die Gene, die für das Myelin kodieren, sehr (BONTROP *et al.* 1999). Das Vorhandensein des menschlichen HLA-DR-Lokus bei Marmosetten ist eine wichtige genetische Voraussetzung für die Induzierbarkeit der EAE. Für diesen Genlocus wurde der stärkste Zusammenhang zwischen Genetik und Erkrankungswahrscheinlichkeit beim Menschen gefunden (QUELVENNEC *et al.* 2003). Der Immunstatus der Callithrix-jacchus-Marmosetten ähnelt mit seiner breiten Spannbreite der Immunantwort auf Myelin-Antigene dem des Menschen. Die Induktion der EAE in Marmosetten kann durch aktive Immunisierung mit verschiedenen Myelin-Antigenen oder passiv durch die Übertragung antigenspezifischer T-Zellen geschehen (PANITCH und MCFARLIN 1977). Die gebräuchlichsten Antigene zur aktiven

Immunisierung sind das Myelin-Basische Protein (MBP), das Proteolipid-Protein (PLP) und das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Die dieser Arbeit vorausgegangene aktive Immunisierung der Marmosetten erfolgte mit MOG (vergleiche Abschnitt 3.1). MOG ist ein kleiner, auf der äußersten Oberfläche der Myelinscheide lokalisierter, Bestandteil des Myelins im zentralen Nervensystem und ruft wenige Tage nach Injektion eine B- und T-Zell-Reaktivität gegen dieses Antigen in Primaten hervor (BROK *et al.* 2001). Histopathologisch spiegelt sich die Immunantwort unter anderem in meningealen entzündlichen Infiltraten (POMEROY *et al.* 2005), Demyelinisierung der grauen und weißen Substanz sowie in axonalen Schäden im ZNS der Marmosetten wider (UCCELLI *et al.* 2003). Sowohl bei der MS als auch bei der EAE in Marmosetten zeigen sich Läsionen im Optikus, Rückenmark, Zerebellum und Gehirn mit Beteiligung der weißen und grauen Substanz. Je nach Lokalisation der Herde entwickeln die Tiere dann typische klinische Symptome der EAE.

1.4.1 Kortikale Pathologie in Marmosetten mit EAE

Bei MOG-induzierter EAE in Marmosetten ist auch der Kortex von Entmarkung betroffen (MERKLER *et al.* 2006a). Kortikale Läsionen im Tiermodell der EAE ähneln in ihrer Morphologie und in der Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate den kortikalen Läsionen der MS. Im Tiermodell können, ähnlich wie von PETERSON *et al.* 2001 bei der MS beschrieben, drei unterschiedliche Arten kortikaler Läsionen voneinander abgegrenzt werden: Leukokortikale (Typ I) Läsionen, intrakortikale (Typ II) Läsionen sowie subpiaale (Typ III) Läsionen (POMEROY *et al.* 2005; MERKLER *et al.* 2006a). Dabei sind die subpiaalen Läsionen sowohl bei der EAE als auch bei der chronischen MS die häufigsten kortikalen Läsionen (POMEROY *et al.* 2005; MERKLER *et al.* 2006a; WEGNER *et al.* 2006).

Kortikale Läsionen weisen in der EAE eine relative Hypozellularität (u.a. CD3-positive T-Zellen, CD20-positive B-Zellen, MAC387-positive Makrophagen) im Vergleich zu anderen Läsionstypen der grauen und weißen Substanz auf (POMEROY *et al.* 2005). Während CD3-positive T-Zellen im entmarkten Kortex bei Marmosetten mit EAE überwiegend perivaskulär vorkommen, können B-Zellen nur selten in demyelinisierten Arealen der grauen Substanz beobachtet werden (MERKLER *et al.* 2006a).

Über subpiaalen Läsionen konnten signifikant mehr entzündliche Zellen (u.a. CD3-positive T-Zellen) als über benachbarten myelinisierten Anteilen der Hirnrinde bei EAE beobachtet werden (POMEROY *et al.* 2005), aber quantitative Daten hierzu fehlen bislang.

Immunglobuline oder Komplement (C9) konnten im subpial entmarkten Kortex (Typ III-Läsionen) nicht immunhistochemisch dargestellt werden (MERKLER *et al.* 2006a).

Obwohl subpiale Läsionen einen großen Anteil der kortikalen Herde in Marmosetten mit EAE ausmachen, sind ihre Pathogenese, insbesondere die Rolle zellulärer und humoraler Faktoren, und ihre klinische Bedeutung nicht hinreichend geklärt.

2 Fragestellung

Studien der vergangenen Jahre zeigen, dass die meisten Patienten mit chronischer MS kortikal entmarkte Läsionen aufweisen (WEGNER *et al.* 2006; ALBERT *et al.* 2007). Die häufigsten kortikalen Läsionen sind hierbei die subpialen Herde (WEGNER *et al.* 2006). Bereits bei früher MS können kortikale Läsionen beobachtet werden (POPESCU und LUCCHINETTI 2012).

Die Pathogenese der subpialen kortikalen Entmarkung bei der MS ist bislang nicht hinreichend verstanden. Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob meningeale Entzündungszellen an der Entstehung subpialer kortikaler Läsionen beteiligt sind. Im ersten Teil dieser Arbeit soll diese Fragestellung daher am Tiermodell der EAE in Marmosetten anhand folgender Gesichtspunkte untersucht werden:

- Gibt es eine Assoziation zwischen subpialer kortikaler Demyelinisierung und meningealer Entzündung bei Marmosetten mit früher experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis?
- Welche Zellpopulationen (T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen) finden sich in den Meningen über subpialen Läsionen im Vergleich zu den Meningen über myelinisierten Kortexarealen?
- Gibt es bei der Betrachtung der B-Zellpopulation Hinweise auf das Vorkommen von follikelartigen B-Zell-Ansammlungen in den Meningen über kortikal entmarkten Arealen?

Neben diesen Fragen zur Pathogenese der subpialen Demyelinisierung fehlen bislang auch Daten zur oligodendroglialen Pathologie in subpialen kortikal entmarkten MS-Läsionen. Die Gründe für die unzureichende Remyelinisierung der kortikalen Läsionen in späten Krankheitsstadien sind bisher nicht hinreichend geklärt. Bekannt ist, dass in späten Krankheitsstadien der MS in Läsionen der weißen Substanz die Anzahl der myelinbildenden reifen Oligodendrozyten stark abnimmt (WOLSWIJK 2000), Oligodendrozytenvorläuferzellen jedoch nachweisbar bleiben (KUHLMANN *et al.* 2008). Es scheint eine Beeinträchtigung der Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen in chronischen Läsionen der weißen Substanz vorzuliegen. Im zweiten Teil dieser Arbeit

sollen daher Oligodendrozyten und oligodendrogliale Vorläuferzellen in subpial entmarkten Läsionen bei Autopsien von MS-Patienten mit langer Krankheitsdauer charakterisiert werden und damit die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- Gibt es auch einen Verlust reifer Oligodendrozyten in chronischen subpial entmarkten Läsionen bei Autopsien von MS-Patienten?
- Zeigt sich auch eine Reduktion der Oligodendrozytenvorläuferzellen in diesen kortikalen Läsionen?
- Liefern die Ergebnisse Hinweise auf eine gestörte Proliferation und/oder Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen in chronischen kortikalen MS-Läsionen?

3 Material und Methoden

3.1 Histologisches Material

In dieser Arbeit wurde histologisches Material von Marmosetten-Affen der Spezies *Callithrix jacchus* verwendet, wobei die Durchführung der Tierexperimente im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Göttingen erfolgte. Die Experimente wurden gemäß den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986 (86/EEC) durchgeführt und von der Regierung des Bundeslandes Niedersachsen bewilligt.

Die quantitativen Analysen hinsichtlich subpialer Entzündungszellen erfolgten sowohl an gesunden als auch an mit EAE erkrankten Marmosetten.

In den Tieren wurde die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis mit dem rekombinanten Protein rMOG (rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) in Kombination mit komplettem Freundschens Adjuvans induziert. Die Erkrankungsdauer lag im Durchschnitt bei sechs Wochen (27-57 Tage). Nach dieser Zeit erhielten die Tiere eine Überdosis an Xylazin/Ketamin. Im Anschluss wurden die Marmosetten transkardial mit 200 ml Kochsalzlösung und 400 ml Fixierlösung (4% 0,1 M Natriumphosphat-gepuffertes Paraformaldehyd, pH 7,4) perfundiert. Nach Entnahme der Hirne erfolgte deren Einbettung in Paraffin.

Wie in den Tabellen ersichtlich, basierten die quantitativen Analysen auf 16 Gewebeblöcken von 8 mit EAE erkrankten Tieren (Tabelle 2) und 8 Kontrolltieren (Tabelle 1). Aus jedem Gewebestück konnten vollständige bihemisphärische, koronare Hirnschnitte gefertigt werden. In der Gruppe der erkrankten Tiere wurden 17 Schnitte, in der Gruppe der gesunden Kontrolltiere 10 Schnitte ausgewertet.

Die Schnitte der kranken Marmosetten wurden für diese Arbeit so ausgewählt, dass sie sowohl entmarkte als auch bemarkte kortikale Anteile enthielten. Alle untersuchten Hirnregionen (frontal, frontotemporal, okzipital, parietal) waren von Meningen bedeckt.

Tabelle 1: Klinische Daten der Kontrolltiere

| Kontrolltiere | Hirnregionen | Geschlecht (W/M) | Alter (Monate) |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | parietal | M | 123 |
| 2 | frontotemporal, parietotemporal | keine Angabe | keine Angabe |
| 3 | frontal, frontotemporal | M | 119 |
| 4 | frontotemporal | M | 58 |
| 5 | frontotemporal | M | 48 |
| 6 | frontotemporal | W | 33 |
| 7 | frontotemporal | M | 25 |
| 8 | frontotemporal | W | 32 |

Tabelle 2: Klinische Daten der EAE-Tiere

| EAE-Tiere | Hirnregionen | Geschlecht (W/M) | Alter (Monate) | Krankheitsdauer (Tage) |
|------------------|---|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 | frontotemporal, okzipital | W | 46 | 27 |
| 2 | frontal, frontotemporal, okzipital | M | 38 | 31 |
| 3 | frontal, parietal, okzipital | W | 49 | 42 |
| 4 | frontotemporal, okzipital | M | 47 | 39 |
| 5 | frontal, parietal | M | 29 | 31 |
| 6 | frontotemporal | M | 47 | 57 |
| 7 | frontotemporal | M | 39 | 26 |
| 8 | frontotemporal, okzipital, parietal | W | 30 | 57 |

Um die Dichte von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen in den obersten kortikalen Schichten bei MS zu untersuchen, wurden histologische Analysen an Autopsien von 5 Patienten mit MS und an 10 gesunden Kontrollfällen durchgeführt.

Das Autopsiematerial stammte vom Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Nach Fixierung in Formalin wurden von den Gehirnen Gewebeproben entnommen, die in Paraffin eingebettet wurden. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Auswahl der untersuchten Schnittpräparate und deren klinische Daten.

Tabelle 3: Klinische Daten der humanen Kontrollen

| Kontrollen | Geschlecht (W/M) | Alter (Jahre) | Todesursache | Auswertung | |
|------------|---------------------|------------------|-------------------------------------|------------|-------|
| | | | | NogoA | Olig2 |
| 1 | W | 51 | Myokardinfarkt | | x |
| 2 | M | 62 | keine Angabe | | x |
| 3 | W | 49 | keine Angabe | x | x |
| 4 | W | 35 | Asystolie, Lungenembolie | | x |
| 5 | M | 42 | Myokardinfarkt | | x |
| 6 | M | 58 | Herzversagen, Niereninsuffizienz | | x |
| 7 | W | 40 | keine Angabe | x | |
| 8 | W | 75 | Asystolie | x | |
| 9 | M | 48 | Herzversagen | x | |
| 10 | M | 43 | Sepsis | x | |

Tabelle 4: Klinische Daten der Autopsien von MS-Patienten

| Autopsien MS- Patienten | Geschlecht (W/M) | Alter (Jahre) | Krankheits- dauer (Jahre) | Verlauf | Todes- ursache |
|-------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | W | 47 | 25 | sekundär chronisch progredient | unklar |
| 2 | M | 66 | 12 | primär chronisch progredient | Ileus |
| 3 | M | 41 | 10 | chronisch progredient | Exazerbation |
| 4 | W | 60 | 25 | sekundär chronisch progredient | Pneumonie mit Sepsis |
| 5 | M | 57 | 12 | sekundär chronisch progredient | Herzversagen |

3.2 Gewebepräparation

Zur Paraffineinbettung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% für je zweimal 5 min) entwässert. Nach einem Xylol-Bad folgte das Durchtränken des Gewebes mit 60°C warmem Low Melting-Paraffin (DCS, Innovative Diagnostik-System, Hamburg, Deutschland) für dreimal 30 min. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Paraffinblöcke eingegossen.

Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mittels Mikrotom (Leica SM 2000R, Wetzlar, Deutschland) zirka 1 µm dünne, serielle Schnitte für die nachfolgenden histologischen Färbungen angefertigt und auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Schnittpräparate wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zur Vorbereitung des Gewebes auf die folgenden histologischen Färbetechniken wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert (viermal 10-minütiges Xylolbad, einmalig 5-minütiges Isoxylolbad) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils 10 min in 100%iges und dann für je 5 min in 90%iges, 70%iges, 50%iges Isopropanol und zum Abschluss in Aqua dest.).

Nach Abschluss der jeweils angewandten Färbetechnik wurde das Gewebe wässrig mit Deckgläschen eingedeckt. Als Eindeck-Medium auf Wasserbasis wurde Aqua-Mount verwendet.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Prinzipien der Immunhistochemie

Mithilfe immunhistochemischer Färbemethoden (zu diesen Verfahren vergleiche LINKER *et al.* 2002) gelingt der Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten. Diese Visualisierung von Gewebe- bzw. Zellantigenen beruht auf der Affinität spezifischer markierter Antikörper zu bestimmten Proteinstrukturen (Epitopen) des Antigens. Die Markierung erfolgte in dieser Arbeit mithilfe von Enzymen.

Die ursprüngliche und ältere Methode zur Darstellung von Antigenen ist die direkte Färbemethode, bei der ein enzymmarkierter (konjugierter) Primärantikörper direkt mit dem Gewebeantigen reagiert. Ein hinzugefügtes Substrat reagiert mit dem Enzym unter Bildung eines Farbstoffes (Substrat-Chromogen-Reaktion) und macht somit den Ort der immunhistochemischen Reaktion sichtbar.

Zur Amplifizierung des Signals werden jedoch heutzutage meist zusätzlich an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindende Sekundärantikörper verwendet. Sie können ihrerseits enzymgekoppelt oder biotinyliert sein. Diese als indirekte Färbemethode bezeichnete Technik ist sehr viel sensitiver. Eine starke Affinität von Avidin zu Biotin ermöglicht die anschließende Verwendung von Avidin-gekoppelten Enzymen. Die gebräuchlichsten und in dieser Arbeit verwandten Enzyme sind die Peroxidase, die u.a. Diaminobenzidin (DAB) umsetzt, und die Alkalische Phosphatase, die u.a. Fast Blue umsetzt. Die dazugehörigen Methoden werden als ABC- (Avidin-Biotin-Komplex) und APAAP- (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Methode bezeichnet. Sie ermöglichen die mikroskopische Auswertung der zu detektierenden histologischen Strukturen dieser Arbeit:

- meningeale CD3-positive T-Zellen, CD20-positive B-Zellen sowie IgG-positive Plasmazellen in gesunden Kontrolltieren und Marmosetten mit EAE,

- NogoA-positive Oligodendrozyten sowie stark angefärbte Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen in den oberen kortikalen Schichten bei Autopsien von MS-Patienten und Kontrollfällen.

3.3.2 Durchführung immunhistochemischer Färbemethoden

Um eine Aussage über die Dichte von Zellen in myelinisierten und demyelinisierten Hirnarealen samt der Meningen vergleichend treffen zu können, wurden Doppelmarkierungen mit einem Marker für die betreffende Zellpopulation sowie einem Marker für Myelin durchgeführt. Es ergaben sich damit folgende Kombinationen:

- für meningeale Entzündungszellen in Marmosetten mit EAE
CD3 – MBP,
CD20 - MBP,
IgG – PLP,
- für Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen in den obersten kortikalen Schichten bei Autopsiefällen von MS-Patienten
NogoA – MBP,
Olig2 – MBP (SMI94).

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebe erfolgte eine Demaskierung (Vorbehandlung) der Antigene, um einer durch den Fixierungsvorgang bedingten Quervernetzung (Maskierung) und damit geringeren Reaktivität der Epitope entgegenzuwirken (BUDKA 1983; WERNER *et al.* 2000). Die Vorbehandlungsmethode für eine optimale Antigenerkennung ist je nach verwendetem Antikörper der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Vorbehandlungsmethoden zur Antigendemaskierung

| Antigen | Vorbehandlung zur Antigendemaskierung der Gewebsschnitte von Marmosetten |
|---|---|
| IgG | Proteinase |
| CD3 | Citratpuffer (pH 6) in MW * |
| CD20 | keine Vorbehandlung |
| MBP | keine Vorbehandlung |
| PLP | Proteinase |
| Vorbehandlung zur Antigendemaskierung der humanen Gewebsschnitte | |
| NogoA | Citratpuffer (pH 6) in MW * |
| Olig2 | Tris-EDTA (pH 9) in MW* |
| SMI94 | keine Vorbehandlung |

* Mikrowelle max. 800 Watt

Vorbehandlung mit Citratpuffer

In 50 ml Citratpuffer wurden die Schnitte in einer Küvette fünfmal für jeweils 3 min in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt. Anschließend kühlten die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur ab und wurden mit Aqua dest. gründlich ab gespült.

Vorbehandlung mit Proteinase

Die Inkubation des Gewebes erfolgte für 10 min in 37 °C warmer Proteinaselösung. Im Anschluss wurden die Objektträger in Ethanol geschwenkt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Vorbehandlung mit Tris-EDTA

Die Schnitte wurden zur Demaskierung fünfmal für jeweils 3 min in einer Küvette mit Tris-EDTA in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt. Abschließend kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur ab und wurden mit Aqua dest. gründlich ab gespült.

Für sämtliche Färbungen mit DAB folgte anschließend die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid (3%ig) für 20 min bei 4° C, um eine

unspezifische Braunfärbung bei der Entwicklung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Objektträger mehrmals mit PBS gespült.

Die Visualisierung der Zellpopulationen (CD3-positive T-Zellen, CD20-positive B-Zellen, IgG-positive Plasmazellen, NogoA-positive Oligodendrozyten sowie stark angefärbte Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen) erfolgte nach der ABC- (Avidin-Biotin-Komplex) Methode mit Diaminobenzidin (DAB). In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte nach der APAAP- (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Methode mit Fast Blue behandelt, um die Myelinstrukturen (MBP, PLP) zu visualisieren.

3.3.2.1 ABC-Methode

Jeder der nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurde mit mehrmaligem Spülen der Objektträger mit PBS abgeschlossen.

Zunächst erfolgte das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit 10%iger FCS (*fetal calf serum*)/PBS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur.

Zur eigentlichen Antikörperinkubation wurden je 100 µl des Primärantikörpers (siehe Tabelle 6 und 7) auf den Schnitt gegeben. Über Nacht folgte die Inkubation in der feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4° C. Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die Zugabe des Primärantikörpers fehlte.

Am Folgetag wurden zunächst die biotinylierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation des Gewebes mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (ExtrAvidin[®], Sigma) zum Detektieren der Primärantikörper. Als Substrat der Peroxidase (Meerrettichperoxidase HRP) und als Chromogen zur Visualisierung der gebundenen Antikörper diente 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Inkubation der Schnitte in DAB-Lösung (49 ml PBS, 1 ml DAB, 20 µl 30%iges H₂O₂) variierte je nach verwendetem Primärantikörper und erfolgte, bis eine ausreichende Braunfärbung der zu markierenden Zellen erreicht war.

3.3.2.2 APAAP-Methode

Jeder der nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurde mit mehrmaligem Spülen der Objektträger mit TBS abgeschlossen.

Die Abfolge der Schritte entspricht weitgehend dem Protokoll der ABC-Methode, wobei hier zur Verdünnung TBS (*tris-buffered saline*; pH 7,5) verwendet wurde.

Das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit einer 10%igen FCS (*fetal calf serum*)/TBS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Die Primärantikörper (siehe Tabelle 6 und 7) wurden auf die Schnitte gegeben, bevor sie anschließend über Nacht bei 4 °C inkubierten. Auch hier wurde eine Negativkontrolle mitgeführt.

Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) betrug eine Stunde. Es folgte das Hinzufügen des APAAP-Komplexes (Verdünnung der Komplexbestandteile je 1:50 in 10%igem FCS). Zu dessen Herstellung wurden gereinigte alkalische Phosphatase sowie monoklonale anti-alkalische Phosphatase-Antikörper verwendet: Rbb-anti-Maus (DAKO, Z0259) und APAAP-Maus (DAKO, D0651) wurden zunächst für je eine Stunde, und ein zweites Mal für je 30 min inkubiert. Handelte es sich bei den zuvor verwandten Antikörpern um solche der Spezies Kaninchen, so ging der zweimaligen Inkubation mit Rbb-anti-Maus und APAAP Maus eine einstündige Inkubation mit Maus-anti-Rbb (DAKO, M0737) voraus. Anschließend wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer (pH 8,2) gespült.

Als Chromogen diente Fast Blue (49 ml TRIS-Puffer, 1 ml Naphtol AS Mix, 50 µl Levamisol, 25 mg Fast Blue Salz), welches für 10-20 min auf die Objektträger aufgebracht wurde.

Für eine Gegenfärbung der Zellkerne wurden alle Schnitte für 10-20 sec in eine Mayers Hämalaunlösung getaucht, in Salzsäure-Alkohol-Lösung differenziert und zum Bläuen unter fließendes Leitungswasser gestellt. Zum Abschluss erfolgte das wässrige Eindecken des Gewebes mit Aqua-Mount.

Tabelle 6: Für Marmosetten-Gewebe verwandte Primär-Antikörper

| | Antigen | Spezies | Verdünnung | Kat.-Nr. | Bezugsquelle |
|---------------------|---------|-----------|--------------------|----------|------------------------------|
| T-Zellen | CD3 | Ratte | 1:50* | MCA 1477 | Serotec, Eching, Deutschland |
| B-Zellen | CD20 | Maus | 1:50* | M0755 | Dako, Hamburg, Deutschland |
| Plasmazellen | IgG | Maus | 1:100* | MU367-UC | Biogenex, San Ramon, USA |
| Myelin | MBP | Kaninchen | 1:500 [#] | 062301 | Dako, Hamburg, Deutschland |
| | PLP | Maus | 1:250 [#] | BZL04478 | Biozol, Eching, Deutschland |

PBS = phosphate-buffered saline pH 7,4; TBS = tris-buffered saline pH 7,5

* Verdünnung in 10%iger FCS/PBS-Lösung

Verdünnung in 10%iger FCS/TBS-Lösung

Tabelle 7: Für Human-Gewebe verwendete Primär-Antikörper

| | Antigen | Spezies | Verdünnung | Kat.-Nr. | Bezugsquelle |
|---|---------|-----------|---------------------|----------|--|
| Oligodendrozyten | NogoA | Maus | 1:15 000* | privat | Schwab, Zürich, Schweiz |
| Oligodendrozyten-vorläuferzellen | Olig2 | Kaninchen | 1:300* | 18953 | IBL, Hamburg, Deutschland |
| | MBP | Kaninchen | 1:500 [#] | 062301 | Dako, Hamburg, Deutschland |
| Myelin | SMI94 | Maus | 1:5000 [#] | SMI94 | Sternberger monoclonal Inc., Lutherville, Maryland |

PBS = phosphate-buffered saline pH 7,4; TBS = tris-buffered saline pH 7,5

* Verdünnung in 10%iger FCS/PBS-Lösung

Verdünnung in 10%iger FCS/TBS-Lösung

Tabelle 8: Verwendete Sekundärsysteme

| | konjugiert mit | Verdünnung | Kat.-Nr. | Bezugsquelle |
|--|-----------------------|---|-----------------|---------------------------------------|
| ExtrAvidin[®] | Peroxidase | 1:1000 | E 2886 | Sigma, Hamburg, Deutschland |
| Anti-Maus- Antikörper | Biotin | 1:2 vorverdünnt, Endkonzentration 1:200 | RPM1001 | Amersham, Freiburg, Deutschland |
| Anti-Ratten- Antikörper | Biotin | 1:100 | E0468 | Dako, Hamburg, Deutschland |
| Anti- Kaninchen- Antikörper | Biotin | 1:2 vorverdünnt, Endkonzentration 1:500 | 111-065-144 | Dianova, Hamburg, Deutschland |

3.4 Morphometrische Auswertung und Auszählung der Zellen

Die morphometrische Analyse sämtlicher untersuchter histologischer Strukturen und Zellen erfolgte an einem Mikroskop vom Typ BX 41 der Firma Olympus (Deutschland GmbH, Hamburg). Für die Fotodokumentation wurde eine an das Mikroskop angeschlossene 12,5 Megapixel-CCD-Kamera vom Typ ColorView II von Olympus in Kombination mit der Bildanalysesoftware analySIS[®] beziehungsweise der Nachfolgeversion cell[®] (Soft Imaging System GmbH, Münster) verwendet.

3.4.1 Analyse meningealer Entzündung über subpial entmarkten Läsionen in Marmosetten mit EAE

Um zu untersuchen, ob sich die Anzahl entzündlicher Zellen in den Meningen über subpialen Läsionen von der in den Meningen über myelinisiertem Kortex unterscheidet, wurden IgG-positive Plasmazellen, CD20-positive B-Zellen und CD3-positive T-Zellen über entmarktem und bemarktem Kortex ausgezählt.

Zur Detektion von Demyelinisierung wurden die Hirnschnitte der Marmosetten einer Doppelfärbung unterzogen. Neben der betreffenden Zellpopulation wurden ebenso die Myelinstrukturen durch Antikörper gegen Myelin-Basisches Protein (MBP) beziehungsweise Proteolipid-Protein (PLP) markiert.

Myelinisierter Kortex wurde dabei als Gewebe definiert, welches keinen Hinweis auf Demyelinisierung aufgrund mikroskopischer Inspektion und Histologie aufwies. Als

demyelinisierter Kortex wurde im mikroskopischen Bild Gewebe angesehen, das einen Myelin-Verlust zeigte.

Das Auszählen der Zellen in den Meningen erfolgte dann pro Strecke angrenzend an entmarkten beziehungsweise bemarkten Kortex bei 400-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse der quantitativen Analysen sind in Zellen pro cm angegeben.

Die durch Immunhistochemie visualisierten Zellpopulationen von Plasmazellen, B- und T-Zellen wurden dann in der Auswertung berücksichtigt, wenn sie einen Zellkern mit mindestens halbmondförmiger Anfärbung der Zellmembran aufwiesen. Des Weiteren galten für die jeweiligen Zellen folgende morphologische Merkmale:

- B- und T-Zellen: schmaler regelmäßiger Zytoplasmasaum, der einen chromatindichten runden Zellkern umschließt,
- Plasmazellen: halbmondförmiger Zytoplasmasaum, welcher einen exzentrisch liegenden radspeichenartigen Kern umgibt.

3.4.2 Analyse der Dichte von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer MS

Die Quantifizierung von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen erfolgte in subpialen Läsionen und in myelinisiertem Kortex von MS-Patienten sowie bei gesunden Kontrollfällen in den obersten kortikalen Schichten. Die Kriterien von myelinisiertem Kortex und demyelinisiertem Kortex entsprechen den im vorherigen Absatz aufgeführten Kriterien.

Zur Unterscheidung von bemarkten und entmarkten Arealen wurden auch diese Schnitte, zusätzlich zu der Markierung von Oligodendrozyten (NogoA-positiv) oder Oligodendrozytenvorläuferzellen (stark Olig2-positiv), gegen MBP doppelmarkiert. Die Anzahl positiver Zellen in den kortikalen Schichten I und II wurde jeweils in demyelinisierten und myelinisierten Kortexarealen bestimmt und pro MS-Fall miteinander verglichen. Gleiches galt für positive Zellen der dritten kortikalen Schicht. Insgesamt wurden 5 MS-Fälle hinsichtlich der Dichte von Oligodendrozyten betrachtet.

Die Anzahl der Zellen wurde in standardisierten mikroskopischen Feldern eines Gitterokulars (Typ WHN10X/22 Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) bei 400-facher Vergrößerung bestimmt. Hierzu wurde das Gitter systematisch durch die, für die Auswertungen relevanten,

Hirnareale bewegt. Aufgrund der teilweise geringen Größe des Autopsiematerials beziehungsweise der zu untersuchenden Läsionen variierte die Anzahl der untersuchten Gesichtsfelder. Im Anschluss erfolgte die Umrechnung auf die Zelldichte (Zellen auf mm^2).

In der Auswertung wurden ausschließlich Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen mit Zellkern, mindestens halbmondförmigen Zellgrenzen und mikroskopisch erkennbaren typischen morphologischen Merkmalen, wie denen eines kleinen runden Zellkerns und zellulären Fortsätzen, berücksichtigt.

3.5 Statistische Auswertung

Die Aufbereitung der erhobenen Daten erfolgte mit Excel 2007. Mithilfe der Software GraphPad™ Prism 5.01 wurden die statistische Auswertung der Daten sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse vorgenommen.

Eine initiale Evaluation zur Überprüfung der Normalverteilung erfolgte anhand des Shapiro-Wilk-Tests. Daten nicht-parametrischer Verteilung wurden anhand des Mann-Whitney U-Tests analysiert. Die Auswertung parametrisch verteilter Daten hingegen erfolgte bei klarem Datenbezug mittels gepaartem T-Test. Bei parametrisch verteilten, voneinander unabhängigen Daten, wurde der ungepaarte T-Test angewandt. Der Spearman-Test diente der Auswertung nicht-parametrischer Korrelationen von Zellpopulationen untereinander. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde für normalverteilte und voneinander unabhängige Wertepaare benutzt. Jeder Datensatz wurde separat analysiert.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte unter Berücksichtigung der Standardfehler. Die Signifikanz wurde für alle Analysen auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse meningealer Entzündung über subpial entmarkten Läsionen in Marmosetten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)

Um zu untersuchen, ob meningeale Entzündung mit subpialer kortikaler Entmarkung assoziiert ist, wurden meningeale entzündliche Zellen angrenzend an subpial entmarkte Kortexareale sowie angrenzend an bemerkten Kortex von 8 EAE-Fällen quantifiziert. Des Weiteren wurde auch die Dichte meningealer Entzündungszellen über myelinisierter Hirnrinde bei 8 gesunden Marmosetten bestimmt. Bei den untersuchten meningealen Immunzellen handelte es sich um CD3-positive T-Zellen, IgG-positive Plasmazellen und CD20-positive B-Zellen.

Um sowohl die Myelinstrukturen als auch die Immunzellen detektieren zu können, wurden stets immunhistochemische Doppelmarkierungen für Myelinproteine und die entsprechende Zellpopulation durchgeführt.

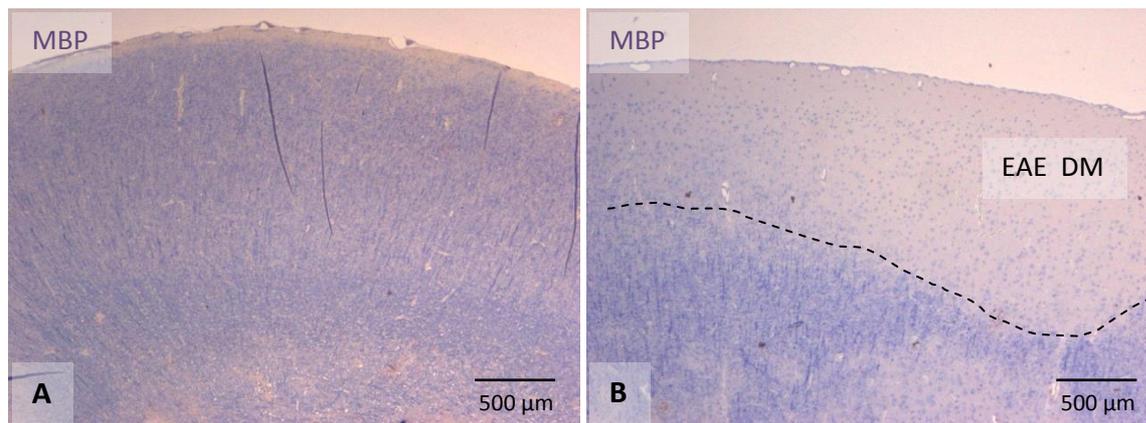
4.1.1 Nachweis subpial entmarkter und bemerkter Kortexareale bei EAE

In allen untersuchten EAE-Fällen zeigten sich sowohl bemerkte als auch entmarkte Kortexareale mit angrenzenden Meningen (Abb. 1 A, B).

Während sich in bemerkten subpialen Hirnarealen blau angefärbte myelinisierte Fasern darstellten (Abb. 1 A), war in den subpialen entmarkten Kortexarealen ein Verlust von Myelin zu beobachten (Abb. 1 B, EAE).

Die Identifizierung von Myelin erfolgte durch die Verwendung von Antikörpern gegen das Myelin-Basische Protein (MBP) (Abb. 1 A, B) oder das Proteolipid-Protein (PLP) (ohne Abbildung).

Abbildung 1: Übersicht myelinisierter und demyelinisierter Kortexareale bei EAE



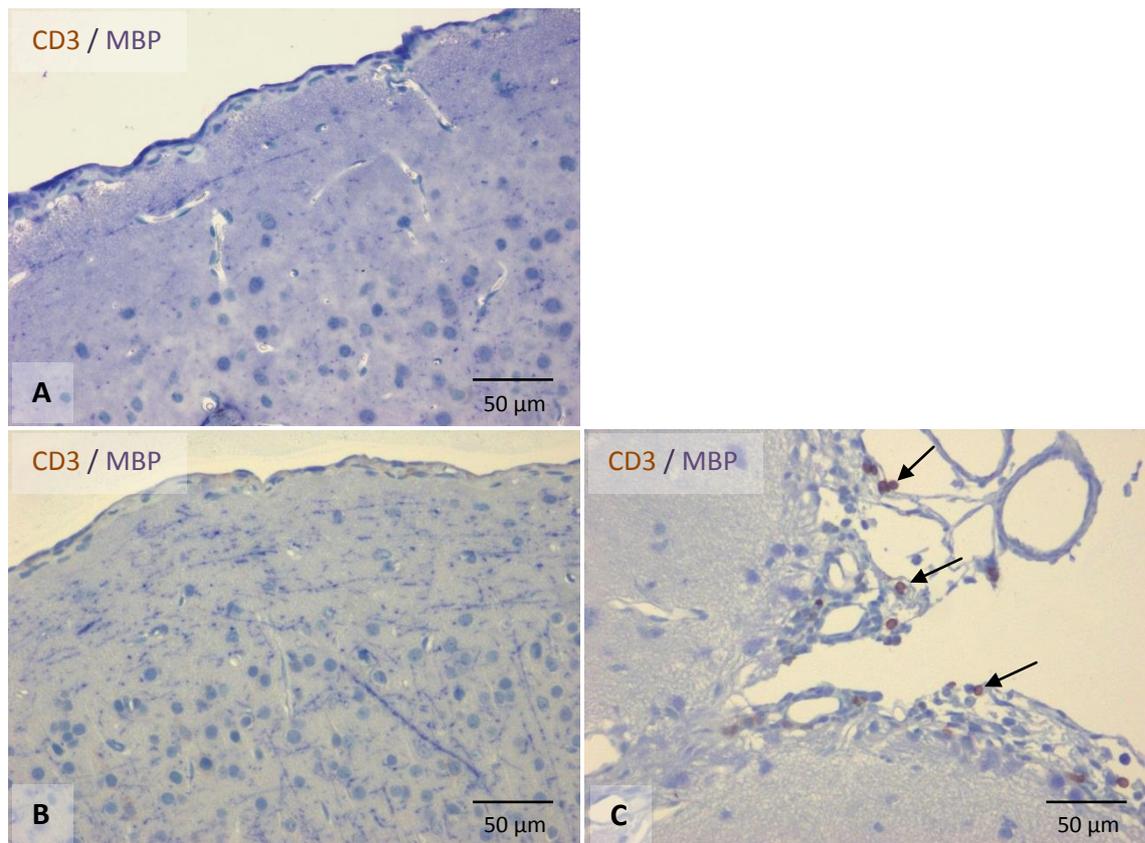
Myelinisierte (**A**) und demyelinisierte (**B**) Kortexareale bei früher EAE. Die Detektion von subpialem Myelin (blau, Fast blue) erfolgte in diesem Fall mit Antikörpern gegen das Myelin-Basisches Protein (MBP). Die subpiale entmarkte Läsion stellt sich als heller Bereich mit fehlendem Myelin in der rechten Abbildung (**1 B**) im oberen Kortex dar (**EAE DM**).

4.1.2 Erhöhte Dichte meningealer T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex

In den ausgewerteten Schnitten zeigten sich nur einzelne meningeale CD3-positive T-Zellen sowohl über den myelinisierten Hirnrinden gesunder Tiere (Abb. 2 A) als auch über den myelinisierten subpialem Hirnarealen EAE-erkrankter Tiere (Abb. 2 B).

Über den subpial demyelinisierten Kortexarealen der erkrankten Tiere (Abb. 2 C) konnten hingegen einige bis etliche meningeale T-Lymphozyten beobachtet werden. Besonders dicht waren die Entzündungszellen dort in den Meningen entlang der Sulci sowie des Gyrus cinguli.

Abbildung 2: Meningeale CD3-positive T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE

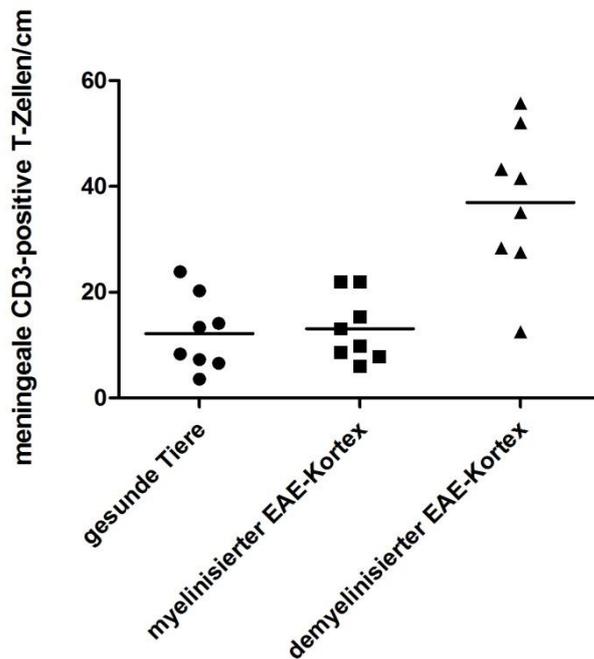


Nur einzelne meningeale CD3-positive T-Zellen (braun, DAB) waren über den myelinisierten Hirnrinden gesunder Kontrolltiere (A) als auch über dem myelinisierten Kortexgewebe der EAE-Fälle (B) zu beobachten (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue). Über demyelinisierten subpialen Hirnarealen erkrankter Tiere (C) zeigten sich hingegen etliche meningeale T-Zellen. Die Pfeile zeigen auf meningeale CD3-positive T-Zellen in Sulcusnähe über entmarktem Hirngewebe bei EAE (C).

Die Meningen über demyelinisierten Kortexarealen der EAE-Fälle zeigten mit einer durchschnittlichen Dichte von 37 ± 14 Zellen/cm hoch signifikant mehr CD3-positive T-Zellen als die Hirnhäute über myelinisierten Kortexarealen der EAE-Fälle (13 ± 6 Zellen/cm; gepaarter t-Test; $p < 0,01$; Abb. 3).

Die Dichte der CD3-positiven T-Lymphozyten in bemerkten subpialen Arealen von EAE-Tieren ähnelte mit 13 ± 6 Zellen/cm der Zelldichte über den Meningen gesunder Kontrolltiere (12 ± 7 Zellen/cm; ungepaarter t-Test; $p = 0,78$; Abb. 3).

Abbildung 3: Signifikant erhöhte Dichte meningealer CD3-positiver T-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex



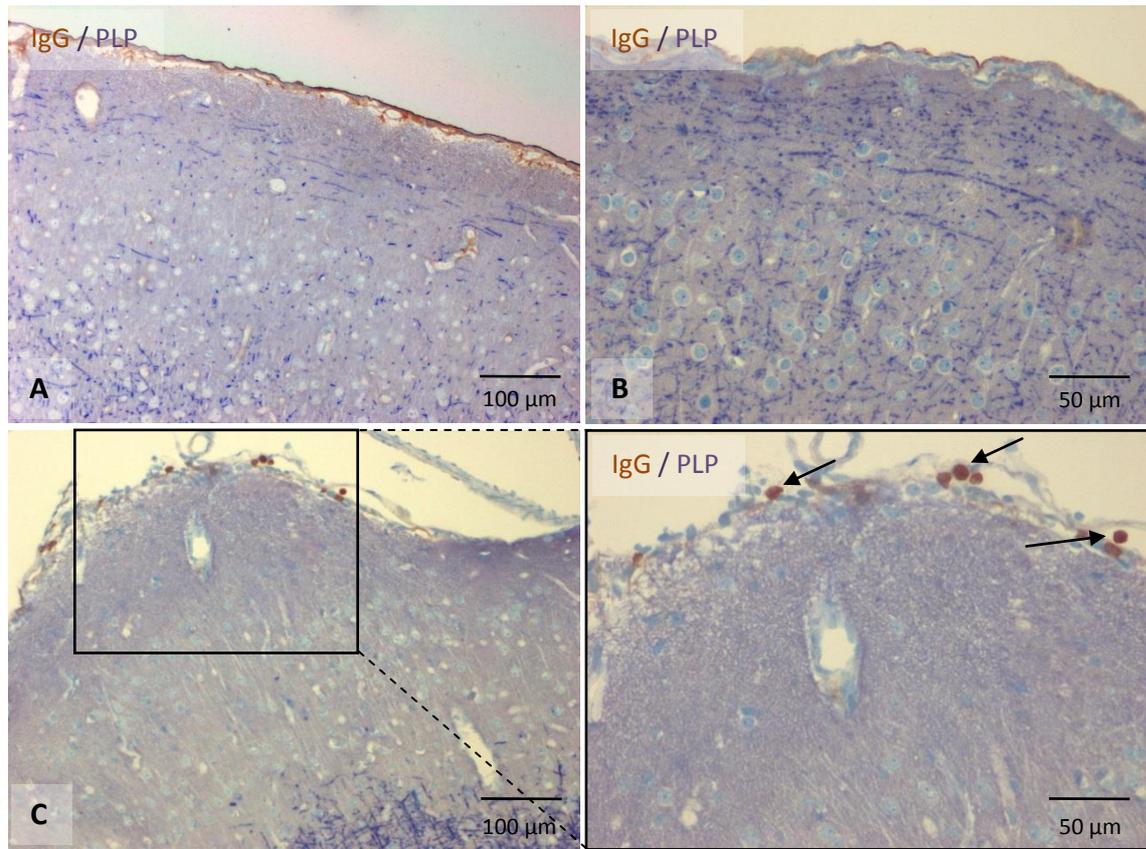
Dichte meningealer CD3-positiver T-Zellen angrenzend an subpial demyelinisierten und myelinisierten Kortex bei EAE sowie angrenzend an bemerkten Kortex der gesunden Tiere. Angegeben sind durchschnittliche Zellzahlen/cm subpialer demyelinisierter Oberfläche pro Fall. Der gepaarte t-Test zeigte eine signifikant höhere Anzahl an T-Zellen über demyelinisierten Kortexarealen im Vergleich zu bemerkten Kortexarealen der EAE-Tiere ($p < 0,01$). Die meningeale Zelldichte über dem myelinisierten Kortex der EAE-Tiere ähnelte der von gesunden Kontrolltieren.

4.1.3 Erhöhte Dichte meningealer Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex

Sowohl über den bemerkten Kortexarealen gesunder Tiere (Abb. 4 A) als auch über den bemerkten subpialen Hirnarealen der Tiere mit EAE (Abb. 4 B) konnten nur vereinzelte meningeale IgG-positive Plasmazellen beobachtet werden.

Die Meningen über entmarkten Kortexarealen der erkrankten Tiere (Abb. 4 C) zeigten hingegen einige bis etliche IgG-positive Zellen. Dort traten sie besonders dicht in den Meningen entlang der Sulci sowie des Gyrus cinguli auf. Eine Ausnahme stellte der EAE-Fall 8 dar, bei dem sich keine meningealen IgG-positiven Zellen über den ausgewerteten entmarkten Kortexarealen zeigten.

Abbildung 4: Meningeale IgG-positive Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE

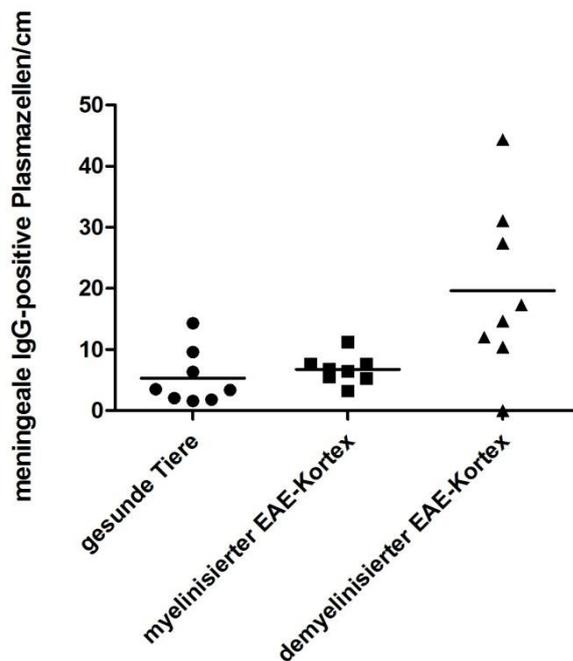


Nur einzelne meningeale IgG-positive Plasmazellen (braun, DAB) waren über der myelinisierten Hirnrinde gesunder Kontrolltiere (A) als auch über dem myelinisierten Kortexgewebe der EAE-Fälle (B) zu beobachten (Proteolipid-Protein, blau, Fast blue). Über demyelinisierten subpialen Hirnarealen erkrankter Tiere (C) zeigten sich hingegen etliche meningeale Plasmazellen. Die Pfeile zeigen auf meningeale IgG-positive Plasmazellen über entmarktem Hirngewebe bei EAE (C).

Die durchschnittliche Dichte meningealer Plasmazellen über entmarkter Hirnrinde der EAE-Fälle betrug 20 ± 14 Zellen/cm und war damit signifikant höher als die über den bemarkten Kortexarealen der EAE-Fälle (gepaarter t-Test; $p = 0,02$; Abb. 5).

In den Meningen über dem myelinisierten Kortexgewebe der EAE-Fälle waren durchschnittlich 7 ± 2 Plasmazellen/cm zu beobachten. Wie in Abbildung 5 ersichtlich wird, entsprach dies einer ähnlichen meningealen Zelldichte wie über dem Kortex der gesunden Tiere (5 ± 5 Zellen/cm; ungepaarter t-Test; $p = 0,44$).

Abbildung 5: Signifikant erhöhte Dichte meningealer IgG-positiver Plasmazellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex



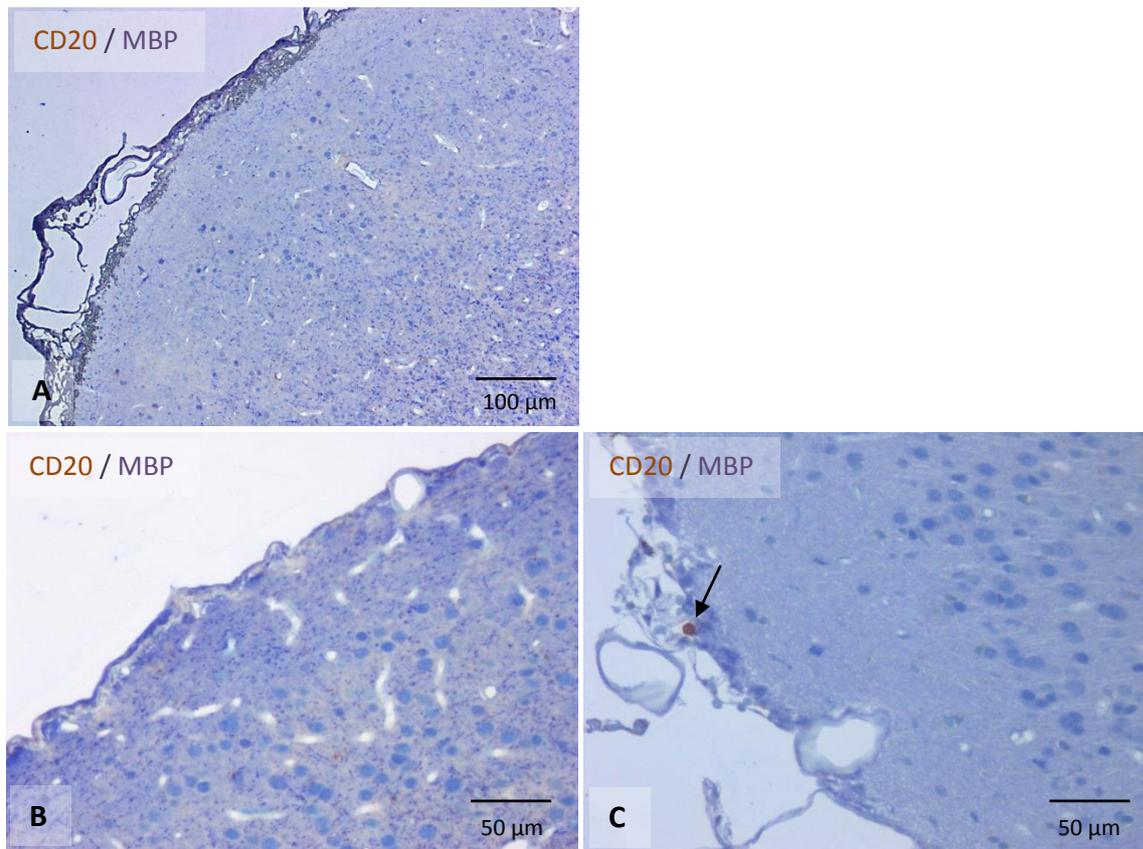
Dichte meningealer IgG-positiver Plasmazellen angrenzend an subpial demyelinisierten und myelinisierten Kortex bei EAE sowie angrenzend an bemerkten Kortex der gesunden Tiere. Angegeben sind durchschnittliche Zellzahlen/cm subpialer demyelinisierter Oberfläche pro Fall. Der gepaarte t-Test zeigte eine signifikant höhere Anzahl an Plasmazellen über demyelinisierten Kortexarealen im Vergleich zu bemerkten Kortexarealen der EAE-Tiere ($p = 0,02$). Die meningeale Zelldichte über dem myelinisierten Kortex der EAE-Tiere ähnelte der über dem Kortex der gesunden Kontrolltiere.

4.1.4 Keine erhöhte Dichte meningealer B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex

In den meisten untersuchten subpialen Kortexarealen, sowohl in entmarkten als auch bemerkten Anteilen, konnten nur vereinzelte CD20-positive B-Zellen beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine ähnlich geringe Anzahl meningealer CD20-positiver B-Zellen angrenzend an subpiale Entmarkung (Abb. 6 C) als auch an bemerkten Kortex der erkrankten (Abb. 6 B) und der gesunden Tiere (Abb. 6 A).

In den untersuchten Schnittpräparaten konnten keine B-Zellansammlungen im Sinne von Follikeln beobachtet werden.

Abbildung 6: Meningeale CD20-positive B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE

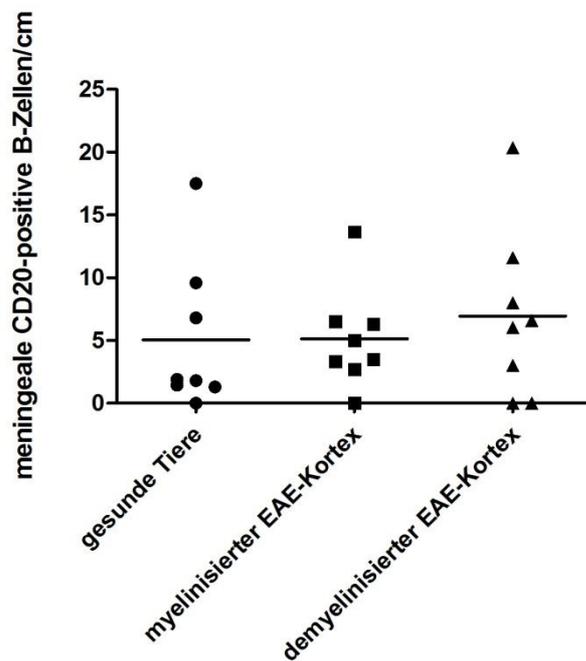


Nur vereinzelte meningeale CD20-positive B-Zellen (braun, DAB) waren in den Meningen gesunder Kontrolltiere (**A**), des myelinisierten Kortexgewebes der EAE-Fälle (**B**) (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue) als auch in den Meningen über demyelinisiertem subpialen Gewebe erkrankter Tiere (**C**) zu beobachten. Der Pfeil zeigt auf eine meningeale CD20-positive B-Zelle über dem entmarkten Hirngewebe bei EAE (**C**).

Die durchschnittliche Dichte meningealer CD20-positiver B-Zellen über dem demyelinisierten Kortex der EAE-Tiere betrug 7 ± 7 Zellen/cm, die der myelinisierten Kortexareale 5 ± 4 Zellen/cm. In den Meningen der bemerkten Kontrollfälle war eine Dichte von 5 ± 6 CD20-positiven B-Zellen/cm zu beobachten.

Damit ergab sich eine ähnlich niedrige Zelldichte der meningealen B-Zellen über dem demyelinisierten und über dem myelinisierten Kortexarealen der EAE-Fälle (gepaarter t-Test; $p = 0,48$; Abb. 7). Auch die Meningen der gesunden Kontrolltiere ähnelten, wie in Abbildung 7 deutlich wird, in ihrer subpialen B-Zell-Dichte den myelinisierten Kortexarealen der EAE-Fälle (Mann-Whitney U-Test; $p = 0,60$).

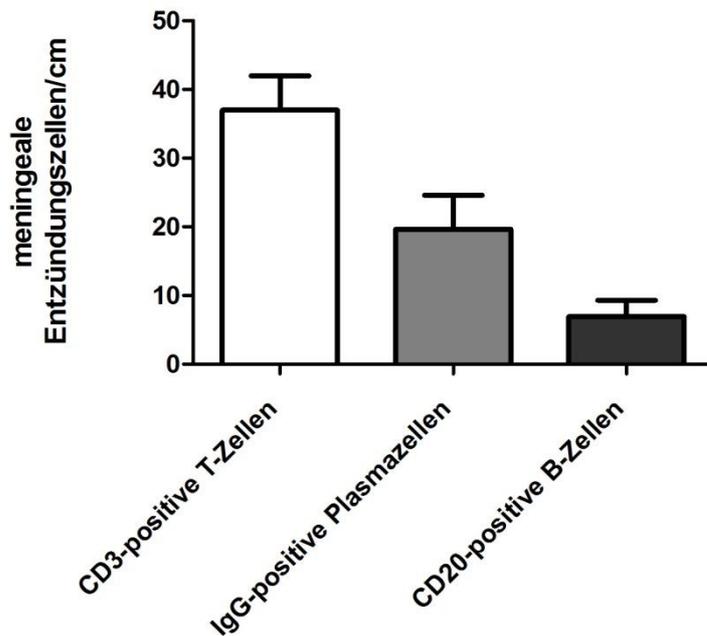
Abbildung 7: Ähnliche Dichte meningealer CD20-positiver B-Zellen angrenzend an subpial entmarkten Kortex



Ähnliche Dichte meningealer CD20-positiver B-Zellen angrenzend an subpial demyelinisierten und myelinisierten Kortex bei EAE sowie angrenzend an bemarkten Kortex der gesunden Tiere. Angegeben sind durchschnittliche Zellzahlen/cm subpialer demyelinisierter Oberfläche pro Fall. Die meningeale Zelldichte über dem myelinisierten und demyelinisierten Kortex der EAE-Tiere ähnelte der über dem Kortex der gesunden Kontrolltiere.

In der Zusammenschau zeigte die Auswertung der Entzündungszellen über dem subpial entmarkten Kortex, dass die CD3-positiven T-Zellen mit 37 ± 14 Zellen/cm die entzündlichen Infiltrate dominierten (Abb. 8). Die zweitgrößte Population bildeten die IgG-positiven Plasmazellen (20 ± 14 Zellen/cm). CD20-positiv B-Zellen waren nur vereinzelt zu beobachten (7 ± 7 Zellen/cm).

Abbildung 8: Meningeale Entzündungszellpopulationen angrenzend an subpial entmarkten Kortex bei früher EAE

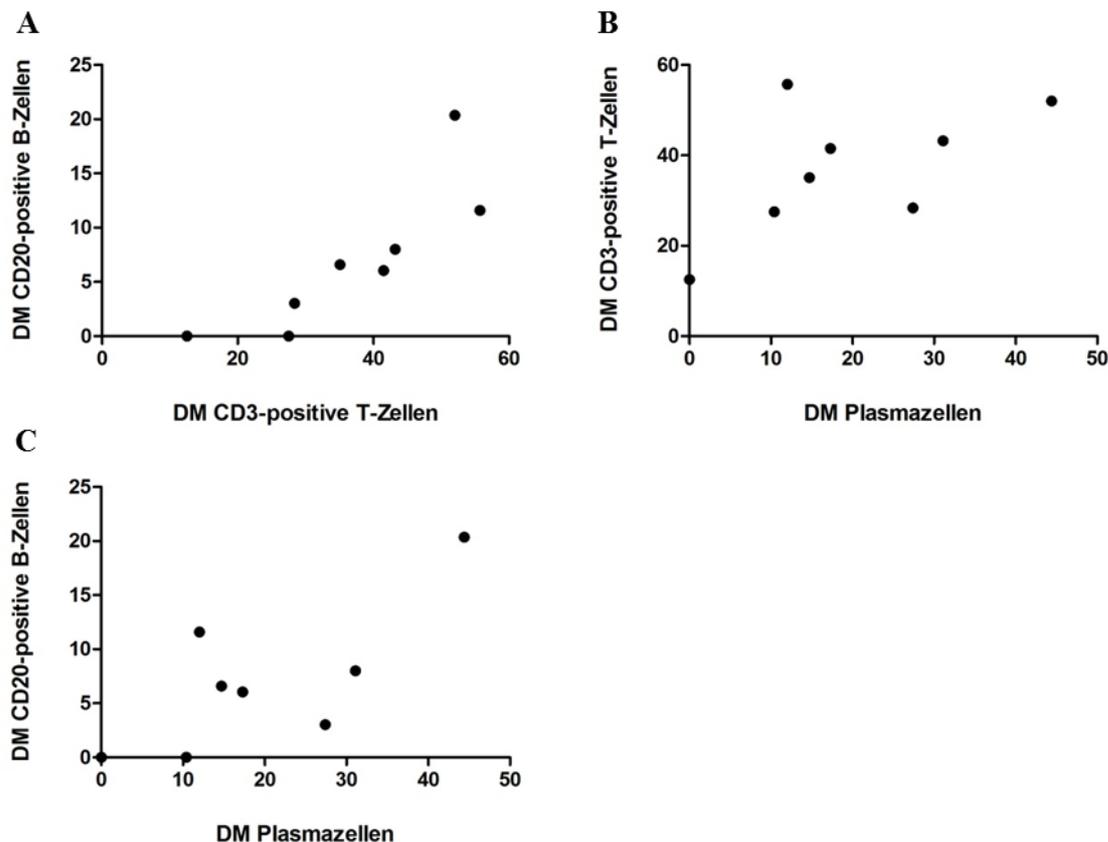


Durchschnittliche Zellzahlen/cm in den Meningen über subpialer Entmarkung. CD3-positive T-Zellen bildeten die größte Population (37 ± 14 Zellen/cm) gefolgt von Plasmazellen (20 ± 14 Zellen/cm) und CD20-positiven B-Zellen (7 ± 7 Zellen/cm).

Um zu untersuchen, ob die Dichte der T-Zellen mit der Dichte der anderen Entzündungszellen assoziiert war, wurden Spearman-Korrelationsanalysen der Entzündungszellpopulationen (CD3-positive T-Zellen, IgG-positive Plasmazellen, CD20-positive B-Zellen) über entmarkten Regionen bei mit EAE erkrankten Marmosetten durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten eine hoch signifikante Korrelation zwischen CD3- und CD20-positiven Lymphozyten ($p < 0,01$; $r = 0,95$; Abb. 9 A). Keine signifikante Beziehung konnte jedoch zwischen dem Vorkommen von CD3-positiven T-Zellen und IgG-positiven Plasmazellen ($p = 0,15$; $r = 0,57$; Abb. 9 B) sowie zwischen CD20-positiven B-Zellen und IgG-positiven Plasmazellen ($p = 0,08$; $r = 0,66$; Abb. 9 C) in den Meningen über den demyelinisierten Hirnarealen festgestellt werden.

Abbildung 9: Korrelation zwischen meningealen CD3- und CD20-positiven Lymphozyten über demyelinisierten Hirnarealen bei Marmosetten mit EAE



Über entmarkten Regionen bei Marmosetten mit EAE zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von CD3-positiven T-Zellen und CD20-positiven B-Zellen ($p < 0,01$) (A). Zwischen CD3-positiven T-Zellen und IgG-positiven Plasmazellen ($p = 0,15$) (B) sowie zwischen CD20-positiven B-Zellen und IgG-positiven Plasmazellen ($p = 0,08$) (C) bestanden keinerlei signifikante Assoziationen. DM = demyelinisierter Kortex von Marmosetten mit EAE.

Neben den Korrelationsanalysen der meningealen Entzündungszellen untereinander, wurde auch untersucht, ob die Krankheitsdauer mit der Dichte meningealer T-Zellen, Plasmazellen und B-Zellen korrelierte. Dabei ergab sich kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer und der Dichte der einzelnen Zellpopulationen (CD3-positiv T-Lymphozyten: $p = 0,70$; $r = -0,17$; IgG-positiv Plasmazellen: $p = 0,32$; $r = -0,41$; CD20-positiv B-Lymphozyten: $p = 0,72$; $r = -0,15$). Auch für die Gesamtdichte sämtlicher Entzündungszellen über dem demyelinisierten subpialen Kortex war keine Korrelation mit der Erkrankungsdauer der Tiere festzustellen ($p = 0,49$; $r = -0,29$; Korrelationskoeffizient nach Pearson).

Zusammenfassend für den ersten Ergebnisteil dieser Arbeit sind die durchschnittlichen Zellzahlen pro untersuchter Strecke [cm] Meningen über der pialen Oberfläche in den Tabellen 9 bis 10 aufgeführt.

Tabelle 9: Durchschnittliche Dichte meningealer Entzündungszellen angrenzend an subpiale Entmarkung (DM) sowie angrenzend an myelinisierten Kortex (M) bei 8 EAE-Fällen

| | CD3-positive | | IgG-positive | | CD20-positive | |
|-------------------|--------------|---------|-----------------|---------|---------------|---------|
| | T-Zellen/cm | | Plasmazellen/cm | | B-Zellen/cm | |
| | M | DM | M | DM | M | DM |
| EAE-Fall 1 | 9 ± 4 | 42 ± 10 | 7 ± 6 | 17 ± 10 | 0 ± 0 | 6 ± 4 |
| EAE-Fall 2 | 22 ± 11 | 52 ± 39 | 11 ± 8 | 44 ± 14 | 6 ± 11 | 20 ± 16 |
| EAE-Fall 3 | 8 ± 6 | 28 ± 10 | 5 ± 1 | 27 ± 26 | 3 ± 1 | 3 ± 3 |
| EAE-Fall 4 | 22 ± 3 | 43 ± 31 | 8 ± 1 | 31 ± 22 | 14 ± 9 | 8 ± 6 |
| EAE-Fall 5 | 6 ± 2 | 28 ± 19 | 6 ± 4 | 10 ± 7 | 3 ± 0 | 0 ± 0 |
| EAE-Fall 6 | 10 ± 0 | 56 ± 39 | 8 ± 0 | 12 ± 8 | 4 ± 0 | 12 ± 8 |
| EAE-Fall 7 | - | 35 ± 0 | 7 ± 0 | 15 ± 0 | 7 ± 0 | 7 ± 0 |
| EAE-Fall 8 | 13 ± 0 | 13 ± 0 | 3 ± 1 | 0 ± 0 | 5 ± 6 | 0 ± 0 |

Angegeben sind gerundete Mittelwerte der jeweiligen Zellpopulation ± Standardabweichung (siehe Methodenteil Kapitel 3.1 bezüglich der Schnittpräparat-Auswahl).

Tabelle 10: Durchschnittliche Dichte meningealer Entzündungszellen angrenzend an myelinisierten Kortex bei 8 Kontrollfällen

| | CD3-positive T-Zellen/cm | IgG-positive Plasmazellen/cm | CD20-positive B-Zellen/cm |
|------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Kontroll-Fall 1 | 13 ± 0 | 4 ± 0 | 10 ± 0 |
| Kontroll-Fall 2 | 7 ± 5 | 2 ± 1 | 1 ± 0 |
| Kontroll-Fall 3 | 8 ± 2 | 6 ± 4 | 1 ± 2 |
| Kontroll-Fall 4 | 20 ± 0 | 2 ± 0 | 0 ± 0 |
| Kontroll-Fall 5 | 4 ± 0 | 14 ± 0 | 18 ± 0 |
| Kontroll-Fall 6 | 14 ± 0 | 10 ± 0 | 2 ± 0 |
| Kontroll-Fall 7 | 7 ± 0 | 2 ± 0 | 7 ± 0 |
| Kontroll-Fall 8 | 24 ± 0 | 3 ± 0 | 2 ± 0 |

Angegeben sind gerundete Mittelwerte der jeweiligen Zellpopulation ± Standardabweichung (siehe Methodenteil Kapitel 3.1 bezüglich der Schnittpräparat-Auswahl).

4.2 Verminderung von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer Multipler Sklerose

Um zu untersuchen, wie sich Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen in der grauen Substanz chronischer MS-Läsionen quantitativ darstellen, wurde ihre Dichte in den obersten kortikalen Schichten in subpial entmarktem und bemerktem Kortex bei 5 Autopsie-Fällen ermittelt. Zusätzlich erfolgte in gleicher Weise die Analyse beider Zellpopulationen an myelinisierten Kortexarealen bei 10 Kontrollfällen ohne neurologische Erkrankung.

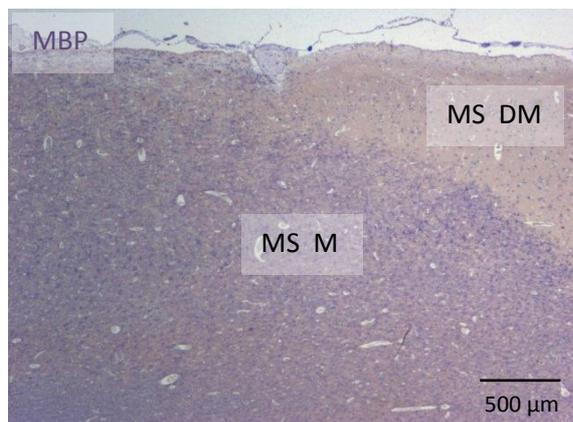
Bei den untersuchten Zellpopulationen handelte es sich um NogoA-positive Oligodendrozyten und stark angefärbte Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen. Die positiven Zellen wurden im bemerkten (Abb. 10, MS M) und entmarkten (Abb. 10, MS DM) Kortex ausgezählt. Anschließend wurde die Dichte in diesen Arealen pro Fall ermittelt.

Um sowohl Myelin als auch die Vorläuferzellen und Oligodendrozyten detektieren zu können, wurden stets immunhistochemische Doppelmarkierungen durchgeführt. Während sich in den bemerkten kortikalen Hirnarealen blau angefärbte myelinisierte Fasern darstellten

(Abb. 10, MS M), war in den subpial entmarkten Kortexarealen ein kompletter Verlust von Myelin zu beobachten (Abb. 10, MS DM).

Die Identifizierung von Myelin erfolgte durch die Verwendung von Antikörpern gegen das Myelin-Basische Protein (anti-MBP oder anti-SMI94) (Abb. 10).

Abbildung 10: Übersicht entmarkter und bemarkter Kortexareale bei chronischer MS

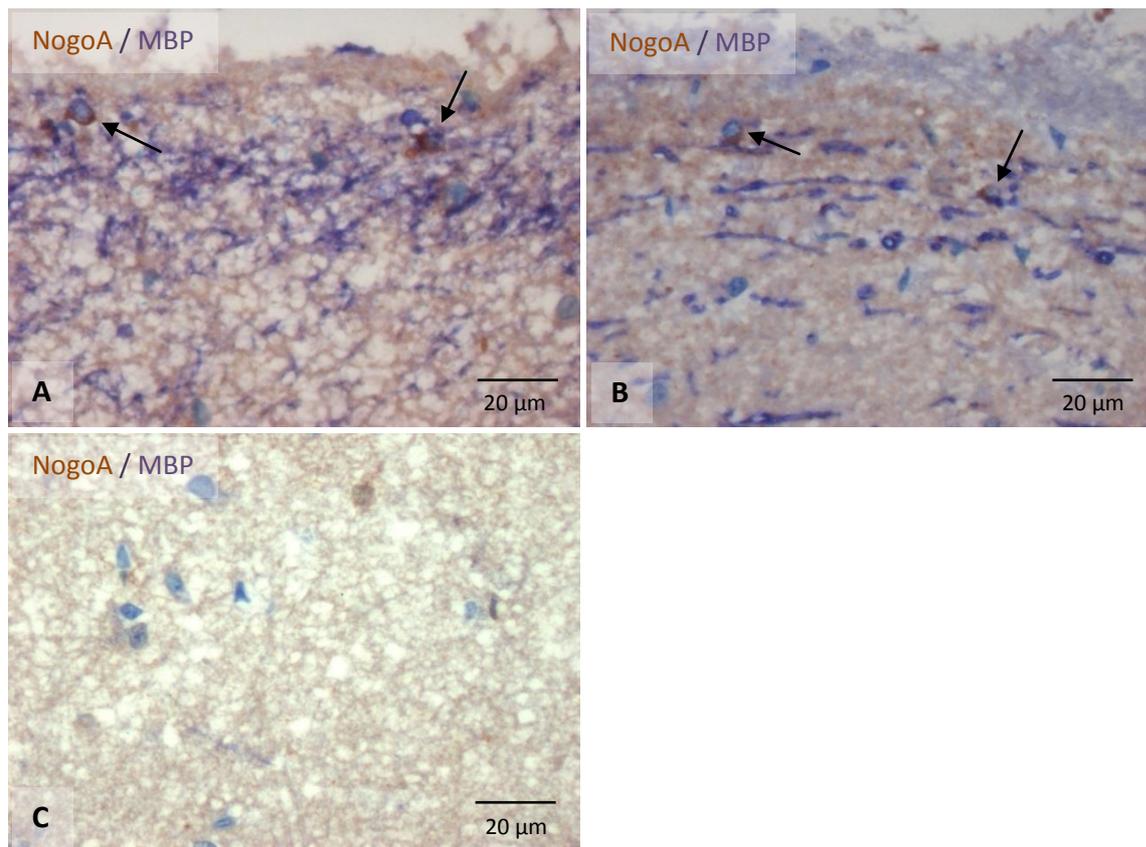


Beispiel für myelinisierte (MS M) als auch demyelinisierte (MS DM) Kortexareale bei einem Autopsie-Fall mit chronischer MS in der Übersicht. Die Detektion von Myelin (blau, Fast blue) erfolgte in diesem Fall mit Antikörpern gegen das Myelin-Basische Protein (MBP). Die kortikale Läsion stellt sich als heller Bereich im rechten oberen Bildabschnitt dar. Hier fehlt das Myelin im Vergleich zum umliegenden myelinisierten Gewebe.

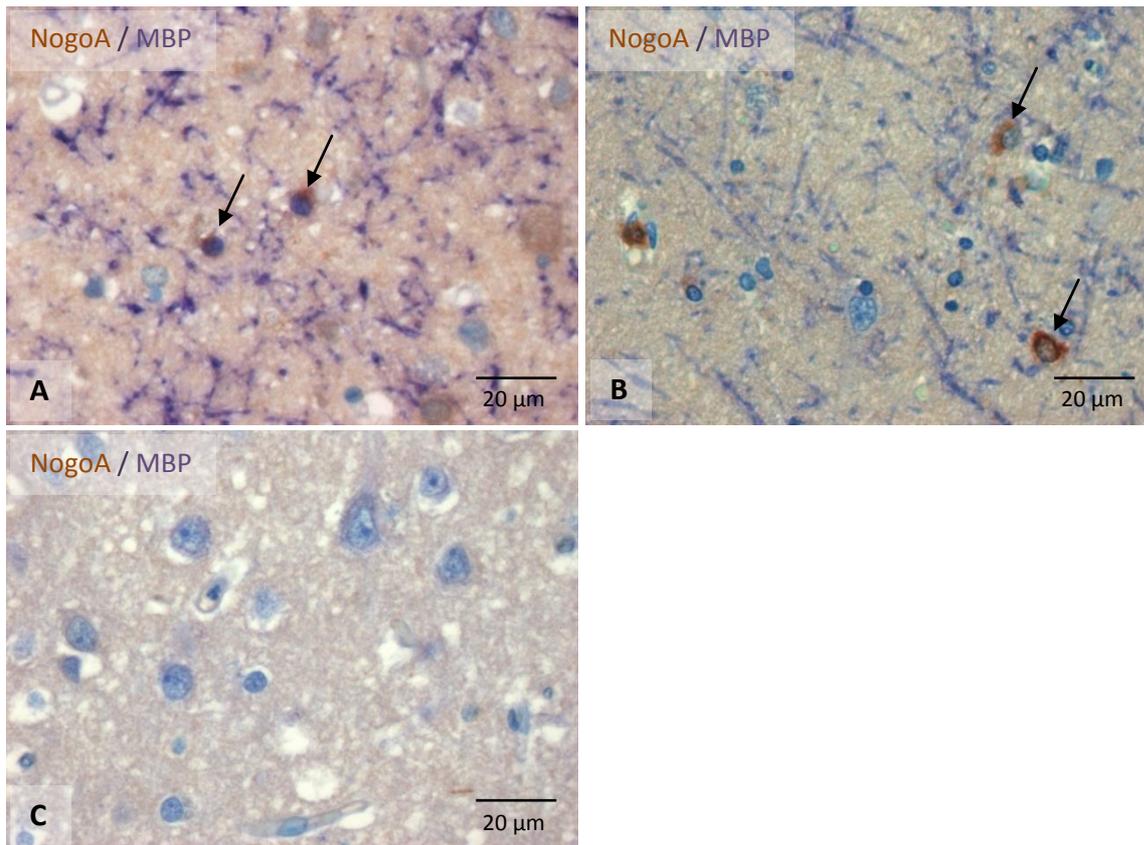
4.2.1 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten in den subpial demyelinisierten Schichten bei MS

NogoA-positive Oligodendrozyten konnten nur vereinzelt im entmarkten Kortex bei MS beobachtet werden. Dies traf sowohl für die oberflächlichen kortikalen Schichten I und II (Abb. 11 C) als auch für die kortikale Schicht III (Abb. 12 C) zu.

Etliche NogoA-positive Zellen zeigten sich hingegen im angrenzenden bemarkten subpialen Kortex der MS-Fälle, sowohl in den beiden obersten Schichten (Abb. 11 B) als auch in der Schicht III (Abb. 12 B). Die MS- (Abb. 11 B und 12 B) und Kontroll-Fälle (Abb. 11 A und 12 A) zeigten in den bemarkten Kortexarealen sowohl in den Schichten I und II (Abb. 11) als auch der Schicht III (Abb. 12) ähnlich viele NogoA-positive Zellen.

Abbildung 11: Reduktion NogoA-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS

Etliche NogoA-positive Oligodendrozyten (braun, DAB) waren in den bemarkten kortikalen Schichten I und II der Kontrollen (A) und der MS-Fälle (B) (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue) zu beobachten. Hingegen zeigten sich nur vereinzelte NogoA-positive Zellen im entmarkten Kortex (C) der Schichten I und II bei den MS-Fällen. Die Pfeile zeigen auf NogoA-positive Oligodendrozyten.

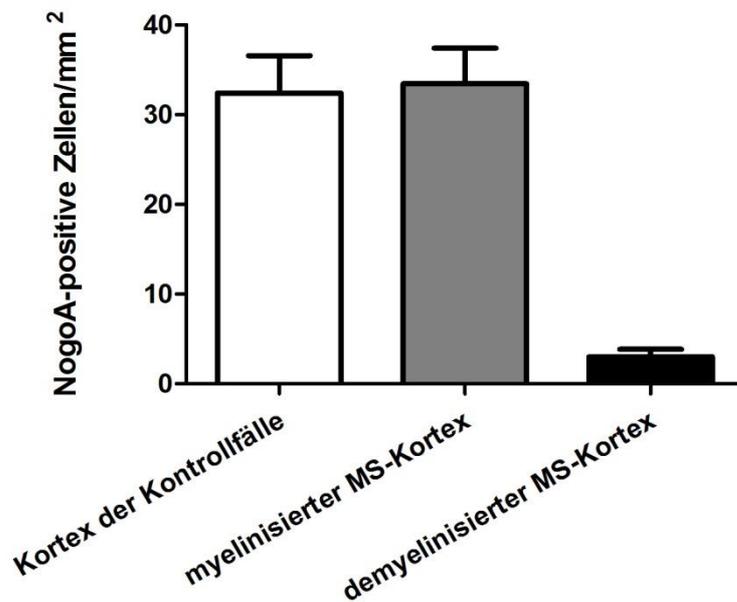
Abbildung 12: Reduktion NogoA-positiver Zellen in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS

Etliche NogoA-positive Oligodendrozyten (braun, DAB) waren in der bemerkten kortikalen Schicht III der Kontrollen (**A**) und der MS-Fälle (**B**) (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue) zu beobachten. Hingegen zeigten sich nur vereinzelt NogoA-positive Zellen im entmarkten Kortex (**C**) der Schicht III bei den MS-Fällen. Die Pfeile zeigen auf NogoA-positive Oligodendrozyten.

Die demyelinisierten Kortexareale der MS-Fälle zeigten in den Schichten I und II signifikant weniger NogoA-positive Oligodendrozyten (3 ± 2 Zellen/mm²) als die angrenzenden bemerkten Areale (33 ± 8 Zellen/mm²; gepaarter t-Test; $p < 0,01$; Abb. 13).

Der bemerkte Kortex der Kontroll- und MS-Fälle wies in den Schichten I und II eine ähnlich hohe Zelldichte NogoA-positiver Oligodendrozyten (32 ± 9 Zellen/mm² versus 33 ± 8 Zellen/mm²; ungepaarter t-Test; $p = 0,90$; Abb. 13) auf.

Abbildung 13: Reduktion NogoA-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS

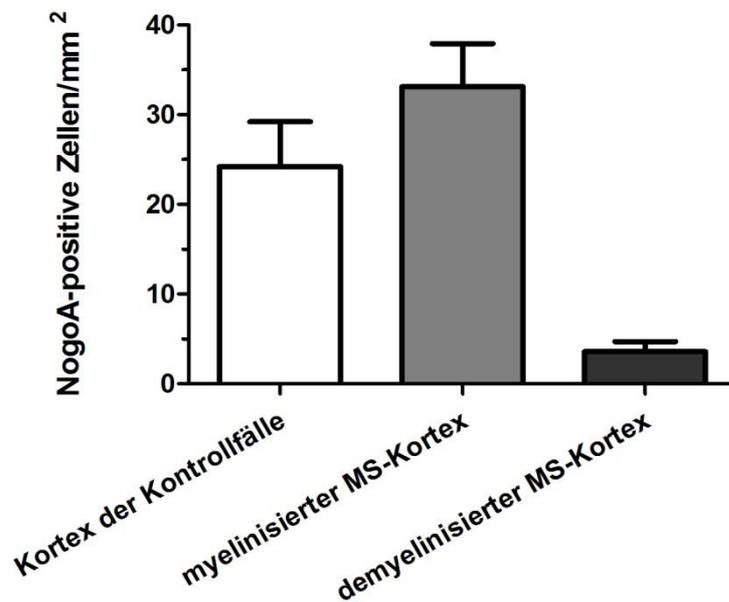


Reduzierte Dichte NogoA-positiver Oligodendrozyten in den entmarkten kortikalen Schichten I und II im Vergleich zum bemarkten MS- und Kontroll-Kortex. Angegeben ist die durchschnittliche Zellzahl/mm² pro Fall. Der gepaarte t-Test zeigte eine signifikant verminderte Dichte NogoA-positiver Oligodendrozyten in den demyelinisierten Kortextarealen der MS-Fälle ($p < 0,01$) im Vergleich zum angrenzenden myelinisierten grauen Substanz der MS-Fälle.

Bei den MS-Fällen konnte auch in der kortikalen Schicht III eine signifikante Verminderung der NogoA-positiven Oligodendrozyten in den entmarkten Kortextarealen (4 ± 3 Zellen/mm²) gegenüber den bemarkten angrenzenden Arealen (33 ± 11 Zellen/mm²) festgestellt werden (gepaarter t-Test; $p < 0,01$; Abb. 14).

Die Zelldichte im Kortex der Kontroll-Fälle (24 ± 11 Zellen/mm²) und in den myelinisierten Hirnrindenarealen der MS-Fälle (33 ± 11 Zellen/mm²) war ähnlich in der kortikalen Schicht III (ungepaarter t-Test; $p = 0,30$; Abb. 14).

Abbildung 14: Reduktion NogoA-positiver Zellen in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS



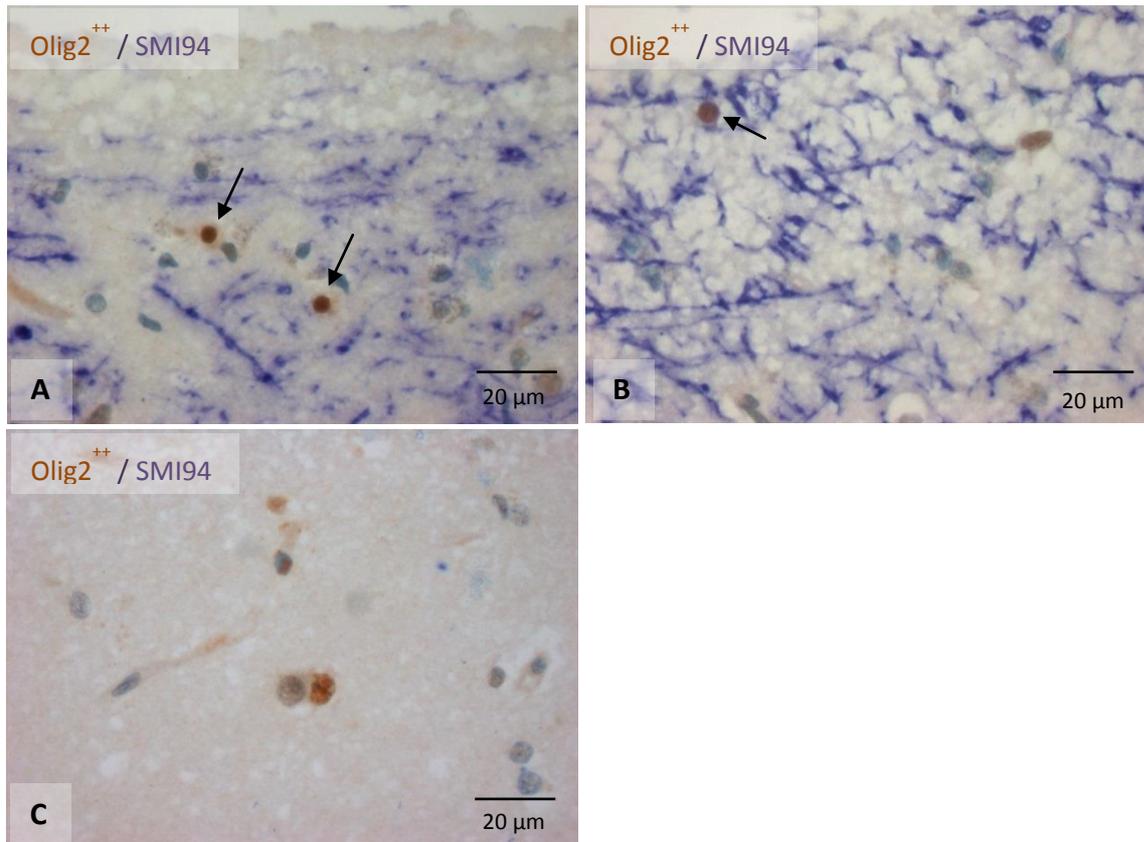
Reduzierte Dichte NogoA-positiver Oligodendrozyten in der entmarkten kortikalen Schicht III im Vergleich zum bemarkten MS- und Kontroll-Kortex. Angegeben ist die durchschnittliche Zellzahl/mm² pro Fall. Der gepaarte t-Test zeigte eine signifikant verminderte Anzahl an NogoA-positiven Oligodendrozyten in den demyelinisierten Kortexarealen der MS-Fälle ($p < 0,01$) im Vergleich zum angrenzenden myelinisierten MS Kortex. Die untersuchten Kontrollen zeigten eine ähnlich hohe Zelldichte wie die myelinisierte graue Substanz der MS-Fälle.

4.2.2 Reduktion der stark angefärbten Olig2-positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen in den subpial demyelinisierten Schichten bei MS

Oligodendrozytenvorläuferzellen, welche sich durch eine starke Kernfärbung in der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen Olig2 markierten, waren sowohl in den myelinisierten als auch in den demyelinisierten obersten Kortexarealen sämtlicher MS-Fälle nachweisbar.

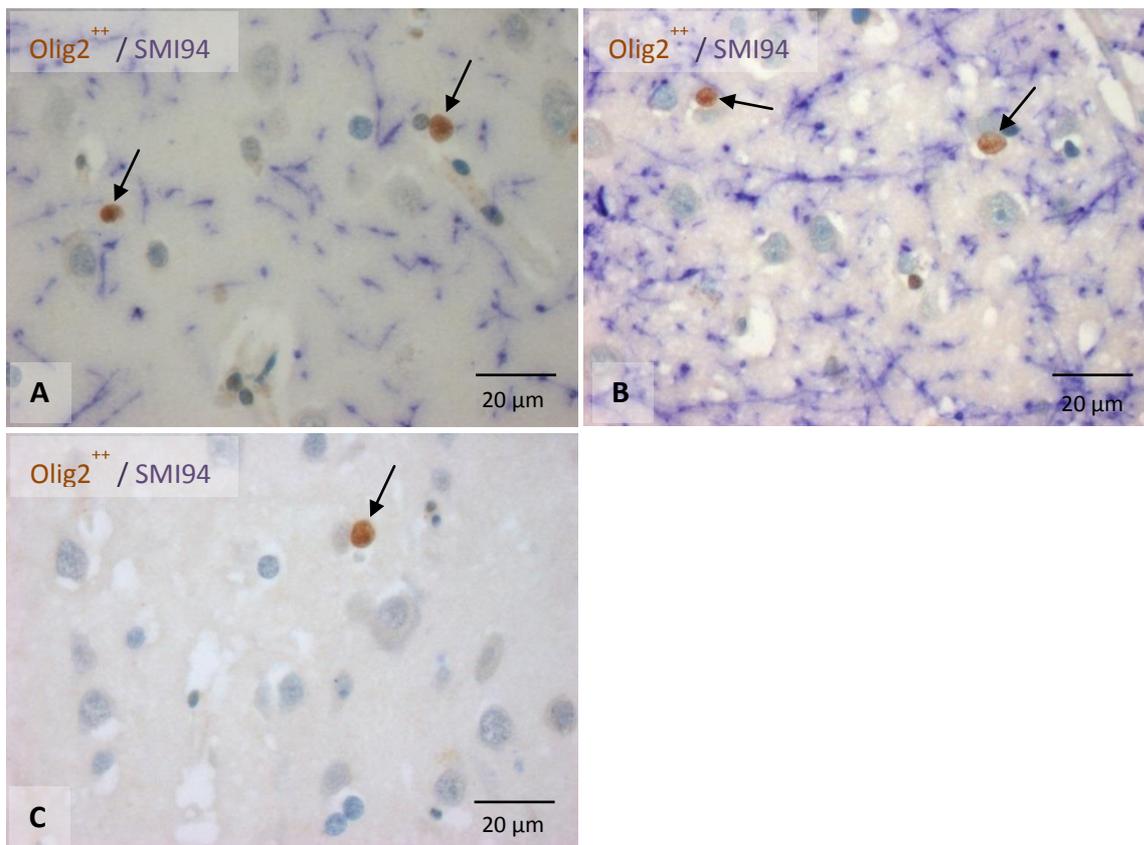
In den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS waren nur vereinzelte stark angefärbte Olig2-positive Vorläuferzellen (Abb. 15 C), in den angrenzenden bemarkten Kortexarealen (Abb. 15 B) jedoch etliche, zu erkennen. In den Analysen der Oligodendrozytenvorläuferzellen in der Schicht III zeigten sich ebenfalls nur vereinzelte stark angefärbte Olig2-positive Zellen in entmarkten Kortexarealen (Abb. 16 C), während in den bemarkten Arealen (Abb. 16 B) einige positive Zellen zu beobachten waren. Die oberen beiden kortikalen Schichten (Abb. 15 A) sowie die Schicht III (Abb. 16 A) in myelinisierten Hirnrindenarealen der Kontrollfälle zeigten ähnlich viele stark angefärbte Olig2-positive Zellen wie die entsprechenden myelinisierten Kortexareale der MS-Fälle.

Abbildung 15: Reduzierte – allerdings noch nachweisbare - stark angefärbte Olig2-positive Zellpopulation in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS



Etliche stark angefärbte Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen (Olig2⁺⁺, braun, DAB) waren in den bemarkten kortikalen Schichten I und II der Kontrollen (**A**) und der MS-Fälle (**B**) (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue) zu beobachten. Hingegen zeigten sich nur vereinzelte stark angefärbte Olig2-positive Zellen im entmarkten Kortex (**C**) der Schichten I und II bei den MS-Fällen. Die Pfeile zeigen auf stark angefärbte Olig2-positive Zellkerne.

Abbildung 16: Reduzierte – allerdings noch nachweisbare – stark angefärbte Olig2-positive Zellpopulation in der entmarkten kortikalen Schicht III bei MS

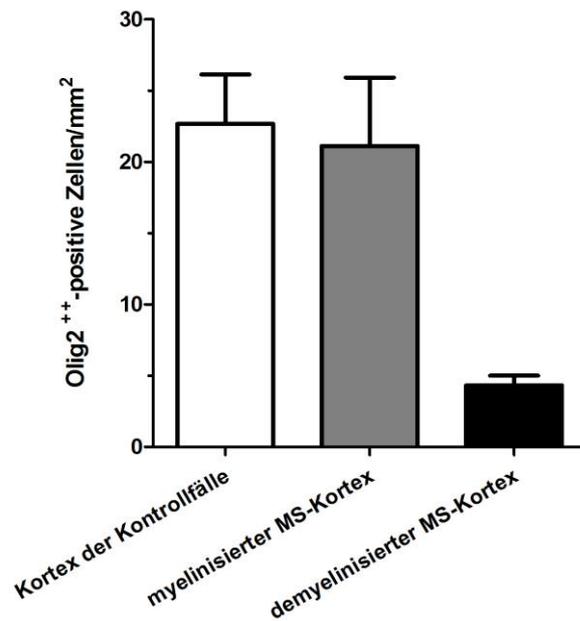


Etliche stark angefärbte Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen (Olig2⁺⁺, braun, DAB) waren in der bemerkten kortikalen Schicht III der Kontrollen (**A**) und der MS-Fälle (**B**) (Myelin-Basisches Protein, blau, Fast blue) zu beobachten. Hingegen zeigten sich nur vereinzelte stark angefärbte Olig2-positive Zellen im entmarkten Kortex (**C**) der Schicht III bei den MS-Fällen. Die Pfeile zeigen auf stark angefärbte Olig2-positive Zellkerne.

Die quantitative Auswertung in den Schichten I und II der MS-Fälle ergab in den demyelinisierten Arealen einen Trend zu niedrigeren Zellzahlen (4 ± 1 Olig2-positive Vorläuferzellen/mm²) im Vergleich zu den angrenzenden myelinisierten Gewebeanteilen (21 ± 10 Zellen/mm²; gepaarter T-Test; $p = 0,05$; Abb. 17).

Die Analysen der Kontrollen ergaben eine ähnlich hohe Zelldichte stark angefärbter Olig2-positiver Vorläuferzellen (23 ± 8 Zellen/mm²) wie in den myelinisierten Hirnrindenarealen der MS-Fälle in den Schichten I und II (21 ± 10 Zellen/mm²; ungepaarter t-Test; $p = 0,80$; Abb. 17).

Abbildung 17: Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Zellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II bei MS

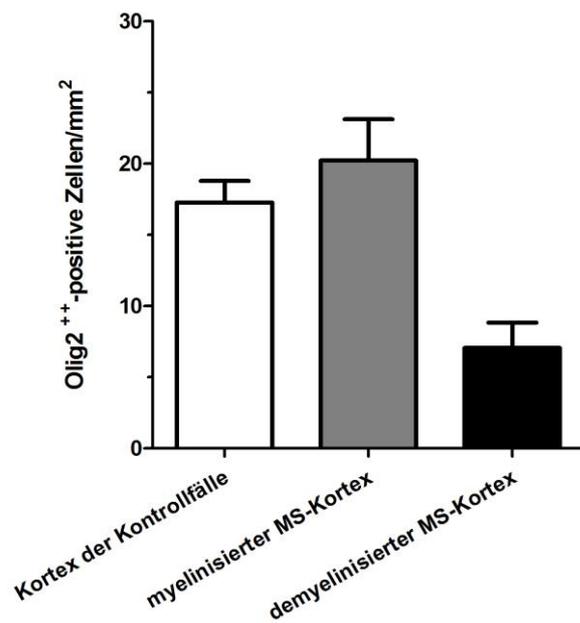


Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Oligodendrozytenvorläuferzellen in den entmarkten kortikalen Schichten I und II. Angegeben ist die durchschnittliche Zellzahl/mm² pro Fall. In den demyelinisierten Kortexarealen der MS-Fälle waren einzelne stark angefärbte Olig2-positiv Zellen (Olig2⁺⁺) weiterhin nachweisbar. Es zeigte sich allerdings ein Trend zur niedrigeren Zelldichte im Vergleich zu den myelinisierten Kortexarealen der MS-Fälle. Die untersuchten Kontrollen zeigten eine ähnlich hohe Zelldichte wie die myelinisierte graue Substanz der MS-Fälle.

Die quantitative Auswertung der kortikalen Schicht III bei chronischer MS ergab signifikant weniger stark angefärbte Olig2-positiv Oligodendrozytenvorläuferzellen in den entmarkten Kortexarealen (7 ± 4 Zellen/mm²) im Vergleich zu den myelinisierten angrenzenden Arealen (20 ± 6 Zellen/mm²; gepaarter t-Test; $p = 0,02$; Abb. 18).

Der bemerkte Kortex der Kontroll- und MS-Fälle wies hingegen in der Schicht III eine ähnlich hohe Zelldichte stark angefärbter Olig2-positiv Zellen (17 ± 4 Zellen/mm² versus 20 ± 6 Zellen/mm²; ungepaarter t-Test; $p = 0,40$; Abb. 18) auf.

Abbildung 18: Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Zellen in der oberflächlichen Schicht III bei MS



Nachweis stark angefärbter Olig2-positiver Oligodendrozytenvorläuferzellen in der entmarkten kortikalen Schicht III. Angegeben ist die durchschnittliche Zellzahl/mm² pro Fall. In den demyelinisierten Kortextarealen der MS-Fälle waren stark angefärbte Olig2-positiv Zellen (Olig2⁺⁺) weiterhin nachweisbar. Der gepaarte t-Test zeigte jedoch eine signifikant verminderte Anzahl der Oligodendrozytenvorläuferzellen in den demyelinisierten Kortextarealen der MS-Fälle ($p = 0,02$). Die untersuchten Kontrollen zeigten eine ähnlich hohe Zelldichte wie die der myelinisierten grauen Substanz der MS-Fälle.

4.2.3 Ausgeprägtere Reduktion der NogoA-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu den stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten von bis zu 88% in der Schicht III sowie von bis zu 91% in den beiden obersten kortikalen Schichten in den chronischen kortikalen MS-Läsionen im Vergleich zu den myelinisierten Hirnrindenarealen der jeweiligen Schicht (Tab. 11).

In den obersten kortikalen Schichten waren trotz der langjährigen chronischen Erkrankung einzelne stark angefärbte Olig2-positiv Vorläuferzellen in den Läsionen auffindbar. Für die Vorläuferzellen ergaben die Auswertungen eine Reduktion von 81% in den Schichten I und II, für die Schicht III eine Verminderung der Zelldichte um 65% in den demyelinisierten, im Vergleich mit den myelinisierten, Kortextarealen (Tab. 11). Zusammenfassend zeigte sich daher eine ausgeprägtere Verminderung der NogoA-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu den stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen in der entmarkten grauen Substanz bei chronischer MS.

Tabelle 11: Durchschnittliche Dichte stark angefärbter Olig2-positiver Vorläuferzellen sowie NogoA-positiver Oligodendrozyten in den kortikalen Schichten bei MS und in Kontrollen. Angaben zum Zelldichteverlust zwischen myelinisiertem und demyelinisiertem Kortex in % bei chronischer MS

| | Olig2-positiv Vorläuferzellen | Verlust in % | NogoA-positiv Oligodendrozyten | Verlust in % |
|--|--|---------------------|---|-------------------------|
| Kontrollen Schichten I und II | 23 ± 8 | | 32 ± 9 | |
| M Schichten I und II | 21 ± 10 | | 33 ± 8 | |
| DM Schichten I und II | 4 ± 1 | 81% | 3 ± 2 | 91%*** |
| Kontrollen Schicht III | 17 ± 4 | | 24 ± 11 | |
| M Schicht III | 20 ± 6 | | 33 ± 11 | |
| DM Schicht III | 7 ± 4 | 65%* | 4 ± 3 | 88 %*** |

Angegeben sind die gerundeten Mittelwerte ± Standardabweichung. M = myelinisierter MS-Kortex; DM = demyelinisierter MS-Kortex; * signifikant: < 0,05; ** signifikant: < 0,01; *** signifikant: < 0,001

5 Diskussion

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob die subpiale kortikale Entmarkung in früher EAE bei Marmosetten mit meningealer Entzündung assoziiert ist. Das zweite Ziel dieser Arbeit war, oligodendrogliale Vorläuferzellen und Oligodendrozyten in subpial entmarkten Läsionen bei Autopsien von MS-Patienten mit langer Krankheitsdauer zu charakterisieren.

Die Ergebnisse des ersten Teils zeigten, dass bei früher EAE die subpiale kortikale Entmarkung mit einer erhöhten Dichte von meningealen CD3-positiven T-Lymphozyten und IgG-positiven Plasmazellen assoziiert war. Im Vergleich dazu waren CD20-positive B-Lymphozyten nur vereinzelt sowohl über demyelinisiertem als auch myelinisiertem subpialen Kortex zu beobachten und damit nicht mit der subpialen Entmarkung assoziiert. Zusammenfassend stellten über subpial entmarkten Läsionen die T-Zellen in sämtlichen EAE-Fällen die dominierende Entzündungszellpopulation in den Meningen dar, gefolgt von Plasmazellen und nur wenigen B-Zellen.

Die Untersuchungen an Autopsien von MS-Patienten ergaben eine signifikante Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten in den obersten kortikalen entmarkten Schichten im Vergleich zu den angrenzenden markierten Kortexarealen. Stark angefärbte Olig2-positive oligodendrogliale Vorläuferzellen waren zwar in ihrer Dichte im demyelinisierten oberen Kortex ebenfalls reduziert, jedoch weiterhin nachweisbar. Diese Beobachtungen sprechen für eine Beeinträchtigung der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen in den obersten Schichten der grauen Substanz bei der chronischen MS.

5.1 Assoziation meningealer Entzündung mit subpialer Entmarkung im Tiermodell der EAE bei Marmosetten

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe des Tiermodells, der akuten EAE bei Marmosetten, gezeigt werden, dass meningeale T-Lymphozyten und Plasmazellen mit der subpialen Entmarkung bei akuter EAE assoziiert waren. Das Vorkommen CD20-positiver B-Zellen war hingegen nicht mit der subpialen Demyelinisierung assoziiert. B-Zell-Ansammlungen im Sinne von Follikeln konnten nicht nachgewiesen werden.

5.1.1 T-Zell-dominierte meningeale Entzündung bei subpialer Entmarkung

Die Auswertungen dieser Arbeit zeigten, dass meningeale Entzündung über subpial entmarkten Arealen in frühen Stadien der EAE in Marmosetten nachweisbar ist. In jedem der 8 untersuchten EAE-Fälle bildeten T-Lymphozyten in subpialen Läsionen die dominierende Zellpopulation. In den Meningen über subpialen Läsionen war die Dichte der T-Zellen - im Vergleich zu benachbarter myelinisierter Hirnrinde - signifikant um das Dreifache erhöht.

Diese Assoziation zwischen kortikaler Entmarkung und subpialer entzündlicher Immunantwort wird durch Ergebnisse von POMEROY und Kollegen unterstützt. Auch sie wiesen eine signifikante Dichtezunahme subpialer CD3-positiver T-Zellen über entmarkten kortikalen Arealen bei Marmosetten im EAE-Modell nach (POMEROY *et al.* 2005).

Es erscheint naheliegend, dass T-Zellen in den entzündlichen meningealen Infiltraten dominieren, da es sich bei der EAE um ein T-Zell-vermitteltes Tiermodell handelt.

Die T-Zell-dominierte meningeale Entzündung wurde besonders in den Hirnhäuten entlang der Sulci sowie des Gyrus cinguli deutlich. Auch B-Lymphozyten und Plasmazellen wurden bevorzugt entlang dieser Hirnhautareale beobachtet. Diese Beobachtung ist im Einklang mit Ergebnissen aus der EAE- und MS-Forschung. PETERSON und Kollegen 2001 beobachteten größere Entzündungszellpopulationen bei Autopsien von MS-Patienten in Sulci. Außerdem beschrieben POMEROY *et al.* 2005 den Kortex des Gyrus cinguli als den Ort der höchsten Dichte subpialer Läsionen bei Marmosetten mit EAE. Die vorliegende Arbeit und bereits publizierte Beobachtungen unterstützen damit die Hypothese, dass im Liquor befindliche Mediatoren eine Rolle in der Entzündungsausbreitung spielen könnten.

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen erfolgten nicht nur an Autopsien EAE-erkrankter Tiere, sondern auch an 8 Kontrollfällen. Bei allen drei Zellpopulationen war in sämtlichen untersuchten Kontrollfällen eine ähnlich niedrige Dichte meningealer Entzündungszellen wie über dem myelinisierten EAE-Kortex festzustellen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit Ergebnissen von POMEROY und Kollegen, die unter anderem auch meningeale CD3-positive T-Lymphozyten und CD20-positive B-Zellen über entmarkten subpialen Läsionen bei EAE und in Kontrollen untersuchten (POMEROY *et al.* 2005).

Die in dieser Arbeit beobachtete Assoziation von CD3-positiven T-Lymphozyten mit subpialer Entmarkung in früher EAE wird von aktuellen Ergebnissen aus der MS-Forschung untermauert. LUCCHINETTI und Kollegen konnten anhand von Biopsien bereits in frühen

Erkrankungsstadien der MS einen starken topographischen Zusammenhang von subpialer kortikaler Demyelinisierung mit meningealer Entzündung zeigen. Über den subpialen Läsionen wurden meningeale CD3- und CD8-positive T- Zellen sowie CD20-positive B-Zellen immunhistochemisch markiert. B-Zell-Ansammlungen im Sinne von Follikeln wurden selbst bei früher subpialer Entmarkung bei MS nicht beschrieben. IgG-positive Plasmazellen wurden nicht angefärbt. Aufgrund ihrer Beobachtungen gehen LUCCHINETTI und Kollegen davon aus, dass meningeale Infiltrate zu früher kortikaler Entmarkung beitragen (LUCCHINETTI *et al.* 2011).

Untersuchungen anhand von Autopsiematerial von MS-Patienten mit langer Erkrankungsdauer zeigten sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Arbeit des EAE-Tiermodells. Experimente, in denen unter anderem die Dichte von CD3-positiven T-Zellen, CD20-positiven B-Zellen und CD138-positiven Plasmazellen in den Meningen von langjährigen MS-Patienten bestimmt wurden, stellten auch eine T-Zell-Dominanz heraus (KOOI *et al.* 2009). Auch neuere Forschungsergebnisse von HOWELL und Kollegen unterstützen dahingehend das Ergebnis dieser Arbeit. Sie untersuchten die Dichte von CD3-positiven T-Zellen, CD68-positiven Monozyten und CD20-positiven B-Zellen in den Meningen über kortikalen Läsionen bei Patienten mit sekundär progressiver MS. T-Zellen stellten auch bei dieser Untersuchung die dominierende meningeale Entzündungszellpopulation über demyelinisierten kortikalen Hirnarealen dar (HOWELL *et al.* 2011).

5.1.2 Rolle humoraler Faktoren für die subpiale Entmarkung

Die subpiale kortikale Entmarkung war mit einer erhöhten Dichte meningealer Plasmazellen, aber nicht mit B-Zellen, assoziiert. B-Zell-Ansammlungen im Sinne von Follikeln konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Auch POMEROY und Kollegen beobachteten meningeale CD20-positive B-Zellen über subpialen Läsionen bei Marmosetten mit EAE. Auch sie beschrieben keine follikelartigen B-Zell-Ansammlungen (POMEROY *et al.* 2005).

Obwohl es sich bei der EAE um ein T-Zell-vermitteltes Tiermodell handelt, konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass neben den T-Zellen auch die IgG-positiven Plasmazellen, die dem letzten Stadium der Differenzierung der B-Zellreihe entsprechen, mit subpialer Demyelinisierung in früher EAE signifikant assoziiert waren.

Dass ins ZNS eingewanderte Plasmazellen zu intrathekaler Synthese von Immunglobulinen und damit zu oligoklonalem IgG im Liquor führen können, ist eine bereits in frühen

Krankheitsstadien der MS bekannte Pathologie (ROJAS *et al.* 2012). Sie wird daher routinemäßig diagnostisch genutzt. Aber auch in Primaten mit EAE wurde die intrathekale Synthese von IgG beobachtet (GALLO *et al.* 1989). Dies und insbesondere die relativ hohe Anzahl an Plasmazellen in den untersuchten Meningen über subpialer kortikaler Entmarkung, stärkt deren mögliche Relevanz für die subpiale Entmarkung.

In den Meningen über frühen subpialen Läsionen bei MS-Patienten konnten LUCCHINETTI und Kollegen zwar B-Zellen, jedoch keine B-Zell-Ansammlungen im Sinne von Follikeln beobachten (LUCCHINETTI *et al.* 2011).

Der Zusammenhang von meningealer Entzündung mit subpialer Entmarkung sowie die Relevanz von B-Zell-Follikeln bei chronisch progressiver MS wird in der Literatur kontrovers diskutiert. KOOI und Mitarbeiter konnten keinerlei Assoziation zwischen dem Ausmaß kortikaler Demyelinisierung und der Dichte meningealer Entzündungszellen bei Patienten mit chronischer MS zeigen. Dies galt sowohl für CD20-positive B-Zellen als auch für CD3-positive T-Zellen und CD138-positive Plasmazellen (KOOI *et al.* 2009). Auch die Forschungen von PETERSON *et al.* 2001 und BØ *et al.* 2003a ergaben keinerlei Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen subpialer kortikaler Entmarkung und einer vermehrten Dichte meningealer Entzündungszellen bei chronischer MS.

Dem stehen Beobachtungen anderer Forschungsgruppen entgegen: Diese stellten eine Assoziation der meningealen Entzündung, insbesondere der B-Zellen, mit subpialer Entmarkung bei der chronisch progressiven MS fest. Ihre Beobachtungen bezogen sich auf CD20-positive follikelartige B-Zell-Ansammlungen (SERAFINI *et al.* 2004; MAGLIOZZI *et al.* 2007, 2010).

Weder CHOI *et al.* 2012 noch KOOI *et al.* 2009 konnten jedoch meningeale follikelartige B-Zell-Ansammlungen über grauer Substanz bei chronischer MS beobachten und unterstützen damit das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bei früher EAE.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Beobachtungen von meningealen Entzündungszellen über frühen kortikalen MS-Läsionen legen nahe, dass B-Zellen bzw. follikelartige B-Zell-Ansammlungen keine wesentliche Rolle für die frühe subpiale Entmarkung zu spielen scheinen. Derzeit bleibt offen, inwieweit bei der fortgeschrittenen MS meningeale B-Zellen bzw. deren Ansammlungen eine Rolle spielen. Um diese Frage zu klären, bedarf es weiterer Studien.

Auch wenn meningeale B-Zellen nicht mit subpialer Entmarkung bei früher EAE assoziiert waren, so spielen nach BITSCH und BRÜCK 2002 B-Zellen bei einem bestimmten Subtyp der MS eine Rolle bei der Entstehung von Läsionen in der weißen und vermutlich auch in der grauen Substanz. Bei den bisher vier beobachteten histopathologischen Subtypen wurde neben einem durch T-Zellen und Makrophagen vermittelten Verlauf, einer distalen Oligodendrogliepathie und einer primären Oligodendrozyten-Degeneration auch ein humoral vermittelter Verlauf der Erkrankung beschrieben. Bei diesem Subtyp II der MS sind Antikörper, die sich gegen das Myelin der Markscheiden richten und das Komplementsystem aktivieren, zu beobachten (BRÜCK *et al.* 2002; BITSCH und BRÜCK 2002). Es ist anzunehmen, dass besonders Patienten diesen histopathologischen Subtyps der MS, von einer Therapie mit anti-CD20 monoklonalen Antikörpern (Rituximab[®]) profitieren. Ein partieller Erfolg mit dieser Antikörpertherapie konnte in klinischen Studien insbesondere für die schubförmige MS gezeigt werden (KEEGAN und NOSEWORTHY 2002; HAUSER *et al.* 2008).

5.1.3 Limitationen

Interessant und aufschlussreich wäre die vergleichende Untersuchung der gleichen Zellpopulationen in den Meningen über kortikalen Läsionen bei den nachfolgend untersuchten MS-Fällen gewesen. Diese Analysen waren allerdings nicht möglich, da die humanen Fälle in der Regel keine Meningen aufwiesen. Außerdem wäre bei den chronischen MS-Fällen eine sehr viel geringere Entzündungszelldichte zu erwarten, da es sich um Patienten mit langjähriger Erkrankung handelte.

Das bei diesen Untersuchungen verwandte Modell der EAE an *Callithrix jacchus*-Marmosetten ahmt viele klinische, immunologische und histopathologische Aspekte der Multiplen Sklerose nach und konnte in den letzten Jahren wiederholt wesentliche Merkmale der kortikalen Läsionen bei der MS zeigen (POMEROY *et al.* 2005; MERKLER *et al.* 2006a). Trotzdem ist die Übertragbarkeit der EAE-Forschungsergebnisse auf die MS nicht ohne Einschränkungen möglich. Die EAE ist nur bedingt in der Lage, das gesamte Spektrum der humanen Autoimmunkrankheit zu imitieren (‘t HART und AMOR 2003).

Um abschätzen zu können, inwieweit Schlüsse aus den Ergebnissen der Tiermodellforschung auf die Multiple Sklerose gezogen werden können, werden weitere vergleichende Untersuchungen benötigt. Die Forschung am Tiermodell stellt dabei eine wertvolle

Alternative dar, um zu einem besseren Verständnis der MS-Genese beizutragen, da Gewebematerial von frühen MS-Läsionen nur in geringem Maße zur Verfügung steht.

5.1.4 Zusammenfassung

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden meningeale Entzündungszellen quantitativ über subpialen EAE-Läsionen, myelinisiertem EAE-Kortex und über der Hirnrinde nicht erkrankter Tiere untersucht. Dabei legen die Ergebnisse einen kombinierten Entzündungsprozess in frühen kortikalen EAE-Läsionen bei Marmosetten nahe, wobei sowohl T-Zellen als zelluläre Komponente als auch Plasmazellen als Teil des humoralen Immunsystems eine Rolle zu spielen scheinen. CD3-positive T-Zellen dominierten die in dieser Arbeit untersuchten subpialen Läsionen. Sowohl T-Lymphozyten als auch IgG-positive Plasmazellen zeigten eine Assoziation mit kortikaler Demyelinisierung. CD20-positive B-Zellen konnten nicht mit kortikaler Entmarkung assoziiert werden. Zudem gab es keinerlei Hinweise auf das Vorkommen follikelartiger CD20-positiver B-Zell-Ansammlungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren eine Rolle bei der Entstehung subpialer Läsionen in der EAE spielen. Daher könnten Therapieansätze, die frühzeitig beide Immunkomponenten berücksichtigen, möglicherweise die kortikale Läsionsausprägung bei der EAE und im übertragenen Sinne auch bei der MS günstig beeinflussen.

5.2 Verminderung der Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen im subpial entmarkten Kortex bei chronischer MS

In den vergangenen Jahren konnte durch Untersuchungen an humanem Autopsiegewebe bei MS gezeigt werden, dass das Ausmaß der Demyelinisierung der grauen Substanz teilweise größer ist als das der weißen Substanz. Bisher war allerdings unklar, wie sich Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen in kortikalen Läsionen bei chronischer MS quantitativ darstellen und warum es mitunter nur zu einer unvollständigen kortikalen Remyelinisierung kommt. In dieser Arbeit wurde daher die Dichte von NogoA-positiven Oligodendrozyten und stark angefärbten Olig2-positiven oligodendroglialen Vorläuferzellen in Autopsien von MS-Patienten mit langjähriger Krankheitsdauer in den oberen kortikalen Schichten ermittelt.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Verlust NogoA-positiver Oligodendrozyten und eine Verminderung oligodendroglialer Vorläuferzellen in demyelinisierten kortikalen Läsionen im Vergleich zu benachbarten myelinisierten Arealen der Hirnrinde. Die

Auswertungen deuten auf eine gestörte Proliferation und Differenzierung der oligodendroglialen Zellen in der grauen Substanz hin.

5.2.1 Reduktion NogoA-positiver Oligodendrozyten

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten einen signifikanten Verlust der Oligodendrozyten in den subpial entmarkten Arealen bei chronischer MS. Die Ergebnisse bezogen sich dabei auf NogoA-positive Oligodendrozyten in den kortikalen Schichten I und II sowie der Schicht III bei Autopsien von Patienten mit langjähriger MS. Nur vereinzelte NogoA-positive Zellen konnten im entmarkten Kortex – sowohl in den Schichten I und II als auch in Schicht III - beobachtet werden. Die quantitative Auswertung ergab einen Oligodendrozyten-Verlust von 91% in den entmarkten oberen beiden kortikalen Schichten und einem Verlust von 88% in der Schicht III, im Vergleich zu den benachbarten bemerkten Hirnrindenarealen.

KUHLMANN und Kollegen konnten in publizierten Untersuchungen zeigen, dass NogoA vor allem in reifen Oligodendrozyten stark exprimiert wird und ein sehr verlässlicher immunhistochemischer Marker für humane reife Oligodendrozyten ist (KUHLMANN *et al.* 2007).

Auch ALBERT und Kollegen konnten in kortikalen entmarkten Läsionen bei Patienten mit langjähriger MS nur eine niedrige Dichte von Oligodendrozyten beobachten ($12,9 \pm 15,5$ Zellen/mm²). Die von ihnen veröffentlichten Ergebnisse beziehen sich jedoch auf MBP-positive myelinbildende Oligodendrozyten. Die absoluten Werte sind etwas höher als in der vorliegenden Arbeit, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass ALBERT *et al.* unter anderem auch die tiefen kortikalen Schichten auswerteten, die unter physiologischen Bedingungen eine höhere Oligodendrozyten-Dichte aufweisen. Insgesamt stimmen deren Ergebnisse und die der vorliegenden Arbeit jedoch überein (ALBERT *et al.* 2007).

Auch in kortikalen Läsionen bei früher MS konnte eine verminderte Anzahl an Oligodendrozyten im Vergleich zu angrenzenden myelinisierten Kortexarealen beobachtet werden. Dies zeigten kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von LUCCHINETTI und Kollegen. Sie stellten die Oligodendrozyten immunhistochemisch mittels anti-CNPase (2'3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) dar (LUCCHINETTI *et al.* 2011).

Die meisten Untersuchungen zu oligodendroglialen Veränderungen bei der MS wurden bisher an Läsionen der weißen Substanz vorgenommen. KUHLMANN *et al.* 2008 analysierten ebenfalls NogoA-positive Oligodendrozyten. Ihre Ergebnisse zeigten eine starke

Verminderung von Oligodendrozyten in Läsionen der weißen Substanz bei Patienten mit chronischer MS. Die Veröffentlichung beinhaltete jedoch keine absoluten quantitativen Ergebnisse für die Dichte NogoA-positiver Oligodendrozyten. In ihren Untersuchungen wurden die oligodendroglialen Zellen, neben NogoA, zusätzlich durch die geringe Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.2 und Olig2 quantitativ analysiert.

Untersuchungen von WOLSWIJK zeigten ebenfalls einen Verlust der Oligodendrozyten in Läsionen der weißen Substanz bei chronischer MS. Die Identifizierung von Oligodendrozyten erfolgte unter anderem mit Antikörpern gegen O4 und GalC sowie mithilfe morphologischer Kriterien (WOLSWIJK 2000).

In frühen Läsionen der weißen Substanz zeigte sich ebenfalls eine verminderte Oligodendrozyten-Dichte, die allerdings jedoch von Fall zu Fall einer starken Varianz (0-970 Zellen/mm²) unterlag (LUCCHINETTI *et al.* 1999). Die immunhistochemische Markierung erfolgte unter anderem mittels anti-MOG und anti-MBP.

Im Tiermodell der fokalen kortikalen EAE konnte die subpiale kortikale Entmarkung in der Ratte simuliert werden. Auch in diesem Tiermodell zeigte sich ein Verlust NogoA-positiver Oligodendrozyten von etwa 50% am Tag 3 nach intrazerebraler Zytokin-Injektion bei Ratten, die vorher subklinisch mit MOG immunisiert wurden. Am siebten Tag nach intrazerebraler Injektion waren die NogoA-positiven Oligodendrozyten in den Schichten III bis V wieder signifikant gestiegen – im Sinne einer beginnenden Remyelinisierung. Nach zwei Wochen war kein Unterschied mehr im Vergleich zu myelinisiertem kortikalem Gewebe auszumachen (MERKLER *et al.* 2006b). Auch beim Menschen ist eine ausgeprägte Remyelinisierung, vor allem im Kortex beschrieben worden (ALBERT *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Verlust von NogoA-positiven Oligodendrozyten im subpial entmarkten Kortex von etwa 90%. Die Tatsache, dass der Verlust NogoA-positiver Zellen in der fokalen kortikalen EAE geringer ausfällt, dürfte am ehesten durch die unterschiedliche Erkrankungsdauer begründet sein. Im EAE-Rattenmodell von MERKLER *et al.* 2006b handelte es sich lediglich um eine kurze und akute Form der Entzündung. Das in dieser Arbeit verwendete Gewebe stammt hingegen von MS-Patienten mit langjähriger Krankengeschichte.

5.2.2 Reduktion stark angefärbter Olig2-positiver Oligodendrozytenvorläuferzellen

Die stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen waren in den obersten kortikalen Schichten subpial entmarkter Läsionen bei chronischer Multipler Sklerose zwar vermindert, jedoch waren bei allen MS-Fällen immer noch einzelne Zellen präsent.

Der Verlust der Vorläuferzellen betrug 81% in den entmarkten kortikalen Schichten I und II im Vergleich zum angrenzenden myelinisierten Kortex. In den entmarkten Arealen der Schicht III ergaben die Auswertungen eine signifikante Reduktion um 65% im Vergleich zum angrenzenden bemarkten kortikalen Gewebe.

Vergleichende Ergebnisse für Olig2-positive Zellen in Läsionen der grauen Substanz gibt es bisher nicht. Mehrere Forschungsgruppen haben jedoch oligodendrogliale Vorläuferzellen in chronischen MS-Läsionen der weißen Substanz untersucht.

KUHLMANN und Kollegen zeigten die Präsenz stark angefärbter Olig2-positiver Vorläuferzellen in allen Läsionsstadien in der weißen Substanz, auch bei langjährig bestehender MS. Die Dichte in subpial entmarkten kortikalen Läsionen, die in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, liegt interessanterweise in einer ähnlichen Größenordnung wie die von KUHLMANN *et al.* ermittelte Dichte in chronischen Herden der weißen Substanz (26 ± 5 Olig2⁺⁺-positive Vorläuferzellen/mm²). Auch zeigten deren Untersuchungen einen signifikanten Verlust in Läsionen der weißen Substanz im Vergleich zur myelinisierten weißen Substanz (KUHLMANN *et al.* 2008).

WOLSWIJK identifizierte die Oligodendrozytenvorläuferzellen durch ihre Eigenschaften als O4-positiv und GalC-negativ. Seine Untersuchungen ergaben eine Dichte von bis zu $38,4 \pm 3,8$ Zellen/mm² in chronisch demyelinisierten Hirnarealen der weißen Substanz von Patienten mit einer Krankheitsdauer zwischen 9 und 46 Jahren (WOLSWIJK 2002).

Sowohl die Arbeit von WOLSWIJK als auch die Untersuchungen von KUHLMANN und Kollegen zeigten, dass Oligodendrozytenvorläuferzellen in Läsionen von MS-Fällen mit langjähriger Erkrankungsgeschichte in weißer Substanz in verminderter Anzahl nachweisbar sind. Zusammenfassend zeigt sich sowohl in chronischen kortikalen Läsionen als auch in chronischen Läsionen der weißen Substanz eine Reduktion oligodendroglialer Vorläuferzellen.

5.2.3 Ausgeprägtere Reduktion der Oligodendrozyten im Vergleich zu den Vorläuferzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen signifikanten Verlust NogoA-positiver Oligodendrozyten von 91% in den Schichten I und II sowie 88% in der Schicht III bei chronischer MS. Ebenso war ein Verlust der Oligodendrozytenvorläuferzellen von 81% in den Schichten I und II und 65% in der Schicht III nachweisbar. Damit waren in den subpialen

kortikalen Läsionen bei chronischer MS die reifen Oligodendrozyten stärker betroffen als die oligodendroglialen Vorläuferzellen.

Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten erläutert, ist bekannt, dass auch in Läsionen der weißen Substanz in späten Krankheitsstadien der MS die Anzahl der myelinbildenden Oligodendrozyten stark abnimmt. Oligodendrozytenvorläuferzellen bleiben jedoch in reduzierter Anzahl nachweisbar (WOLSWIJK 2002; KUHLMANN *et al.* 2008).

Bislang ist nicht abschließend geklärt, warum es zur unzureichenden Proliferation und Differenzierung oligodendroglialer Zellen und damit zur fehlenden oder inkompletten Remyelinisierung bei der MS kommt. Bekannt ist, dass Remyelinisierung bereits in frühaktiven Läsionen stattfinden kann (LUCCHINETTI *et al.* 1999) und in Läsionen der grauen Substanz schneller und effektiver verlaufen kann, als in entmarkten Regionen weißer Substanz (ALBERT *et al.* 2007).

Als Ursachen für den Verlust von Oligodendrozyten werden immunologische Einflüsse von Makrophagen (GRIOT *et al.* 1990), zytotoxischen T-Zellen (LININGTON *et al.* 1993), freien Radikalen (GRIOT *et al.* 1989) und humoralen Faktoren vermutet (LASSMANN *et al.* 1988). Aber auch eine erhöhte Vulnerabilität der Oligodendrozyten durch Apoptose oder eine primäre Degeneration könnten in einigen Fällen bei diesem Prozess eine Rolle spielen (LUCCHINETTI *et al.* 2000; BRÜCK *et al.* 2002; LASSMANN *et al.* 2003).

Oligodendrozytenvorläuferzellen sind selbst in langjährig bestehenden, chronischen MS-Läsionen der weißen und, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, auch in chronischen Läsionen der grauen Substanz, zu finden. Diese Tatsache ist ein Hinweis dafür, dass die limitierte Remyelinisierung nicht nur auf einen Mangel an Vorläuferzellen zurückgeführt werden kann. Es liegt vielmehr nahe, dass die oligodendroglialen Vorläuferzellen durch den Erkrankungsprozess in ihrer Proliferation und Differenzierung beeinträchtigt werden. Hinweise darauf geben Ergebnisse von Studien mit dem Proliferationsmarker Ki67, die eine relative Inaktivität der Vorläuferzellen in chronischen Läsionen der weißen Substanz zeigen konnten (WOLSWIJK 1998).

Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Reduktion der stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen in Kombination mit einem Proliferations- und Differenzierungsverlust zum Ausbleiben der Remyelinisierung in lang bestehenden kortikalen MS-Läsionen führen könnte. Analog zu den Voruntersuchungen in den Läsionen der weißen Substanz, könnten folgende Faktoren zur fehlenden Remyelinisierung beitragen: eine gestörte

Interaktion zwischen myelinisierenden Zellen und Axonen (CHANG *et al.* 2002) sowie der Mangel an Wachstumsfaktoren z.B. von IGF1 und TGF- β 1 (MCMORRIS und MCKINNON *et al.* 1996) oder von TNF- α und IL1- β (MASON *et al.* 2001). Weitere Studien sind nötig, um die Faktoren, welche die oligodendrogliale Repopulation und Differenzierung sowie die nachfolgende Remyelinisierung positiv beeinflussen, besser zu verstehen.

5.2.4 Limitationen

In dieser Arbeit erfolgte die Identifizierung von Oligodendrozyten mithilfe des Markers NogoA, die der Oligodendrozytenvorläuferzellen mithilfe des Markers Olig2.

NogoA wurde in einer Studie von KUHLMANN und Kollegen 2007 im Vergleich mit anderen Arten oligodendroglialer Markierung (PLP, mRNA und CC1) als verlässlicher Marker für humane reife Oligodendrozyten in der weißen und grauen Substanz beschrieben. In ihren Untersuchungen zeigte NogoA keine Kreuzreaktionen mit Astrozyten oder Mikrogliazellen. Eine Veröffentlichung von 2008 gibt jedoch Hinweise darauf, dass das in oligodendroglialen Zellen exprimierte NogoA nicht nur spezifisch diese Zellen markiert, sondern auch Astrozyten und Neurone markieren kann (KUHLMANN *et al.* 2008). Zudem konnte die Expression von NogoA in den innersten und äußersten Myelinschichten, retinalen Ganglienzellen, Neuronen des Vorderhorns und in Ganglienzellen der Hinterwurzel im Rückenmark beobachtet werden (HUBER *et al.* 2002; WANG *et al.* 2002; BUSS *et al.* 2005). Um oligodendrogliale Vorläuferzellen in bemarkten und entmarkten Kortextarealen identifizieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit stark angefärbte Olig2-positive Zellen ausgewertet. Die starke Expression des Proteins Olig2 konnte bereits in mehreren Publikationen in Oligodendrozytenvorläuferzellen beobachtet werden (KUHLMANN *et al.* 2008; LIGON *et al.* 2006; ZHOU *et al.* 2000). Nach heutigem Stand ist es der Marker, mit dem sich die Vorläuferzellen besonders früh, sogar vor der Expression von PDGFR-alpha, erkennen lassen (LU *et al.* 2001). Eine schwache Expression von Olig2 konnte hingegen sowohl im ZNS von Mäusen (KITADA und ROWITCH 2006) als auch im menschlichen ZNS (KUHLMANN *et al.* 2008) in reifen Oligodendrozyten beobachtet werden.

5.2.5 Zusammenfassung

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Dichte von reifen Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen in langjährig bestehenden, subpial entmarkten MS-Läsionen und in angrenzenden myelinisierten Arealen in den oberen kortikalen Schichten bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Verlust NogoA-positiver Oligodendrozyten in entmarkten subpialen Läsionen verglichen mit benachbarten myelinisierten Arealen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Beobachtungen in chronischen MS-Läsionen der weißen Substanz. Die stark angefärbten Olig2-positiven Vorläuferzellen waren in den subpialen kortikalen Läsionen zwar weiterhin nachweisbar, aber in ihrer Dichte ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zum angrenzenden myelinisierten Kortex. In den Läsionen war die relative Reduktion der reifen Oligodendrozyten ausgeprägter als die der oligodendroglialen Vorläuferzellen. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine gestörte Proliferation und Differenzierung der oligodendroglialen Zellen in kortikalen Läsionen hin. Diese Befunde ähneln den vorbeschriebenen Veränderungen in chronischen Läsionen der weißen Substanz bei der MS.

6 Zusammenfassung

Die meisten Patienten mit chronischer MS weisen kortikale entmarkte Läsionen auf. Die häufigsten kortikalen Läsionen sind hierbei subpial kortikal entmarkte Herde. Die Pathogenese der subpialen kortikalen Entmarkung bei der MS ist bislang nicht hinreichend verstanden. Kontrovers diskutierte Vorarbeiten weisen auf eine Beteiligung meningealer Entzündungszellen hin. Auch liegen bisher wenige Daten zur oligodendroglialen Pathologie in subpialen kortikal entmarkten MS-Läsionen vor.

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob die subpiale kortikale Entmarkung mit meningealer Entzündung in einem Tiermodell der MS assoziiert ist. Das zweite Ziel dieser Arbeit war, Oligodendrozyten und oligodendrogliale Vorläuferzellen in subpial entmarkten Läsionen bei Autopsien von MS-Patienten mit langer Krankheitsdauer zu charakterisieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde an *Callithrix-jacchus*-Marmosetten mit früher experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) immunhistochemisch untersucht, ob meningeale Entzündungszellen mit der subpialen kortikalen Entmarkung assoziiert sind. Gesunde Marmosetten wurden hierbei als Kontrollgruppe vergleichend herangezogen.

Die Ergebnisse dieses Teils zeigten, dass mehr meningeale Entzündungszellen über den subpial entmarkten kortikalen Arealen als über myelinisierten Arealen bei den EAE-Tieren nachweisbar waren. Hierbei waren meningeale Entzündungszellen bevorzugt in den Meningen in der Nähe der Sulci und über dem Gyrus cinguli zu erkennen. Über entmarkten Kortexarealen zeigte sich eine signifikante, dreifach höhere Dichte an meningealen T-Zellen sowie Plasmazellen als über angrenzenden myelinisierten Kortexarealen. Für diese beiden Zellpopulationen war damit eine Assoziation mit subpialer kortikaler Entmarkung nachweisbar. Für die rar vorkommenden B-Zellen zeigte sich hingegen kein Zusammenhang mit der subpialen Demyelinisierung. Zudem gab es keinerlei Hinweise auf das Vorkommen follikelartiger CD20-positiver B-Zell-Ansammlungen.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren bei der Entstehung subpialer Läsionen im Tiermodell der EAE bei Marmosetten eine Rolle spielen. Daher könnten Therapieansätze, die frühzeitig beide Immunkomponenten berücksichtigen, möglicherweise die Entstehung subpialer kortikaler Läsionen hemmen. Meningeale B-Zellen bzw. B-Zell-Follikel scheinen jedoch für die

Entstehung subpialer Läsionen bei früher EAE nicht relevant zu sein. Eine Assoziation von B-Zellen bzw. B-Zell-Follikeln mit subpialer Entmarkung konnte bisher nur bei Autopsien von Patienten mit langjähriger MS beobachtet werden, wobei selbst diese Ergebnisse kontrovers diskutiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden reife NogoA-positive Oligodendrozyten und Olig2-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen mittels Immunhistochemie in subpialen kortikal entmarkten Läsionen und im angrenzenden myelinisierten Kortex bei Patienten mit langjähriger MS untersucht. Die Dichte wurde jeweils in den oberen kortikalen Schichten in demyelinisierten Läsionen, in bemarktem MS-Kortex und in myelinisiertem Kortex von Kontrollfällen an humanem Autopsiegewebe ermittelt.

Die quantitativen Analysen zeigten einen signifikanten Verlust reifer Oligodendrozyten von ca. 90% in entmarkten im Vergleich zu bemarkten subpialen Kortexarealen. Einzelne oligodendrogliale Vorläuferzellen waren in demyelinisierten Arealen meist noch nachweisbar und zeigten insgesamt eine etwas geringgradigere Reduktion von 65-81% im Vergleich zu myelinisierten kortikalen Arealen.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit Untersuchungen an chronischen MS-Läsionen der weißen Substanz. Diese Erkenntnisse liefern Hinweise dafür, dass die fehlende Remyelinisierung nicht nur auf einen Mangel an Vorläuferzellen zurückzuführen ist, sondern auch eine gestörte Proliferation und Differenzierung in chronischen kortikalen Läsionen vorliegt.

Zusammenfassend führen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem besseren Verständnis dafür, welche Faktoren an der frühen kortikalen Läsionsentstehung beteiligt sind und welche Mechanismen zum Ausbleiben der kortikalen Remyelinisierung bei chronischer MS beitragen. Die Erkenntnisse des ersten Teils deuten darauf hin, dass immunmodulatorische Therapien zu Beginn der Erkrankung möglicherweise auch die meningeale Entzündung und damit auch die subpiale kortikale Entmarkung reduzieren könnten. Die Ergebnisse des zweiten Teils weisen darauf hin, dass remyelinisierungsfördernde Therapien potentiell zu einer Verbesserung der oligodendroglialen Proliferation und Differenzierung und damit zur effizienteren kortikalen Remyelinisierung - gegebenenfalls auch noch in späteren Erkrankungsstadien - beitragen könnten.

Anhang

Tabelle 12: Kurtzke-Skala (*expanded disability status scale, EDSS*) zur Beurteilung des Behinderungsgrades bei MS (KURTZKE 1983)

| Art und Grad der Behinderung | |
|--|------------|
| Normale neurologische Untersuchung in allen FS | 0,0 |
| Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem FS | 1,0 |
| Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem FS | 1,5 |
| Minimale Behinderung in einem FS | 2,0 |
| Minimale Behinderung in 2 FS | 2,5 |
| Mäßiggradige Behinderung in einem FS oder leichte Behinderung in 3 oder 4 FS, aber noch voll gehfähig | 3,0 |
| Voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem FS und einem oder 2 FS Grad 2 oder 2 FS Grad 3 oder 5 FS Grad 2 | 3,5 |
| Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden am Tag trotz relativ schwerer Behinderung | 4 |
| Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität; benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung | 4,5 |
| Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen | 5 |
| Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität unmöglich zu machen | 5,5 |
| Bedarf intermittierend oder auf einer Seite konstant Unterstützung durch Krücke, Stock oder Schiene, um etwa 100 m ohne Rast zu gehen | 6 |
| Benötigt konstant beiderseits Hilfsmittel, um etwa 20 m ohne Rast zu gehen | 6,5 |
| Unfähig, selbst mit Hilfe mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt Rollstuhl selbst, transferiert ohne Hilfe | 7 |
| Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen | 7,5 |
| Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden. Pfl egt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme | 8 |
| Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme. Einige Selbstpflege möglich | 8,5 |
| Hilfloser Patient im Bett, kann essen und kommunizieren | 9 |
| Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren | 9,5 |
| Tod infolge Multipler Sklerose | 10 |

FS = funktionelle Systeme

Tabelle 13: Aktuelle Diagnoseleitlinien der Multiplen Sklerose (eigene Darstellung in Anlehnung an McDONALD *et al.* 2001; POLMAN *et al.* 2011)

| Klinisches Erscheinungsbild | Zusätzlich erforderliche Daten für die MS-Diagnose |
|---|---|
| ≥ 2 Schübe; objektiver klinischer Nachweis von ≥ 2 Läsionen <u>oder</u> objektiver klinischer Nachweis von einer Läsion mit einem anamnestisch begründeten Hinweis auf einen vorausgegangenen Schub | keine |
| ≥ 2 Schübe; objektiver klinischer Nachweis von einer Läsion | räumliche Dissemination im MRT <u>oder</u> weiterer klinischer Schub |
| 1 Schub; objektiver klinischer Nachweis von ≥ 2 Läsionen | zeitliche Dissemination im MRT <u>oder</u> 2. klinischer Schub |
| 1 Schub; objektiver klinischer Nachweis einer Läsion (Klinisch isoliertes Syndrom) | räumliche Dissemination im MRT <u>und</u> zeitliche Dissemination im MRT <u>oder</u> 2. klinischer Schub |
| Neurologische Progression, die auf eine MS hinweist (PPMS) | mind. 1 Jahr Krankheitsprogression <u>plus</u> 2 der folgenden 3 Kriterien: 1. Hinweis auf räumliche Dissemination aufgrund ≥ 1 T2-Läsionen in den MS- typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell) 2. Hinweis auf räumliche Dissemination im Rückenmark aufgrund ≥ 2 spinaler T2- Läsionen 3. positiver Liquorbefund (oligoklonale Banden und/oder erhöhter IgG-Index) |

IgG = Immunglobulin G; MRT = Magnetresonanztomographie; MS = Multiple Sklerose; PP-MS = *primary-progressive MS*; ZNS = zentrales Nervensystem

Die in der Tabelle genannten Kriterien sind an folgende Bedingungen geknüpft:

- Ein Schub ist als das Auftreten neuer oder das Wiederaufflammen bereits bekannter klinischer Symptome (subjektiver Patientenbericht oder durch Untersuchung objektiviert) definiert, die länger als 24 Stunden anhalten, in Abwesenheit von Fieber

oder Infektionen auftreten und definitionsgemäß frühestens 30 Tage nach einem vorausgegangenem Schub auftreten.

- Für die Feststellung von räumlicher Dissemination wurden die bisher nach BARKHOF und TINTORE (BARKHOF *et al.* 1997; TINTORE *et al.* 2003) gültigen Kriterien von SWANTON und Kollegen erneuert. Danach ist die räumliche Dissemination durch das Vorhandensein von mindestens einer T2-Läsion in der MRT in mindestens zwei von vier MS-typischen Regionen des ZNS (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, Rückenmark) (SWANTON *et al.* 2006, 2007) oder durch das Auftreten eines weiteren klinischen Schubes, welcher eine weitere Lokalisation im ZNS einbezieht, belegt.
- Die zeitliche Dissemination kann durch das gleichzeitige Vorhandensein asymptomatischer Gadolinium-aufnehmender und nicht-aufnehmender Läsionen oder den Nachweis einer neuen T2- und/oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion in der Kontroll-MRT (zeitunabhängig vom magnetresonanztomographischen Ausgangsbefund) oder durch das Auftreten eines zweiten klinischen Schubes nachgewiesen werden (MONTALBAN *et al.* 2010).

Literaturverzeichnis

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

Aloisi F, Serafini B, Magliozzi R, Howell OW, Reynolds R (2010): Detection of Epstein-Barr virus and B-cell follicles in the multiple sclerosis brain: what you find depends on how and where you look. *Brain* 133, 1-5

Alter M, Okihiro M (1971): When is multiple sclerosis acquired? *Neurology* 21, 1030-1036

Archelos JJ, Hartung HP (2000): Pathogenetic role of autoantibodies in neurological diseases. *Trends Neurosci* 23, 317-327

Bakshi R, Hutton GJ, Miller JR, Radue EW (2004): The use of magnetic resonance imaging in the diagnosis and long-term management of multiple sclerosis. *Neurology* 63, 3-11

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Ader HJ, Losseff N, Valk J (1997): Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120, 2059-2069

Bayas A, Gold R (2003): Lessons from 10 years of interferon beta-1b (Betaferon/Betaseron) treatment. *J Neurol* 250 Suppl 4, IV3-IV8

Bitsch A, Brück W (2002): Differentiation of multiple sclerosis subtypes: implications for treatment. *CNS Drugs* 16, 405-418

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

Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mork SJ (2003)a: Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler* 9, 323-331

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

Bø L, Geurts JJ, van der Valk P, Polman C, Barkhof F (2007): Lack of correlation between cortical demyelination and white matter pathologic changes in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 64, 76-80

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

Brink BP, Veerhuis R, Breij EC, van der Valk P, Dijkstra CD, Bø L (2005): The pathology of multiple sclerosis is location-dependent: no significant complement activation is detected in purely cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 147-155

Brok HP, Hornby RJ, Griffiths GD, Scott LA, Hart BA (2001): An extensive monoclonal antibody panel for the phenotyping of leukocyte subsets in the common marmoset and the cotton-top tamarin. *Cytometry* 45, 294-303

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

Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2002): The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 8, 93-97

Budka H (1983): Immunohistological demonstration of serum proteins and structural and viral antigens in paraffin sections of nervous tissues. *Ann N Y Acad Sci* 420, 176-184

Buss A, Sellhaus B, Wolmsley A, Noth J, Schwab ME, Brook GA (2005): Expression pattern of NOGO-A protein in the human nervous system. *Acta Neuropathol* 110, 113-119

Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, Sommer N, Hemmer B (2005): Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115, 1352-1360

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

Charcot JM (1868): Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop* 141, 554-558

Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, Nicholas R, Roncaroli F, Reynolds R (2012): Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 135, 2925-2937

Clark D (2004): Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 11 Suppl 2, 112A-119A

Coles AJ (2013): Alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 33, 66-73

Compston A (1999): The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1623-1634

Corboy JR, Goodin DS, Frohman EM (2003): Disease-modifying Therapies for Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 5, 35-54

Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, Koopman WJ, Hader W, Baskerville J, Ebers GC (1999): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122, 625-639

Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Rache MK (2004): High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103, 4222-4231

de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415-5423

Fogdell A, Hillert J, Sachs C, Olerup O (1995): The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5*0101 allele. *Tissue Antigens* 46, 333-336

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006): Multiple sclerosis - the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942-955

Gallo P, Cupic D, Bracco F, Krzalic L, Tavolato B, Battistin L (1989): Experimental allergic encephalomyelitis in the monkey: humoral immunity and blood-brain barrier function. *Ital J Neurol Sci* 10, 561-565

Gilbert JJ, Sadler M (1983): Unsuspected multiple sclerosis. *Arch Neurol* 40, 533-536

Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971

Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Jr., Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, van den Noort S (2002): Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58, 169-178

Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R (2001): [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* 72, 577-589

Griot C, Burge T, Vandeveld M, Peterhans E (1989): Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination. *Acta Neuropathol* 78, 396-403

Griot C, Vandeveld M, Richard A, Peterhans E, Stocker R (1990): Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun* 11, 181-193

Gronning M, Riise T, Kvale G, Albrektsen G, Midgard R, Nyland H (1993): Infections in childhood and adolescence in multiple sclerosis. A case-control study. *Neuroepidemiology* 12, 61-69

Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsberg P (2004): A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 109, 270-275

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676-688

Hedström AK, Sundqvist E, Baarnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L (2011): Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain* 134, 653-664

Hein T, Hopfenmüller W (2000): [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71, 288-294

Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R (2011): Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2755-2771

Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME (2002): Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22, 3553-3567

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J (2001): A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 669-676

Jersild C, Ammitzboll T, Clausen J, Fog T (1973): Association between HL-A antigens and measles antibody in multiple sclerosis. *Lancet* 1, 151-152

Keegan BM, Noseworthy JH (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285-302

Kieseier BC, Jeffery DR (2010): Chemotherapeutics in the treatment of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 3, 277-291

Kitada M, Rowitch DH (2006): Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord. *Glia* 54, 35-46

Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9, 520-532

Kooi EJ, Geurts JJ, van Horssen J, Bø L, van der Valk P (2009): Meningeal inflammation is not associated with cortical demyelination in chronic multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 1021-1028

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212

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

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

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

Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452

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

Lassmann H (1998): Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 4, 93-98

Lassmann H, Brunner C, Bradl M, Linington C (1988): Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. *Acta Neuropathol* 75, 566-576

Lassmann H, Suchanek G, Ozawa K (1994): Histopathology and the blood-cerebrospinal fluid barrier in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 Suppl, S42-S46

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115-121

Lassmann H, Reindl M, Rauschka H, Berger J, Aboul-Enein F, Berger T, Zurbriggen A, Lutterotti A, Brück W, Weber JR (2003): A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 126, 1347-1357

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17, 210-218

Leary SM, Thompson AJ (2005): Primary progressive multiple sclerosis: current and future treatment options. *CNS Drugs* 19, 369-376

Ligon KL, Fancy SP, Franklin RJ, Rowitch DH (2006): Olig gene function in CNS development and disease. *Glia* 54, 1-10

Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu HC, Lassmann H, Wekerle H (1993): T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23, 1364-1372

Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M (2002): CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8, 620-624

Lu QR, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, Alzamora MG, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH (2001): Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 98, 10851-10856

Lucchinetti C, Brück 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, 2279-2295

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

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

Lumsden CE (1971): The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res* 28, 365-390

Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F (2007): Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089-1104

Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, Roncaroli F, Nicholas R, Serafini B, Aloisi F, Reynolds R (2010): A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68, 477-493

Marrie RA, Wolfson C (2001): Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: a review. *Epidemiol Infect* 127, 315-325

Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK (2001): Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21, 7046-7052

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127

McMorris FA, McKinnon RD (1996): Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol* 6, 313-329

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

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

Milligan NM, Newcombe R, Compston DA (1987): A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 511-516

Minagar A, Alexander JS (2003): Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9, 540-549

Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C (2010): MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 74, 427-434

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

Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI (1972): Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 2, 1-4

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

Olerup O, Hillert J (1991): HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1-15

Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Brück W, Budka H, Jellinger K, Lassmann H (1994): Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 117, 1311-1322

Panitch HS, McFarlin DE (1977): Experimental allergic encephalomyelitis: enhancement of cell-mediated transfer by concanavalin A. *J Immunol* 119, 1134-1137

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

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302

Pomeroy IM, Matthews PM, Frank JA, Jordan EK, Esiri MM (2005): Demyelinated neocortical lesions in marmoset autoimmune encephalomyelitis mimic those in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2713-2721

Popescu BF, Lucchinetti CF (2012): Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurol* 12, 11

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

Quelvennec E, Bera O, Cabre P, Alizadeh M, Smadja D, Jugde F, Edan G, Semana G (2003): Genetic and functional studies in multiple sclerosis patients from Martinique attest for a specific and direct role of the HLA-DR locus in the syndrome. *Tissue Antigens* 61, 166-171

Rojas JI, Patrucco L, Tizio S, Cristiano E (2012): Oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid and increased brain atrophy in early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 70, 574-577

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH (1988): Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29, 533-541

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ, . (1993): A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 33, 281-285

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

Schilling S, Linker RA, König FB, Koziol M, Bahr M, Müller GA, Paulus W, Gartner J, Brück W, Chan A (2006): [Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients]. *Nervenarzt* 77, 430-438

Schreiber K, Sørensen PS, Koch-Henriksen N, Wagner A, Blinkenberg M, Svarer C, Petersen HC (2001): Correlations of brain MRI parameters to disability in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 104, 24-30

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

Sellebjerg F, Frederiksen JL, Nielsen PM, Olesen J (1998): Double-blind, randomized, placebo-controlled study of oral, high-dose methylprednisolone in attacks of MS. *Neurology* 51, 529-534

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004): Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14, 164-174

Sloka JS, Stefanelli M (2005): The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 11, 425-432

Sørensen PS, Fazekas F, Lee M (2002): Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur J Neurol* 9, 557-563

Sospedra M, Martin R (2005): Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747

Stangel M, Gold R (2005): Intravenous Immunoglobulins in MS. *Int MS J* 12, 5-10

Stephan H, Manolescu J (1980): Comparative investigations on hippocampus in insectivores and primates. *Z Mikrosk Anat Forsch* 94, 1025-1050

Stratton CW, Sriram S (2003): Association of Chlamydia pneumoniae with central nervous system disease. *Microbes Infect* 5, 1249-1253

Sun D, Tani M, Newman TA, Krivacic K, Phillips M, Chernosky A, Gill P, Wei T, Griswold KJ, Ransohoff RM (2000): Role of chemokines, neuronal projections, and the blood-brain barrier in the enhancement of cerebral EAE following focal brain damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 1031-1043

Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH (2006): Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 830-833

Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Huerga E, Miszkiel KA, Plant GT, Polman C (2007): MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 6, 677-686

't Hart BA, Amor S (2003): The use of animal models to investigate the pathogenesis of neuroinflammatory disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 16, 375-383

Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F (1996): Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39, 233-240

Taylor I, Butzkueven H, Litewka L, MacGregor LR, Szoeki C, Cook M, Mitchell P, Kilpatrick TJ, Tubridy N (2004): Serial MRI in multiple sclerosis: a prospective pilot study of lesion load, whole brain volume and thalamic atrophy. *J Clin Neurosci* 11, 153-158

Thompson AJ, Kermode AG, Moseley IF, MacManus DG, McDonald WI (1993): Seizures due to multiple sclerosis: seven patients with MRI correlations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56, 1317-1320

Tintore M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grive E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sanchez E, Comabella M, Montalban X (2003): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology* 60, 27-30

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

van Horssen J, Bø L, Vos CM, Virtanen I, de Vries HE (2005): Basement membrane proteins in multiple sclerosis-associated inflammatory cuffs: potential role in influx and transport of leukocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 722-729

Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM (2002): Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 22, 5505-5515

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

Weinshenker BG (1998): The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 18, 301-307

Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000): Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24, 1016-1019

Wolinsky JS (2006): The use of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98, 273-292

Wolswijk G (1998): Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 18, 601-609

Wolswijk G (2000): Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 123, 105-115

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

Zarei M, Chandran S, Compston A, Hodges J (2003): Cognitive presentation of multiple sclerosis: evidence for a cortical variant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 872-877

Zhang J, Raus J (1994): Myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis: pathologic relevance and therapeutic targeting. *Cytotechnology* 16, 181-187

Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000): Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25, 331-343

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück sowie Frau Dr. Dr. med. Christiane Theodossiou-Wegner dafür danken, mir diese wissenschaftliche Arbeit im Institut für Neuropathologie ermöglicht zu haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Dr. med. Christiane Theodossiou-Wegner für den Vorschlag des Dissertationsthemas, die kontinuierliche fachliche Unterstützung sowie für die entgegengebrachte Geduld über die gesamte Zeit bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Fuchs für das zur Verfügung gestellte Gewebe der Marmosetten vom Deutschen Primatenzentrum für die histologischen Untersuchungen dieser Arbeit. Außerdem gilt mein Dank den an MS erkrankten Patienten und ihren Angehörigen für die Freigabe des Autopsiegewebes für die Wissenschaft.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern im Institut, insbesondere Jasmin Reichl, für die Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragen und die Mitarbeit bei meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Lebenslauf

Am 10. Mai 1988 wurde ich, Katharina Neid, in Brandenburg an der Havel geboren.

Nach dem Besuch der staatlichen Grundschule in Lengfeld war ich ab 1998 Schülerin des Tilesius-Gymnasiums Mühlhausen. Dort erwarb ich 2006 die Allgemeine Hochschulreife.

Im Oktober 2006 nahm ich an der Georg-August-Universität Göttingen das Studium der Humanmedizin auf. Im August 2008 legte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Das Praktische Jahr, von Februar 2012 bis Januar 2013, absolvierte ich im Akershus Universitätsklinikum Oslo, im Pius-Hospital Oldenburg und in der Asklepios Klinik Schildautal/Seesen. Nach erfolgreich bestandenem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Mai 2013 wurde mir am 03. Juni 2013 die Approbation als Ärztin erteilt.

Seit September 2013 arbeite ich im St. Josef Krankenhaus in Haan als Assistenzärztin der Inneren Medizin.