

Aus dem Institut für Neuropathologie

(Prof. Dr. med. W. Brück)

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Histologische Charakterisierung der Leukodystrophien und deren differentialdiagnostische Abgrenzung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mevlude Türkmen (geb. Yilmaz)

aus

Kurtalan, Türkei

Göttingen 2019

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

Referent: Prof. Dr. med. W. Brück

Ko-Referent/in: Prof. Dr. J. Gärtner

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 13.02.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Histologische Charakterisierung der Leukodystrophien und deren differentialdiagnostische Abgrenzung“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Übersicht über die Leukodystrophien.....	1
1.2 Metachromatische Leukodystrophie	1
1.3 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie.....	4
1.4 Vanishing White Matter Disease.....	6
1.5 Morbus Alexander.....	7
1.6 Ziele der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Reagenzien.....	10
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	12
2.1.3 Antikörper und Sekundärsysteme	12
2.1.4 Verbrauchsmaterialien, technische Geräte und Software.....	15
2.2 Auswahl der Leukodystrophiefälle und Kontrollen	16
2.3 Histologische und immunhistochemische Arbeitsmethoden	17
2.3.1 Histologische Standardfärbungen.....	17
2.3.2 Immunhistochemie	20
2.3.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	23
2.3.4 Herstellung von Semidünn- und Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	25
2.4 Histologische Auswertung.....	25
2.4.1 Entmarkungsgrad.....	26
2.4.2 Axonale Schädigung.....	26
2.4.3 Quantifizierung von Zellen und axonaler Sphäroide	27
2.5 Genetische Untersuchung.....	27
2.6 Ethikvotum	27
2.7 Statistische Auswertung.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Metachromatische Leukodystrophie	29
3.1.1 Klinische Daten der Patienten	29
3.1.2 Histopathologie der metachromatischen Leukodystrophie	30
3.2 X-chromosomale-Adrenoleukodystrophie.....	39
3.2.1 Klinische Daten der Patienten	39

3.2.2	Histopathologie der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie.....	43
3.3	Vanishing White Matter Disease.....	64
3.3.1	Klinische Daten der Patienten	64
3.3.2	Histopathologie der VWMD.....	66
3.4	Morbus Alexander.....	78
3.4.1	Klinische Daten der Patienten	78
3.4.2	Histopathologie des M. Alexander.....	79
4	Diskussion.....	86
4.1	Vergleich mit wissenschaftlichen Publikationen zur Histopathologie von Leukodystrophien	86
4.1.1	Metachromatische Leukodystrophie.....	86
4.1.2	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie.....	87
4.1.3	Vanishing White Matter Disease	89
4.1.4	Morbus Alexander.....	90
4.2	Differentialdiagnosen der Leukodystrophien	91
4.2.1	Histopathologie der entzündlichen Entmarkungskrankheiten	91
4.2.2	Histopathologie der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie	94
4.2.3	Histopathologie des Morbus Leigh.....	95
4.2.4	Histopathologie der zentralen pontinen Myelinolyse.....	96
4.3	Abgrenzung der Leukodystrophien von den Differentialdiagnosen	97
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literaturverzeichnis	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #1.....	30
Abbildung 2: Histopathologie MLD-Fall #1.....	32
Abbildung 3: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #2.....	33
Abbildung 4: Histopathologie MLD-Fall #2.....	34
Abbildung 5: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #3.....	35
Abbildung 6: Histopathologie MLD-Fall #3.....	36
Abbildung 7: Histopathologie X-ALD-Fall #1.....	45
Abbildung 8: Histopathologie X-ALD-Fall #2.....	47
Abbildung 9: Histopathologie X-ALD-Fall #3.....	49
Abbildung 10: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #4.....	50
Abbildung 11: Histopathologie X-ALD-Fall #4 Bildertafel 1.....	51
Abbildung 12: Histopathologie X-ALD-Fall #4 Bildertafel 2.....	52
Abbildung 13: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #5.....	53
Abbildung 14: Histopathologie X-ALD-Fall #5.....	54
Abbildung 15: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #6.....	56
Abbildung 16: Histopathologie X-ALD-Fall #6.....	56
Abbildung 17: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #7.....	57
Abbildung 18: Histopathologie X-ALD-Fall #7.....	58
Abbildung 19: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #1.....	68
Abbildung 20: Histopathologie VWMD-Fall #1 Bildertafel 1.....	69
Abbildung 21: Histopathologie VWMD-Fall #1 Bildertafel 2.....	70
Abbildung 22: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #2.....	71
Abbildung 23: Histopathologie VWMD-Fall #2.....	72
Abbildung 24: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #3.....	74
Abbildung 25: Histopathologie VWMD-Fall #3.....	75
Abbildung 26: Histopathologie M. Alexander-Fall #1.....	80
Abbildung 27: Histopathologie M. Alexander-Fall #2.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien	10
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer für die Histologie und Immunhistochemie	12
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.....	13
Tabelle 4: Sekundärsysteme und deren Verwendung.....	14
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 6: Technische Geräte und Software	15
Tabelle 7: Anzahl verwendeter LD-Fälle und Kontrollen	17
Tabelle 8: Skala Entmarkungsgrad.....	26
Tabelle 9: Skala Reduktionsgrad.....	26
Tabelle 10: Klinische Daten des biochemisch gesicherten MLD-Falls und der Kontrollen.....	29
Tabelle 11: Ergebnisse der untersuchten MLD-Fälle und Kontrollen	38
Tabelle 12: Klinische Daten der X-ALD-Fälle und der Kontrollen	40
Tabelle 13: Ergebnisse der X-ALD-Fälle und der jeweiligen Kontrollen	60
Tabelle 14: Klinische Daten der Patienten mit VWMD und der Kontrollen.....	65
Tabelle 15: Ergebnisse der untersuchten VWMD Fälle und der Kontrollen	76
Tabelle 16: Ergebnisse der untersuchten M. Alexander-Fälle.....	84
Tabelle 17: Vergleich histopathologischer Merkmale der Leukodystrophien und ihrer Differentialdiagnosen.....	98

Abkürzungsverzeichnis

ADEM	Akute Disseminierte Enzephalomyelitis
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Amyloidvorläuferprotein)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AEP	akustisch evozierte Potentiale
AK	Antikörper
AQP 4	Aquaporin-4
ASA	Arylsulfatase A
ATP	Adenosintriphosphat
bds.	beidseits
bidest.	bidestilliert
CNPase	<i>Cyclic Nukleotide Phosphodiesterase</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CNTRL	<i>Control</i> (Kontrolle)
CT	Computertomografie
DAB	3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalografie
eIF2B1-B5	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B1-B5</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
Flair	Fluid Attenuated Inversion Recovery
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> (saures gliales Faserprotein)
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
LD	Leukodystrophie
LFB/PAS	Luxol-Fast-Blue/Periodsäure-Schiffsche Reagenz
M	Molar
m	männlich
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
mk	monoklonal
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MRP14	<i>Migration Inhibitory Factor-Related Protein 14</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MRS	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MW	Mikrowelle
n.a.	nicht auswertbar
NaOH	Natronlauge
NF200	Neurofilament 200
NGS	Normales <i>Goat</i> (Ziegen-Serum)
NMO	<i>Neuromyelitis optica</i>
Olig 2	Oligodendrozyten Transkription Faktor 2
P25	Anti-Tubulin Polymerisation Protein Antikörper
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
HIO4	Periodsäure

pk	polyklonal
PLP	Proteolipid Protein
PML	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie
pv	periventrikulär
sk	subkortikal
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEP	visuell evozierte Potentiale
VLCFA	<i>Very Long Chain Fatty Acids</i> (überlangkettige Fettsäuren)
VWMD	<i>Vanishing White Matter Disease</i>
w	weiblich
WS	Weißer Substanz
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Übersicht über die Leukodystrophien

Leukodystrophien (LD) sind eine Gruppe von unterschiedlichen Erkrankungen der weißen Hirnsubstanz, die häufig eine genetische Ursache haben und mit einer Störung der Myelinisierung einhergehen (Renaud 2016). Myelin ist eine fettreiche Substanz, die die Axone umhüllt und im zentralen Nervensystem (ZNS) von den Oligodendrozyten gebildet wird (Lüllmann-Rauch 2009). Bei den Leukodystrophien wird ungenügendes oder fehlerhaftes Myelin produziert, welches im Verlauf zu einem fortschreitenden Myelinverlust führt.

Die ersten klinischen Symptome treten in der Regel in der Kindheit auf. Ein Beginn im Erwachsenenalter ist eher selten. Klinisch zeigen die Betroffenen progrediente neurologische Symptome, wobei typischerweise bereits erworbene Fähigkeiten nach und nach verloren gehen.

Ursache für den Myelinverlust sind oftmals Funktionsstörungen verschiedener Zellstrukturen, ausgelöst durch einen genetischen Defekt. So werden lysosomale Erkrankungen, wie die metachromatische Leukodystrophie (MLD) und der Morbus Krabbe, peroxisomale Erkrankungen, wie die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD), mitochondriale Erkrankungen, wie der Morbus Leigh, und Erkrankungen des Zytoplasmas, wie der Morbus Alexander und Morbus Canavan, voneinander unterschieden. Es gibt aber auch Leukodystrophien, bei denen der Gendefekt zwar bekannt, die Pathogenese aber noch weitgehend ungeklärt ist. Hierzu zählt die *Vanishing White Matter Disease* (VWMD) (Gärtner und Kohlschütter 2004).

In der vorliegenden Dissertation wurden Gewebeproben von Patienten mit MLD, X-ALD, VWMD und Morbus Alexander untersucht.

1.2 Metachromatische Leukodystrophie

Epidemiologie und Pathogenese

Die MLD ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Stoffwechselkrankheit (Hageman et al. 1995). Die Inzidenz beträgt 1:40.000 – 1:100.000 Neugeborene (Gärtner und Kohlschütter 2004). Verursacht wird die Erkrankung durch eine mangelhafte oder fehlende

Arylsulfatase A Enzymaktivität (ASA) oder seltener ihres Aktivatorproteins Saposin B (Shapiro et al. 1979; Gieselmann 2008). Mehr als 100 Mutationen im ASA-Gen auf dem Chromosom 22 wurden bislang beschrieben (Gieselmann und Krägeloh-Mann 2011). Durch den Mangel an ASA und seltener seines Aktivatorproteins Saposin B kommt es zu einer Störung im Abbau der Sulfatide und somit zur Akkumulation von Sulfatiden im Gehirn, im peripheren Nervensystem und anderen Organen, wie den Gallengängen der Leber und den Nieren (von Figura et al. 2001; Gieselmann et al. 2003). Im Nervensystem reichern sich die Sulfatide in den Lysosomen der Oligodendrozyten, der Schwannzellen, der Astrozyten und einiger Nervenzellen an (Gärtner und Kohlschütter 2004; Gieselmann und Krägeloh-Mann 2010). In Folge der lysosomalen Ablagerungen kommt es zu einem Untergang der betroffenen Zellen, unter anderem der Oligodendrozyten, was zu einer fortschreitenden Entmarkung der weißen Substanz im ZNS führt (Fenzi et al. 1983; von Figura et al. 2001). Diese lysosomalen Ablagerungen lassen sich mit basischen und blauen Anilinfarbstoffen braun darstellen. Dieser Farbumschlag wird Metachromasie genannt (Ulrich 1971).

Klinik und Verlauf

Je nach Erkrankungsbeginn werden eine spät-infantile, früh-juvenile, spät-juvenile und adulte Form voneinander unterschieden (Gärtner und Kohlschütter 2004).

Die spät-infantile MLD beginnt im Alter von 15-24 Monaten. Die Kinder entwickeln sich bis zum Ausbruch der Erkrankung motorisch und geistig altersentsprechend. Ein frühes Symptom ist häufiges Stolpern. Es kommt zu einer progredienten Abnahme der motorischen Fähigkeiten. Die Kinder verlieren ihre Fähigkeit zu sitzen, zu gehen und zu stehen. Zudem kommt es zu Sprachstörungen, die sich in einer Dysarthrie und Aphasie äußern. Des Weiteren können bei den betroffenen Kindern eine Ataxie, eine Optikusatrophie, ein Nystagmus und eine gräuliche Verfärbung der Makula beobachtet werden. Sie werden zunehmend berührungsempfindlich und der anfänglich schlaffe Muskeltonus geht in einen spastischen Muskeltonus mit verminderten Muskeleigenreflexen in allen Extremitäten über.

Die früh-juvenile MLD beginnt im Alter von vier bis sechs Jahren, verläuft deutlich langsamer und äußert sich in Störungen der Feinmotorik, Gang- und Haltungsstörungen, Verhaltensstörungen, Optikusatrophie und progredienter Hemiparese. Die spät-juvenile MLD beginnt im Alter von sechs bis 16 Jahren. Sie äußert sich anfänglich mit Verhaltensstörungen, Schulproblemen und Sprachstörungen. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu motorischen Störungen, die sich zunächst als Gangunsicherheit manifestieren und sich dann zu einer langsam progredienten spastischen Tetraparese bis hin zum vollständigen Verlust aller Fähigkeiten mit Bettlägerigkeit entwickeln. Der Beginn der Erkrankung bei der

adulten Form der MLD ist variabel und kann ab der Pubertät in jedem Alter erfolgen. Die Patienten zeigen einen Abbau der intellektuellen Fähigkeiten im Schul- oder Berufsleben. Sie entwickeln eine emotionale Instabilität, zeigen Gedächtnis- und Verhaltensstörungen oder psychiatrische Störungen, wie Halluzinationen, weswegen hier zunächst oftmals die Diagnose einer Schizophrenie oder Depression gestellt wird. Die Patienten entwickeln im Verlauf eine spastische Tetraparese mit gesteigerten Muskeleigenreflexen. Im Endstadium aller MLD-Formen zeigen die Patienten eine Ataxie, Blindheit, Taubheit, Demenz und eine Tetraplegie (von Figura et al. 2001; Gärtner und Kohlschütter 2004; Gieselmann und Krägeloh-Mann 2011). Die Lebenserwartung beträgt bei der spätinfantilen Form wenige Jahre. Die Kinder versterben meistens innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung. Bei der früh- und spät-juvenilen Form versterben die Betroffenen meistens vor dem zwanzigsten Lebensjahr. Bei der adulten Form kann die Überlebenszeit nach Diagnosestellung wenige Jahre bis Jahrzehnte betragen (von Figura et al. 2001).

Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt biochemisch. Die verminderte Enzymaktivität der ASA kann im Urin, in den Leukozyten und in Fibroblasten nachgewiesen werden. Empfehlenswert ist es, neben der Bestimmung der Enzymaktivität, die Akkumulation von Sulfatiden im 24-Stunden-Urin mittels Dünnschichtchromatographie nachzuweisen, da eine erniedrigte Aktivität der ASA auch bei etwa 2% der gesunden Bevölkerung gefunden werden kann (Gärtner und Kohlschütter 2004), die sog. Pseudodefizienz (Weber und Köhler 2010). In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich symmetrische T2-Signalanhebungen, die von der periventrikulären weißen Substanz nach peripher voranschreiten und keine Kontrastmittelaufnahme aufweisen (Gärtner und Kohlschütter 2004; Weber und Köhler 2010). Bildgebend schreitet die MLD bei der spät-infantilen und juvenilen Form schneller voran als bei der adulten Form. Im weiteren Verlauf ist eine kortikale Atrophie feststellbar. Die Liquoruntersuchung kann einen Normalbefund ergeben. Beim Fortschreiten der Erkrankung kann der Eiweißgehalt im Liquor erhöht sein (von Figura et al. 2001).

Therapie

Die Therapiemöglichkeiten für die MLD sind begrenzt. Aktuell gilt die Erkrankung als nicht heilbar. Experimentelle Therapieansätze umfassen die Stammzelltransplantation und die Enzymersatztherapie, wobei die Stammzelltransplantation nur bei Patienten als sinnvoll erachtet wird, bei denen die Erkrankung noch nicht ausgebrochen ist oder die sich in einem sehr frühen, langsam fortschreitenden Stadium der Erkrankung befinden (Gärtner und Kohlschütter 2004). Zur symptomatischen Behandlung kommen verschiedene physi-

kalische und medikamentöse Maßnahmen zur Reduktion der neurologischen Symptome, Linderung von Schmerzen und Erhalt und Verbesserung der Lebensqualität zum Einsatz (Gärtner und Kohlschütter 2004; von Figura et al. 2001).

1.3 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Epidemiologie und Pathogenese

Die X-ALD ist eine der häufigsten hereditären Leukodystrophien mit einer Inzidenz von 1:17.000 (Weber und Köhler 2010). Der Erkrankung liegt eine Mutation im *ABCD1-Gen* auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Nave 1999) zugrunde, welches für ein Adenosintriphosphat-bindendes, peroxisomales Membrantransportprotein (ABC-Transport) kodiert (Renaud 2016). Dieses Protein ist für den transmembranen Transport von überlangkettigen Fettsäuren ($\geq C22$; *Very Long Chain Fatty Acids*, VLCFA) in die Peroxisomen und deren anschließenden beta-oxidativen Abbau verantwortlich. Durch die Mutation kommt es zu einer Störung des Transports der VLCFA und der beta-Oxidation und demzufolge zu einer Erhöhung von VLCFA im Plasma (Nave 1999) sowie einer pathologischen Akkumulation der VLCFAs in den Zellen des ZNS, den Nebennieren und dem Hoden (Moser et al. 2001; Nave 1999).

Es sind verschiedene klinische Formen der X-ALD bekannt, wobei die zerebrale X-ALD, die Adrenomyeloneuropathie (AMN), die spinozerebelläre Ataxie, die einfache Addison-Variante und die asymptotische Form im Erwachsenenalter (Moser et al. 2001) voneinander unterschieden werden. Zudem können auch heterozygote Frauen an der X-ALD erkranken und Symptome ähnlich der Adrenomyeloneuropathie zeigen, deren Verlauf viel milder ist als der der X-ALD (Weber und Köhler 2010). In dieser Arbeit wird die zerebrale Form der X-ALD beschrieben.

Klinik und Verlauf

Die zerebrale Form der X-ALD lässt sich in eine kindliche und in eine adulte Form unterteilen.

Die kindliche zerebrale X-ALD tritt zwischen dem dritten und zehnten Lebensjahr auf und ist mit über 30% die häufigste und die am schwersten verlaufende Form der X-ALD. Sie ist durch einen raschen Progress gekennzeichnet und führt meistens im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt zum Tode. In 80% der Fälle tritt eine begleitende Nebenniereninsuffizienz auf. Die betroffenen Kinder entwickeln sich bis zum Ausbruch der Erkrankung altersentsprechend (Moser et al. 2001). Auffällig werden die Kinder durch Konzentrationsstö-

rungen und Verhaltensauffälligkeiten, wie emotionale Labilität und Hyperaktivität, sowie schulischem Leistungsabfall (Nave 1999). Im Verlauf folgen Hör- und Sehstörungen, Gangauffälligkeiten, Dysarthrie, eine spastische Parese und eine Demenz. Fokale oder generalisierte Krampfanfälle treten bei fast allen Patienten auf. Im Endstadium der Erkrankung sind die Kinder bettlägerig und aufgrund einer Optikusatrophie erblindet. Sie sind nicht mehr in der Lage zu kommunizieren und müssen über eine Magensonde oder eine perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) ernährt werden. In diesem Stadium können die Kinder mehrere Jahre verbleiben.

Die adulte zerebrale X-ALD bricht meistens im zweiten Lebensjahrzehnt oder später aus und ist viel seltener als die kindliche zerebrale X-ALD-Form. Auch hier kann eine Nebenniereninsuffizienz auftreten. Der Verlauf und die Ausprägung der Symptome können von Patient zu Patient unterschiedlich sein. Jedoch treten häufig initial Verhaltensstörungen, wie Psychosen, Depressionen, Manie, Gedächtnisstörungen, Perseverationsneigung und Distanzminderung im Sozialverhalten mit erhöhten Redefluss auf. Die Patienten bekommen häufig aufgrund dieser Symptome die Diagnose einer Schizophrenie gestellt. Später stellen sich neurologische Symptome, wie Sehstörungen, Dysphagie und Paresen, ein (Moser et al. 2001). Der weitere Verlauf der Erkrankung ist ähnlich der kindlichen zerebralen Form (Weber und Köhler 2010).

Diagnostik

Die Diagnosestellung kann anhand einer Blutuntersuchung erfolgen, bei der die Erhöhung des VLCFAs im Blutplasma bestimmt wird. Hierbei spielt nicht nur die Erhöhung des VLCFA-Blutplasmaspiegels, sondern auch das Verhältnis von C₂₆:C₂₂ eine wichtige Rolle bei der Diagnose (Nave 1999). Die Bestimmung der VLCFA- Spiegel kann aber auch in Erythrozyten, Leukozyten oder Fibroblasten durchgeführt werden (Moser et al. 2001). In der MRT-Untersuchung zeigt sich eine Entmarkung der weißen Substanz, vor allem im Balken und im parietookzipitalen Marklager (80%) oder dem Frontallappen (20%), typischerweise mit einer randständigen Kontrastmittelaufnahme (Weber und Köhler 2010). Mithilfe der Magnetresonanztomographie (MRS) kann ein erniedrigtes N-Acetylaspartat-Signal und ein erhöhtes Cholin-Signal auf ein Entmarkungsgeschehen hinweisen (Pouwels et al. 1998). Eine genetische Untersuchung ist aufgrund der einfachen Diagnosestellung anhand einer Blutprobe nur selten indiziert.

Therapie

Die Therapiemöglichkeiten bei der X-ALD sind begrenzt. Ein kurativer Therapieansatz wurde bislang noch nicht beschrieben. Eine Therapiemöglichkeit ist die Knochenmarks-

transplantation, die vor allem bei Patienten im Frühstadium der Erkrankung zum Einsatz kommt. Bei fortgeschrittenem Befall des Großhirns ist die Knochenmarkstransplantation wenig erfolgversprechend. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Gabe von Lorenzos Öl, einem Gemisch aus Glycerin-Trioleat und Glycerin-Triercuate in einem Verhältnis von 4:1. Die Gabe des Öls und zusätzliche diätetische Maßnahmen sollen zu einer Reduzierung der exogenen Zufuhr und Hemmung der endogenen Synthese von überlangkettigen Fettsäuren führen (Raymond 2011). Symptomatisch können physiotherapeutische und medikamentöse Maßnahmen zur Linderung von muskulären Spastiken und Schmerzen zum Einsatz kommen. Die Behandlung der begleitenden Nebenniereninsuffizienz mit den entsprechenden Hormonen ist lebensnotwendig. Studien zeigten, dass immunmodulatorische Therapien keinen Einfluss auf die Progression der Erkrankung haben (Moser et al. 2001).

1.4 Vanishing White Matter Disease

Vanishing White Matter Disease, auch *Childhood Ataxia With Central Hypomyelination* (CACH) oder *Myelinopathia Centralis Diffusa* genannt, ist eine der seltensten Leukodystrophien im Kindesalter und wird autosomal rezessiv vererbt (van der Knaap et al. 2006; Gärtner und Kohlschütter 2004). Der Erkrankung liegen Mutationen im *eIF2B1*-, *eIF2B2*-, *eIF2B3*-, *eIF2B4*-, oder *eIF2B5*-Gen auf Chromosom 1 beziehungsweise 2 zugrunde (Gärtner und Kohlschütter 2004; Schiffmann und Elroy-Stein 2006), welche für den *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B* (*eIF2B*), einem Proteinkomplex, bestehend aus fünf Untereinheiten, kodieren. *eIF2B* spielt in der Regulation der Proteinsynthese unter verschiedenen Bedingungen, wie erhöhter Körpertemperatur und Stress, eine große Rolle. Mutationen in diesen Genen führen zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber erhöhter Körpertemperatur und Stress. Patienten mit einer VWMD entwickeln sich anfänglich normal. Ein stattgefundenener Infekt oder ein leichtes Schädelhirntrauma führen zu einem Ausbruch der Erkrankung, die hauptsächlich die weiße Substanz des Gehirns betrifft, wobei der *eIF2B*-Proteinkomplex essentiell für alle Zellen des Körpers ist (van Knaap et al. 2003). Die genaue Pathophysiologie ist bislang nicht geklärt.

Klinik und Verlauf

Die betroffenen Kinder zeigen in der Regel die ersten klinischen Symptome im zweiten bis sechsten Lebensjahr (van der Knaap et al. 2006). Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch einen chronisch progredienten Verlauf mit deutlichem Verlust von motorischen und kognitiven Fähigkeiten. Die Kinder leiden an einer zerebellären Ataxie und zunehmender Demenz. Im Verlauf entwickeln die Kinder eine Tetraspastik. Bei einigen Kindern wurde eine

Optikusatrophy mit daraus resultierenden Sehstörungen beobachtet. Die betroffenen Kinder können zudem an einer symptomatischen Epilepsie leiden. Charakteristischerweise kommt es durch fieberhafte Infekte und leichte Schädelhirntraumen zu einer raschen Progression der Erkrankung. Während der fieberhaften Episoden leiden die betroffenen Kinder an Erbrechen, hypotonem Muskeltonus und sind leicht reizbar. Es schließt sich ein Zustand der Bewusstseinsintrübung an. Diese rezidivierenden Episoden führen letztendlich zum Koma und zum Tod (Gärtner und Kohlschütter 2004; van der Knaap et al. 2006).

Diagnostik

Die Diagnosestellung der VWMD erfolgt anhand der klinischen Symptomatik, den typischen bildgebenden Befunden und dem genetischen Nachweis der Mutation. In der MRT-Untersuchung, insbesondere in der *Fluid-Attenuated-Inversion-Recovery-Sequenz* (Flair-Sequenz), zeigen sich charakteristische diffuse, teils zystische Veränderungen in der weißen Substanz. Vom Signal unterscheidet sich die weiße Substanz kaum vom Liquor. Des Weiteren kann der molekulargenetische Nachweis einer Mutation im *EIF2B1*-, *EIF2B2*-, *EIF2B3*-, *EIF2B4*- oder *EIF2B5*-Gen die Diagnose festigen (Gärtner und Kohlschütter 2004; van der Knaap et al. 2006).

Therapie

Bislang ist keine spezifische Therapie zur Behandlung der VWMD verfügbar, so dass die symptomatische Behandlung im Vordergrund steht. Wichtig ist, Stresssituationen zu vermeiden, die den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen. Fieberhafte Infekte werden medikamentös mit Antipyretika und ggf. Antibiotika behandelt. Bei den Kindern sollten die entsprechenden Impfungen erfolgen. Auf gewisse Sportarten sollte aufgrund einer hohen Verletzungsgefahr und der damit verbundenen Krankheitsprogression verzichtet werden (van der Knaap et al. 2006).

1.5 Morbus Alexander

Der Morbus Alexander ist eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung (Renaud 2016). Sie wurde erstmals 1949 von dem Pathologen William Stewart Alexander beschrieben, der die histopathologischen Auffälligkeiten der Alexander-Krankheit bei einem 15 Monate alten Jungen entdeckte und beschrieb (Mignot et al. 2004). Verursacht wird die Erkrankung durch eine Mutation im *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP)-Gen (Flint und Brenner 2011). Das GFAP ist ein saures Gliafaserprotein und ist ein Bestandteil der Astrozytenintermediärfilamente (Lüllmann-Rauch 2009). Die Mutationen treten meist de novo auf (Renaud 2016).

Klinik und Verlauf

Beim Morbus Alexander wird abhängig vom Manifestationsalter zwischen einer infantilen, juvenilen und adulten Form unterschieden (Kuhlmann et al. 2008).

Die infantile Form ist die häufigste und beginnt in der Regel zwischen dem ersten Lebensmonat und zweiten Lebensjahr. Die betroffenen Kinder zeigen eine abnorme Vergrößerung des Gehirns (*Megalenzephalie*), geistige Retardierung, eine progrediente spastische Parese und Epilepsien (Mignot et al. 2004).

Die juvenile Form beginnt zwischen dem zweiten und 13. Lebensjahr (Flint und Brenner 2011). Sie beginnt mit bulbären oder pseudobulbären Symptomen, wie Schluck- und Sprachstörungen. Zusätzlich können die Kinder an Erbrechen, Ataxien und spastischen Paresen leiden (Gärtner und Kohlschütter 2004). Eine Größenzunahme des Gehirns ist nicht nachweisbar. Das Auftreten einer geistigen Retardierung ist in variablem Ausmaß möglich (Mignot et al. 2004).

Bei der adulten Form manifestiert sich die Erkrankung ab dem 13. Lebensjahr oder später. Zu den Symptomen zählen psychomotorische Entwicklungsverzögerungen, Ataxien, Tetraspastik, bulbäre oder pseudobulbäre Symptome. Bei einigen Betroffenen werden zusätzlich Myoklonien des Gaumensegels, Nystagmus, Schlafapnoe, Skoliosen, Obstipationen und Hyper- oder Hypotonien der Muskulatur mit unterschiedlicher Häufigkeit beobachtet (Flint und Brenner 2011).

Diagnostik

Diagnostisch wegweisend sind die klinischen Symptome und die charakteristischen Veränderungen im MRT. Des Weiteren können Mutationen im *GFAP*-Gen bei 95% der Fälle beobachtet werden. Bei 5% der Morbus Alexander-Fälle kann keine *GFAP*-Mutation nachgewiesen werden. Zu den charakteristischen MRT-Veränderungen bei der infantilen und juvenilen Form gehören ausgedehnte Veränderungen in der weißen Substanz, vor allem frontal und periventrikulär (hypointens in T2-Wichtung und hyperintens in T1-Wichtung) (Flint und Brenner 2011). Bei der adulten Form zeigt die MRT-Untersuchung nur geringe oder keine Veränderungen in der periventrikulären weißen Substanz des Gehirns. Vielmehr können Atrophien und Signalveränderungen in der *Medulla oblongata* und den oberen Anteilen des Zervikalmarks mit fleckiger Kontrastmittelaufnahme beobachtet werden. Zudem sind häufig Signalveränderungen im *Nukleus dentatus* und im mittleren

Kleinhirnstiel feststellbar. Bildgebend unterscheidet sich die adulte Form deutlich von der infantilen und juvenilen Form (Renaud 2016).

Therapie

Derzeit gibt es keine kausale Therapiemöglichkeit. Bei der symptomatischen Therapie steht die Behandlung von epileptischen Anfällen und der Hirndrucksymptomatik im Vordergrund (Renaud 2016).

1.6 Ziele der Arbeit

Die Leukodystrophien zählen zu den Entmarkungskrankheiten und müssen in die differentialdiagnostischen Überlegungen bei der Beurteilung von ZNS-Gewebeproben mit nachweisbarem Myelinverlust einbezogen werden. In der medizinischen Fachliteratur fehlt bislang eine detaillierte histologische Übersichtsstudie zu den Leukodystrophien und deren differentialdiagnostische Abgrenzung zu Entmarkungskrankheiten anderer Genese.

In der vorliegenden Dissertation wurden alle dem Institut für Neuropathologie an der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung stehenden Biopsie- und Autopsieproben von Patienten mit Leukodystrophien histologisch und immunhistochemisch untersucht. Darunter fanden sich Proben von Patienten mit MLD, X-ALD, VWMD und Morbus Alexander. Im Rahmen der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden der Grad der Entmarkung, das Ausmaß der axonalen Schädigung, das Ausmaß der entzündlichen Infiltration, die Dichte und Schädigung der Oligodendrozyten, die Astrozytenreaktion und Makrophagenabräumreaktion analysiert. Zudem sollte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Göttingen eine genetische Untersuchung der Gewebeproben erfolgen.

Ziel dieser Dissertation ist es, anhand der durchgeführten detaillierten histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von Gewebeproben, die histologischen Charakteristika der MLD, X-ALD, VWMD und des Morbus Alexander zu erfassen und zu beschreiben. Die herausgearbeiteten histologischen Merkmale sollen im Rahmen der neuropathologischen Routinediagnostik helfen, sowohl die verschiedenen Leukodystrophien untereinander als auch die Entmarkungskrankheiten anderer Genese voneinander unterscheiden zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Eine Übersicht über die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Reagenzien ist in der Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

Substanz	Verwendung	Firma, Herstellungsort
Ammoniak, 32%	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
1% Azur II	Elektronenmikroskopie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC)	Immunhistochemie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bleicitrat	Elektronenmikroskopie	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
1% Borax= Di-Natrium-Tetraborat-10-hydrat	Elektronenmikroskopie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Immunhistochemie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Fluoreszenzimmunhistochemie	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
DePex	Eindecken von Gewebeschnitten	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Ethylendiamintetraacetat</i> (EDTA)	Pulver zur Herstellung von Pufferlösungen	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	Herstellung von Eosin-Lösung, Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Ethansäure) 100%	Herstellung von Eosin-Lösung, Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Extra Avidin-Peroxidase	Immunhistochemie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS), steril	Blockierer, Immunhistochemie	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Eindecken von Gewebeschnitten, Fluoreszenzimmunhistochemie	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Substanz	Verwendung	Firma, Herstellungsort
Formaldehyd 37%	Fixierung von Gewebe	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
10% <i>Goat</i> (Ziegen)-Serum	Immunhistochemie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Blockierung der endogenen Peroxidase, Immunhistochemie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl), 25%	Herstellung von HCl-Lösung, Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Alkohol-Reihe Histologie, Immunhistochemie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<i>Immersion Oil for Microscopy</i>	Immersionsöl zum Mikroskopieren	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Luxol-Fast-Blue</i> (LFB)	Pulver zur Herstellung von LFB-Lösung, Histologie	Clin-Tech, Guilford, United Kingdom
Lithiumcarbonat 0,05%,	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaun	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
2% Methylenblau	Elektronenmikroskopie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Einstellung des pH-Wertes von Lösungen und Puffern	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Normales <i>Goat</i> (Ziegen)-Serum (NGS)	Immunhistochemie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Paraffin (Paraplast Plus®)	Einbettung von Gewebe	Tyco Healthcare, Neustadt, Deutschland
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS), phosphatgepufferte Salzlösung Dulbecco's	Pulver zur Herstellung von Pufferlösungen	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Perijodsäure	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure, 65%	Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Histologie	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	<i>Periodic Acid Schiff</i> (PAS)-Färbung, Histologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i> (Tris, Trisma® base)	Pulver zur Herstellung von Pufferlösungen, Immunhistochemie	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
TRITON® X-100	Immunhistochemie	MP Biomedical, Fontain Parkway, United Kingdom
Xylol	Histologie, Immunhistochemie	Th.Geyer GmbH + Co.KG, Renningen, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Pulver zur Herstellung von Citratpuffer, Histologie	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Lösungen und Puffer

Eine Übersicht über die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Lösungen und Puffer gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer für die Histologie und Immunhistochemie

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
Bleicitrat- Lösung	1,4 g Bleicitrat, 10 ml Aqua bidestilliert, 8 ml Natriumhydroxid (40 g/L), 32 ml Aqua bidestilliert	Elektronenmikroskopie
Citrat-Puffer 10mM pH6	1l Aqua bidestilliert, 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat mit Natriumhydroxid auf gewünschten pH-Wert titrieren	Immunhistochemie, Antigendemaskierung
Blockierungspuffer	PBS 10% FCS/NGS	Immunhistochemie
DAB-Lösung	49 ml PBS, 1 ml DAB, 20 µl Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Immunhistochemie
1% Eosin	70% Isopropanol, 1% Eosin 0,05 % Essigsäure (vor der Benutzung hinzufügen)	Histologie
Entwicklerlösung	20ml Formalaldehyd 37%, 100ml Aqua bidestilliert, 0,5 g Zitronensäure, 1 Tropfen Salpetersäure	Immunhistochemie
FCS (10 %)	1 ml FCS, 9 ml PBS	Immunhistochemie
Farbstofflösung nach Richardson	2 Teile 1% Azur II, 1 Teil 2% Methylenblau 1 Teil 1% Borax= Di-Natrium-Tetraborat-10-hydrat	Elektronenmikroskopie
10 % Goat-Serum	10 ml Goat-Serum, 100ml Aqua bidestilliert.	Immunhistochemie
3% H ₂ O ₂	45 ml PBS, 5ml H ₂ O ₂ 30 %	Immunhistochemie, Blockierung der endogenen Peroxidase
1% HCl	70% Isopropanol, 1% HCl absolut	Histologie
LFB-Lösung	1 L Ethanol, 100%, 1 g LFB, 5ml Essigsäure 10%	Histologie
Natriumthiosulfat-Lösung	0,1 mol/l Natriumthiosulfat in wässriger Lösung, gebrauchsfertig	Histologie
PBS 0,1M	1 L Aqua bidestilliert, 9,55 g PBS-Pulver	Immunhistochemie
1 % Perjodsäure	1 L Aqua bidestilliert, 10 g Perjodsäure-Pulver	Histologie
20% Silbernitratlösung	20 g Silbernitrat, 100 ml Aqua bidestilliert	Histologie
Tris-EDTA-Puffer, pH 9	1 L Aqua bidestilliert, 1,21 g Tris, 1 ml EDTA, 1 mol/ml, pH 8 , mit Natronlauge (NaOH) auf den gewünschten pH-Wert titrieren	Immunhistochemie, Antigendemaskierung
1% TRITON/PBS	1 ml TRITON® X-100 ,100 ml Aqua bidestilliert	Immunhistochemie

2.1.3 Antikörper und Sekundärsysteme

Eine Übersicht über die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Primärantikörper ist in der Tabelle 3 zu finden. In der Tabelle 4 sind die Sekundärsysteme aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Funktion/Marker	Klon	Spezies	Verdünnung/ Vorbehandlung/ Puffer	Firma, Herstellungsort
Aquaporin-4 (AQP4)	Wasserkanal, auf Astrozyten exprimiert		Rabbit pk	1:200/MW Citrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Amyloid Precursor Protein</i> (APP)	Protein in Neuronen	22C11	Mouse mk	1:2000/MW Citrat	Chemicon Millipore, Darmstadt, Deutschland
CD3	Pan-T-Zell-Marker	SP7	Rabbit pk	1:50/MW Citrat	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
CD4	T-Helfer-Zellen	SP35	rab-mab	1:100/MW TRIS EDTA	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
CD8	Zytotoxische T- Zellen	C8/14 4B	Mouse mk	1:50/MW Citrat	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
CD20	B-Zellen	L26	Mouse mk	1:100	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
CD138	Plasmazellen	MI15	Mouse mk	1:50/ MW TRIS EDTA	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
C9neo	Marker für aktivierte Komplementkomponenten		Rabbit pk	1:1500/ Steamer Citrat	Paul Morgan, Cardiff University, Wales United Kingdom
C9neo	Marker für aktivierte Komplementkomponenten	B7	Mouse mab	1:50/ Protease	Paul Morgan, Cardiff University, Wales, United Kingdom
C9neo	Marker für aktivierte Komplementkomponenten		Rabbit/Rat pk	1:6000/ MW Citrat	Paul Morgan, Cardiff University, Wales, United Kingdom
<i>Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase</i> (CNPase)	Myelinprotein	SMI 91	Mouse mk	1:2000/ MW Citrat	HISS Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland
Fibrinogen	Glykoprotein im Blutplasma		Rabbit pk	1:300/Protease	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> (GFAP)	Astrozyten		Rabbit pk	1:1000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Immunglobulin G (IgG)	Plasmazellen		Rabbit pk	1:250/ MW Citrat	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Kim1P	Makrophagen, aktivierte Mikroglia		Mouse mk	1:5000/MW Citrat	Prof. Radzun, Heinz-Joachim, Pathologie Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
<i>Migration Inhibitory Factor-Related Protein 14</i> (MRP14)	frühaktive Makrophagen, Monozyten	S36.48	Mouse mk	1:500/ Protease	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Myelin-Basisches Protein (MBP)	Myelinprotein		Rabbit pk	1:2000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Antigen	Funktion/Marker	Klon	Spezies	Verdünnung/ Vorbehandlung/ Puffer	Firma, Herstellungsort
Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)	Myelinprotein	Mab	Mouse mk	1:1000/ MW Citrat	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)	Myelinprotein		Rat mk	1: 1000/ MW Citrat	Institut für Neuropathologie Göttingen, Deutschland
NOGO-A	Oligodendrozyten		Rabbit pk	1:500/ MW Citrat	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Neurofilament (NF) 200	Bestandteil von Axonen	N52	Mouse mk	1:1000/ MW Citrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor (Olig) 2	Oligodendrogliale Vorläuferzellen und reife Oligodendrozyten		Rabbit pk	1:300 /MW TRIS EDTA	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Gunma, Japan
Proteolipidprotein (PLP)	Myelinprotein	Plpc1	Mouse mk	1:500/ MW Citrat	AbD Serotec, Puchheim, Deutschland
Tubulin polymerization-promoting protein (P25)	Oligodendrozyten	EPR33 16	Rabbit mk	1:500	Abcam, Cambridge, United Kingdom
P62	Ubiquitin-bindendes Protein	3/P62 LCK LIG-AND	Mouse mk	1:500/ Steamer Citrat	BD Transduction Laboratories TM, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 4: Sekundärsysteme und deren Verwendung

Bezeichnung	Verwendung	Verdünnung	Firma, Herstellungsort
Alexa Fluor 488	Sekundärantikörper Fluoreszenz- Immunhistochemie	1:200	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Biotinylierter Sekundärantikörper	Immunhistochemie	1:500	Jackson ImmunoResearch Lab., Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Cy3	Sekundärantikörper Fluoreszenz-Immunhistochemie	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab., Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
ExtrAvidin®	Avidin-Konjugierte Peroxidase, Immunhistochemie	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RREAL™ Envision Detection System	Kit zur Signalamplifikation, Immunhistochemie		Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Tyramid Signal Amplifikation Kit #42, Alexa 555	Kit zur Signalamplifikation, Immunhistochemie		Molecular Probes™, Eugene, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien, technische Geräte und Software

Die in dieser Dissertation verwendeten Verbrauchsmaterialien, technischen Geräte und Software werden in Tabelle 5 bzw. 6 aufgelistet.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Materialname	Firma	Herstellungsort
Deckgläser (24x24, 24x26)	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
E-Cup (2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt AG& CO	Nümbrecht, Deutschland
Falcon™-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Messpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt AG& CO	Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen (1 ml, 200µl, 10µl, 2,5 µl)	Sarstedt AG& CO	Nümbrecht, Deutschland
Mikrotome Blade (Mikrotom-Klinge)	FEATHER®	Osaka, Japan

Tabelle 6: Technische Geräte und Software

Technisches Gerät	Firma	Herstellungsort
25-Punkte Zählgitter	Carl- Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Diamantmesser	Diatome	Nidau, Schweiz
Elektronenmikroskop 10	Carl- Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Kupfergrid	Science Services GmbH	München, Deutschland
Mikrowellengeeignete Färbekästen nach Hellendahl	Carl Roth GmbH+Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Mikrotom SM2000R	Leica	Wetzla, Deutschland
Mikrowelle NN E201 WM	Panasonic	Wiesbaden, Deutschland
Mikroskop BX 40	Olympus Europa GmbH	Hamburg, Deutschland
Mikroskop IX51 mit+DP71 Digitalkamera und XM10 Monochromkamera	Olympus Europa GmbH	Hamburg, Deutschland
pH-Meter inoLab®	WTW GmbH	Weilheim, Deutschland
Wärmeplatte SP 13	Medax Nagel KG	Kiel, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH	Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL® GmbH	Burgwedel, Deutschland
Software		
Adobe Photoshop CS6 Extended	Adobe Systems GmbH	München, Deutschland
Bildanalyse-Software Cell-F	Soft-Imaging Systems GmbH	Münster, Deutschland
Exel 2011 Version 14.0.0	Microsoft DE GmbH	Unterschleißheim, Deutschland

2.2 Auswahl der Leukodystrophiefälle und Kontrollen

Aus dem Autopsie- und Biopsiearchiv des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen wurden über den Zeitraum von 1970 bis einschließlich 2015 alle zur Verfügung stehenden Gewebeproben von Patienten mit der neuropathologischen Verdachtsdiagnose einer Erkrankung aus dem Formenkreis der Leukodystrophien herausgesucht.

Die Patienten mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Verfügbarkeit von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten ZNS-Gewebeproben aus Autopsien oder Biopsien,
- neuropathologische Diagnose eines entmarkenden ZNS-Prozesses vereinbar mit einer Leukodystrophie,
- keine infektiöse, autoimmune oder toxische Genese der neuropathologischen Veränderungen.
- Es werden Patienten beider Geschlechter und jeden Alters eingeschlossen.

Zu den Ausschlusskriterien gehören:

- Fehlen von auswertbaren ZNS-Gewebeproben,
- nachgewiesene infektiöse, toxische oder autoimmune Genese der ZNS-Pathologie

Insgesamt standen von 15 Patienten Autopsieproben und von drei Patienten Biopsieproben für die histologischen Untersuchungen zur Verfügung. Um die Ergebnisse der Auswertung der LD-Fälle miteinander vergleichen und interpretieren zu können, wurde Autopsiegewebe von gleichaltrigen Kontrollen zum Vergleich herangezogen. Insgesamt wurden Gewebeproben von zwölf Kontrollen, die ebenfalls aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie Göttingen stammen, in die Studie eingeschlossen.

Die Kontrollen wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt:

- Verfügbarkeit von Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten ZNS-Gewebe,
- gesunde Patienten, die an einer nicht natürlichen Todesursache verstarben, oder Patienten mit Vorerkrankungen ohne ZNS-Mitbeteiligung,
- neuropathologischer Autopsiebefund ohne wesentliche pathologische Veränderungen,
- Alter der Patienten

Bei einzelnen LD-Fällen konnten keine klinischen Angaben, insbesondere keine Altersangabe, eruiert werden. Hier konnte kein Vergleich mit einem Kontrollfall durchgeführt werden. Bei den Morbus Alexander-Fällen wurde auf einen Vergleich mit Kontrollen verzichtet, da aufgrund der Art und Lokalisation der pathologischen Veränderungen ein Vergleich als nicht sinnvoll angesehen wurde.

Die 19 LD-Fälle wurden nummeriert (# Nr.). Die zwölf Kontrollen (CNTRL) sind gekennzeichnet mit der # Nr. des jeweiligen LD-Falls, dem sie zugeordnet sind, und mit einem Großbuchstaben (beginnend mit A), da bei manchen LD-Fällen mehrere Kontrollen ausgewertet wurden. In der folgenden Tabelle wird die Anzahl der LD-Fälle und Kontrollen aufgelistet.

Tabelle 7: Anzahl verwendeter LD-Fälle und Kontrollen

LD	Anzahl LD-Fälle	Anzahl Kontrollen
MLD	n=3	n=2
X-ALD	n=7	n=6
VWMD	n=3	n=2
M. Alexander	n=2	n=0

2.3 Histologische und immunhistochemische Arbeitsmethoden

Von den Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Autopsie- und Biopsiegewebeproben wurden mit einem Mikrotom 1 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe und Überführung in Aqua bidestilliert.

2.3.1 Histologische Standardfärbungen

Zu den hier verwendeten histologischen Standardfärbungen gehören die Hämatoxylin-Eosin (HE), die *Luxol Fast Blue/Periodic Acid Schiff Reaction* (LFB/PAS) und die Versilberung nach Bielschowsky.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der wichtigsten, schnell und einfach anzuwendenden Färbungen in der Histologie. Die HE-Färbung ermöglicht eine gute Übersicht über die Morphologie des Gewebes. Hämatoxylin/Hämalaun ist ein positiv geladener Kernfarbstoff. Es reagiert daher mit basophilen (sauen, negativ geladenen) Strukturen und färbt die Zellkerne blau. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff (sauer) und reagiert mit den

azidophilen (basischen, positiv geladenen) Strukturen, welche vor allem im Zytoplasma zu finden sind (Wegerhoff 2015).

Die HE-Färbung wurde nach der Entparaffinierung und Rehydrierung gemäß dem Protokoll der Neuropathologie Göttingen wie folgt durchgeführt:

- 1) Spülen mit Aqua destilliert
- 2) Inkubation in Mayers Hämalaun für fünf Minuten
- 3) Differenzieren in 1% HCl-Alkohol
- 4) Bläuen in fließendem Leitungswasser für zehn Minuten
- 5) Inkubation in 1% Eosin-Gebrauchslösung für fünf Minuten
- 6) einmaliges Spülen mit Aqua destilliert
- 7) Überführung in aufsteigende Alkoholreihe
 - a. zweimal je drei Minuten in 100% Isopropanol
 - b. einmal kurzes Eintauchen in Isopropanol/Xylol-Gemisch (1:1)
 - c. viermal je drei Minuten in Xylol
- 8) Eindecken mit DePex

Die *Luxol Fast Blue/Periodic Acid Schiff Reaction* ist eine Kombinationsfärbung. Der LFB-Farbstoff wird in der Histologie zur Darstellung der Markscheiden benutzt (Hirano 1983). Er ist ein basisches Kupfer-Phthalocyanin mit einer ähnlichen Ringstruktur wie das Chlorophyll und bindet an den Markscheiden über die Cholinbausteine der Phospholipide (Wegerhoff 2015). Der PAS-Farbstoff beinhaltet die Periodsäure (HIO₄) und das Schiff'sche Reagenz, eine farblose fuchsinschwefelige Säure, und wird zur Darstellung von Polysacchariden (zum Beispiel Glykogen), Glykoproteinen, Muzinen und Glykolipiden eingesetzt (Lüllmann-Rauch 2009). Durch die LFB/PAS-Färbung markieren sich die Markscheiden türkisblau und die Zellkerne blauviolett.

Die LFB/PAS- Färbung wurde gemäß dem Protokoll der Neuropathologie Göttingen wie folgt durchgeführt:

Erster Schritt LFB-Färbung:

- 1) Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte in der absteigenden Alkoholreihe bis 90% Isopropanol
- 2) Inkubation in LFB-Lösung bei +60 °C über Nacht
- 3) Differenzierung mit 0,05 % Lithiumcarbonat, anschließend mit 70% Isopropanol und Aqua destilliert, bis sich die Markscheiden der weißen Hirnsub-

stanz von der grauen Hirnsubstanz durch ihre kräftige blaue Farbe unterscheiden.

Zweiter Schritt PAS-Färbung:

- 4) Inkubation in 1% Periodsäure für fünf Minuten bei Raumtemperatur
- 5) fünf Minuten Abspülen mit Leitungswasser
- 6) gründlich zweimal mit Aqua destilliert spülen
- 7) 20 Minuten Inkubation in Schiff'schem Reagenz bei Raumtemperatur
- 8) fünf Minuten Abspülen unter fließendem Leitungswasser
- 9) zwei Minuten Inkubation in Mayers Hämalaun bei Raumtemperatur
- 10) einmaliges kurzes Abspülen mit Aqua destilliert
- 11) kurzes Differenzieren mit 1% HCl-Alkohol
- 12) fünf bis zehn Minuten Bläuen in fließendem Leitungswasser
- 13) Überführung in die aufsteigende Alkoholreihe
- 14) einmalige kurze Inkubation in Isopropanol/Xylol Gemisch (1:1)
- 15) dreimal je drei Minuten Inkubation in Xylol
- 16) Eindecken mit DePex

Mit der Versilberung nach Bielschowsky lassen sich Neurone und deren Fortsätze darstellen. Die Färbemethode ermöglicht eine mikroskopische Beurteilung der axonalen Dichte. Ebenso wird die Methode zum Nachweis von Alzheimerischen Veränderungen angewendet. Die Axone stellen sich schwarz dar (Hirano 1983).

Die Versilberung nach Bielschowsky wurde nach der Entparaffinierung und Rehydrierung gemäß dem Protokoll der Neuropathologie Göttingen wie folgt durchgeführt:

- 1) 20 Minuten Inkubation in 20% Silbernitrat-Lösung bei Raumtemperatur
- 2) Spülung mit Aqua bidestilliert
- 3) Zugabe von einigen Tropfen Ammoniak 32% zur zuvor verwendeten 20% Silbernitrat-Lösung
- 4) 15 Minuten Inkubation der Schnitte in der 20% Silbernitrat-Lösung + 32% Ammoniak-Lösung im Dunkeln
- 5) Spülung mit einer Wasser-Ammoniak-Lösung
- 6) Zugabe von 10 Tropfen Entwicklerlösung (20 ml 37% Formalaldehyd, 100ml Aqua bidestilliert, 0,5 g Zitronensäure, ein Tropfen Salpetersäure) in die 20% Silbernitrat-Lösung + 32% Ammoniak und kurze Inkubation, bis die Schnitte tabakbraun sind

- 7) Spülung mit Aqua bidestilliert
- 8) zwei Minuten Inkubation in 2 % Natriumthiosulfat-Lösung
- 9) kurzes Abspülen mit Leitungswasser
- 10) Überführung in die aufsteigende Alkoholreihe
- 11) einmalige kurze Inkubation in Isopropanol/Xylol Gemisch (1:1)
- 12) dreimal je drei Minuten Inkubation in Xylol
- 13) Eindecken mit DePex

2.3.2 Immunhistochemie

2.3.2.1 Grundlagen

In der Immunhistochemie gelingt der Nachweis von spezifischen Makromolekülen, wie z.B. Proteinen, in Zellen und Geweben mithilfe von Antikörpern. Hierbei bedient man sich direkter und indirekter Färbemethoden, um die zell- und gewebespezifischen Proteine (Antigene) darzustellen.

Bei der direkten Färbemethode, die auch als Einschnitt-Methode bezeichnet wird, wird auf den Schnitt ein enzymgekoppelter Antikörper gegeben. Dieser Antikörper ist gegen das zu detektierende Antigen gerichtet. Nach Hinzufügen eines Substrates kommt es zu einer Reaktion des Enzymes mit dem Substrat, welches zu einem Farbprodukt führt und im Lichtmikroskop sichtbar wird (Boenisch et al. 2003; Wegerhoff 2015).

Bei der indirekten Färbemethode, der Zweischritt-Methode, bindet sich ein unmarkierter Primärantikörper zunächst an das zu detektierende Antigen. Anschließend wird ein mit einem Enzym konjugierter Sekundärantikörper dazugegeben. Dieser ist jetzt gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet sich daran. Durch die Hinzugabe von Chromogen als Substrat erfolgt die Substratreaktion, wodurch die Farbentstehung ausgelöst wird (Boenisch et al. 2003).

In dieser Arbeit wurde die indirekte (Strept)Avidin-Biotin-Methode angewendet, welche nachfolgend beschrieben wird.

2.3.2.2 Die (Strept)Avidin-Biotin-Methode

Bei dieser Methode nutzt man die starke Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. Avidin ist ein Protein aus dem Hühnereiweiß und Streptavidin ist ein Protein aus dem Bakterium *Streptomyces avidini*. Das Streptavidin wird häufiger verwendet, da es weniger unspezifische Markierungen verursacht. Beide Proteine haben vier Bindungsstellen für das Biotin (Wegerhoff 2015). Das Prinzip der Methode lässt sich wie folgt erklären: Der unkonjugierte

Primärantikörper erkennt das darzustellende Antigen im Gewebe, und es kommt zur Bindung. Dieser wird nun von einem biotinylierten Zweitantikörper erkannt. Nach Zugabe des Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes bindet sich die biotinylierte Peroxidase an den drei Bindungsstellen des Streptavidins, welches sich wiederum mit seiner freien Bindungsstelle an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Es folgt eine Enzym-Substrat-Reaktion, wodurch die Farbentstehung zustande kommt. Häufig wird das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) verwendet. Es ist ein Enzym, welches aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen wird. Ihr Substrat, das 3'3'-Diaminobenzidin, bildet ein braunes Endprodukt, welches in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist (Boenisch et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 3 und 4 (Kapitel 2.1.3) aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen verwendet.

Nach dem Schneiden und Entparaffinieren der Schnitte ist bei einigen immunhistochemischen Färbungen eine Vorbehandlung der Schnitte nötig (siehe Tabelle 3). Die Vorbehandlung dient der Demaskierung der Antigene, um sie für den Antikörper zugänglich zu machen.

Die (Strept)Avidin-Biotin-Methode wurde gemäß dem Protokoll der Neuropathologie Göttingen wie folgt durchgeführt:

- 1) Objektträger in einem Tris-EDTA-Puffer oder 10 mM Citratpuffer mit einem pH von 6 oder in 2 mM HCl fünfmal für drei Minuten in der Mikrowelle bei 800 Watt kochen.
- 2) 30 Minuten abkühlen, dreimal mit destilliertem Wasser spülen und einmal in PBS stellen.
- 3) Blockierung der endogenen Peroxidase:
 - a. Gewebeschnitte 20 Minuten in eine Küvette mit 3% H_2O_2 in PBS-Puffer (je 50 ml pro Küvette) bei 4 °C stellen und anschließend dreimal mit PBS spülen.
- 4) Vorinkubation:
 - a. Schnitte mit 100 μ l 10% FCS in PBS beschichten und in einer feuchten Kammer 20 Minuten inkubieren.
- 5) Antikörperinkubation:
 - a. FCS dekantieren und Objektträger weitgehend trocken tupfen
 - b. Primärantikörper (bereits mit 10% FCS verdünnt) auf Schnitt geben

- c. Luftblasenfrei mit einem Deckglas bedecken und über Nacht in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubieren
 - d. Deckglas entfernen und Schnitte dreimal mit PBS spülen
 - e. Trockeninkubation mit sekundären biotinylierten Antikörper (1:200 in 10% FCS verdünnt) eine Stunde bei Raumtemperatur
- 6) Peroxidase-Inkubation:
- a. Schnitte spülen, trocken tupfen und mit 100 µl ExtAvidin-Peroxidase (verdünnt 1:1000 in 10% FCS) beschichten und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- 7) Entwicklung:
- a. Schnitte mit PBS spülen
 - b. in einer Küvette mit der DAB-Lösung (49 ml PBS, 1 ml DAB, 20 µl 30% H₂O₂ entwickeln (Dauer: je nach Antikörper 1-20 Minuten)
 - c. mehrmals mit PBS spülen
- 8) Kernfärbung mit Hämalaun:
- a. 30 Sekunden Mayers Hämalaun
 - b. kurz in HCL-Alkohol tauchen
 - c. zehn Minuten mit Leitungswasser bläuen
- 9) in aufsteigender Alkohol-Xylol-Reihe entwässern und mit DePex eindecken

2.3.2.3 Die EnVision-Methode

Die EnVision-Methode ist ein immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis von schwach exprimierten Antigenen. In dieser Dissertation wurde das *Kit REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse* von Dako Deutschland GmbH, Hamburg verwendet. Die EnVision-Methode ist ein Zwei-Schritt-Detektionssystem. Im ersten Schritt werden die Schnitte mit einem optimal verdünnten Primärantikörper (aus dem Kaninchen oder der Maus) inkubiert. Im zweiten Schritt werden die Schnitte mit einem Peroxidase (HRP)-konjugierten Polymer aus dem Kit inkubiert. An die Peroxidase-markierten Polymere sind sekundäre Antikörper konjugiert. Nach Hinzugabe des Substrats, einer DAB-Chromogenlösung, kommt es zu einer Farbreaktion (Boenisch et al. 2003).

Durchführung gemäß dem Protokoll der Neuropathologie Göttingen:

- 1) zehn Minuten in 3% H₂O₂ in PBS-Puffer blockieren
- 2) dreimal mit PBS spülen
- 3) zehn Minuten Präinkubation in 10% FCS in PBS

- 4) anschließend dreimaliges Spülen mit PBS
- 5) Inkubation mit in 10% FCS in PBS verdünnten Primärantikörpern für 60-90 Minuten bei Raumtemperatur
- 6) dreimal mit PBS spülen
- 7) 50-150 μ l (Menge je nach Gewebegröße) der Flasche A (HRP-konjugiertes Polymer) vom Dako EnVision Kit dazugeben und bei Raumtemperatur 35 Minuten inkubieren
- 8) dreimal mit PBS spülen
- 9) 1 ml der Flasche B (Substratpuffer) vom Dako EnVision Kit mit 20 μ l der Flasche C (DAB-Chromogenlösung) mischen
- 10) Inkubation der Schnitte in 50-150 μ l der Mischung (Schritt 9) bei Raumtemperatur und Entwicklung der Farbreaktion
- 11) Spülen und Stoppen der Farbreaktion mit Aqua destilliert
- 12) 30 Sekunden Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun
- 13) vier Sekunden mit Aqua destilliert spülen
- 14) zwei Sekunden differenzieren in HCl-Alkohol
- 15) fünf Minuten Bläuen mit Leitungswasser
- 16) Überführung in die aufsteigende Alkoholreihe
- 17) einmalige kurze Inkubation in Isopropanol/Xylol Gemisch (1:1)
- 18) Dreimal je drei Minuten Inkubation in Xylol
- 19) Eindecken mit DePex

2.3.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Um zwei Antigene in einem Gewebeschnitt zu detektieren, wurden Doppelmarkierungen durchgeführt. Es wurden Doppelmarkierungen mit folgenden Primärantikörpern durchgeführt:

- Anti-IgG-Antikörper (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen) und anti-GFAP-Antikörper (monoklonaler Antikörper aus der Maus)
- Anti-IgG-Antikörper (polyklonal, Kaninchen) und anti-p25-Antikörper (polyklonal, Kaninchen).

Da bei der zuletzt genannten Doppelfärbung beide Antikörper aus derselben Spezies stammen, wurde die Tyramid Signalamplifikationsmethode angewendet. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass Tyramid von der Peroxidase zu hochreaktiven Tyramid-Radikalen umgesetzt wird, welche mit den Proteinen in der unmittelbaren Umgebung eine kovalente Bin-

dung eingehen. Somit gelingt die Detektion eines Antigens mit einem unkonjugierten Primärantikörper und im Anschluss daran die Darstellung eines Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers. Zur Verstärkung des Signals kann ein biotylinierter Sekundärantikörper verwendet und eine Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase durchgeführt werden. Das Tyramid-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat wird von der Peroxidase umgesetzt, und es kommt zu einer Absetzung des Farbstoffes in die unmittelbare Umgebung. Mithilfe der Tyramid-Signalamplifikationsmethode ist im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren eine deutliche Verdünnung der Primärantikörper möglich, da diese Methode eine höhere Verstärkung des Signals ermöglicht (Wang et al. 1999).

Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung, nach Entparaffinierung der Schnitte und Durchführung der entsprechenden Vorbehandlungen:

- 1) 60 Minuten Inkubation in 1% TRITON/PBS bei Raumtemperatur
- 2) 20 Minuten in 10% *Goat*-Serum/PBS bei Raumtemperatur
- 3) Zugabe erster Primärantikörper (Anti-IgG-Antikörper 1:1000 in 10% *Goat*-Serum/0,1 % TRITON), Inkubation bei 4 °C über Nacht
- 4) Zugabe erster Sekundärantikörper konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoff (Cy3), 50 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 5) Zugabe zweiter Primärantikörper (Anti-GFAP-Antikörper 1:100 in 10% FCS/PBS) und Inkubation über Nacht bei 4 °C
- 6) Zugabe zweiter Sekundärantikörper konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 488), Zugabe DAPI 1:10.000 in PBS und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 7) Eindecken mit *Fluorescent Mounting Medium*

Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit der Tyramid Signalamplifikationsmethode nach der Entparaffinierung der Schnitte und der Durchführung der entsprechenden Vorbehandlung:

- 1) 60 Minuten Inkubation in 1% TRITON/PBS bei Raumtemperatur
- 2) 20 Minuten in 10% *Goat*-Serum/PBS bei Raumtemperatur
- 3) Zugabe erster Primärantikörper (Anti-p25-Antikörper, 1:5000, in 1% *Blocking*-Reagenz), Inkubation über Nacht bei 4 °C
- 4) Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers in 1% Block Reagenz,
- 5) HRP-Streptavidin 1:100 in 1% *Blocking* Reagenz 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur

- 6) fünf Minuten Inkubation in Alexa 555 in 0,0015% H₂O₂ 1:500 in Amplifikationspuffer
- 7) Spülen mit PBS
- 8) 20 Minuten Inkubation in 1% *Blocking*-Reagenz bei Raumtemperatur
- 9) Inkubation zweiter Primärantikörper Anti-IgG-Antikörper (1:500) in 1% Block Reagenz bei 4 °C über Nacht
- 10) 60 Minuten Inkubation Alexa 488 (1:200) in 1% *Blocking* Reagenz bei Raumtemperatur
- 11) Zugabe DAPI 1:10.000 in PBS und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 12) Eindecken mit *Fluorescent Mounting Medium*

2.3.4 Herstellung von Semidünn- und Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Um eine hohe räumliche Auflösung der Morphologie, der Struktur und der Zusammensetzung des Gewebes zu ermöglichen, wurden bei den MLD- und X-ALD-Fällen Autopsieproben elektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden zunächst Semidünnschnitte von 340-400 nm Dicke mit einem Ultramikrotom der Firma Leica angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Semidünnschnitte wurden auf einer Wärmeplatte mit einer Temperatur von 60°C getrocknet. Dann wurde die Farbstofflösung nach Richardson aufgetragen und drei Minuten belassen. Anschließend wurde die Farbe mit Aqua bidest. abgespült und die Schnitte zum Trocknen auf die Wärmeplatte gelegt. Nach der lichtmikroskopischen Beurteilung der Semidünnschnitte erfolgte die Anfertigung der Ultradünnschnitte. Mit einer Rasierklinge wurden trapezförmig zuvor im Semidünnschnitt ausgewählte Regionen herausgeschnitten und mit einem Diamantmesser Schnitte von 70nm Dicke angefertigt, die mit einem Kupfergrid aufgefangen wurden, getrocknet wurden und im Anschluss für zehn bis zwölf Minuten mit Bleicitrat kontrastiert wurden.

2.4 Histologische Auswertung

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurde das Licht- und Fluoreszenzmikroskop IX51 der Firma Olympus verwendet. Bei jedem LD-Fall wurden, wenn möglich, unterschiedlich stark betroffene Bereiche ausgewählt und ausgewertet. Hierbei wurden das Ausmaß der Entmarkung in der grauen und weißen Substanz und die axonale Schädigung beurteilt. Des Weiteren wurden die entzündliche Infiltration, die Makrophagenabräumreaktion, die reaktive Gliose und das Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung ausgewertet und quantifi-

ziert. Die fotografische Dokumentation erfolgte mithilfe der Digitalkamera Olympus DF 71 und der monochromen Kamera XM10, der Bildanalysesoftware CellSens Dimension 1.7 und der Adobe Photoshop Software CS6 Extended. Die statistische Aufarbeitung der Daten wurde mit Microsoft Office Excel 2011 Version 14.0.0 durchgeführt.

2.4.1 Entmarkungsgrad

Um das Ausmaß der Entmarkung semiquantitativ zu erfassen, wurde die in der Tabelle 8 dargestellte Skala verwendet. Der Entmarkungsgrad wurde in den zuvor ausgewählten unterschiedlich stark betroffenen Arealen in den verschiedenen Myelinfärbungen (LFB/PAS-, MBP-, PLP-, CNP-, MAG-, MOG-Färbung) beurteilt.

Tabelle 8: Skala Entmarkungsgrad

Grad	Entmarkung
0	keine feststellbare Entmarkung
1	milde Entmarkung, < 1/3 der Fläche betroffen
2	moderate Entmarkung, 1/3 bis 2/3 der Fläche betroffen
3	schwere Entmarkung, > 2/3 der Fläche betroffen
4	vollständige Entmarkung

2.4.2 Axonale Schädigung

Für die Beurteilung der axonalen Schädigung wurden die relative axonale Dichte und der Grad der axonalen Reduktion ermittelt. Die relative axonale Dichte wurde in der Versilberung nach Bielschowsky mithilfe eines 25-Punkte-Zählgitters (Carl Zeiss) bestimmt. Hierbei wurde in zehn Gesichtsfeldern bei 1000-facher Vergrößerung die Anzahl an Axonen erfasst, die exakt die 25 Punkte des Zählgitters kreuzen. Der daraus gebildete Mittelwert der Anzahl der kreuzenden Axonen/Gesichtsfeld wurde mit den 25 Kreuzpunkten ins Verhältnis gesetzt, um die relative axonale Dichte in % zu ermitteln. Die axonale Reduktion wurde anhand einer Skala von 0 bis 4 semiquantitativ bestimmt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Skala Reduktionsgrad

Grad	Axonale Reduktion
0	Keine feststellbare axonale Reduktion
1	Milde axonale Reduktion
2	Moderate axonale Reduktion
3	Schwere axonale Reduktion
4	kompletter Axonverlust

2.4.3 Quantifizierung von Zellen und axonaler Sphäroide

Die Quantifizierung von verschiedenen Zelltypen und von axonalen Sphäroiden wurde mittels fotografischer Dokumentation mit der Olympus DF 71 Digitalkamera und dem Olympus Licht- und Fluoreszenzmikroskop IX 51 durchgeführt. Dazu wurden bei 400-facher Vergrößerung mindestens zehn Aufnahmen von dem jeweiligen Areal und der jeweiligen Färbung angefertigt. Das ausgewertete Areal wurde mithilfe der Olympus Cell-Sens Dimension 1.7 ausgemessen (Fläche= 0.0361489 mm²). In jeder Aufnahme wurden die Zellen ausgezählt und die Dichte/mm² bestimmt. Anschließend wurden der Mittelwert und der Standardfehler ermittelt.

Folgende Zellen bzw. zelluläre Strukturen wurden so quantifiziert:

- KiM1P-positive Mikroglia und Makrophagen/mm²
- CD3-positive T-Zellen/mm², CD4-positive T-Helferzellen/mm², CD8-positive zytotoxische T-Zellen/mm², CD20-positive B-Zellen/mm², CD138-positive Plasmazellen/mm²
- Nogo-A- oder p25-positive Oligodendrozyten/mm²
- GFAP-positive Astrozyten/mm²
- APP-positive axonale Sphäroide/mm²

2.5 Genetische Untersuchung

In Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Ohlenbusch, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Göttingen, wurde eine genetische Untersuchung der Autopsieproben angestrebt. Dafür wurde zunächst versucht, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe zu extrahieren und mithilfe der Polymerasekettenreaktion zu amplifizieren. Leider ist es nicht gelungen, verwertbares DNA-Material aus dem z.T. bereits über Jahrzehnte in Paraffin eingebetteten Autopsiegewebe zu extrahieren. Eine Mutationsanalyse zur genetischen Bestätigung der Diagnose war daher nicht möglich.

2.6 Ethikvotum

Die Studie „Vergleichende Untersuchung zur Histopathologie und Genetik der Leukodystrophien“ wurde durch die Ethikkommission Göttingen geprüft und genehmigt (AZ: 24/4/15). Die Ethikkommission Göttingen hat keinerlei ethische und rechtliche Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel. In den Ergebnistabellen ist jeweils der Mittelwert der Anzahl der Zellen/mm² \pm Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Metachromatische Leukodystrophie

Autopsiegewebe von insgesamt drei Patienten mit MLD standen für die Auswertung zur Verfügung. Bei Fall Nummer #1 wurde zu Lebzeiten des Patienten mithilfe einer Hautbiopsie die Diagnose biochemisch gesichert. Die Analyse der kultivierten Fibroblasten aus der Hautbiopsie ergab eine Erniedrigung der Arylsulfatase-A-Aktivität auf 3%. Bei den Fällen #2 und #3 sind keine klinischen Angaben verfügbar. Beide Fälle zeigen jedoch lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch die typischen Kennzeichen einer MLD.

3.1.1 Klinische Daten der Patienten

Die klinischen Angaben zum biochemisch gesicherten MLD-Fall #1 sowie zu den dazugehörigen zwei Kontrollen (CNTRL-A und -B) werden in der Tabelle 10 aufgeführt. Bei den MLD-Fällen #2 und #3 handelt es sich um erwachsene Patienten (#2 männlich und 31 Jahre alt, #3 weiblich und 47 Jahre alt), von denen jedoch abgesehen von Alter und Geschlecht keine weiteren klinischen Daten verfügbar sind.

Tabelle 10: Klinische Daten des biochemisch gesicherten MLD-Falls und der Kontrollen.

Fall	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Klinische Symptome	Todesursache
MLD-Fall #1	2 Jahre 4 Monate	weiblich	Eltern nicht verwandt, Eltern und Geschwister gesund	Durchfall und Erbrechen, progrediente spastische Tetraparese, Horizontalnystagmus links, kein Stehen, kein Gehen mehr möglich	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu MLD #1)	2 Jahre 6 Monate	männlich	keine Angaben verfügbar	gesundes Kind	Ertrinken
CNTRL-B (zu MLD #1)	2 Jahre 2 Monate	männlich	keine Angaben verfügbar	gesundes Kind	Ertrinken
MLD-Fall #2	31 Jahre	männlich	keine Angaben verfügbar		
CNTRL-A (zu MLD #2)	29 Jahre	männlich	keine Angaben verfügbar	Lungenentzündung, Sepsis, Dialyse bei Nierenversagen, <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , Extrakorporale Membranoxygenierung	Herz-Kreislauf-Versagen
MLD-Fall #3	47 Jahre	weiblich	keine Angaben verfügbar		
CNTRL-A (zu MLD #3)	46 Jahre	weiblich	keine Angaben verfügbar	Verkehrsunfall mit linksseitigem Weichteiltrauma, Bruch linke Speiche, Beckenbruch, Schenkelhalsbruch, Ileus, Peritonitis	Lungenembolie

3.1.2 Histopathologie der metachromatischen Leukodystrophie

3.1.2.1 Allgemeine histopathologische Beschreibung der untersuchten Fälle

MLD-Fall #1: Sowohl die supra- als auch die infratentoriellen Strukturen sind betroffen. Das Marklager zeigt eine nahezu vollständige Demyelinisierung (Abb. 1A+B+C, Abb. 2A). Die demyelinisierten Bereiche erscheinen insgesamt zellarm. Es lassen sich nur sehr wenige Zellkerne identifizieren. Nur äußerst wenige intakte, zum Teil bereits aufgedunsene Myelinfasern sind noch vorhanden (Abb. 2C+D). Myelintrümmer finden sich frei im Parenchym liegend (Abb. 2C+D). Die Demyelinisierung ist in der LFB-Färbung deutlicher zu sehen als in den Färbungen für die Myelinproteine MBP, PLP, CNP, MAG und MOG (Abb. 1A+B+C).

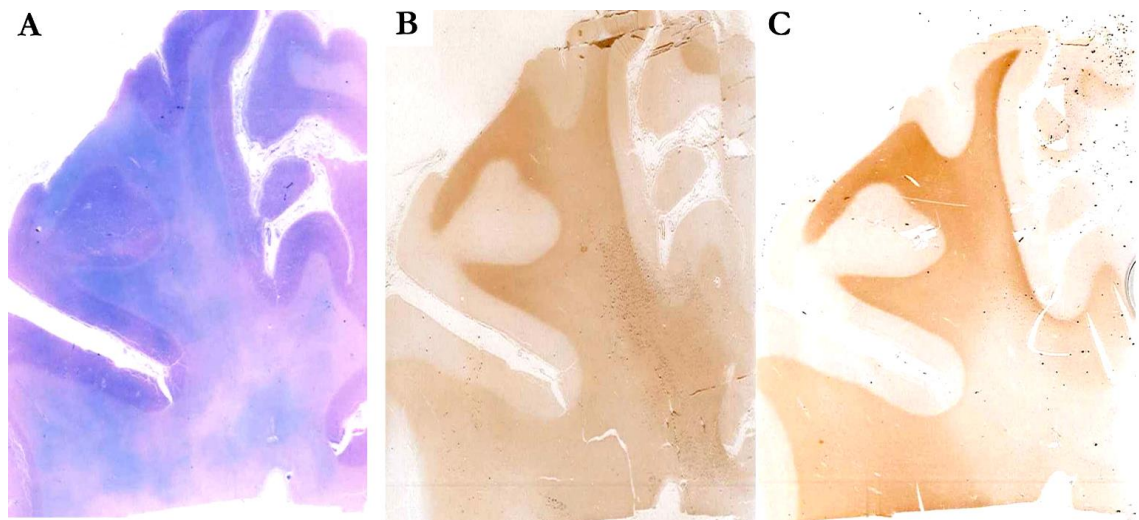


Abbildung 1: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #1.

A= LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

Innerhalb der Makrophagen lässt sich der Myelinabbau nur in sehr wenigen Makrophagen darstellen (Abb. 2E). Auch der axonale Besatz ist deutlich reduziert (Abb. 2B). Eine signifikante akute axonale Schädigung kommt nicht zur Darstellung. Die gliale Matrix ist ausgedünnt und weist eine ausgeprägte Gliose auf (Abb. 2H). Der Kortex ist von der Entmarkung nicht betroffen, ist aber aufgrund des Alters des Kindes noch nicht vollständig myelinisiert. Auffällig sind zum Teil sehr große Makrophagen mit dicht bepackten zytoplasmatischen Einschlüssen (Abb. 2A+C+D+F). Diese Einschlüsse stellen sich in der HE-Färbung teils eosinophil und teils basophil dar, lassen sich in der LFB/PAS-Färbung deutlich abgrenzen und weisen teils Ubiquitin-positives Material auf (Bildausschnitt Abb. 2D). In der PLP- und KiM1P-Färbung lassen sich oftmals bläuliche Einschlüsse in den Makrophagen nachweisen (Abb. 2F★). Die Makrophagen finden sich selten in Gruppen, oftmals verein-

zelt im Parenchym und schütter perivaskulär verteilt. Oft zeigt sich ein chromatindichter längsovaler Zellkern am Rand des Zelleibs. Einzelne Makrophagen weisen einen kleinen, fragmentierten Zellkern auf, hinweisend auf eine Apoptose (Abb. 2F). Granuläre Einschlüsse finden sich auch vereinzelt im Zytoplasma der Astrozyten (Abb. 2H). Zudem zeigt sich ein deutlicher Verlust von Oligodendrozyten in der weißen Substanz (Abb. 2I). Vor allem in den Bereichen mit vollständiger Entmarkung fehlen die Oligodendrozyten stellenweise vollständig. Eine signifikante Entzündungsaktivität zeigt sich in den ausgewerteten Bereichen nicht. Allerdings lassen sich in anderen Bereichen perivaskulär vereinzelt T-Zellen nachweisen. B-Lymphozyten oder Plasmazellen kommen nicht zur Darstellung. Ultrastrukturell zeigen sich die typischen lamellären Einschlüsse in den Makrophagen (Abb. 2J).

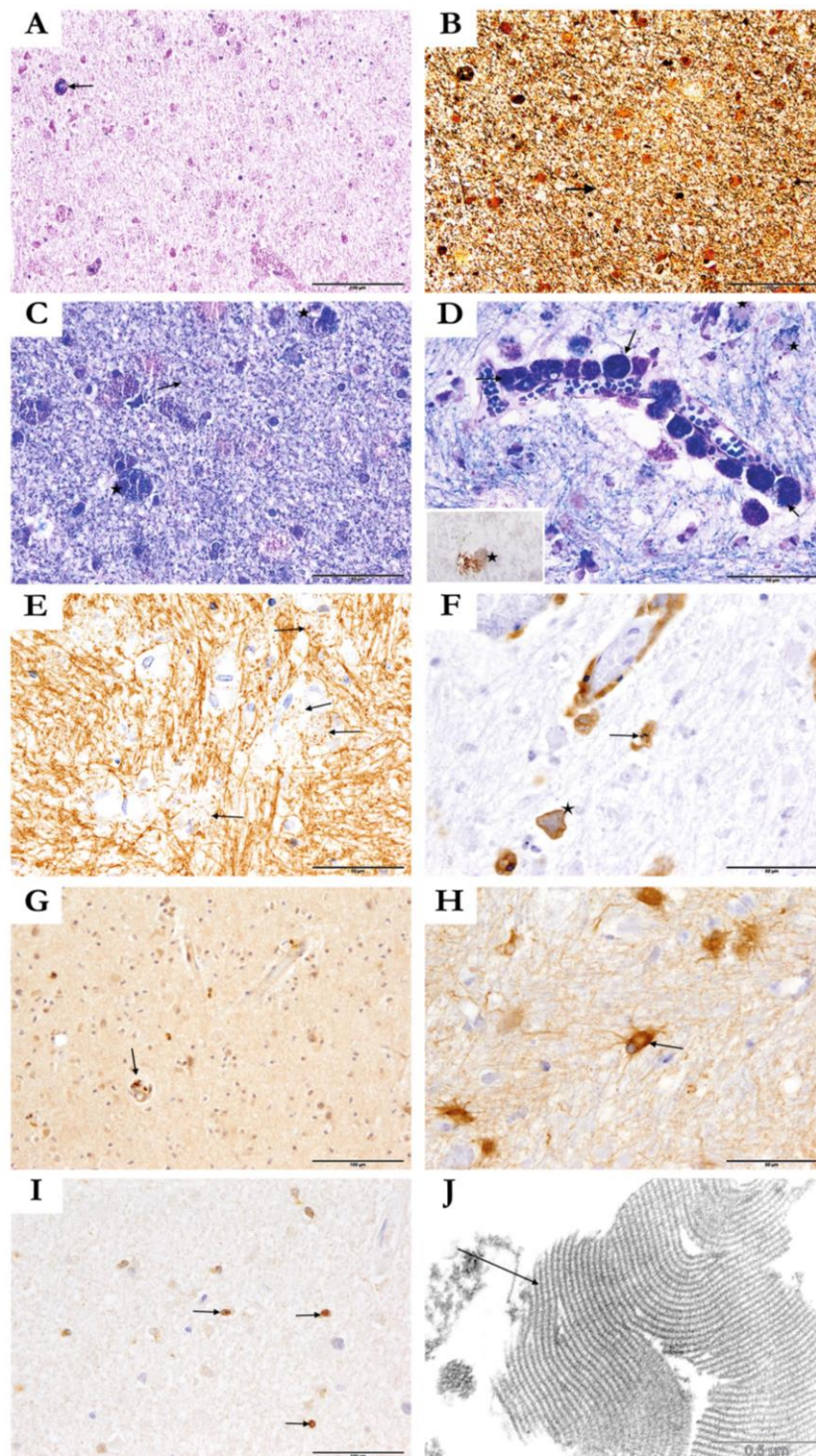


Abbildung 2: Histopathologie MLD-Fall #1.

Nahezu vollständig demyelinisierter Bereich (A, Makrophage ➔). Reduzierter axonaler Besatz (B, Axon ➔). Wenige intakte, teils aufgedunsene Myelinfasern (C ➔). Zahlreiche Makrophagen, dicht bepackt mit zyttoplasmatischen Einschlüssen (C, Makrophage, D, Makrophagen ➔), die teils Ubiquitin-positives Material erkennen lassen (D Ausschnitt links unten ★). Der Myelinabbau innerhalb der Makrophagen ist vereinzelt darstellbar (E ➔). Einige Makrophagen zeigen blaue Einschlüsse (F★). Vereinzelt sind Makrophagenapoptosen erkennbar (F ➔). Entzündliche Infiltrate im Parenchym lassen sich nicht identifizieren. Nur perivaskulär kommen vereinzelt CD3-positive T-Zellen zur Darstellung (G ➔). Die gliale Matrix ist ausgedünnt und weist

eine ausgeprägte Gliose auf (H →). Im Zytoplasma der Astrozyten kommen granuläre (D★) und kugelige (H →) Einschlüsse zur Darstellung. Einige wenige P25-positive Oligodendrozyten können nachgewiesen werden (I→). Ultrastrukturell zeigen sich die typischen lamellären Einschlüsse (J→). Histologische Färbungen: A+C+D: LFB/PAS, B: Versilberung nach Bielschowsky; Immunhistochemie für: PLP (E), KiM1P (F), CD3 (G), GFAP (H), P25 (I), Elektronenmikroskopische Aufnahme (J). Messbalken: A+B+G+I= 100 µm; C- H: 50 µm; J: 0,5 µm.

MLD-Fall #2: Im gesamten Marklager sowohl supra- als auch infratentoriell lässt sich eine ausgedehnte, unscharf begrenzte, unvollständige Entmarkung erkennen (Abb. 3A+B+C, Abb. 4A+B). Das Myelin in den U-Fasern ist noch vorhanden (Abb. 3A+B+C).

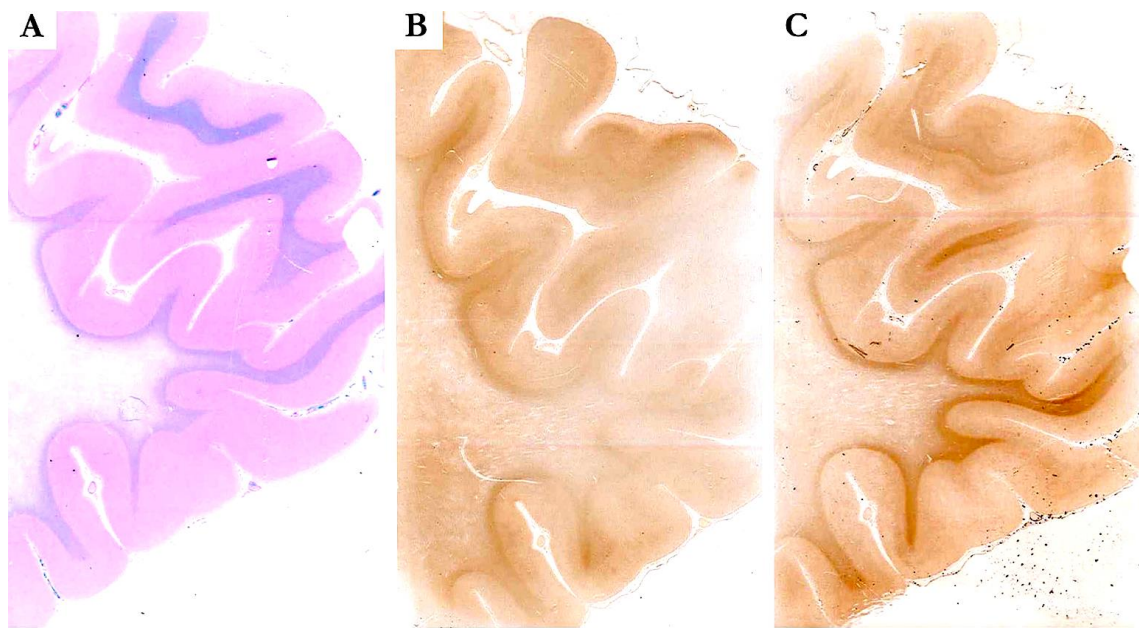


Abbildung 3: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #2.

A=LFB/PAS-Färbung, B=MBP-Färbung, C=MOG-Färbung.

Stellenweise sind einige Markscheiden erhalten, allerdings oft vakuolisiert oder fragmentiert (Abb. 4A+B). Eine kortikale Entmarkung zeigt sich nicht. Der axonale Besatz ist reduziert. Auch hier lassen sich viele Makrophagen mit eosinophilem, blass basophilem, PAS-positivem und vereinzelt LFB-positivem inkorporiertem Material darstellen, und einzelne Makrophagen zeigen bläulich wirkende Vakuolen (Abb. 4F) im Zellinneren. Die Makrophagen sind unterschiedlich groß und oftmals ist kein Zellkern erkennbar. Die Verteilung der Makrophagen ist ungleichmäßig. Teils liegen sie vereinzelt im Parenchym und teils in Nestern (Abb. 4A★), vor allem perivaskulär. Auch hier finden sich zahlreiche Makrophagen mit inkorporiertem Material, die sich in den verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Färbungen unspezifisch markieren (Abb. 4D). Makrophagen finden sich auch in den U-Fasern und im Sehnerv (Abb. 4C). Eine nennenswerte Entzündung kommt

nicht zur Darstellung (Abb. 4E). Ein deutlicher Verlust von Oligodendrozyten ist erkennbar. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigen sich die typischen lysosomalen Einschlüsse (Abb. 4H).

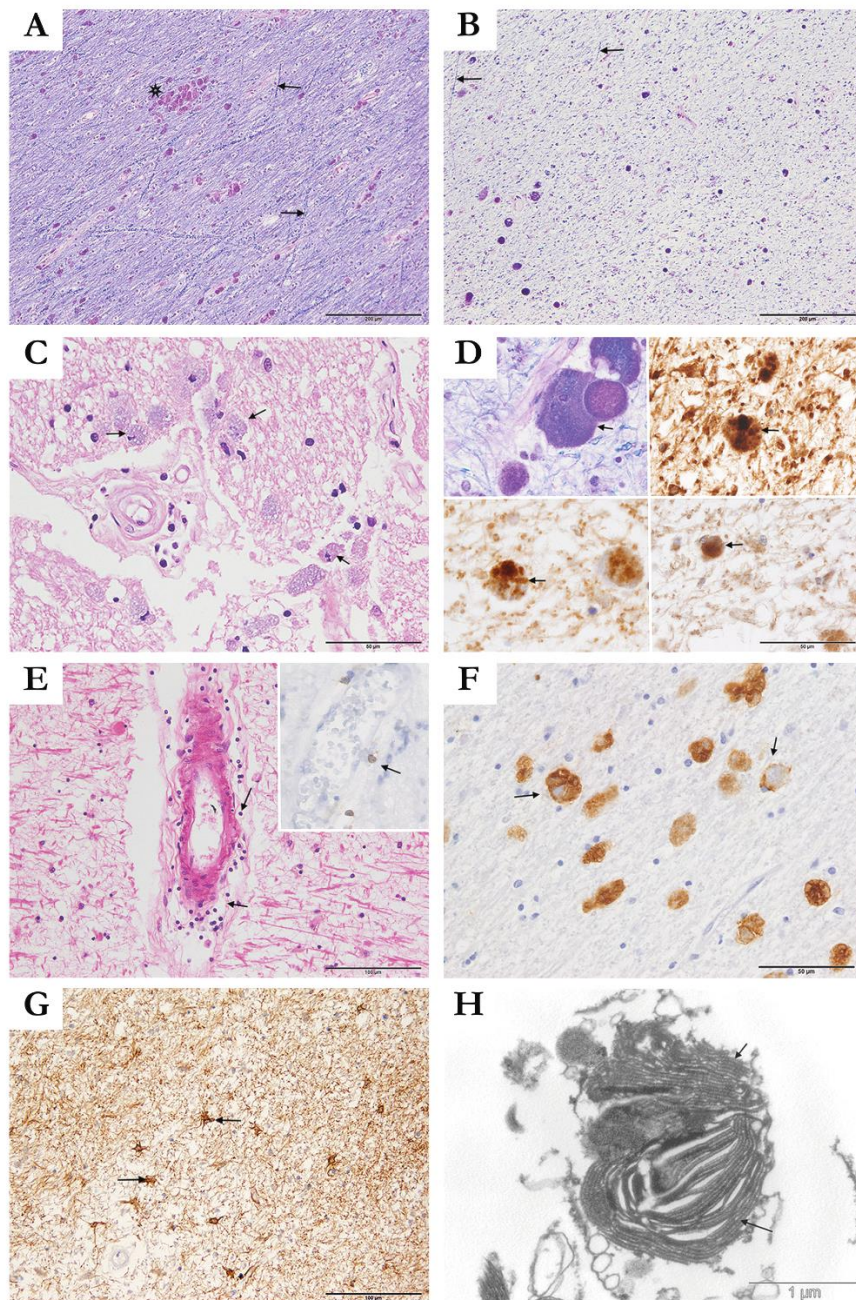


Abbildung 4: Histopathologie MLD-Fall #2.

Frühes (A) und spätes (B) Stadium der Demyelinisierung mit zahlreichen PAS-positiven und vereinzelt LFB-positiven Makrophagen, teils verstreut im Parenchym und teils in Nestern liegend (A★). Einige Markscheiden sind erhalten, allerdings oft aufgedunsen und fragmentiert (A+B →). Auch im Sehnerv lassen sich große, dicht bepackte Makrophagen mit zytoplasmatischen Einschlüssen nachweisen (C →). Die Makrophagen sind insgesamt sehr groß und voll bepackt mit inkorporiertem Material, das sich in den unterschiedlichen histologischen und immunhistologischen Färbungen unspezifisch markiert (D →). Höchst vereinzelt kommen

Lymphozyten zur Darstellung (E →). Einige Makrophagen zeigen bläulich wirkende Vakuolen im Zellinneren (F →). Eine ausgeprägte Fasergliose (G →) ist feststellbar. Ultrastrukturell zeigen sich die typischen lysosomalen lamellären Einschlüsse (H →). Histologische Färbungen: A+B+D (links oben): LFB/PAS, C+E: HE; Immunhistochemie für: CNP (D rechts oben), MAG (D links unten), MOG (D rechts unten), CD8 (E kleiner Ausschnitt rechts oben), Kim1P (F), GFAP (G); Elektronenmikroskopische Aufnahme (H). Messbalken: A+B: 200 µm; C+D+F: 50 µm; G+E: 100 µm; H: 1 µm.

MLD-Fall #3: Sämtliche Bereiche der weißen Substanz des ZNS sind betroffen. Die weiße Substanz zeigt in den Übersichtsaufnahmen eine flächige Entmarkung, wobei die U-Fasern von der Entmarkung nicht betroffen sind (Abb. 5A+B+C). Bei genauerer Untersuchung imponiert die Entmarkung eher fleckig. Die vollständig entmarkten Areale sind sehr zellarm. Daneben kommen auch Areale mit noch stehendem Myelin zur Darstellung, wobei die Myelinfasern teilweise aufgedunsen und aufgequollen erscheinen (Abb. 6A+B+C). Eine kortikale Entmarkung lässt sich nicht nachweisen. Zahlreiche perivaskuläre und parenchymale Makrophagen (Abb. 6B+C+D) und apoptotische Makrophagen lassen sich darstellen. Zahlreiche Makrophagen finden sich in den U-Fasern. Der axonale Besatz ist deutlich reduziert. Die Oligodendrozyten sind deutlich in ihrer Zahl reduziert (Abb. 6E). Perivaskulär und parenchymal können T-Lymphozyten nur höchst vereinzelt identifiziert werden (Abb. 6F). B-Lymphozyten und Plasmazellen lassen sich nicht darstellen. Eine ausgeprägte Fasergliose kommt in der weißen Substanz zur Darstellung (Abb. 6G). Ultrastrukturell kommen lysosomale Einschlüsse zur Darstellung (Abb. 6H).

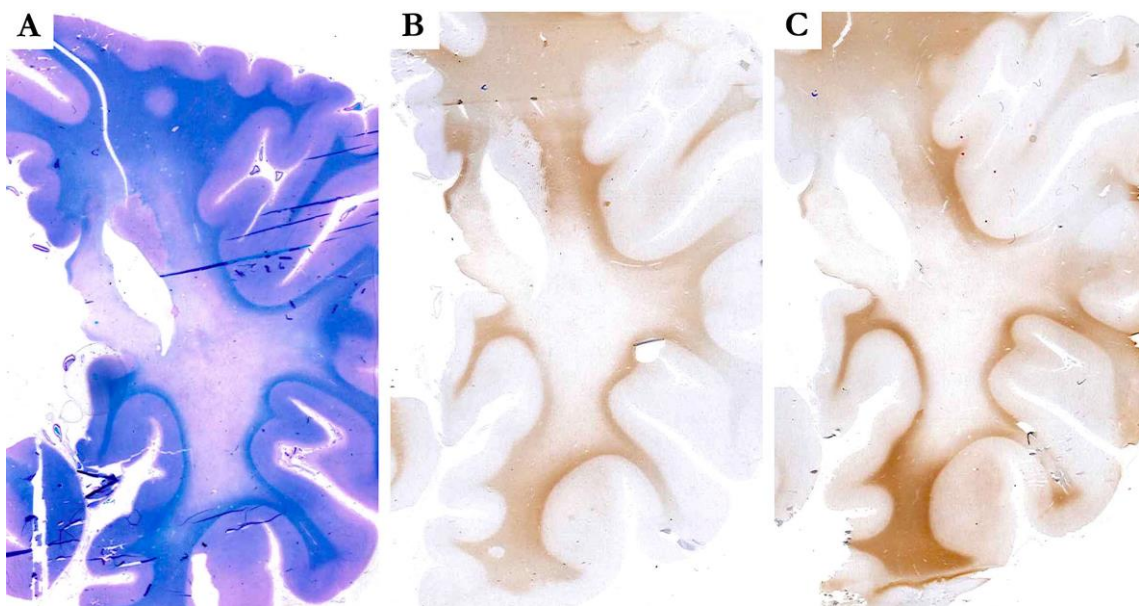


Abbildung 5: Ausmaß der Entmarkung im MLD-Fall #3.

A=LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

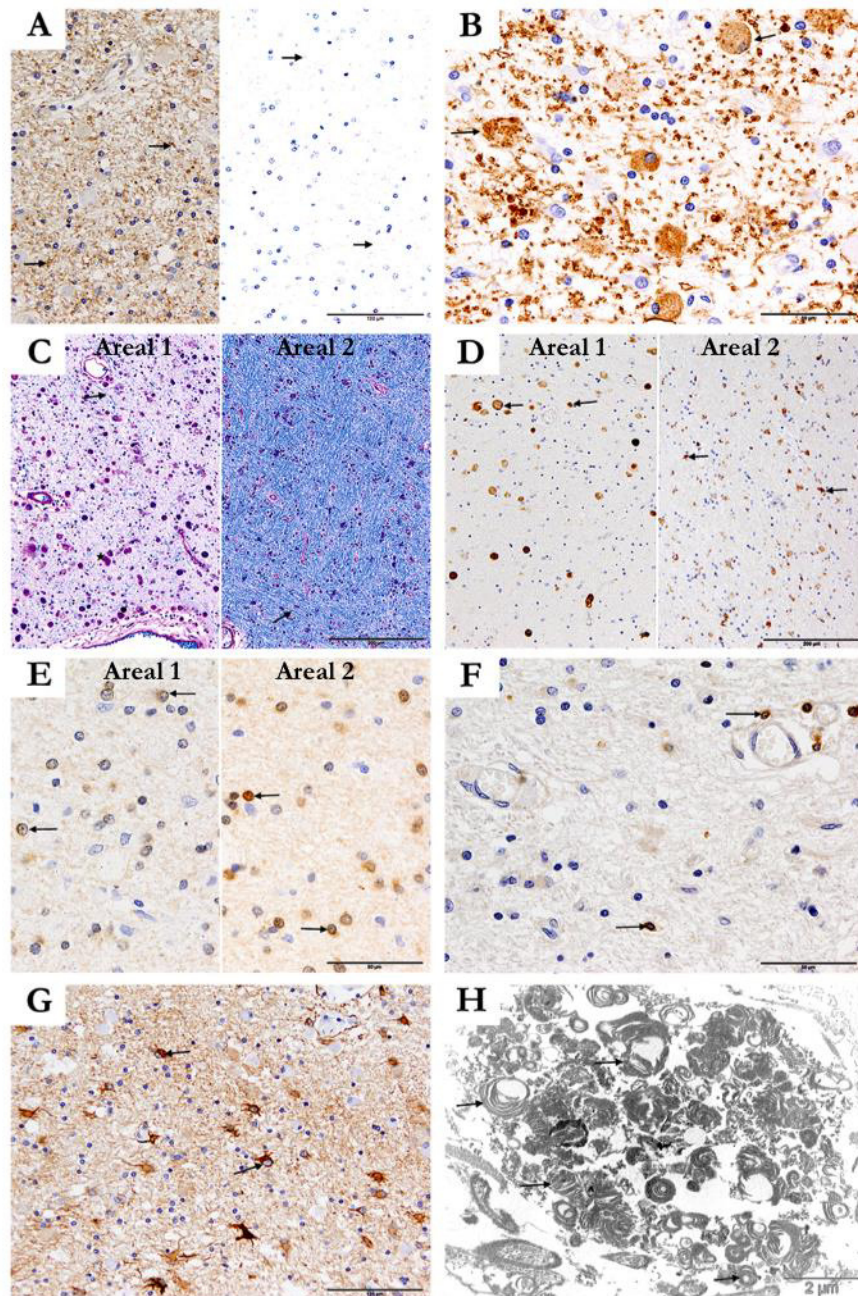


Abbildung 6: Histopathologie MLD-Fall #3.

Kleine und große Myelinproteine in Form von Trümmern im Parenchym (A → Myelin). Stellenweise finden sich Makrophagen mit PLP-positiven Myelinabbauprodukten in ihrem Zytoplasma (B →). Das Ausmaß der Entmarkung variiert in verschiedenen Arealen (C links Areal 1 ausgeprägte Demyelinisierung, C rechts Areal 2 milde bis keine feststellbare Entmarkung, → noch stehende Myelinfasern), ebenso das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung und Makrophageninfiltration (D links Areal 1 einige schaumzellige Makrophagen →, D rechts Areal 2 überwiegend Mikrogliaaktivierung ohne Schaumzellbildung →). Die Reduktion der Oligodendrozyten variiert je nach Entmarkungsgrad (E links Areal 1 wenige Oligodendrozyten →, E rechts Areal 2 zahlreiche Oligodendrozyten →). Höchst vereinzelt lassen sich perivaskulär T-Lymphozyten nachweisen (F →). Eine ausgeprägte Fasergliose mit zahlreichen reaktiven Astrozyten (G →) zeigt sich in den betroffenen Arealen. Ultrastrukturell finden sich die typischen lamellären Einschlüsse (H →). Histologische Färbungen: C: LFB/PAS, Immunhistochemie für: MBP (A links), CNP (A rechts), PLP (B), Kim1P (D), P25 (E), CD3 (F),

GFAP (G), Elektronenmikroskopische Aufnahmen (H). Messbalken: A+G: 100 μm ; B+E+F: 50 μm ; C+D: 200 μm ; H: 2 μm .

3.1.2.2 Ergebnisse der untersuchten MLD-Fälle und der Kontrollen

In der Tabelle 11 werden die Ergebnisse der verschiedenen ausgewerteten Bereiche der MLD-Fälle und der jeweiligen Kontrollen dargestellt. In den entmarkenden Arealen der MLD-Fälle ist die Expression der großen und kleinen Myelinproteine ähnlich reduziert. Es zeigt sich je nach Entmarkungsgrad eine variable Reduktion von Axonen und Oligodendrozyten. Eine signifikante akute axonale Schädigung ist nicht feststellbar. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die MLD-Fälle eine ähnliche Anzahl an Mikrogliazellen, wobei diese bei den MLD-Fällen aktiviert sind bis zu hin zur Umwandlung in schaumzellige Makrophagen, wohingegen bei den Kontrollen die Mikroglia ruht. Die Anzahl an reaktiven Astrozyten kann vermehrt sein. Eine entzündliche Infiltration im Parenchym zeigt sich nicht.

Tabelle 11: Ergebnisse der untersuchten MLD-Fälle und Kontrollen

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten/mm ²	KiM1P-positive Mikroglia /mm ²	GFAP-positive Astrozyten/mm ²	CD3-positive T-Zellen/mm ²	CD4-positive T-Zellen/mm ²	CD8-positive T-Zellen/mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP positiven Sphäroide/mm ²						
MLD #1	tiefe	4	1	2	n.a.	1	1	1	17,4	0	8,6 ± 3,7	92,7 ± 18,1	207,5 ± 22,1	0	0	0
	sk	4	1	1	n.a.	1	1	1	8	0	188,1 ± 34,3	149,4 ± 31,9	160,5 ± 20,7	0	0	0
CNTRL-A (zu MLD #1)	sk	0	0	0	0	0	0	0	39,6	0	379,0 ± 69,1	166,0 ± 21	210,2 ± 26,3	0	0	0
CNTRL-B (zu MLD #1)	sk	0	0	0	0	0	0	0	31,6	0	445,4 ± 63,2	127,3 ± 26,3	185,3 ± 30,1	0	0	0
MLD #2	sk	2	3	2	2	3	3	2	23,2	n.a.	n.a.	116,2 ± 16	232,4 ± 34,5	0	0	0
CNTRL-A (zu MLD #2)	sk	0	0	0	0	0	0	0	68,8	0	337,5 ± 24,3	207,5 ± 39,4	55,3 ± 9,9	0	n.a.	n.a.
MLD #3	pv	3	3	3	3	4	3	2	15,6	0	757,9 ± 72,7	99,6 ± 11,4	203,3 ± 12,6	74,7 ± 27,8	45,8 ± 12,6	63,6 ± 14,8
	sk	0	0	0	0	0	0	1	4,8	0	1070,6 ± 43,1	276,63 ± 33,2	262,8 ± 18,6	80,2 ± 40,9	19,4 ± 7,2	52,56 ± 17,7
CNTRL-A (zu MLD #3)	sk	0	0	0	0	0	0	0	58,8	0	n.a.	185,3 ± 21,4	110,7 ± 2,5	0	0	0

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Auswertung der MLD-Fälle und der dazugehörigen Kontrollen dargestellt. **Score Entmarkung:** 0: keine Entmarkung, 1: milde Entmarkung, 2: moderate Entmarkung, 3: schwere Entmarkung, 4: vollständige Entmarkung, **Score Grad der axonalen Reduktion:** 0: keine axonale Reduktion, 1: milde axonale Reduktion, 3: moderate axonale Reduktion, 4: kompletter Axonverlust

3.1.2.3 Histopathologische Charakteristika der metachromatischen Leukodystrophie

Zusammenfassend finden sich folgende histologische Merkmale bei der MLD:

- 1) Ausgedehnte, unscharf begrenzte Entmarkung, zellarme Bereiche mit wenigen vitalen Zellen, vakuolisiertes stehendes Myelin und Myelintrümmer im Parenchym,
- 2) Makrophagen von unterschiedlicher Größe, dicht bepackt mit inkorporiertem, teils Ubiquitin-positivem Material, oftmals unspezifische Markierung in den verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Färbungen,
- 3) Nachweis von Makrophagenapoptosen,
- 4) Deutliche Reduktion der Oligodendrozyten, keine eindeutigen Oligodendrozytenapoptosen nachweisbar;
- 5) Keine kortikale Entmarkung,
- 6) U-Fasern mit Makrophageninfiltration, aber ohne deutliche Entmarkung,
- 7) Variable Reduktion des axonalen Gerüsts, keine nennenswerte akute axonale Schädigung,
- 8) Keine nennenswerte entzündliche Infiltration im Parenchym.

3.2 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Zur Auswertung standen Autopsiegewebe von vier Patienten und Biopsiegewebe von drei Patienten mit einer X-ALD zur Verfügung.

Bei den X-ALD-Fällen #1, #2 und #3 wurde eine Hirnbiopsie durchgeführt, bevor durch die Bestimmung der VLCFA im Plasma die Diagnose X-ALD gesichert wurde.

Bei den Fällen #4 und 5# fehlen Angaben zur Höhe des VLCFA-Spiegels im Plasma, wobei angemerkt werden muss, dass es sich bei diesen beiden Fällen um Autopsien aus den 70er Jahren handelt. Beide Patienten zeigen die für die X-ALD typischen neurologischen Symptome und eine Nebennierenrindeninsuffizienz. Klinische Angaben zu den Patienten #6 und #7 fehlen. Bei beiden Patienten finden sich in den Autopsieproben die typischen licht- und elektronenmikroskopischen Veränderungen der X-ALD.

3.2.1 Klinische Daten der Patienten

Die klinischen Angaben zu den X-ALD-Fällen sowie zu den jeweiligen Kontrollen (CNTRL) werden in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Klinische Daten der X-ALD-Fälle und der Kontrollen

Fall	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesursache
X-ALD-Fall #1	20 Jahre bei Krankheitsbeginn	m	Keine Angaben zu den Eltern, 3 gesunde Schwestern, 1 gesunder Bruder, <u>Großmutter mütterlicherseits</u> : sensible und motorische Polyneuropathie	<u>Beginn der Erkrankung</u> : Zunehmende Sehstörungen, Abbruch der Berufsausbildung, zunehmende psychomotorische Verlangsamung, Gedächtnisstörungen <u>7 Monate nach Krankheitsbeginn</u> : Knochenmarkstransplantation <u>8 Monate nach Krankheitsbeginn</u> : zunehmende Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit epileptischen Anfällen, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Somnolenz, Desorientiertheit, zunehmende Verschlechterung, palliative Führung	<u>Ophthalmologische Untersuchung</u> : bitemporale Hemianopsie nach links und obere Quadrantenanopsie. <u>MRT</u> : massive Alteration des temporalen bis occipitalen Marklagers beidseits, im Balken mit deutlicher randständiger Kontrastmittelanreicherung, Progression der Marklagerveränderungen in nachfolgenden MRT-Aufnahmen, spinal unauffälliger Befund. <u>Neurologischer Befund</u> : Hinterstrangsyndrom, Gesichtsfeldeinschränkung bei deutlichen neuropsychologischen Defiziten und organischer Wesensveränderung. <u>Neurophysiologische Testung</u> : IQ von 70, zerebrale Sehstörung, Verlangsamung und Funktionsstörung mit gesteigerter Perseverationsneigung, reduzierte verbale Arbeitsgedächtniskapazität und Distanzminderung im Sozialkontakt. <u>Liquor-Untersuchung</u> : Schrankenstörung. <u>Labor</u> : Hexacosansäure (C26:0) 0,61 mg/l (Normwerte: 0,1-0,6 mg/l), C26:C22-Quotient 0,08 (Normwert < 0,02), Arylsulfatase A 7,7 nmol/ml (Normwerte 3,6-9,4 nmol/ml). <u>Histologischer Befund der Hirnbiopsie</u> : entmarkende ZNS-Erkrankung mit entzündlichen Infiltraten	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu X-ALD #1 und #3)	19 Jahre 2 Monate	w	keine Angaben verfügbar	Allergischer Schock		Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-B (zu X-ALD #1 und #3)	19 Jahre 1 Monat	w	keine Angaben verfügbar.	Allergien, <i>Myokarditis</i> , <i>Perikarditis</i>		Herz-Kreislauf-Versagen

Fall	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesursache
X-ALD-Fall #2	33 Jahre bei Krankheitsbeginn	m	keine Angaben verfügbar	<u>Zum Krankheitsbeginn:</u> erstmaliger tonisch-klonischer Anfall, Hemianopsie nach rechts, generalisierte spastische Tonuserhöhung mit diskreter Gangstörung. <u>Im weiteren Verlauf:</u> Stammzellentransplantation, jedoch weitere neurologische Verschlechterung, zusätzliche Sprachstörungen	<u>Neurologischer Befund:</u> erhöhter Muskeltonus, Absinken und Pronation des rechten Arms im Armhalteversuch, seitengleich lebhaftige Muskeldehnungsreflexe, verbreitete Reflexzonen, Babinski-Zeichen bds. positiv, breitbasiges Gangbild. <u>MRT:</u> teilweise kontrastmittelaufnehmende Läsion im rechten parietalen Marklager im Bereich des Trigonus mit Einstrahlung in den Balken, spinal unauffälliger Befund. <u>Liquor-Untersuchung:</u> diskrete Pleozytose, diskrete Schrankenstörung, kein Nachweis von oligoklonalen Banden. <u>Labor:</u> deutlich vermindertes Serum-Dehydroepiandrosteron, sonst intakte Nebennierenfunktion, erhöhte Konzentration von C26:0 bei pathologisch erhöhten Quotienten von C26:0/C22:0 und C24:0/C22:0. <u>Hirnbioptie:</u> entzündlich demyelinisierender ZNS-Prozess mit ausgeprägten reaktiven und resorptiven Veränderungen	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu X-ALD #2)	29 Jahre	m		<i>Pneumonie, Sepsis, Acute Respiratory Distress Syndrome, Extrakorporale Membranoxygenierung Therapie</i>		Herz-Kreislauf-Versagen
X-ALD-Fall #3	19 Jahre	m	keine Angaben verfügbar	Beginn der Symptomatik 8 Monate vor Biopsie, progrediente spastische Tetraparese, undeutliche Sprache, kognitive Defizite	<u>MRT:</u> ausgedehnte beidseitige Marklagerveränderungen, pathologischer Befund in der Elektroenzephalografie (EEG)	Herz-Kreislauf-Versagen

Fall	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesursache
X-ALD-Fall #4	8 Jahre 5 Monate	m	Eltern gesund und nicht verwandt, ein gesunder Bruder	<u>Bei Geburt:</u> 4.250 Gramm, Spontangeburt, termingerecht, keine Komplikationen, Kryptorchismus. <u>Mit 17 Monaten:</u> Freihändiges Laufen. <u>Mit 3 Jahren und 5 Monaten:</u> Sprechen. <u>Mit 5 Jahren:</u> geistige Retardierung, verzögerte Sprachentwicklung, kontaktschwach. <u>Mit 8 Jahren 2 Monaten:</u> Sturzneigung, kein selbstständiges Aufstehen. <u>Mit 8 Jahren 3 Monate:</u> Nachziehen des rechten Beins, Kraftverlust und Koordinationsstörung rechter Arm, Verlust des Orientierungssinns, Einnässen, Gehör- und Sprachstörungen. <u>Mit 8 Jahren 5 Monaten:</u> zunehmende Ataxie bis hin zur Gehunfähigkeit, ängstlich verstört	<u>Neurologischer Befund:</u> Parese rechtes Bein, schlaffer Muskeltonus, Muskeldehnungsreflexe beidseits symmetrisch lebhaft, Pupillenreaktion prompt, ausdrucksarme Mimik, verwaschene Sprache, psychisch retardiert, zunehmende Verschlechterung: rechtsbetonte Spastik der Extremitäten, Hypersalivation, nicht kontaktierbar, Fieber bis 41°C, pathologisches EEG <u>Organbefund:</u> Atrophie linke Nebennieren, vollständiges Fehlen der rechten Nebenniere	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu X-ALD #4)	8 Jahre 7 Monate	m		gesundes Kind		Ertrinken
X-ALD-Fall #5	16 Jahre 5 Monate	m	keine Angaben verfügbar	Entwicklung bis zum zehnten Lebensjahr unauffällig. <u>Ab dem 10. Lebensjahr:</u> schneller motorischer und langsamer geistiger Abbau, spastische Lähmung bis zur Rollstuhlspflichtigkeit <u>Letzte Monate vor dem Tod:</u> kein Sitzen, Wesensveränderung, Sprache erhalten, schwere		Pneumonie

Fall	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesursache
				generalisierte Krämpfe, hohes Fieber, Nebennierenrinden-Hormontherapie		
CNTRL-A (zu X-ALD #5)	16 Jahre 9 Monate	w		gesund, keine Vorerkrankungen		Herz-Kreislauf-Versagen
X-ALD-Fall #6	28 Jahre 7 Monate	m	keine Angaben verfügbar	keine Angaben verfügbar	keine Angaben verfügbar	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu X-ALD #6)	29 Jahre	w		Zustand nach Entbindung vor 7 Wochen, rezidivierende Lungenembolien		Lungenembolie
X-ALD-Fall #7	1 Monat	m	keine Angaben verfügbar	keine Angaben verfügbar	keine Angaben verfügbar	keine Angaben verfügbar

3.2.2 Histopathologie der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie

3.2.2.1 Allgemeine histopathologische Beschreibung der untersuchten Fälle

X-ALD-Fall #1: In der Hirnbiopsie kommt weiße Substanz mit deutlich erhöhter Zellzahl zur Darstellung. Die weiße Substanz weist eine flächige Entmarkung auf. Nur äußerst wenige intakte, zum Teil bereits vakuolisierte Myelinfasern sind noch vorhanden. Der Übergang zu dem Bereich der weißen Substanz mit stehendem Myelin ist relativ scharf (Abb. 7A). Die entmarkten Bereiche sind sehr zell dicht. Zahlreiche Makrophagen, mit teils PAS-positivem und vereinzelt LFB-positivem inkorporiertem Material, lassen sich darstellen (Abb. 7A, Bildausschnitt rechts oben). Die Makrophagen liegen teils vereinzelt und teils in Clustern parenchymal und perivaskulär. Besonders auffällig sind gut definierte farblose spindelförmige Spalten im Zellinneren der Makrophagen (Abb. 7A, Bildausschnitt rechts oben). Zahlreiche MRP14-positiv-reaktive Makrophagen lassen sich identifizieren. Vereinzelt kommen IgG-positiv-reaktive Makrophagen zur Darstellung. Aktivierte Komplementkomponenten innerhalb der Makrophagen sind nicht nachweisbar. Innerhalb der Makrophagen ist der Abbau der einzel-

nen Myelinproteine MBP, PLP, CNPase, MOG, MAG deutlich erkennbar (Abb. 7F-J). Die Kim1P-Färbung zeigt eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung, darunter zahlreiche Makrophagen (Abb. 7D). Das axonale Gerüst ist deutlich reduziert (Abb. 7B). Des Weiteren lassen sich zahlreiche APP-positive axonale Sphäroide darstellen als Hinweis auf eine akute axonale Schädigung (Abb. 7E). Die Oligodendrozyten sind deutlich in ihrer Anzahl reduziert. Vor allem in den entmarkten Bereichen sind nur wenige vitale Oligodendrozyten und einige CNP-positive Oligodendrozytenapoptosen nachweisbar (Abb. 7H, Kreise und Bildausschnitt links unten). Die gliale Matrix ist sehr ausgedünnt und weist eine ausgeprägte Gliose auf. In den entmarkten Bereichen finden sich Astrozyten mit farblosen, spindelförmigen Spalten im Zellinneren. Einige CD3-positive T-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen sind perivaskulär und parenchymal innerhalb des entmarkten Bereichs erkennbar (Abb. 7C). Einzelne CD20-positive B-Zellen und wenige CD138-positive Plasmazellen lassen sich identifizieren.

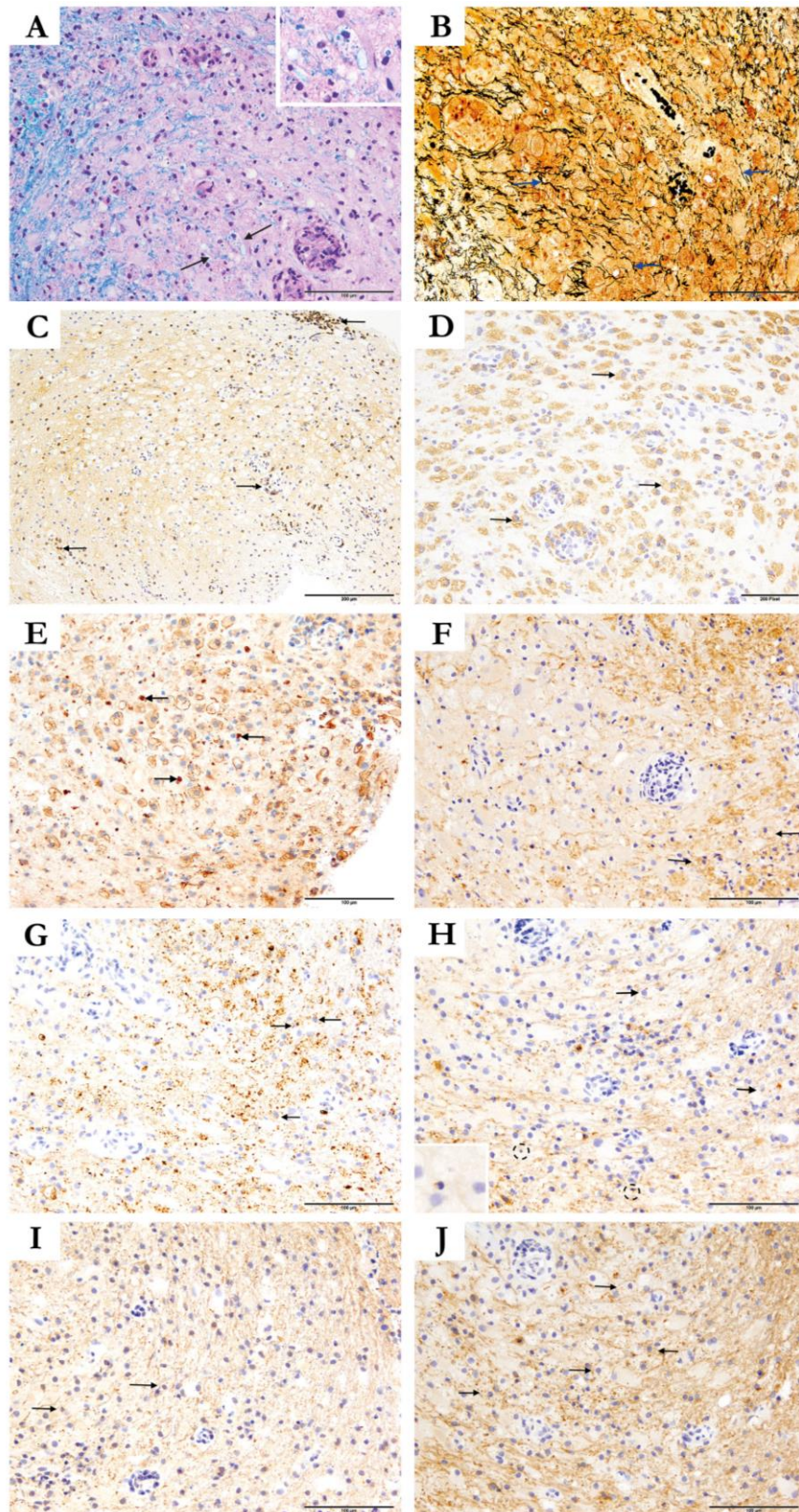


Abbildung 7: Histopathologie X-ALD-Fall #1.

Betroffenes Areal mit fast vollständiger Entmarkung in der weißen Substanz mit äußerst wenigen intakten, zum Teil vakuolisierten Myelinfasern (A). Zahlreiche Makrophagen mit PAS- und LFB-positivem inkorporiertem Material (A, Bildausschnitt rechts oben, → zeigt auf Makrophage) und Makrophagen mit farblosen und spindelförmigen Spalten kommen zur Darstellung (A →). Der axonale Besatz ist deutlich reduziert (B → zeigen auf Axo-

ne). In den entmarkten Arealen zeigt sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit vielen CD3-positiven T-Lymphozyten (C → zeigen auf CD3-positive T-Lymphozyten). Die Kim1P-Färbung (D) zeigt eine deutliche Mikrogliaaktivierung mit Schaumzellbildung. Zahlreiche APP-positive axonale Sphäroide kommen zur Darstellung (E →). Innerhalb der Makrophagen lässt sich der Abbau der Myelinproteine deutlich nachweisen (F-J). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Anzahl reduziert und einige CNP-positive Oligodendrozytenapoptosen kommen zur Darstellung (H, Kreise und Bildausschnitt links unten). Färbungen: A: LFB/PAS, B: Versilberung nach Bielschowsky, Immunhistochmie für: CD3 (C), Kim1P (D), APP (E), MBP (F), PLP (G), CNP (H), MAG (I), MOG (J). Messbalken: A+B+E-J: 100 µm; C+D: 200 µm.

X-ALD-FALL #2: Hier kommen mehrere kleine Biopsiefragmente zur Darstellung, bestehend aus weißer und grauer Hirnsubstanz. Die betroffenen Bereiche der weißen Substanz weisen eine flächige Entmarkung und einen aufgelockerten Gewebegrund auf (Abb. 8A+B). Die graue Substanz erscheint insgesamt regelrecht. Es sind nur noch wenig intakte, allerdings bereits aufgedunsene und aufgequollene Myelinfasern vorhanden. Zudem zeigen sich entzündliche Infiltrate bestehend aus Makrophagen und Lymphozyten (Abb. 8B+C). Die Makrophagen liegen in Gruppen, aber auch vereinzelt im Parenchym und perivaskulär und weisen LFB- und PAS-positives inkorporiertes Material auf. Besonders auffällig sind Makrophagen (Abb. 8B, weißer Pfeil) und einzelne Astrozyten mit schlanken, spindelförmigen, farblosen Spalten im Zellinneren (Abb. 8B, roter Pfeil). Der Myelinproteinabbau im Zytoplasma der Makrophagen ist vor allem in der Färbung für die Myelinproteine MOG, CNP und PLP (Abb. 8E) erkennbar. Vereinzelt kommen MRP14-positive frühaktive Makrophagen (Abb. 8G) und IgG-positive Makrophagen in den entmarkten Bereichen zur Darstellung. Eine Ablagerung von aktivierten Komplementkomponenten zeigt sich nicht. Die Kim1P-Färbung zeigt zahlreiche insbesondere perivaskulär liegende, schaumzellige Makrophagen. Das axonale Gerüst ist rarefiziert und axonale Sphäroide kommen zur Darstellung. Die Oligodendrozyten sind in ihrer Anzahl reduziert (Abb. 8F). Höchst vereinzelt finden sich Oligodendrozytenapoptosen. Des Weiteren lässt sich eine ausgeprägte Gliose mit Nachweis zahlreicher reaktiver Astrozyten erkennen. Es finden sich entzündliche Infiltrate perivaskulär und parenchymal liegend, darunter CD3-positive T-Zellen (Abb. 8C) und CD138-positive Plasmazellen (Abb. 8D). Elektronenmikroskopisch zeigen sich die typischen trilamellären Einschlüsse im Zytoplasma der Makrophagen (Abb. 8H).

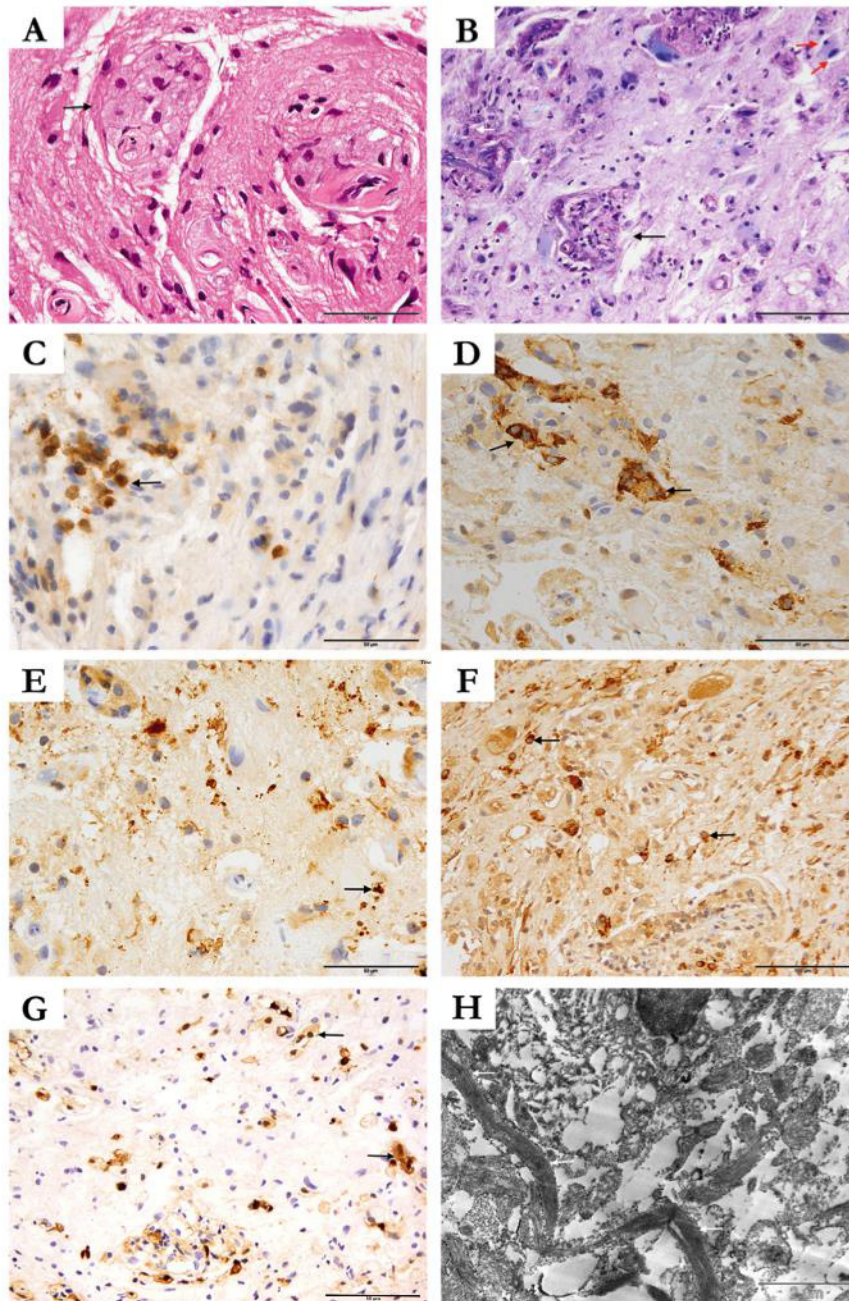


Abbildung 8: Histopathologie X-ALD-Fall #2.

Flächige Entmarkung in den betroffenen Bereichen. Insgesamt sind wenige intakte, aufgequollene Myelinfasern ersichtlich. Es zeigt sich eine erhöhte Zellzahl mit entzündlichen Infiltraten bestehend aus Makrophagen und Lymphozyten (A+B → zeigen auf Makrophagencluster). Zahlreiche Makrophagen, in Gruppen und vereinzelt im Parenchym liegend, mit feinem granulärem eosinophilem, teils basophilem, LFB- und PAS-positivem inkorporiertem Material im Zellinneren lassen sich nachweisen (A, B). Farblose zytoplasmatische Spalten sind in den Makrophagen (B, weißer Pfeil) und den Astrozyten (B, roter Pfeil) feststellbar. Entzündliche Infiltrate mit vielen CD3-positiven T-Lymphozyten (C →) und einigen CD138-positiven Plasmazellen (D →) kommen zur Darstellung. Der Myelinproteinabbau ist in der PLP-Färbung deutlich erkennbar (E →). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Anzahl reduziert, einige vitale Oligodendrozyten lassen sich darstellen (F →). MRP14-positive frühaktive Makrophagen sind ersichtlich (G →). Ultrastrukturell zeigen trilamelläre Einschlüsse (H, weiße Pfeile). Histologi-

sche Färbungen: A: HE, B: LFB/PAS. Immunhistochemie für: CD3 (C), CD138 (D), PLP (E), CNP (F), MRP14 (G), Elektronenmikroskopische Aufnahmen (H). Messbalken: A+C+D+E+G: 50 µm; B+F: 100 µm, H: 2 µm.

X-ALD-Fall #3: In der Hirnbiopsie zeigt sich weiße Substanz mit erhöhter Zellzahl (Abb. 9A). In der LFB/PAS-Färbung ist eine flächige Entmarkung erkennbar (Abb. 9B). Das noch stehende Myelin erscheint vakuolisiert und aufgedunsen. Zahlreiche Makrophagen, mit eosinophilem und basophilem, teils LFB-positivem zytoplasmatischem Material, kommen zur Darstellung (Abb. 9A+B). MBP, PLP, CNP und MAG werden im Zytoplasma der Makrophagen abgebaut. Zudem sind MRP14-positive frühaktive Makrophagen (Abb. 9D) und IgG-positive Makrophagen nachweisbar. Auch in den nicht entmarkten Arealen finden sich zahlreiche LFB-positive Makrophagen. Besonders auffällig sind hier ebenfalls die zentral liegenden Spalten im Zellinneren der Makrophagen (Abb. 9A+B schwarzer Pfeil) und Astrozyten (Abb. 9A weißer Pfeil + C rechtes Bild schwarzer Pfeil). Die Phospholipide (LFB/PAS-Färbung) und einzelnen Myelinproteine sind gleichermaßen verlustig. Ein subtotaler axonaler Verlust und eine akute axonale Schädigung sind erkennbar (Abb. 9F links). Sowohl in den entmarkten Arealen als auch den nicht entmarkten Arealen können Oligodendrozyten dargestellt werden. Sie sind in der Anzahl in den entmarkten Arealen mäßig reduziert. Zudem lassen sich CNP- und MOG-positive Oligodendrozytenapoptosen darstellen (Abb. 9F kleiner Bildausschnitt rechts oben). Die gliale Matrix ist sehr ausgedünnt und weist eine ausgeprägte Gliose mit zahlreichen reaktiven Astrozyten auf (Abb. 9C Bild rechts). Bestandteil der perivaskulären lymphozytären Infiltraten sind unter anderen CD8-positive T-Zellen (Abb. 9E rechts). Auch eine erhöhte Anzahl CD138-positiver Plasmazellen (Abb. 9E links) und einzelne CD20-positive B-Zellen kommen zur Darstellung.

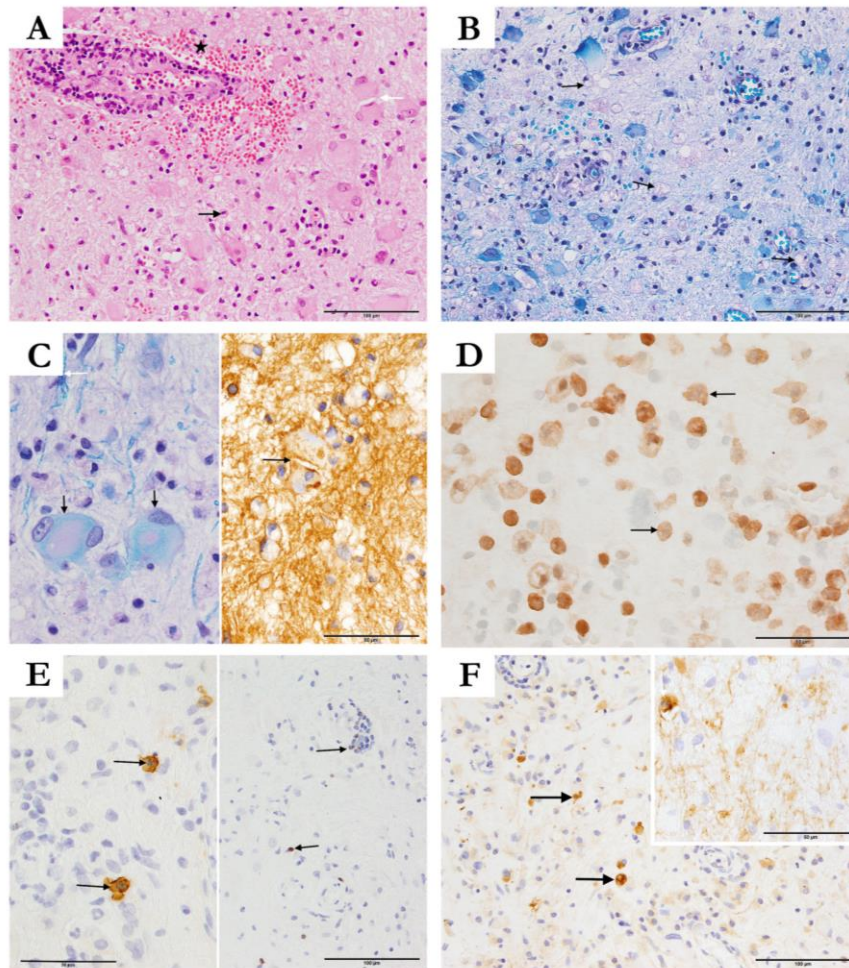


Abbildung 9: Histopathologie X-ALD-Fall #3.

Die Hirnbiopsie zeigt zellreiche weiße Substanz mit reaktiver Gliose und entzündlicher Infiltration (A). Ein deutlicher Myelinverlust ist in der LFB/PAS-Färbung ersichtlich (B). Das noch stehende Myelin ist vakuolisiert und aufgedunsen (C linkes Bild weißer Pfeil). Farblose Spalten sind in den Makrophagen (B →) und den Astrozyten ersichtlich (A weißer Pfeil, C rechtes Bild schwarzer Pfeil). Die GFAP-Färbung zeigt eine ausgeprägte Gliose mit zahlreichen reaktiven Astrozyten (C rechts). MRP14-positive frühaktive Makrophagen lassen sich nachweisen (D →). Die perivaskulären entzündlichen Infiltrate (A★) bestehen aus CD8-positive T-Zellen (E rechtes Bild →) und CD138-positiven Plasmazellen (E linkes Bild →). In der APP-Färbung ist eine akute axonale Schädigung mit zahlreichen axonalen Sphäroiden feststellbar (F links →). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Anzahl reduziert. Oligodendrozytenapoptosen sind nachweisbar (F kleiner Bildausschnitt). Histologische Färbungen: A: HE, B+C (links): LFB/PAS. Immunhistochemie für: GFAP (C rechts), MRP 14 (D), CD8 (E links), CD138 (E rechts), APP (F), CNP (F Bildausschnitt rechts oben). Messbalken: A+B+E+F: 100 µm; C+D+F kleiner Bildausschnitt: 100 µm.

X-ALD-FALL #4: Die weiße Substanz des Großhirns, Hirnstamms und des Kleinhirns zeigt eine flächige und in einigen Bereichen fast vollständige Demyelinisierung (Abb. 10 und 11A+C). Eine kortikale Entmarkung zeigt sich nicht. Die betroffenen Bereiche sind zellreich mit deutlicher entzündlicher Infiltration und reaktiver Gliose. Die noch stehenden Myelinfa-

sern wirken aufgequollen und vakuolisiert (Abb. 11C). Es finden sich zahlreiche Makrophagen mit feinen granulären Einschlüssen im Zytoplasma. Diese Einschlüsse stellen sich in der HE-Färbung teils eosinophil und teils basophil dar, heben sich in der LFB/PAS-Färbung deutlich hervor (Abb. 11A-C) und lassen teils Ubiquitin-positives Material erkennen (Abb. 12F Ausschnitt rechts oben). Besonders auffällig sind auch hier farblose und spindelförmige Spalten im Zellinneren der Makrophagen (Abb. 11B) und Astrozyten (Abb. 11L). Der Abbau der großen Myelinproteine, wie z.B. PLP (Abb. 12F), als auch der kleinen Myelinproteine, wie z.B. MOG, lässt sich im Zytoplasma der Makrophagen darstellen. Die Phospholipide (LFB/PAS-Färbung) und Myelinproteine sind vom Abbau gleichermaßen betroffen. Auch MRP14-positive frühaktive Makrophagen kommen vor allem in den demyelinisierenden Bereichen mit vorhandenen Myelinfasern zur Darstellung (Abb. 12F, Bildausschnitt links unten). Zahlreiche aktivierte Mikrogliazellen bzw. schaumzellige Makrophagen sind erkennbar (Abb. 11G-I). Der axonale Besatz ist mäßig bis stark reduziert und entspricht dem Myelinbesatz (Abb. 11D-F). Zudem lassen sich zahlreiche axonale Sphäroide als Zeichen einer axonalen Schädigung darstellen (Abb. 12A), wobei sich wenige APP-positiv anfärben lassen (Abb. 12B). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Zahl reduziert. Es kommen Apoptosen zur Darstellung, die sich aber nur bedingt als Oligodendrozytenapoptosen identifizieren lassen. Eine ausgeprägte Gliose mit vielen reaktiven Astrozyten ist erkennbar (Abb. 11J-L). Die Astrozyten besitzen zum Teil einen sehr großen Kern und weisen zentrale Spalten im Zellinneren auf (Abb. 11L). Aquaporin 4 wird regelrecht auf den Astrozyten exprimiert. Es zeigen sich deutliche entzündliche Infiltrate mit vielen CD3-positiven T-Zellen, ein Teil davon CD4-positiv T-Helferzellen und ein Teil CD8-positiv zytotoxische T-Zellen (Abb. 12C-E). Auch lassen sich viele CD138-positiv Plasmazellen und einige CD20-positiv B-Zellen darstellen. Zudem zeigt sich, dass in den stark entmarkten Arealen deutlich mehr entzündliche Infiltrate vorhanden sind als in den weniger entmarkten Bereichen.

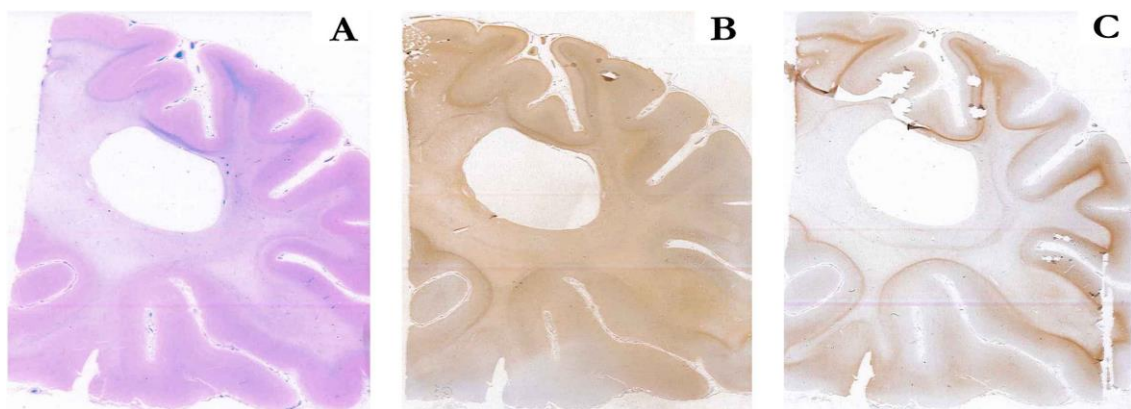


Abbildung 10: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #4.

A=LFB/PAS-Färbung, B=MBP-Färbung, C=MOG-Färbung.

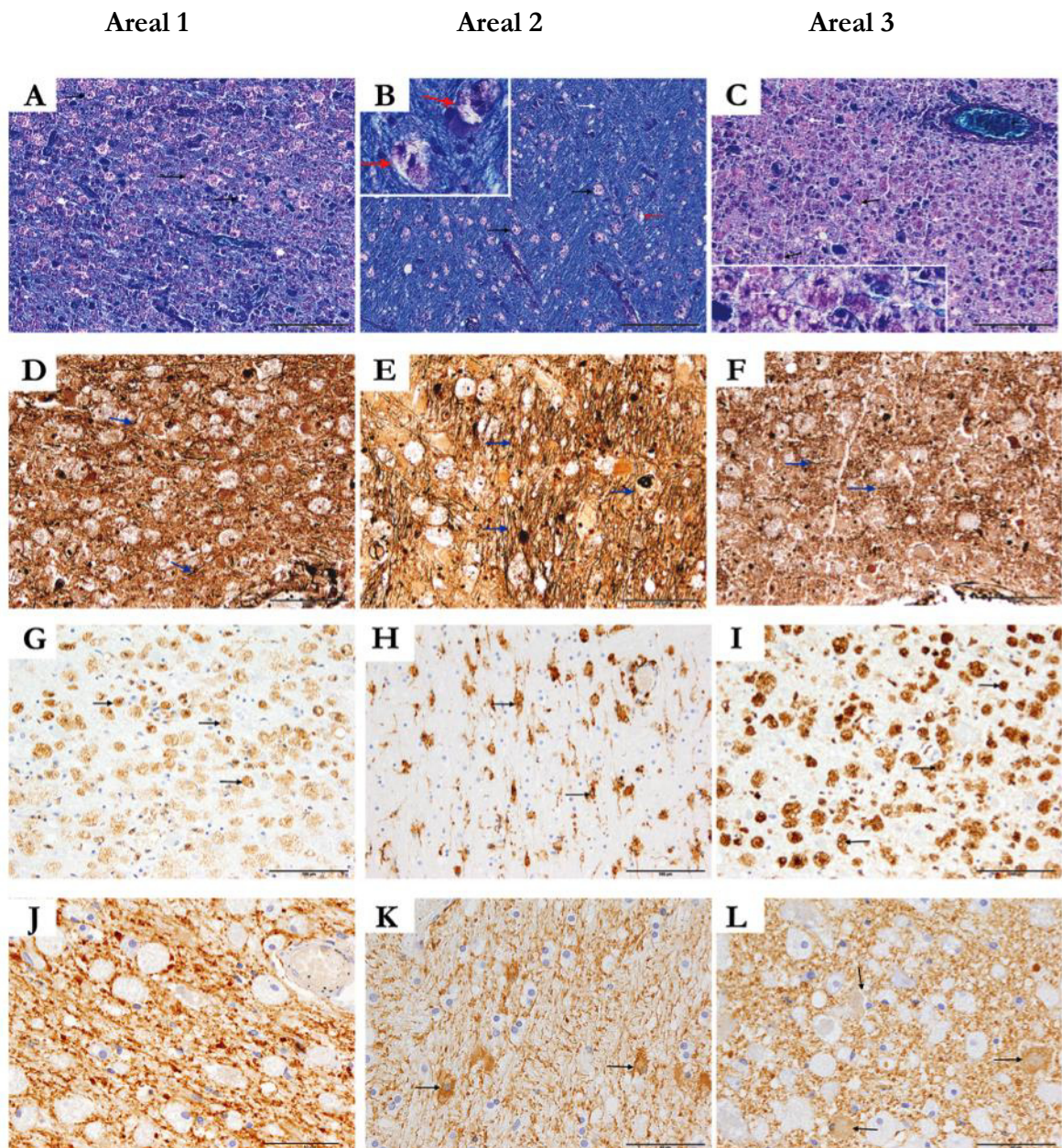


Abbildung 11: Histopathologie X-ALD-Fall #4 Bildertafel 1.

Hier ist die Entmarkung (A moderate Entmarkung, B milde Entmarkung, C starke Entmarkung), axonale Reduktion (D-F), Makrophageninfiltration (G-I) und reaktive Gliose (J-L) in unterschiedlich stark betroffenen Arealen dargestellt. Der Grad der Entmarkung entspricht in etwa dem axonalen Besatz. Die noch stehenden Myelinfasern wirken aufgedunsen und aufgequollen (C weißer Pfeil Bildausschnitt links unten). Zahlreiche Makrophagen mit LFB- und PAS-positiven Einschlüssen (A-C →) und Makrophagen mit farblosen, spindelförmigen Spalten (B roter Pfeil Bildausschnitt links oben) kommen zur Darstellung. Histologische Färbungen: A-C: LFB/PAS, D-F: Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistochemie für: Kim1P(G-I), GFAP (J-L). Messbalken: A-C: 200 µm; D-I: 100 µm, J-L: 50 µm.

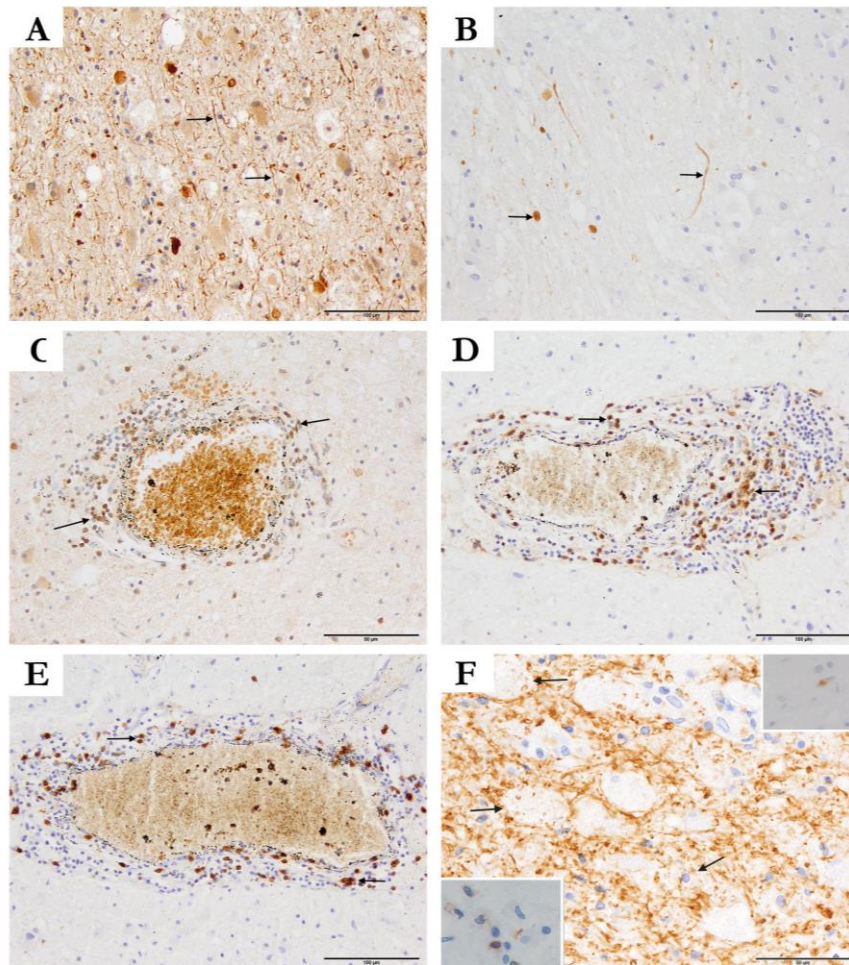


Abbildung 12: Histopathologie X-ALD-Fall #4 Bildertafel 2.

In den betroffenen Bereichen zeigen sich in der NF200-Färbung zahlreiche axonale Sphäroide (A →), wobei sich nur wenige auch in der APP-Färbung positiv markieren (B →). In den entmarkten Arealen lassen sich zahlreiche T-Zellen nachweisen (C →), darunter CD4-positive T-Helferzellen (D →) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen (E →). Der Myelinproteinabbau ist in den Makrophagen ersichtlich, vor allem deutlich in der PLP-Färbung zu erkennen (F, → zeigen PLP-positive Makrophagen). Zudem lassen sich in den betroffenen Arealen MRP14-positive frühaktive Makrophagen (F Bildausschnitt unten links) und Makrophagen mit Ubiquitin-positivem zytoplasmatischem Material darstellen (F Bildausschnitt oben rechts). Immunhistochemie für: NF200 (A), APP(B), CD3 (C), CD4 (D), CD8 (E), PLP (F), MRP14 (F Bildausschnitt unten links), P62 (F Bildausschnitt oben rechts). Messbalken: A+B+D+E: 100 µm; C+F: 50 µm.

X-ALD-FALL #5: Es zeigt sich eine fast vollständige Entmarkung in der weißen Substanz des Großhirns (Abb. 13A-C) einschließlich der Stammganglien und der Medulla oblongata sowie eine beginnende Entmarkung im thorakalen, lumbalen und sakralen Rückenmark. In den U-Fasern zeigen sich eine aufgelockerte Matrix, eine astrozytäre Gliose und viele, vor allem perivaskulär angeordnete Makrophagen. Trotz der stark betroffenen weißen Substanz erscheint der Kortex altersentsprechend myelinisiert und ist von der Entmarkung nicht betroffen. Das Myelin der weißen Substanz ist fast vollständig verlustig. Stellenweise erkennt man

einzelne stehengebliebene Myelinfasern, die allerdings bereits aufgedunsen und ödematös wirken (Abb. 14B schwarzer Pfeil). Es finden sich viele Makrophagen mit LFB- und PAS- positivem Material (Abb. 14B weißer Pfeil) und Makrophagen mit zentral liegenden Spalten im Zellinneren. Auch im Zytoplasma der Astrozyten zeigen sich zentral liegende Spalten. Myelinproteinabbauprodukte finden sich in den Makrophagen nicht. Die Kim1P-Färbung zeigt eine Mikrogliaaktivierung und zahlreiche schaumzellige Makrophagen (Abb. 14C rechts). MRP14-positive und IgG-positive Makrophagen lassen sich nicht nachweisen. Das axonale Gerüst ist deutlich reduziert und in den stark entmarkten Bereichen kommt ein fast vollständiger axonaler Verlust zur Darstellung. Eine signifikante akute axonale Schädigung zeigt sich nicht. In den betroffenen Bereichen sind die Oligodendrozyten deutlich in ihrer Anzahl reduziert. Vereinzelt lassen sich Apoptosen darstellen. Die gliale Matrix der weißen Substanz weist eine ausgeprägte Gliose auf (Abb. 14A+D). Zudem lassen sich Creutzfeldt-Peters-Zellen nachweisen (Abb. 14A Bildausschnitt oben rechts). Eine signifikante Entzündung bestehend aus CD3-positiven T-Zellen ist in sämtlichen betroffenen Bereichen sowohl perivaskulär als auch parenchymal vorzufinden, wobei die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen den größeren Anteil der T-Zellen darstellen (Abb. 14C Bildausschnitt links). Nur höchst vereinzelt zeigen sich CD20-positive B-Zellen, diese vor allem perivaskulär. CD138-positive Plasmazellen lassen sich nicht darstellen.

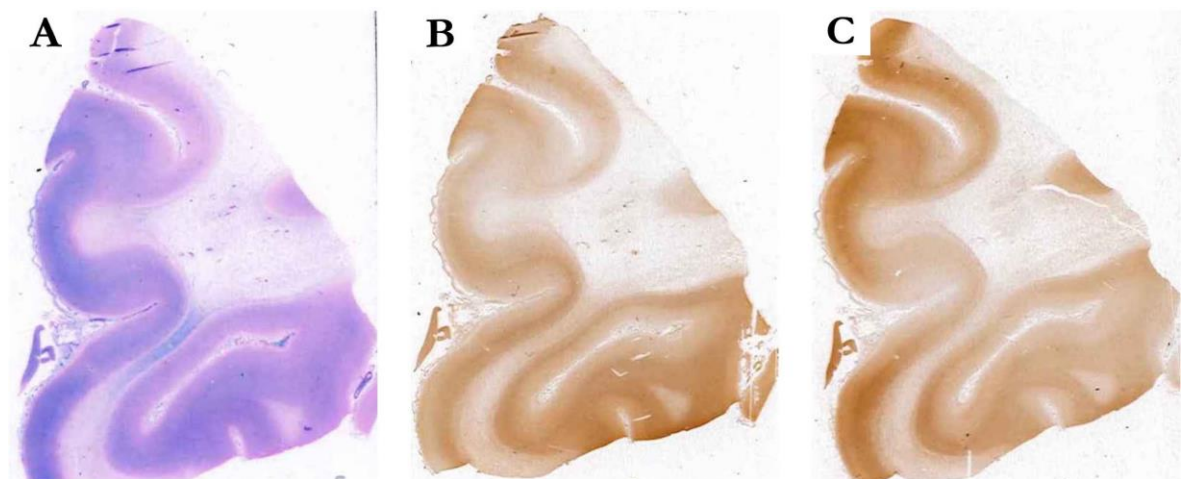


Abbildung 13: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #5.

A= LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

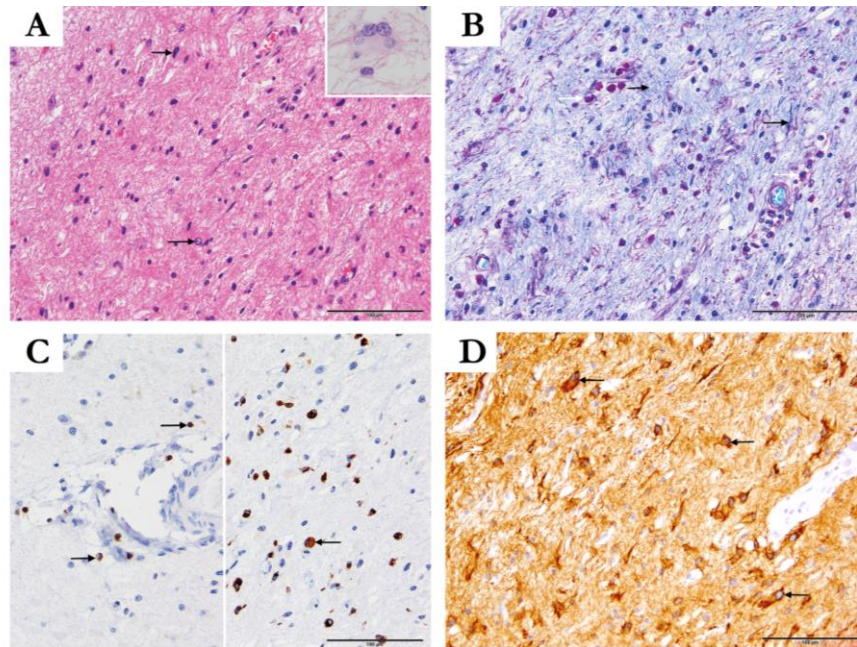


Abbildung 14: Histopathologie X-ALD-Fall #5.

Die betroffene weiße Substanz weist eine reaktive Gliose auf (A). Höchst vereinzelt kommen Creutzfeldt-Peters-Zellen zur Darstellung (A Ausschnitt rechts oben). Das Myelin in den betroffenen Bereichen ist fast vollständig verlustig (B, → zeigen auf Myelin). Viele Makrophagen mit stark PAS-positivem Material (B weißer Pfeil) lassen sich nachweisen. Perivaskulär finden sich einzelne CD8-positive T-Zellen (C links →). Zudem zeigen sich in der Kim1P-Färbung (C rechts →) zahlreiche aktivierte Mikrogliazellen bzw. schaumzellige Makrophagen. Eine ausgeprägte Fasergliose (D →) ist feststellbar. Histologische Färbungen: A: HE, B: LFB/PAS. Immunhistochemie für: CD8 (C links), Kim1P (C rechts), GFAP (D). Messbalken: A-D: 100 µm.

X-ALD-FALL #6: Das Gehirn erscheint insgesamt atroph mit einer Rarefizierung der grauen Substanz. Die weiße Substanz des Großhirns weist eine flächige, fast vollständige Demyelinisierung auf (Abb. 15A-C). Auch die Basalganglien sind von der Entmarkung betroffen. Die Makrophageninfiltration erscheint hier streifig (Abb. 16C). Das Myelin der U-Fasern ist noch erhalten, jedoch finden sich hier bereits viele Makrophagen. Eine kortikale Entmarkung ist nicht erkennbar. In einigen entmarkten Bereichen sind vereinzelt Myelinfasern darstellbar, jedoch wirkt die Mehrzahl der noch erhaltenen Myelinfasern bereits aufgedunsen und ödematös. Die betroffenen Bereiche sind insgesamt zellarm, bestehend aus Astrozyten und wenigen Makrophagen. Es zeigen sich insgesamt wenig Makrophagen im Parenchym. Perivaskulär sind jedoch Cluster von Makrophagen erkennbar, oft mit stark PAS-positivem zytoplasmatischem Material (Abb. 16A links oben). Vereinzelt und besonders in weniger stark entmarkten Bereichen finden sich Makrophagen mit LFB-positivem Material im Zellinneren. Auch hier sind die farblosen Spalten im Zellinneren der Makrophagen und Astrozyten deutlich zu erkennen (Abb. 16B). MRP-14 positive Makrophagen lassen sich nicht nachweisen. Der Myelinproteinabbau in den Makrophagen ist nicht erkennbar, und die Myelinproteine und Phospholipide erscheinen

gleichermaßen verlustig (Abb. 16A links oben und links unten, rechts oben). In den betroffenen entmarkten Bereichen zeigt sich ein subtotaler Axonverlust, passend zum Myelinbesatz (Abb. 16A rechts unten), wobei eine signifikante akute axonale Schädigung mit APP-positiven axonalen Sphäroiden nicht festzustellen ist. Eine deutliche Reduktion der Oligodendrozyten lässt sich vor allem in den stark entmarkten Bereichen nachweisen. Es kommen nur sehr wenige P25- und NOGO-A-positive Oligodendrozyten in den entmarkten Arealen zur Darstellung. Dagegen zeigen sich deutlich mehr Oligodendrozyten in den U-Fasern. In der Kim1P-Färbung ist eine Mikrogliaaktivierung erkennbar. Die gliale Matrix weist eine deutliche Faser-gliose auf (Abb. 16B). Aquaporin-4 wird auf den Astrozyten regelrecht exprimiert. Höchst vereinzelt kommen vor allem perivaskulär viele CD3-positive T-Zellen zur Darstellung. B-Zellen finden sich nicht und Plasmazellen äußerst selten. Elektronenmikroskopisch zeigen sich die typischen trilamellären Einschlüsse (Abb. 16D).

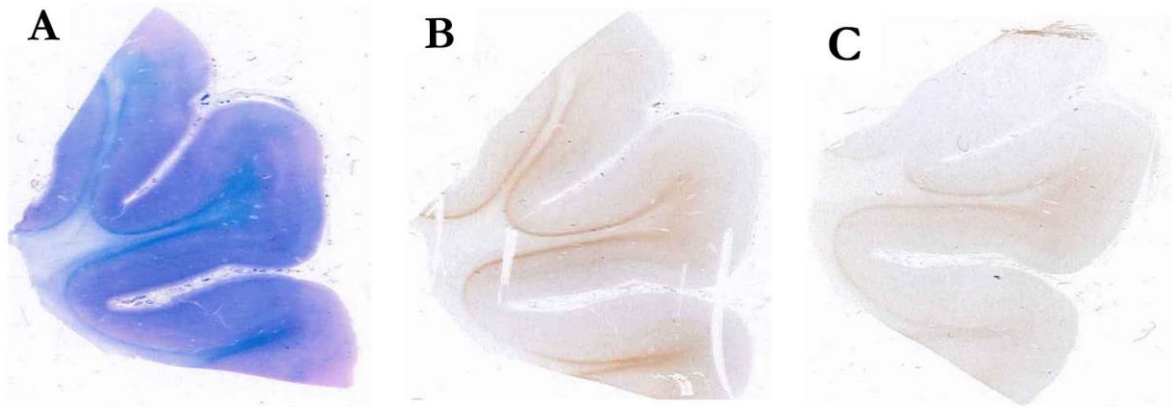


Abbildung 15: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #6.

A=LFB/PAS-Färbung, B=MBP-Färbung, C=MOG-Färbung.

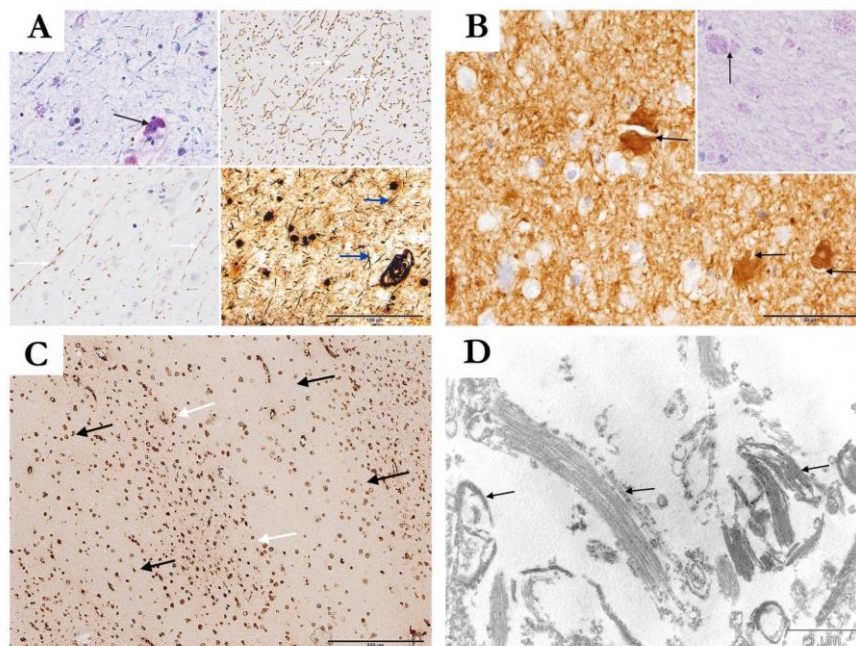


Abbildung 16: Histopathologie X-ALD-Fall #6.

Die betroffenen Bereiche sind zellarm. Passend zum Myelinbesatz zeigt sich ein subtotaler Axonverlust (A unten rechts). Die Myelinproteine und Phospholipide sind gleichermaßen betroffen (A links oben LFB/PAS, rechts oben PLP-Färbung, links unten MAG-Färbung, rechts unten Versilberung nach Bielschowsky). Insgesamt sind wenige Makrophagen mit stark PAS-positivem zytoplasmatischem Material nachweisbar (A links oben). Makrophagen und Astrozyten mit farblosen Spalten im Zellinneren sind ersichtlich (B Astrozyt, Bildausschnitt rechts oben Makrophage mit zentralem Spalt). In der Kim1P-Färbung zeigt sich eine streifige Verteilung der Makrophageninfiltrate in den Basalganglien (C, schwarze Pfeile: wenige Makrophagen, weiße Pfeile: viele Makrophagen). Ultrastrukturell zeigen sich die für die X-ALD typischen trilamellären Einschlüsse (D). Histologische Färbungen: A links oben und B rechts oben: LFB/PAS, A rechts unten: Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistochemie für: PLP (A rechts oben), MAG (A links unten), GFAP (B). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (D). Messbalken: A-C: 50 μ m; D: 1 μ m.

X-ALD-Fall #7: Die supratentoriellen und infratentoriellen Strukturen sind von einer unvollständigen Entmarkung betroffen. Das Myelin ist in den U-Fasern erhalten (Abb. 17A-C). Der Kortex ist altersentsprechend myelinisiert und weist keine Anzeichen einer Entzündung oder Entmarkung auf. In den betroffenen Bereichen zeigt sich eine ausgedünnte gliale Matrix (Abb. 18A) mit einem ausgeprägten Myelinabbau (Abb. 18I). Perivaskulär zeigen sich Makrophageninfiltrate (Abb. 18E) und lymphozytäre Infiltrate (Abb. 18F). Interessanterweise finden sich hier stellenweise kleine Mineralisationen (Abb. 18G). Das Myelin der Capsula interna ist gut erhalten. Allerdings wirkt ein Teil der noch stehenden Myelinfasern aufgedunsen und ödematös (Abb. 18H). Insgesamt zeigen sich in den entmarkten Bereichen wenige Makrophagen. Die Makrophagen liegen vereinzelt im Parenchym und perivaskulär in Gruppen. Sie weisen feine granuläre Einschlüsse im Zytoplasma auf, die sich in der HE-Färbung teils eosinophil, teils basophil darstellen und in der LFB/PAS-Färbung LFB- und PAS-positiv markieren. Im Zytoplasma der Makrophagen und Astrozyten finden sich zentral gelegene, farblose Spalten (Abb. 18E). Innerhalb der Makrophagen ist der Myelinproteinabbau nicht erkennbar. Die Phospholipide und Myelinproteine sind gleichermaßen verlustig (Abb. 18B links oben, links unten, rechts oben). Der axonale Besatz ist deutlich reduziert (Abb. 18B rechts unten), wobei eine nennenswerte akute axonale Schädigung nicht zur Darstellung kommt. P25- und NOGO-A-positive Oligodendrozyten lassen sich in den gering entmarkten Arealen identifizieren. In den vollständig entmarkten Bereichen sind keine Oligodendrozyten darstellbar. Eine deutliche Gliose ist in den betroffenen Bereichen feststellbar (Abb. 18D links). Viele mehrkernige Astrozyten und Astrozyten mit zentralen Spalten im Zytoplasma kommen zur Darstellung. Aquaporin-4 wird regelrecht von den Astrozyten exprimiert. Es zeigt sich eine Mikrogliaaktivierung in der Kim1P-Färbung (Abb. 18D rechts). Eine ausgeprägte Entzündung kommt zur Darstellung, die vor allem aus CD3-positiven T-Zellen (Abb. 18C+J links) besteht. Höchst vereinzelt finden sich CD20-positiv B-Zellen.

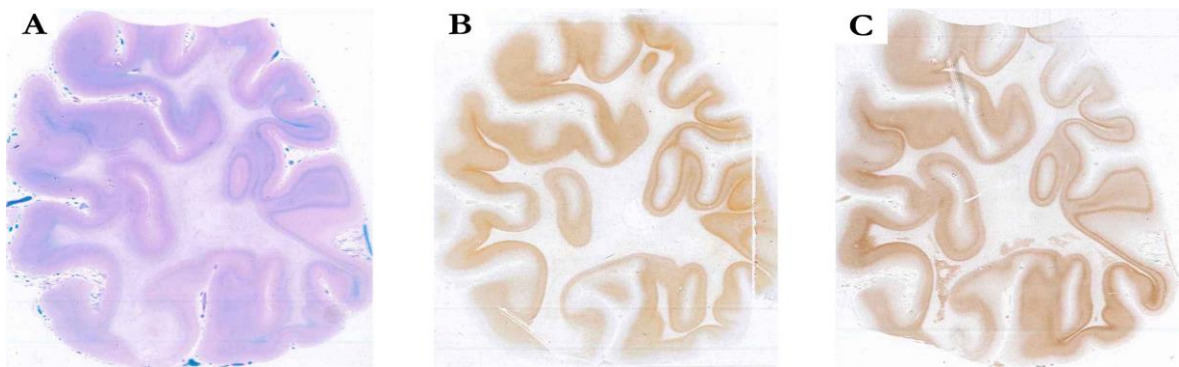


Abbildung 17: Ausmaß der Entmarkung im X-ALD-Fall #7.

A=LFB/PAS-Färbung, B=MBP-Färbung, C=MOG-Färbung.

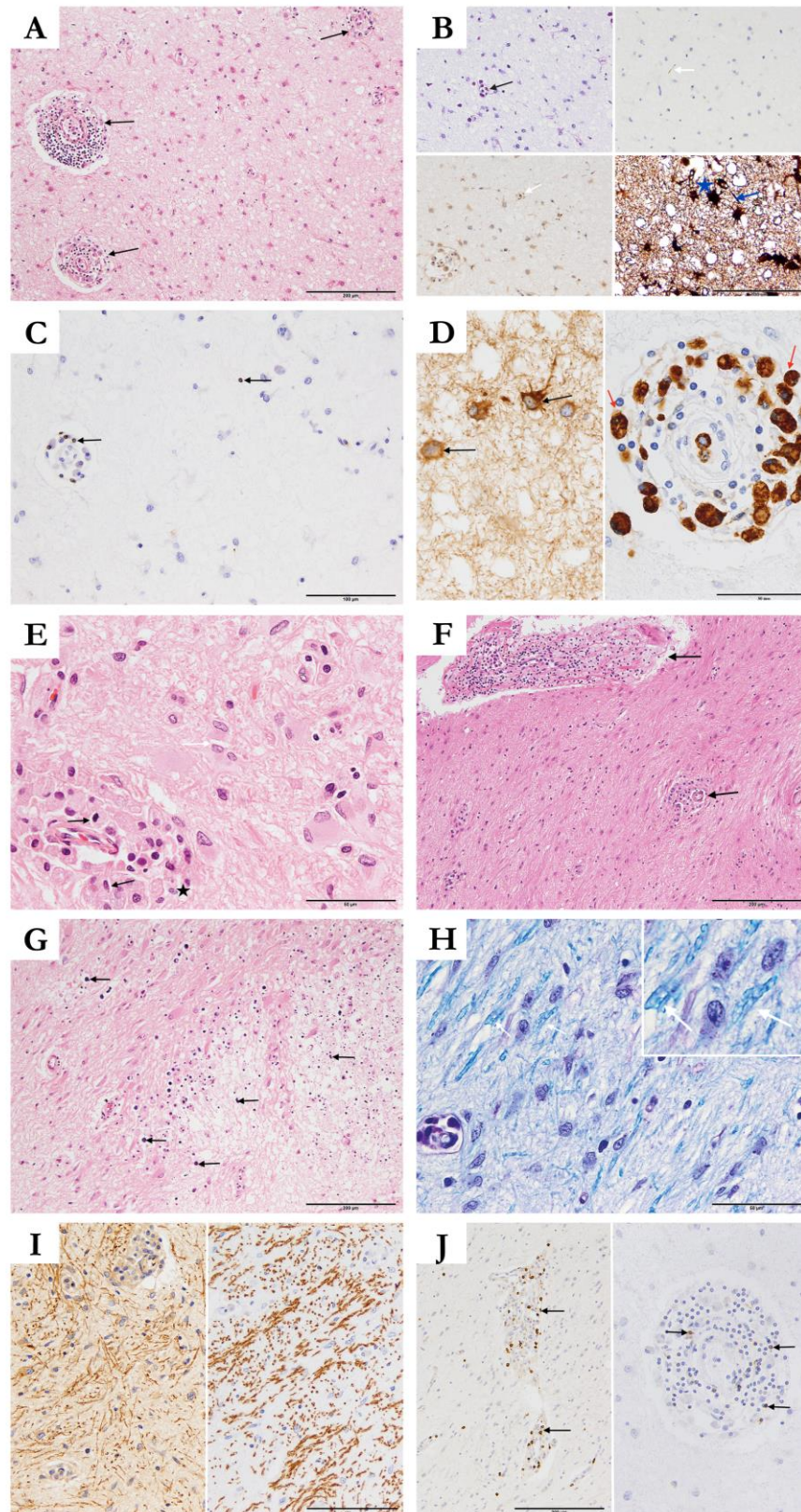


Abbildung 18: Histopathologie X-ALD-Fall #7.

In der weißen Substanz erscheint die gliale Matrix ausgedünnt. Perivaskulär sind entzündliche lymphozytäre Cuffs erkennbar (A →). Ein subtotaler Axonverlust kommt zur Darstellung (B rechts unten, Axone blauer Pfeil und Astrozyten ★). Zahlreiche CD3-positive T-Zellen finden sich vor allem perivaskulär (C + J links →), darun-

ter nur wenige CD4-positive T-Helferzellen (J rechts →). Eine deutliche Gliose mit mehrkernigen Astrozyten kommen zur Darstellung (D links →). Es zeigt sich eine deutliche Mikrogliaaktivierung (D rechts →). Die perivaskulären Cuffs bestehen aus Makrophagen (E ★) und Lymphozyten (F →). Makrophagen (E →) und Astrozyten (E weiße Pfeile) mit Spalten im Zellinneren kommen zur Darstellung. In den betroffenen Arealen zeigen sich viele Verkalkungen (G →). Die noch stehenden Myelinfasern erscheinen oftmals vakuolisiert (H weiße Pfeile). Die Myelinproteine CNP (I links) und PLP (I rechts) sind gleichermaßen verlustig. Histologische Färbungen: A + E-G: HE, B (links oben) + H: LFB/PAS, B (rechts unten): Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistoch-mie für: PLP (B rechts oben + I links), MOG (B links unten), CD3 (C + J links), GFAP (D links), Kim1P (D rechts), CNP (I rechts), CD20 (J rechts). Messbalken: A + B (links oben + unten, rechts oben) + F + G + J (links): 200 µm; B (rechts unten) + C + I + J (rechts): 100 µm; D + E + H: 50 µm.

3.2.2.2 Ergebnisse der untersuchten X-ALD-Fälle und der Kontrollen

In der folgenden Tabelle 13 sind die Ergebnisse der quantitativen und semiquantitativen Analyse der X-ALD-Fälle und der jeweiligen Kontrollfälle aufgezeigt. In den X-ALD-Fällen zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen eine flächige Entmarkung mit axonaler Reduktion und gewisser akuter axonaler Schädigung, Mikrogliaaktivierung, Reduktion der Oligodendrozyten, entzündlicher Infiltration und reaktiver Gliose. Die Anzahl an Astrozyten ist in den X-ALD-Fällen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. In den X-ALD-Fällen ist die Mikroglia deutlich aktiviert. Zahlreiche schaumzellige Makrophagen kommen zur Darstellung. In den Kontrollen ruht die Mikroglia.

Tabelle 13: Ergebnisse der X-ALD-Fälle und der jeweiligen Kontrollen

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten /mm ²	NOGO-A positive Oligodendrozyten /mm ²	KiM1P-positive Mikrogliosa/mm ²	GFAP-positive Astrozyten/mm ²	CD3-positive T-Zellen/mm ²	CD4-positive T-Zellen/mm ²	CD8-positive T-Zellen/mm ²	CD20-positive B-Zellen/mm ²	CD138-positive Plasmazellen/mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APPpositive Sphäroide/mm ²									
X-ALD #1	entmarktes Areal	4	3	4	3	3	3	3	16,4	437 ± 119,8	n.a.	49,8 ± 14,2	852 ± 121,1	296 ± 38,3	448,2 ± 83,3	n.a.	226,8 ± 41,2	33,2 ± 27,3	24,9 ± 7,7
	Areal mit stehendem Myelin	0	0	0	0	0	0	0	88,2	52,6 ± 21,6	n.a.	816,1 ± 64,4	437,1 ± 31,6	315,4 ± 51,7	38,7 ± 15,5	n.a.	19,4 ± 9,3	0	0
CNTRL-A (zu X-ALD #1)	sk	0	0	0	0	0	0	0	78,4	0	484,1 ± 32,5	450,9 ± 55,8	138,3 ± 14,3	138 ± 16	0	0	0	0	0
CNTRL-B (zu X-ALD #1)	sk	0	0	0	0	0	0	0	82,4	0	791,2 ± 56	423,2 ± 43,8	127,3 ± 11,1	113,4 ± 16,7	0	0	0	0	0
X-ALD #2	entmarktes Areal	4	4	4	3	n.v.	4	3	n.a.	n.v.	n.v.	595,9 ± 101,2	801,2 ± 77,8	462,4 ± 24,4	260,1 ± 53,6	n.v.	n.v.	n.v.	174,3 ± 45
CNTRL-A (zu X-ALD #2)	Balken	0	0	0	0	0	0	0	68,8	0	337,5 ± 24,3	630,7 ± 27,9	207,5 ± 34,8	55,3 ± 8,2	19,4 ± 13,1	0	0	0	0

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten /mm ²	NOGO-A positive Oligodendrozyten /mm ²	KiM1P-positive Mikrogliosa/mm ²	GFAP-positive Astrozyten/mm ²	CD3-positive T-Zellen/mm ²	CD4-positive T-Zellen/mm ²	CD8-positive T-Zellen/mm ²	CD20-positive B-Zellen/mm ²	CD138-positive Plasmazellen/mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP-positive Sphäroide/mm ²									
X-ALD #3	entmarktes Areal	4	4	4	3	3	1-4	3	10,0	257,3 ± 29,5	n.v.	282,2 ± 53,1	1405,3 ± 110,9	n.a.	n.v.	n.v.	105,1 ± 28,2	0	0
	Areal mit stehendem Myelin	0	0	0	0	0	0	0	60,4	285,9 ± 42,9	n.v.	398,4 ± 54,1	442,6 ± 225,5	n.a.	n.v.	n.v.	150,6 ± 28,4	0	0
CNTRL-A (zu X-ALD #3)	sk	0	0	0	0	0	0	0	78,4	0	484,1	450,9 ± 55,8	138,3 ± 14,3	138 ± 16	0	0	0	0	0
CNTRL-B (zu X-ALD #3)	sk	0	0	0	0	0	0	0	82,4	0	791,2	423,2 ± 43,8	127,3 ± 11,1	113,4 ± 16,7	2,8 ± 2,8	0	0	0	0
X-ALD #4	sk	2	3	3	n.a.	n.a.	2	2	16,8	0	44,3 ± 10,3	201,9 ± 37,3	818,8 ± 74,4	n.a.	166,1 ± 34,5	36,0 ± 17,5	43,0 ± 12,5	0	19,4 ± 5,9
	sk	1	0	0	0	0	0	1	13,6	11,1 ± 7,4	309,8 ± 36,1	641,8 ± 74,4	356,9 ± 53,4	171,5 ± 26	74,7 ± 56,6	16,6 ± 4,5	44,3 ± 13,2	2,8 ± 2,8	0
	tiefe	3	3	3	3	4	3	3	2,8	13,8 ± 8,5	24,9 ± 5	30,4 ± 11,3	799,5 ± 62,9	n.a.	38,7 ± 16	49,8 ± 8	0,1 ± 21,7	11,1 ± 6,2	2,8 ± 2,8

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten /mm ²	NOGO-A positive Oligodendrozyten /mm ²	KiM1P-positive Mikrogliosa/mm ²	GFAP-positive Astrozyten/mm ²	CD3-positive T-Zellen/mm ²	CD4-positive T-Zellen/mm ²	CD8-positive T-Zellen/mm ²	CD20-positive B-Zellen/mm ²	CD138-positive Plasmazellen/mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP-positive Sphäroide/mm ²									
CNTRL- (zu X-ALD #4)	tiefe	0	0	0	0	0	0	0	66,4	0	652,9 ± 30,1	n.a.	102,4 ± 22,6	152,1 ± 19,9	0	0	0	n.a.	n.a.
X-ALD #5	sk	4	3	3	4	4	3	2	36	0	41,5 ± 8,5	36 ± 19,8	271,1 ± 19,7	334,7 ± 25,9	33,2 ± 6,9	n.a.	25,3 ± 19,3	0,8 ± 0,4	0
	U-Fasern	1	1	1	1	1	1	1	16,8	0	33,2 ± 13,6	246,2 ± 39,4	201,9 ± 25,1	511,8 ± 28,9	49,8 ± 12,9	n.a.	33,1 ± 15,4	0	0
	tiefe	4	4	4	4	4	4	4	0,4	0	0	47 ± 17,5	110,7 ± 16,5	157,7 ± 20,6	13,8 ± 8,5	n.a.	11,1 ± 4,5	0	
CNTRL-A (zu X-ALD #5)	sk	0	0	0	0	0	0	0	52	0	993,1 ± 89,7	874,2 ± 67,7	243,4 ± 28,8	143,8 ± 18,8	0	n.a.	0	0	0
X-ALD #6	sk	3	3	3	n.a.	3	3	3	6,8	0	13,8 ± 6,2	33,2 ± 8	33,2 ± 10,8	141,1 ± 15,1	71,9 ± 42,5	5,5 ± 3,7	0	0	0
	sk	0	0	0	0	0	0	0	56,0	0	1001,4 ± 35,2	929,5 ± 40,7	96,8 ± 18,1	63,6 ± 19,4	0	0	0	0	0

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten /mm ²	NOGO-A positive Oligodendrozyten /mm ²	KiM1P-positive Mikrogliosa/mm ²	GFAP-positive Astrozyten/mm ²	CD3-positive T-Zellen/mm ²	CD4-positive T-Zellen/mm ²	CD8-positive T-Zellen/mm ²	CD20-positive B-Zellen/mm ²	CD138-positive Plasmazellen/mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP-positive Sphäroide/mm ²									
CNTRL-A (zu X-ALD #6)	sk	0	0	0	0	0	0	0	81,2	0	663,9 ± 48,8	307,1 ± 51,6	88,5 ± 14,2	107,9 ± 11,3	0	0	0	0	0
X-ALD #7	sk	4	4	4	4	4	4	2	34,4	0	n.a.	13,8 ± 7,5	276,6 ± 68	301,5 ± 36,1	213 ± 155	71,9 ± 47,8	24,9 ± 7,7	47 ± 32,7	0
	Capsula interna	1	1	1	1	1	1	2	41,6	96,8 ± 13,8	154,9 ± 13,8	199,2 ± 25	426 ± 90,6	248,9 ± 36,4	243,4 ± 77,7	47 ± 23,3	24,9 ± 6,5	0	2,8 ± 2,8

Score Entmarkung: 0: keine Entmarkung, 1: milde Entmarkung, 2: moderate Entmarkung, 3: schwere Entmarkung, 4: vollständige Entmarkung, **Score axonaler Reduktionsgrad:** 0: keine axonale Reduktion, 1: milde axonale Reduktion, 3: moderate axonale Reduktion, 4: vollständiger Axonverlust

3.2.2.3 Histopathologische Charakteristika der X-ALD

- 1) flächige Demyelinisierung der weißen Substanz, mäßig scharf definierte Ränder, wenige intakte, größtenteils vakuolisierte Myelinfasern in entmarkten Bereichen, U-Fasern mit Makrophageninfiltration, graue Substanz nicht betroffen,
- 2) zahlreiche Makrophagen mit teils eosinophilem, teils basophilem (HE-Färbung), teils PAS- und teils LFB-positivem (LFB/PAS-Färbung) inkorporiertem Material, Myelinproteinabbau in den Makrophagen erkennbar,
- 3) zentral gelegene schlanke, farblose, spindelförmige Spalten im Zytoplasma der Makrophagen und Astrozyten,
- 4) MRP14-positive Makrophagen nachweisbar, IgG-positive Ablagerungen in den Makrophagen darstellbar, keine Ablagerungen von aktivierten Komplementkomponenten,
- 5) deutliche Reduktion des axonalen Gerüsts, axonale Dichte korreliert mit Myelinbesatz, akute axonale Schädigung in Arealen mit MRP14-positiven Makrophagen nachweisbar,
- 6) stark ausgeprägte astrozytäre Gliose mit deutlich erhöhter Anzahl reaktiver Astrozyten,
- 7) ausgeprägte entzündliche Infiltration in entmarkten und noch bemerkten Bereichen der weißen Substanz, perivaskuläre Cuffs bestehend aus Makrophagen und T-Lymphozyten, wenige B-Zellen, Plasmazellen in variablem Ausmaß,
- 8) deutliche Reduktion der Oligodendrozyten, Oligodendrozytenapoptosen nachweisbar

3.3 Vanishing White Matter Disease

Autopsiegewebe von drei Patienten mit VWMD stand für die Auswertung zur Verfügung. Der Fall Nummer #1 weist eine Mutation im EIF2B5-Gen auf, was die Diagnose einer VWMD sichert. Die Fälle #2 und #3 sind zu Lebzeiten nicht genetisch untersucht worden. Beide Fälle zeigen aber den typischen klinischen Verlauf und die typischen histologischen Kennzeichen einer VWMD.

3.3.1 Klinische Daten der Patienten

Die klinischen Angaben zu den drei VWMD-Fällen und den dazugehörigen Kontrollen ohne neuropathologische Veränderungen werden in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Klinische Daten der Patienten mit VWMD und der Kontrollen.

Fall	Alter	Ge- schlecht	Familien- anamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesur- sache
VWMD- Fall #1	7 Mo- nate	m	Eltern: nicht ver- wandt und gesund, 2 gesunde Geschwis- ter	Schwangerschaft und Geburt: termin- gerecht, keine Auffälligkeiten Mit 5 Monaten: nach Infekt der Atem- wege Verschlechterung des Allgemein- zustandes mit Entwicklungsverzöge- rung und Hypotonie der Muskulatur. Im Verlauf zunehmende Verschlechte- rung mit Hyperreflexie, Lethargie bis hin zum Koma und respiratorischer Insuffizienz	Keine Angaben	Respirato- rische In- suffizienz
CNTRL- A (zu VWMD- Fall #1)	8 Mo- nate	m	Keine An- gaben	Gesundes Kind	Gesundes Kind	Plötzlicher Kindstod
VWMD- Fall #2	1 Jahr 10 Mona- te	m	Eltern ge- sund, väterli- cherseits: Schwester mit Mul- tipler Skle- rose, Cousin hatte 2 Kinder (w, m), die im Alter von 2 Jahren an einer LD ver- storben sind, drit- tes Kind (w) gesund	Geburt: 35. Schwangerschaftswoche, Gewicht: 1.990g, Kopfumfang: 29,5cm, Apgar-Score: 8/9/10 U1: auffällige Schädelkuppenweichheit U2: keine Auffälligkeiten U3: etwas marmorierte Haut, Hyper- flexibilität U4: leichte links konvexe Haltung, gu- ter Allgemeinzustand U5: Motorik unauffällig, Reflexe leb- haft, erhöhter Muskeltonus, trockene Haut U6: Verdacht auf Ernährungsstörung Mit 10 Monaten: freies Sitzen Mit 11-12 Monaten: erste Worte Mit 16 Monaten: Laufen an Gegen- ständen, kein freies Laufen Mit 19 Monaten: 6 Wochen lang schwallartiges Erbrechen, kein Fieber, kein Durchfall, Rückschritte in der Entwicklung, zittrig, schleichender Gang, ängstlich, Einwärtsdrehung rechter Fuß beim Gehen und Liegen Mit 20 Monaten: beginnender Intenti- onstremor, wiederholtes Zusammen- zucken am ganzen Körper, häufiges Stürzen, kein Halten mit den Händen beim Krabbeln, wiederholtes Zucken	Neurologischer Befund: schläf- rig, kaum Spontanmotorik, Muskeltonus erhöht, keine Kopfkontrolle, Babinski bds. positiv, Pupillen isokor und lichtreagibel, kein Nystagmus, berührungsempfindlich, schrill- les anhaltendes Schreien, Ataxie, Tetraspastik, myokloni- sche Anfälle, Hirnstammfunk- tionsstörungen Labor: keine Fettstoffwechsel- störung, Ausschluss MLD, Morbus Krabbe, Morbus Sandhoff, Morbus Tay Sachs, GM1-Gangliosidose Liquor Untersuchung: Liquor klar, Eiweiß erhöht auf 100 mg/dl, Glukose und Laktat im Normalbereich Sonografie Schädel: Hochpa- thologische Rindenmarkvertei- lung MRT: Weiße Substanz stellt sich von der Signalgebung wie Liquor dar, keine Zysten MRS: Weiße Substanz: N- Acetylaspartat-Level reduziert,	k.A.

Fall	Alter	Ge- schlecht	Familien- anamnese	Klinische Symptome und Verlauf	Diagnostik und Befunde	Todesur- sache
				des Körpers mit Rumpfneigung nach hinten, keine Bewusstlosigkeit Mit 21 Monaten: Fieber bis 38,9 °C, appetitlos, nachts unruhig, Zuckungen der linken Körperhälfte, rechte Körperhälfte steif, Kopf nach links geneigt, vermehrte Unruhe, apathisch, Erbrechen. Allgemeinzustand zunehmend schlechter, anhaltendes Fieber, schrilles Schreien und berührungsempfindlich	Laktat- und Glukose-Level erhöht, alle anderen Metabolite stark gemindert, Graue Substanz: N-Acetylaspartat-Level reduziert, Basalganglien N-Acetylaspartat-Level reduziert. EEG: generalisierte, kontinuierliche, sehr hochamplitudige, polymorphe Delta-Aktivität von 1-2 Sekunden/Minute mit <i>occipital</i> bis zentral überlagernden Theta-Wellen Elektrophysiologie: VEP und AEP nicht ableitbar	
CNTRL-A (zu VWMD-Fall #2)	1 Jahr 11 Monate	w	unauffällig	Gesundes Kind	Gesundes Kind	plötzlicher Kindstod
VWMD-Fall #3	5 Jahre 3 Monate	m	unauffällig	Entwicklung: statomotorische Retardierung und Ataxie Verlauf: zunehmende Verschlechterung der neurologischen Symptomatik, ausgeprägte Schwäche und Steifheit der Extremitäten, Tetraspastik, mehrere Episoden von Bewusstseinsbeeinträchtigung im Rahmen von Infekten	Im Alter von einem Jahr und 8 Monaten erfolgte eine Muskelbiopsie: myopathische Veränderungen mit Texturstörung und regenerierenden Fasern. Nervenbiopsie: leichte chronische degenerative Veränderung Haut- und Konjunktivalbiopsie: keine sicheren pathologischen Veränderungen	Herz-Kreislauf-Versagen
CNTRL-A (zu VWMD-Fall #3)	5 Jahre 9 Monate	m	Keine Angaben	Keine Angaben	Myokarditis	Herz-Kreislauf-Versagen

3.3.2 Histopathologie der VWMD

3.3.2.1 Allgemeine histopathologische Beschreibung der untersuchten Fälle

VWMD-Fall #1: Von der Entmarkung sind sowohl die supra- als auch die infratentoriellen Strukturen betroffen. Das betroffene Marklager ist sehr zellarm und zeigt eine unvollständige flächige Demyelinisierung (Abb. 19A-C). Hingegen ist das Myelin im Balken gut erhalten (Abb. 19A-C, Abb. 20A), weist aber zahlreiche Makrophagen auf. In dem entmarkten Berei-

chen finden sich äußerst wenige, zum Teil bereits aufgedunsene und aufgequollene Myelinfasern (Abb. 20A+B). Nur wenige Makrophagen kommen zur Darstellung. Diese liegen nicht in Gruppen, sondern eher einzeln verstreut im Parenchym. Auch im Balken liegen die Makrophagen schütter im Parenchym verteilt, übertreffen aber zahlenmäßig die Makrophagen in der entmarkten weißen Substanz. MRP14-positive frühaktive Makrophagen lassen sich nicht identifizieren. Innerhalb der Makrophagen ist der Abbau der einzelnen Myelinproteine nicht erkennbar. Die Phospholipide (LFB/PAS-Färbung) und Myelinproteine sind gleichermaßen verlustig. Auch der Cortex ist stellenweise entmarkt, wenn auch in diesem Alter (7 Monate) die Myelinisierung der grauen Substanz noch nicht abgeschlossen ist. In der PLP-Färbung zeigt sich im Vergleich zu den angrenzenden bemarkten Arealen eine flächige kortikale Entmarkung, die vor allem den intrakortikalen Bereich betrifft (Abb. 21C). Eine ausgeprägte Gliose ist kortikal sowohl in den entmarkten als auch bemarkten Arealen feststellbar (Abb. 21D). In der betroffenen weißen Substanz ist der axonale Besatz reduziert (Abb. 20C+D). Die gliale Matrix ist sehr ausgedünnt. In der GFAP-Färbung markieren sich die Astrozyten, die jedoch nicht das typische Bild von reaktiven Astrozyten zeigen. Vielmehr erscheinen die Astrozyten dystroph (Abb. 20E+F). Anhand der durchgeführten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Anti-IgG- und Anti-GFAP-Antikörpern ist eine deutliche Ablagerung von IgG an den Astrozyten und deren Fortsätzen zu erkennen (Abb. 21E). Passend dazu zeigt sich in der Fibrinogen-Färbung ein ähnliches Expressionsmuster. Fibrinogen lagert sich an den dystrophen Astrozyten und deren Fortsätzen ab (Abb. 21G). Aquaporin-4 wird von den dystrophen Astrozyten exprimiert (Abb. 20G+H). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Oftmals weisen die Oligodendrozyten einen auffällig geschwollenen, blass eosinophilen Zelleib auf (Abb. 21A). Vereinzelt lassen sich auch Oligodendrozytenapoptosen identifizieren (Abb. 21B). In der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wird deutlich, dass das IgG nicht an Oligodendrozyten bindet (Abb. 21F). Eine nennenswerte Entzündung zeigt sich in den entmarkten Arealen nicht.

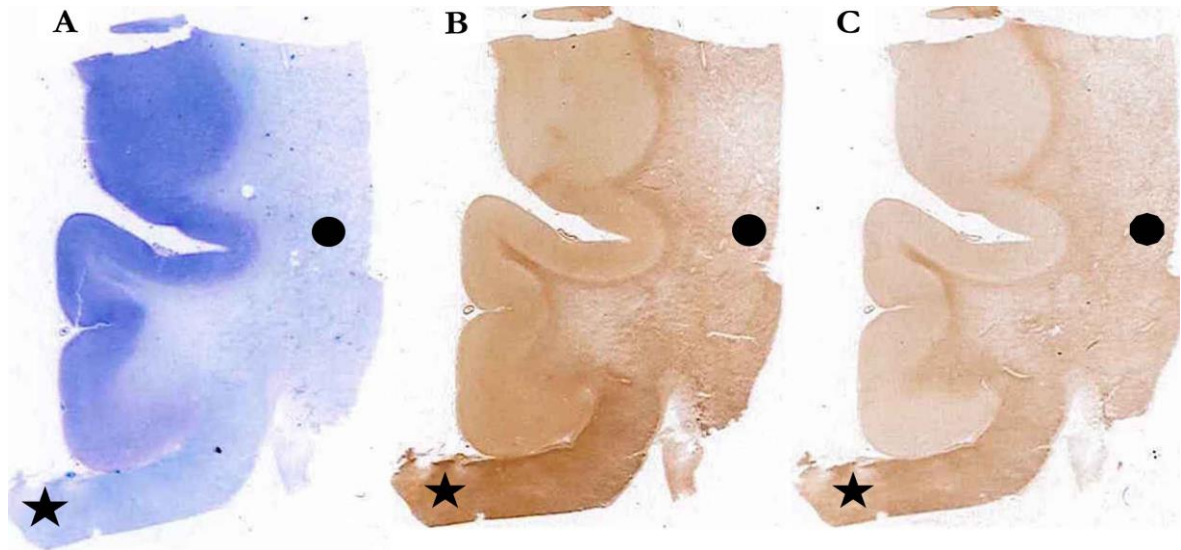


Abbildung 19: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #1.

Der Balken (★) ist wenig betroffen, während das Myelin in der weißen Substanz (●) des Gyrus cinguli deutlich verlustig ist. A=LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

Balken

Weiße Substanz Gyrus cinguli

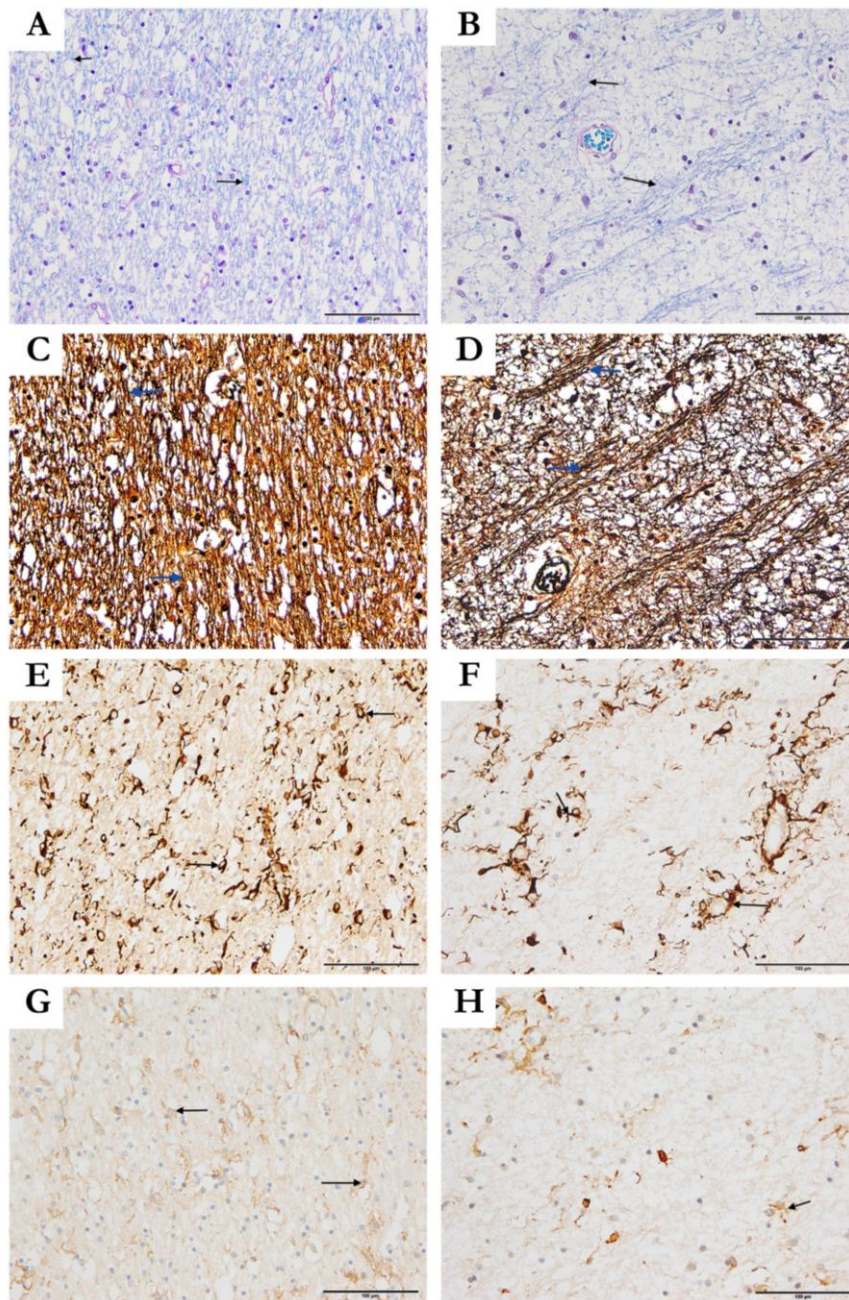


Abbildung 20: Histopathologie VWMD-Fall #1 Bildertafel 1.

Im Balken ist der Myelinbesatz gut erhalten (A, → zeigen Myelinfasern), während in der weißen Substanz des Gyrus cinguli eine unvollständige flächige Entmarkung zur Darstellung kommt (B). Nur wenige zum Teil aufge-dunsene Myelinfasern sind vorhanden (B →). Das axonale Gerüst ist passend zum Myelinbesatz reduziert (C + D, blaue Pfeile zeigen auf Axone). Die Astrozyten erscheinen dystroph (E + F →). In der weißen Substanz des Gyrus cinguli ist die Anzahl der Astrozyten deutlich reduziert. Aquaporin-4 wird auf den dystrophen Astrozyten exprimiert (G + H →). Histologische Färbungen: A + B: LFB/PAS, C+D: Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistochemie für: GFAP (E + F), AQP4 (G + H). Messbalken: A-H: 100 µm.

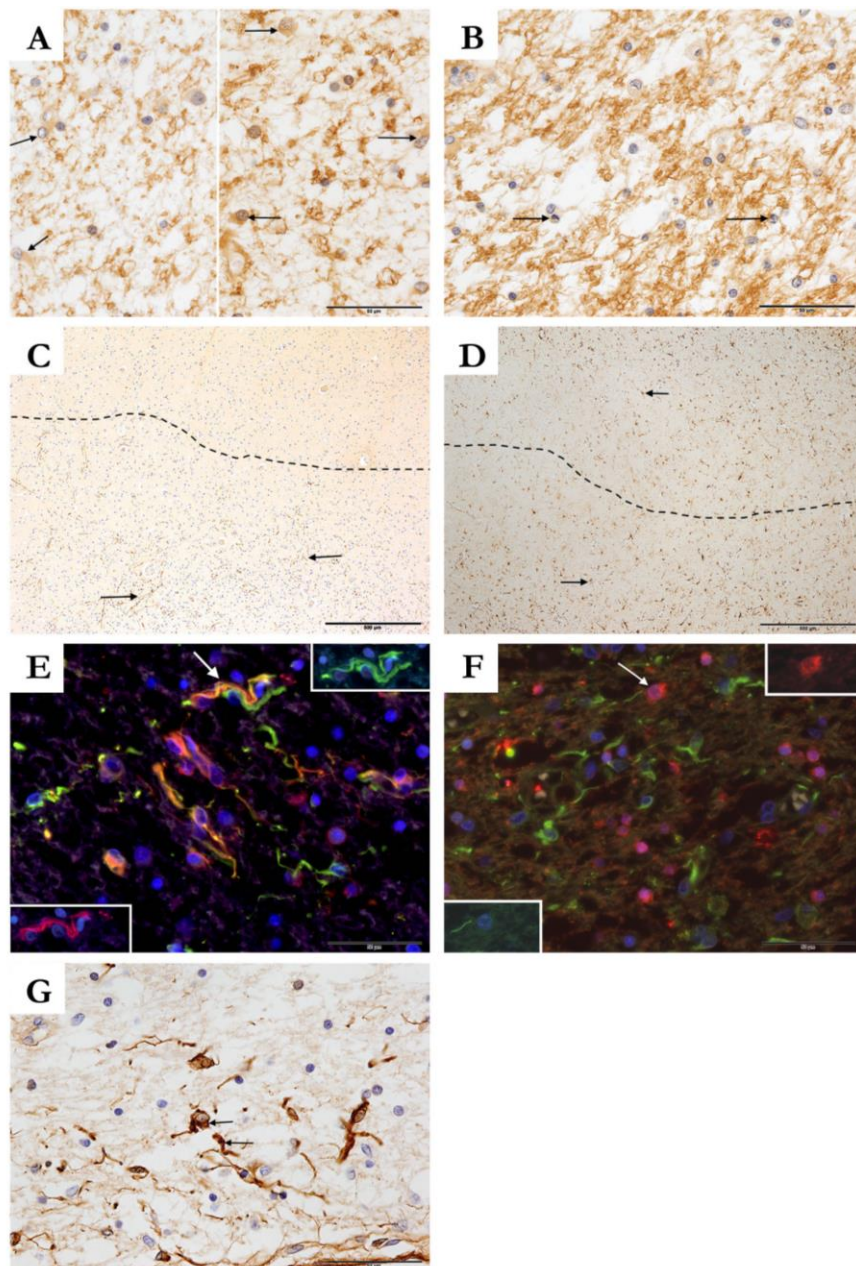


Abbildung 21: Histopathologie VWMD-Fall #1 Bildertafel 2.

Die Anzahl der Oligodendrozyten ist in den betroffenen Bereichen reduziert. Die noch vorhandenen Oligodendrozyten weisen einen auffällig geschwollenen Zelleib auf (A →). Zudem lassen sich Oligodendrozytenapoptosen nachweisen (B →). In der PLP-Färbung zeigt sich eine flächige kortikale Entmarkung, die vor allem den intrakortikalen Bereich betrifft (C, oberhalb der gestrichelten Linie flächige Entmarkung, unterhalb der gestrichelten Linie Myelin vorhanden, → zeigt auf Myelinfasern). In den entmarkten und nicht entmarkten Cortexarealen zeigt sich eine ausgeprägte Gliose (D → zeigt auf Astrozyten). Die Bluthirnschranke ist offen, wodurch es zu einem Austritt von IgG (E + F) und Fibrinogen (G →) aus dem Blut in das Hirnparenchym kommt. Mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung konnte gezeigt werden, dass sich IgG an den dystrophen Astrozyten abgelagert (E weißer Pfeil und Bildausschnitte in E, IgG rot und GFAP grün) und nicht an den Oligodendrozyten (F weißer Pfeil und Bildausschnitte in F, IgG grün und p25 rot). Fibrinogen zeigt ein ähnliches Ablagerungsmuster wie IgG (G →). Immunhistochemie für: MOG (A links+B), MBP (B rechts), PLP (C), GFAP (D), Fibrinogen (G). Im-

munifluoreszenzdoppelfärbung: E= IgG (Cy3, rot) und GFAP (Alexa 488, grün), F= IgG (Alexa 488, grün) und p25 (Alexa 555, rot). Messbalken: A + B + E + F + G: 50 µm; C + D: 500 µm.

VWMD-Fall #2: Die weiße Substanz des Großhirns und des Pons zeigen eine unvollständige fleckige Entmarkung (Abb. 22A-C + 23A). Die U-Fasern, der Balken und die Capsula interna zeigen allenfalls eine geringe Entmarkung. Kortikal erscheint der Myelinbesatz stellenweise deutlich reduziert (Abb. 23 H+I), wobei die kortikale Entmarkung verschiedene Kortexabschnitte betrifft (Abb. 23I). In den entmarkten Bereichen der weißen Substanz finden sich einige Makrophagen schütter verteilt im Parenchym und perivaskulär (Abb. 23C). Höchst vereinzelt lassen sich Makrophagen mit LFB-, PAS-, PLP-, und MBP- positivem zytoplasmatischen Material darstellen. Die großen (MBP, PLP) und kleinen (CNPase, MAG, MOG) Myelinproteine sind im gleichen Ausmaß von der Entmarkung betroffen. Auch erscheint das axonale Gerüst fleckig reduziert (Abb. 23B). Die Oligodendrozyten sind in ihrer Zahl deutlich reduziert. Die noch vorhandenen Oligodendrozyten weisen oftmals ein großes und kompaktes Zytoplasma auf (Abb. 23F). Zudem kommen einzelne Apoptosen zur Darstellung, die noch Myelinproteine exprimieren und sich somit als Oligodendrozytenapoptosen identifizieren lassen (Abb. 23G). Die Oligodendrozytenapoptosen finden sich vor allem in den von der Entmarkung noch nicht betroffenen Arealen. Innerhalb der entmarkten weißen Substanz sind die Astrozyten deutlich dystroph und in ihrer Anzahl reduziert (Abb. 23E). Eine nennenswerte entzündliche Begleitreaktion zeigt sich nicht.

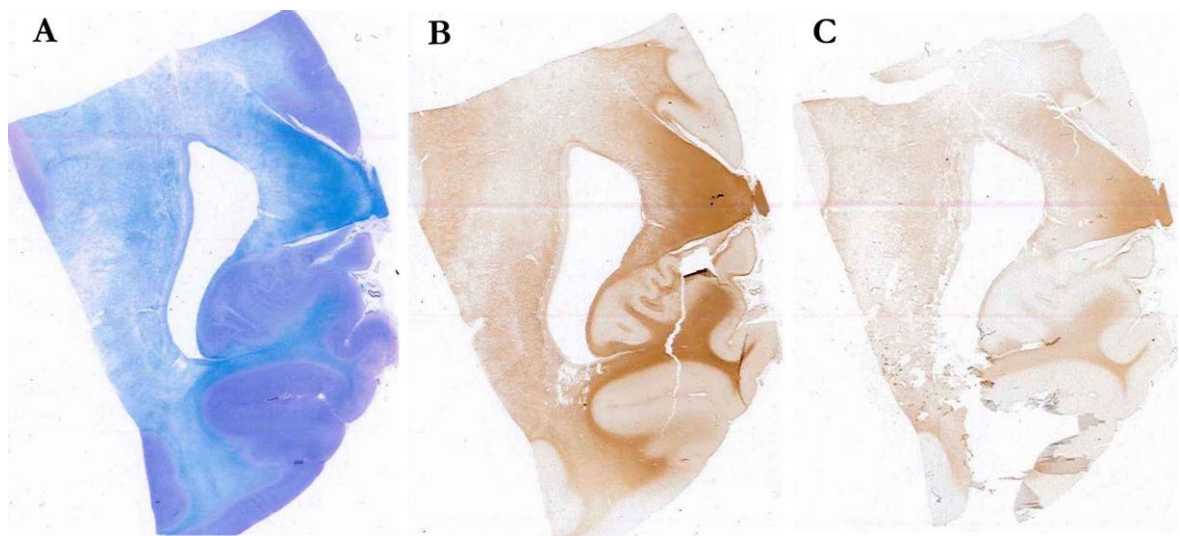


Abbildung 22: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #2.

A= LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

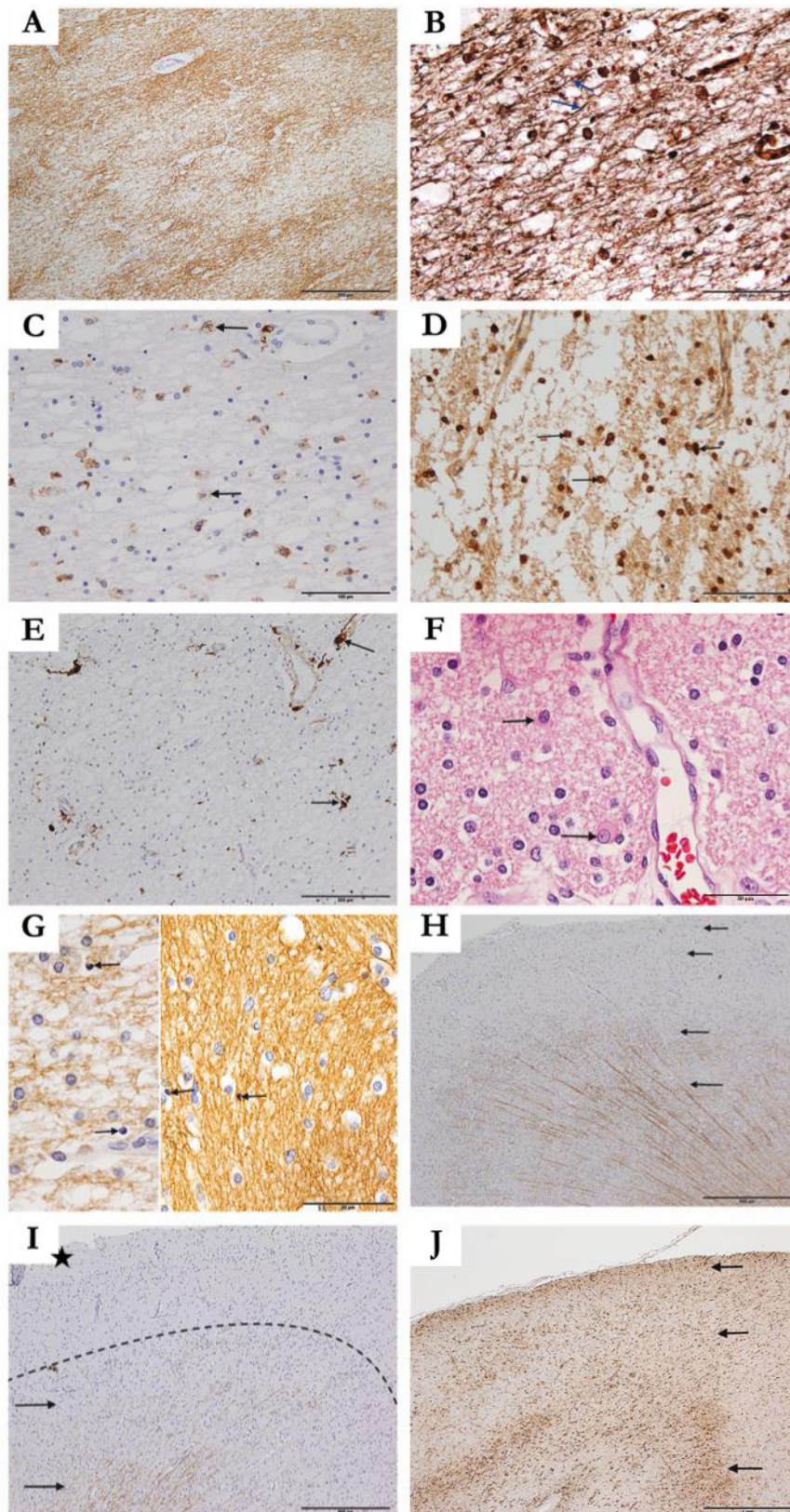


Abbildung 23: Histopathologie VWMD-Fall #2.

Zur Darstellung kommt eine unvollständige fleckige Entmarkung in der WS (A). Das axonale Gerüst ist reduziert (B Axone blauer Pfeil). Einige schaumzellige Makrophagen sind in der weißen Substanz darstellbar (C →). Die Oligodendrozyten sind fleckig reduziert (D →). Einzelne dystrophe Astrozyten und einige gliale Fasern kommen in der GFAP-Färbung zur Darstellung (E →). In der HE-Färbung zeigen die Oligodendrozyten oftmals einen

bauchigen, blass eosinophilen Zelleib (F →). Oligodendrozytenapoptosen lassen sich identifizieren (G →). Während Bild H (→) einen in allen Abschnitten altersentsprechend regelrecht myelinisierten Kortex zeigt, ist in Bild I eine flächige Entmarkung in den oberen Kortexabschnitten erkennbar (→: Myelin im Kortex erhalten, ★: kortikale Entmarkung, oberhalb der gestrichelten Linie). Reaktive, teils dystrophe Astrozyten finden sich diffus im Kortex (J →). Histologische Färbungen: B: Versilberung nach Bielschowsky, F: HE. Immunhistochemie für: PLP (A), Kim1P (C), P25 (D), GFAP (E + J), MOG (G links), PLP (G rechts + H + I). Messbalken: A + H + I: 500 µm; B-D: 100 µm; E: 200 µm, F+G: 50 µm, J: 1 mm.

VWMD-Fall #3: In der HE-Färbung zeigt sich eine aufgelockerte und ausgedünnte Matrix (Abb. 25A). Das Marklager der supra- und infratentoriellen Strukturen zeigt eine nahezu vollständige Demyelinisierung. Auch die U-Fasern sind betroffen (Abb. 24A-C). Die noch stehenden Myelinfasern wirken aufgequollen und ödematös. Die Demyelinisierung ist in der LFB-Färbung ausgeprägter als in den immunhistochemischen Färbungen für die Myelinproteine, wobei die einzelnen Myelinproteine gleichermaßen verlustig sind (Abb. 24A-C). Insgesamt sind nur wenige, locker im Parenchym verteilte, eher kleine Makrophagen ersichtlich, die nur selten PAS-positives Material beinhalten. Innerhalb der Makrophagen lässt sich der Myelinabbau nicht darstellen. Auch bei diesem Fall zeigt sich eine kortikale Entmarkung. Diese betrifft stellenweise die subpialen Areale und in anderen Bereichen vor allem die intrakortikalen Areale (Abb. 25F+G). In der Versilberung nach Bielschowsky zeigt sich eine deutliche Reduktion des axonalen Besatzes. Eine signifikante akute axonale Schädigung lässt sich nicht darstellen. In der GFAP-Färbung kommen zahlreiche dystrophe Astrozyten zur Darstellung (Abb. 25E links +H). Die dystrophen Astrozyten exprimieren Aquaporin-4 (Abb. 25 E rechts). Zudem lässt sich auch hier die Ablagerung von IgG an den Astrozyten nachweisen. Des Weiteren ist eine deutliche Reduktion der Oligodendrozyten darstellbar. Die noch vorhandenen Oligodendrozyten weisen oftmals einen vergrößerten, eosinophilen Zelleib auf. Einzelne CD3-positiv T-Lymphozyten finden sich perivaskulär und schütter im Parenchym (Abb. 25C). Nebenbefundlich kommen im Hippocampus auf Höhe Cornu ammonis 2 und 1 ein Verlust an Nervenzellen und eine reaktive Gliose zur Darstellung, passend zu einer alten hypoxischen Schädigung (Abb. 25B).

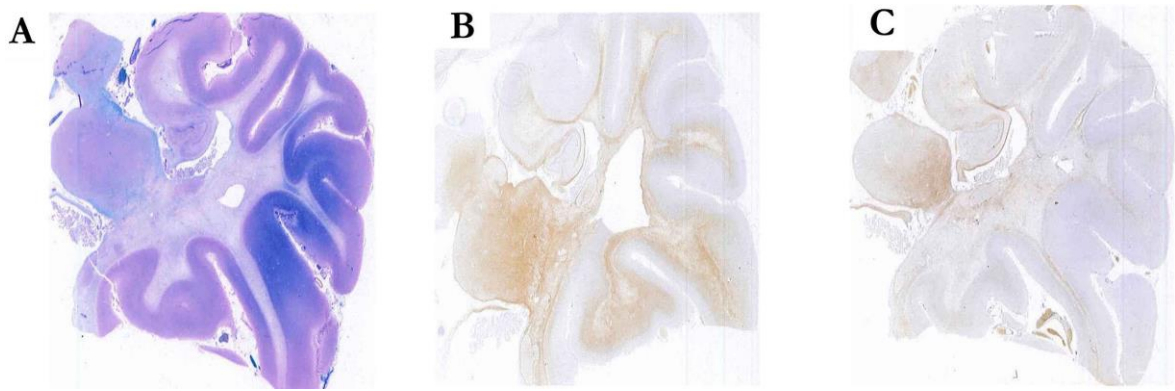


Abbildung 24: Ausmaß der Entmarkung im VWMD-Fall #3.

A= LFB/PAS-Färbung, B= MBP-Färbung, C= MOG-Färbung.

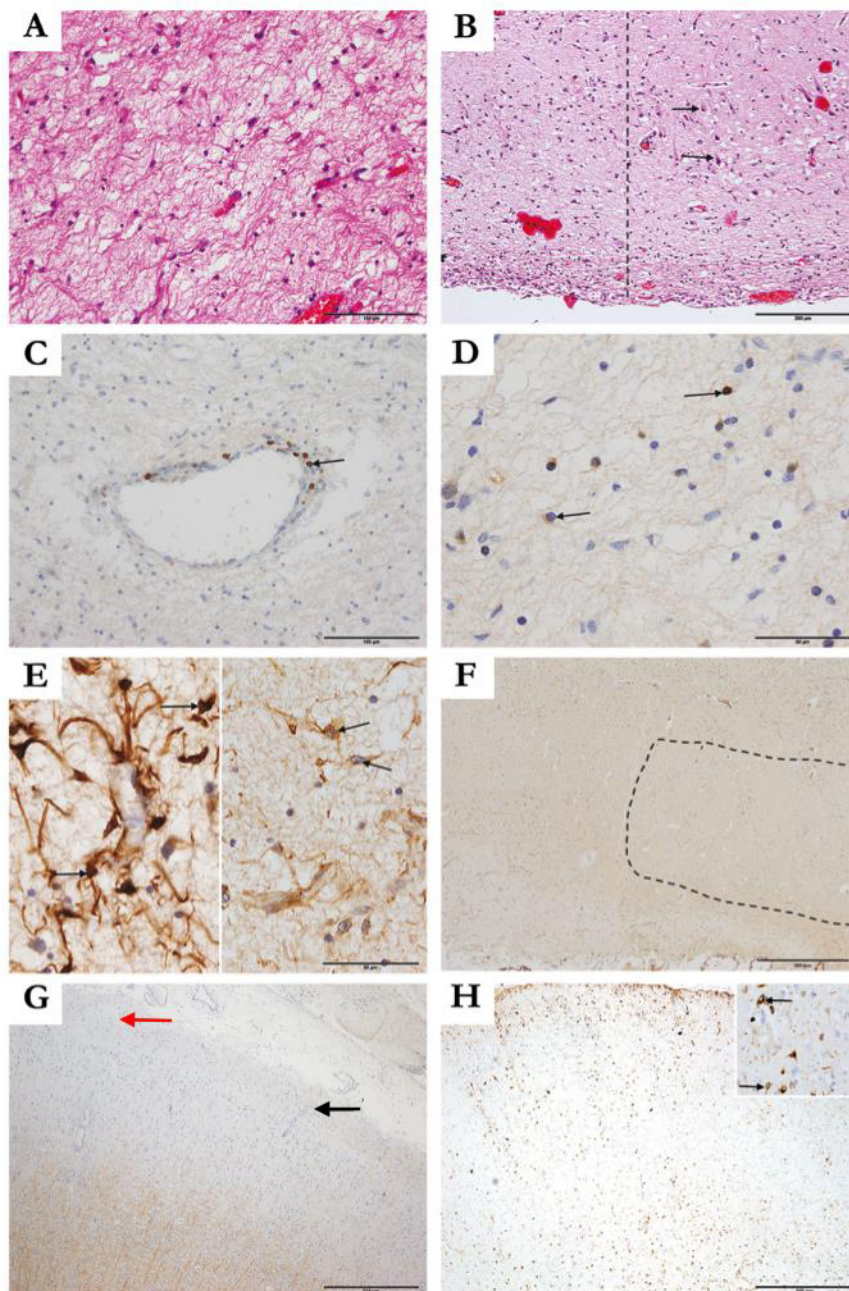


Abbildung 25: Histopathologie VWMD-Fall #3.

In der HE-Färbung zeigt sich eine ausgedünnte gliale Matrix (A). Im Hippocampus ist in Höhe Cornus ammonis 2 und 1 ein Nervenzellverlust feststellbar. Hier kommen auch zahlreiche reaktive Astrozyten zur Darstellung (B linker Bildabschnitt Nervenzellverlust, rechter Bildabschnitt Neurone (➔) erkennbar). Schütter im Parenchym und perivaskulär finden sich einige CD3-positive T-Zellen (C ➔). Eine deutliche Reduktion der Oligodendrozyten lässt sich nachweisen (D ➔ zeigt auf Oligodendrozyten). Die Astrozyten und ihre Fortsätze erscheinen in der GFAP-Färbung dystroph (E linker Abschnitt ➔). Aquaporin-4 wird auf den Astrozyten exprimiert (E rechter Abschnitt ➔). Stellenweise ist der Kortex entmarkt, wobei sowohl intrakortikale Bereiche (F eingekreistes Areal) als auch subpiale Bereiche (G roter Pfeil zeigt auf subpiale Entmarkung, schwarzer Pfeil zeigt auf erhaltenes subpiales Myelin) betroffen sind. Auch im Kortex kommen reaktive, teils dystrophe Astrozyten zur Darstellung (H, Bildausschnitt rechts oben ➔). Histologische Färbungen: A+B: HE. Immunhistochmie für: CD3 (C), P25 (D), GFAP (E links + H), AQP4 (E rechts), MBP (F + G). Messbalken: A + C: 100 µm; B: 200 µm; D + E: 50 µm, F + G + H: 500 µm.

3.3.2.2 3.3.2.1 Ergebnisse der untersuchten VWMD-Fälle und der Kontrollen

Die Ergebnisse der ausgewerteten Bereiche der VWMD-Fälle und der jeweiligen Kontrollen werden in der Tabelle 15 dargestellt. In den entmarkten Bereichen zeigt sich eine fleckige Demyelinisierung mit reduziertem axonalen Besatz und wenigen APP-positiven axonalen Sphäroiden. Im Gegensatz zu den Kontrollen ist in den stark demyelinisierten Bereichen eine deutliche Abnahme der P25- und NOGO-A-positiven Oligodendrozyten ersichtlich. Eine erhöhte Anzahl an Kim1P-positiven aktivierten Mikrogliazellen und eine erhöhte Anzahl an GFAP-positiven Astrozyten sind im Vergleich zu den Kontrollen in den ausgewerteten entmarkten Bereichen der VWMD-Fälle nachweisbar. Entzündliche Infiltrate sind nur gering ausgeprägt oder fehlen.

Tabelle 15: Ergebnisse der untersuchten VWMD Fälle und der Kontrollen

Fall	Untersuchtes Areal in der WS	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozy- ten/mm ²	NOGO-A- positive Oli- godendrozy- ten/mm ²	KiM1P-positive Mikroglia /mm ²	GFAP-positive Astrozyten /mm ²	CD3-positive T- Zellen/ mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP-positive Sphäroide/mm ²					
VWMD #1	Balken	0	0	0	n.a.	0	0	1	26,4	55,3 ± 5,8	741,4 ± 49,8	448,2 ± 52,3	456,5 ± 30,6	348,56 ± 20,7	0
	WS des <i>Gyrus cinguli</i>	2	2	2	n.a.	2	2	1	43,3	33,2 ± 5,5	251,7 ± 33,9	201,9 ± 17	152,15 ± 22,7	265,57 ± 25,2	0
CNTRL-A (zu VWMD-Fall #1)	sk	0	0	0	0	0	0	0	35,6	0	735,8 ± 40,4	426,0 ± 60,2	99,6 ± 18,5	188,11 ± 12,9	0
VWMD #2	Balken	0	0	0	0	0	0	0	33,2	0	1.330,6 ± 74,5	1.236,6 ± 40,8	177,1 ± 14,4	301,5 ± 20,8	0
	sk	2	2	2	2	2	2	2	13,6	74,7 ± 17	293,2 ± 41,3	683,3 ± 38,3	152,1 ± 15,6	66,4 ± 13,8	0
	pv	1	1	1	1	1	1	1	14	0	719,3 ± 72,5	296,0 ± 53,8	163,2 ± 25,6	146,6 ± 17	0
CNTRL-A (zu VWMD-Fall #2)	sk	0	0	0	0	0	0	0	28,4	0	896,1 ± 35,5	893,5 ± 21,6	130 ± 28,9	163,2 ± 18,4	0
VWMD #3	sk	2	2	2	3	n.a.	3	1	28	0	217,8 ± 38,6	n.a.	276,6 ± 40,4	467,5 ± 35,3	11,1 ± 8,5
	sk	4	3	3	4	n.a.	3	3	5,6	0	135,5 ± 22,4	n.a.	188,1 ± 18,3	406,7 ± 26,4	8,3 ± 5,9
CNTRL-A (zu VWMD-Fall #3)	sk	0	0	0	0	0	0	0	34,4	0	461,1 ± 62	874,2 ± 43,3	105,1 ± 16,4	154,9 ± 15	0

In der Tabelle 15 sind die quantitativen und semiquantitativen Auswertungen verschiedener Areale der VWMD-Fälle und der Kontrollen aufgelistet. **Score Entmarkung: 0:** keine Entmarkung, **1:** milde Entmarkung, **2:** moderate Entmarkung, **3:** schwere Entmarkung, **4:** vollständige Entmarkung, **Score axonaler Reduktionsgrad: 0:** keine axonale Reduktion, **1:** milde axonale Reduktion, **3:** moderate axonale Reduktion, **4:** vollständiger Axonverlust

3.3.2.3 Histopathologische Charakteristika der VWMD

Zusammenfassend finden sich folgende histologische Kennzeichen der VWMD:

- 1) fleckige Demyelinisierung mit vakuolisierten noch stehenden Myelinfasern,
- 2) insgesamt wenige und kleine Makrophagen, Myelinabbau in Makrophagen nicht erkennbar,
- 3) Corpus callosum und Capsula interna zeigen keine nennenswerte Entmarkung, aber eine deutliche Mikrogliaaktivierung,
- 4) kortikale Entmarkung und ausgeprägte kortikale Gliose,
- 5) dystrophe Astrozyten, IgG- und Fibrinogen-Ablagerung an Astrozyten und deren Fortsätzen, kein Verlust der Aquaporin 4-Expression auf Astrozyten,
- 6) deutliche Reduktion der Oligodendrozyten, Nachweis von Oligodendrozytenapoptosen, noch vorhandene Oligodendrozyten oftmals mit vergrößerten und eosinophilen Zelleib,
- 7) variable Reduktion des axonalen Gerüsts, keine nennenswerte akute axonale Schädigung,
- 8) höchst vereinzelt perivaskuläre T-Lymphozyten, keine entzündlichen lymphozytären Infiltrate im Parenchym nachweisbar, kein Nachweis von B-Lymphozyten oder Plasmazellen,
- 9) Bluthirnschranke gestört durch Schädigung der Astrozyten als Teil der Bluthirnschranke.

3.4 Morbus Alexander

Insgesamt standen für die Auswertung Autopsiegewebe von zwei Patienten mit Morbus Alexander zur Verfügung.

3.4.1 Klinische Daten

Bei dem Fall #1 handelt es sich um eine 14 Jahre und 6 Monate alte Patientin. Klinische Angaben waren nicht zu eruieren. Bei dem Fall #2 handelt es sich um einen erwachsenen 37 Jahre alten männlichen Patienten. Die MRT-Untersuchung zeigte bei diesem Patienten eine flau kontrastmittelaufnehmende Signalveränderung im Hirnstamm und im *Conus medullaris*. Bei dem Patienten wurden drei Operationen durchgeführt, bei denen Biopsieproben aus dem Hirnstamm und den Basalganglien entnommen wurden. Der Patient verstarb kurz nach der

dritten Biopsieentnahme. Eine Mutation im GFAP-Gen konnte in den molekularpathologischen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

3.4.2 Histopathologie

3.4.2.1 Allgemeine histopathologische Beschreibung der untersuchten Fälle

M. Alexander-Fall #1: Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass vor allem die infratentoriellen Strukturen betroffen sind. Es kommen zahlreiche plumpe, teils zigarrenförmige gliale Fasern zur Darstellung, die sogenannten Rosenthalfasern (Abb. 26A ★). Die Rosenthalfasern stellen sich in der HE-Färbung eosinophil dar und akkumulieren vor allem perivaskulär, subependymal und subarachnoidal (Abb. 26E). Einige Rosenthalfasern lassen bläulich wirkende Vakuolen im Zentrum erkennen (Abb. 26F). Aquaporin-4 wird von den Astrozyten exprimiert (Abb. 26E Ausschnitt rechts oben). Die Fasertrakte im Pons lassen eine unvollständige, fleckige Entmarkung erkennen. Die noch stehenden Myelinfasern sind oftmals vakuolisiert. (Abb. 26B). Die Demyelinisierung erscheint in den immunhistochemischen Färbungen für die Myelinproteine ungleichmäßig. Die Myelinproteine MBP und MAG sind im Gegensatz zu PLP und MOG stärker verlustig (Abb. 26G + H). Die Kim1P-Färbung zeigt eine diffuse Mikrogliaaktivierung (Abb. 26D). Der axonale Besatz erscheint reduziert (Abb. 26C). Eine signifikante akute axonale Schädigung kommt nicht zur Darstellung. Es zeigt sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion bestehend aus T-Lymphozyten und Plasmazellen, die insbesondere perivaskulär zu finden ist (Abb. 26A + I + J).

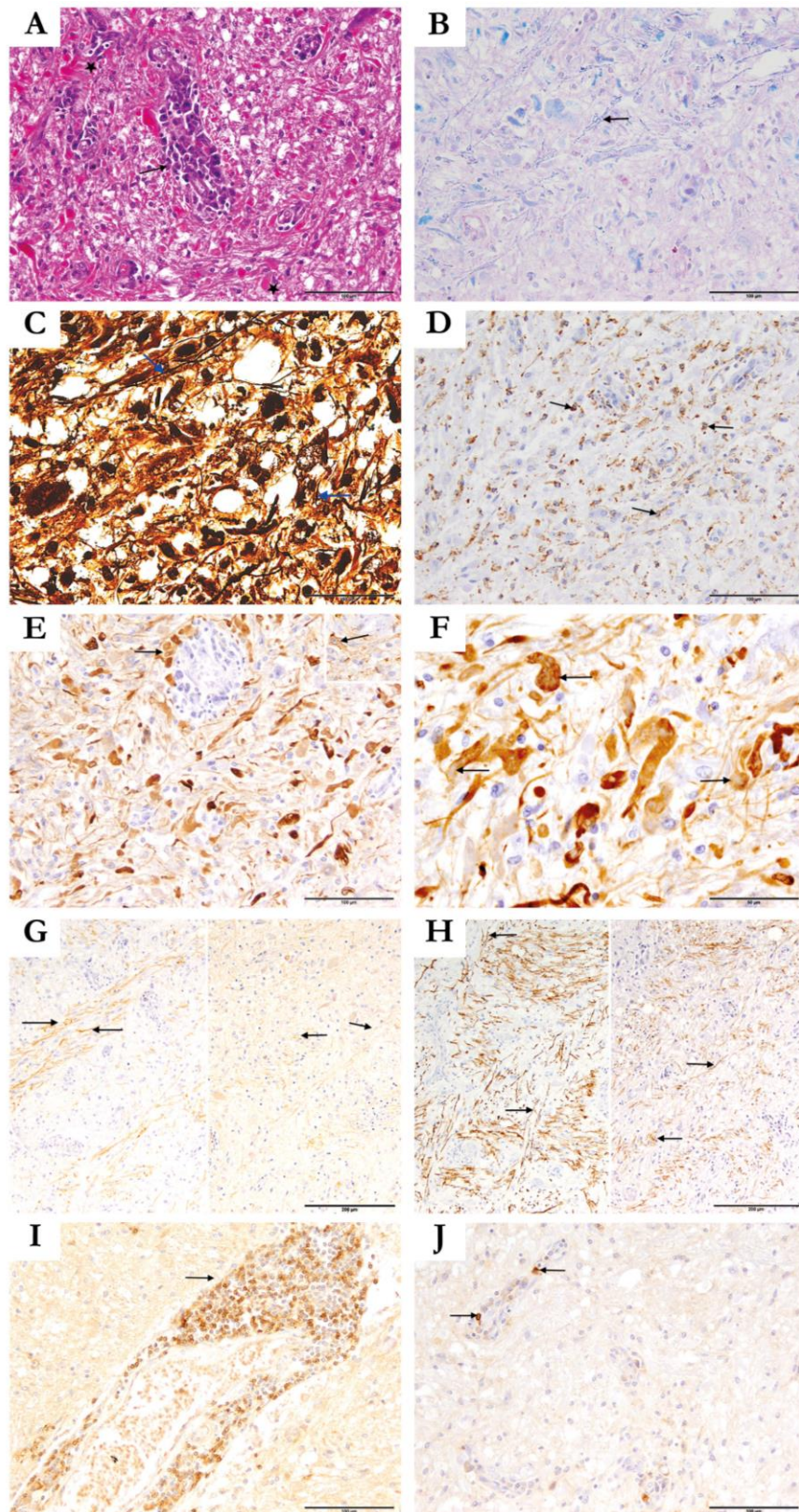


Abbildung 26: Histopathologie M. Alexander-Fall #1.

Zahlreiche Rosenthalfasern sind erkennbar, die sich in der HE-Färbung eosinophil darstellen (A ★ zeigt auf Rosenthalfasern, ➔ zeigt auf Plasmazellen). Die Entmarkung ist im Pons unvollständig und fleckig. Die Myelinfasern sind teils vakuolisiert (B ➔). Der axonale Besatz ist reduziert (C, blaue Pfeile zeigen auf Axone). Die Kim1P-Färbung (D ➔) zeigt eine diffuse Mikrogliaaktivierung. Die Rosenthalfasern akkumulieren perivaskulär (E ➔ zeigt auf Rosent-

halfasern) und zeigen oftmals zentral bläuliche Einschlüsse (F →). Aquaporin-4 wird von den Astrozyten regelrecht exprimiert (E Ausschnitt rechts oben). Die Myelinproteine sind ungleichmäßig betroffen. MBP (G links) und MAG (G rechts) sind stärker verlustig als PLP (H links) und MOG (H rechts). Es findet sich eine ausgeprägte perivaskuläre Entzündungsreaktion, bestehend aus vielen Plasmazellen (A →), T-Zellen (I →) und wenigen B-Zellen (J →). Histologische Färbungen: A: HE, B: LFB/PAS, C: Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistochemie für: Kim1P (D), GFAP (E + F), MBP (G rechts), MAG (G links), PLP (H rechts), MOG (H links), CD3 (I), CD20 (J). Messbalken: A + B + D + E + I + J: 100 µm; C + F: 50 µm; G + H: 200 µm.

M. Alexander-Fall #2: Auch hier ist vor allem der infratentorielle Bereich betroffen. Zahlreiche Rosenthalfasern (Abb. 27A), die perivaskulär, subependymal und subarachnoidal akkumulieren, kommen zur Darstellung (Abb. 27C + D). Das Parenchym wird dadurch deutlich verbreitert. Dazwischen finden sich immer wieder Neurone mit regelrechter Morphologie (Abb. 27I). Die weiße Substanz zeigt eine unvollständige Entmarkung. Die noch vorhandenen Myelinfasern wirken zum Teil ödematös (Abb. 27E links). Die Myelinproteine MAG und MBP (Abb. 27G) sind stärker verlustig als PLP und MOG (Abb. 27H). Zahlreiche aktivierte Mikrogliazellen kommen zur Darstellung (Abb. 27F). Der axonale Besatz ist relativ gut erhalten und ein nennswertiger akuter axonaler Schaden lässt sich nicht erkennen (Abb. 27E rechts). Perivaskulär finden sich zahlreiche Plasmazellen (Abb. 27B) und B-Lymphozyten (Abb. 27F links unten). T-Lymphozyten sind in deutlich geringerer Zahl nachweisbar (Abb. 27F rechts oben). Zudem kommt ein älterer Infarkt im Stadium II bis III zur Darstellung. Hier zeigt sich neben einer Infiltration durch zahlreiche schaumzellige Makrophagen ein kompletter Verlust der Axone und der hirneigenen Zellen; pathologische Veränderungen, die auch mit einem Biopsiedefekt vereinbar wären (Abb. 27J).

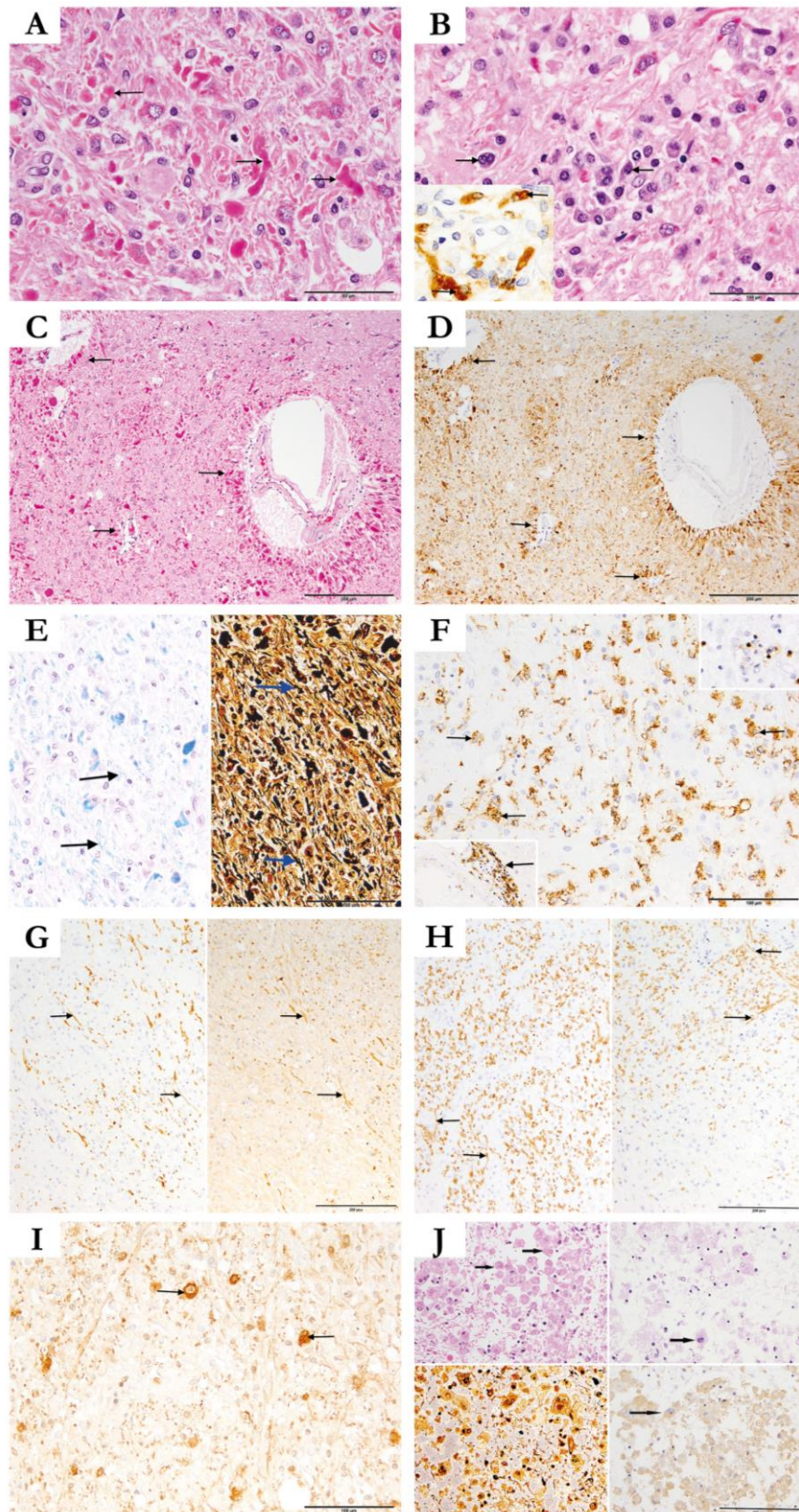


Abbildung 27: Histopathologie M. Alexander-Fall #2.

Zahlreiche Rosenthalfasern (A →), die vor allem perivaskulär (C +D →), subependymal und subarachnoidal akkumulieren. Perivaskulär lassen sich zahlreiche Plasmazellen (B und Ausschnitt links unten in B →) darstellen. Die weiße Substanz zeigt eine unvollständige Entmarkung mit teils ödematös wirkenden Myelinfasern (E links →). Der axonale Besatz ist relativ gut erhalten (E rechts blaue Pfeile zeigen auf Axone). In der Kim1P-Färbung

kommen aktivierte Mikrogliazellen zur Darstellung (F →). Perivaskulär finden sich zudem B-Zellen (F Ausschnitt links unten →) und T-Zellen (F Ausschnitt rechts oben →). Die Myelinproteine MAG (G rechts →) und MBP (G links →) sind stärker vom Abbau betroffen als die Myelinproteine MOG (H rechts →) und PLP (H links →). Einige Neurone mit regelrechter Morphologie sind im Parenchym ersichtlich (I →). Nebenbefundlich zeigt sich ein älterer Infarkt mit zahlreichen schaumzelligen Makrophagen (J links und rechts oben und J rechts unten, → zeigen auf Makrophagen), komplettem Verlust von Axonen (J links unten) und hirneigenen Zellen sowie teils zystischen Gewebegrund, auch vereinbar mit einem Biopsiedefekt. Histologische Färbungen: A-C + J (links oben): HE, E (links) + J (rechts oben): LFB/PAS, E (rechts) + J (links unten): Versilberung nach Bielschowsky. Immunhistochemie für: IgG (B Bildausschnitt rechts unten), GFAP (D), Kim1P (F + J rechts unten), CD 3 (F Bildausschnitt links unten), CD 20 (F Bildausschnitt rechts oben), MBP (G links), MAG (G rechts), PLP (H links), MOG (H rechts), NOGO-A (I). Messbalken: A + B: 50 µm; C + D + G + H + J: 200 µm; F + J: 100 µm.

3.4.2.2 Ergebnisse der untersuchten Morbus Alexander-Fälle

Eine detaillierte quantitative und semiquantitative Auswertung der beiden M. Alexander-Fälle zeigt Tabelle 16. Aufgrund der Art und Lokalisation der pathologischen Veränderungen wurde ein Vergleich mit Kontrollen als nicht sinnvoll erachtet.

Tabelle 16: Ergebnisse der untersuchten M. Alexander-Fälle

M. Alexander-Fall	Untersuchtes Areal	Entmarkungsgrad						Axonaler Schaden			P25-positive Oligodendrozyten/mm ²	NOGO-A-positive Oligodendrozyten/mm ²	KiM1P-positive Mikroglia /mm ²	GFAP-positive Astrozyten /mm ²	IgG-positive Zellen /mm ²	CD138-positive Plasmazellen /mm ²
		LFB	MBP	PLP	CNP	MAG	MOG	Reduktionsgrad	Relative axonale Dichte (%)	APP+ Sphäroide /mm ²						
M. Alexander #1	Pons	2	2	1	n.a.	3	2	1	20,8%	0	58,1 ± 11,3	80,2 ± 12	1106,5 ± 74,3	n.a.	105,1 ± 23,6	276,6 ± 96
M. Alexander #2	Pons	3	3	1	4	3	2	1	20,8%	n.a.	n.a.	229,6 ± 25,8	1087,2 ± 94,7	249,1 ± 37,3	146,6 ± 35,2	n.a.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der ausgewerteten Areale der beiden Morbus Alexander-Fälle dargestellt. **Score Entmarkung: 0:** keine Entmarkung, **1:** milde Entmarkung, **2:** moderate Entmarkung, **3:** schwere Entmarkung, **4:** vollständige Entmarkung, **Score axonaler Reduktionsgrad: 0:** keine axonale Reduktion, **1:** milde axonale Reduktion, **3:** moderate axonale Reduktion, **4:** vollständiger Axonverlust

3.4.2.3 Histopathologische Charakteristika des M. Alexander

Zusammenfassend finden sich folgende histologische Merkmale beim M. Alexander:

- 1) massenhaft Nachweis von Rosenthalfasern, Ansammlung vor allem subependymal, subarachnoidal und perivaskulär, dadurch Verbreitung der Hirnstruktur,
- 2) entzündliche Infiltrate, perivaskulär betont, zahlreiche Plasmazellen und in variablem Ausmaß T-Lymphozyten,
- 3) fleckige und gering bis mäßig ausgeprägte Entmarkung, Myelinproteine ungleichmäßig betroffen, MBP und MAG stärker verlustig als PLP und MOG,
- 4) Mikrogliaaktivierung nachweisbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurden für die MLD, X-ALD, VWMD und den M. Alexander anhand der aktuellen Möglichkeiten der neuropathologischen Diagnostik eine Reihe histopathologischer Charakteristika herausgearbeitet. Im ersten Abschnitt sollen zunächst die Ergebnisse der Dissertation mit dem Forschungsstand in der wissenschaftlichen Fachliteratur abgeglichen werden. Anschließend soll im zweiten Abschnitt geprüft werden, inwieweit die in dieser Studie herausgearbeiteten histopathologischen Charakteristika helfen können, die MLD, X-ALD, VWMD und den M. Alexander von anderen entmarkenden ZNS-Erkrankungen im Rahmen der neuropathologischen Routinediagnostik abgrenzen zu können. Zu den relevanten Differentialdiagnosen gehören mitochondriale Erkrankungen, wie der Morbus Leigh, autoimmune Entmarkungskrankheiten, wie die Multiple Sklerose (MS), die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) und die Neuromyelitis optica (NMO) sowie infektiöse Erkrankungen, wie die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML).

4.1 Vergleich mit wissenschaftlichen Publikationen zur Histologie von Leukodystrophien

4.1.1 Metachromatische Leukodystrophie

In der vorliegenden Dissertation wurden drei MLD-Fälle histologisch untersucht. Acht histologische Merkmale konnten beschrieben werden (Seite 38). In der medizinischen Fachliteratur finden sich größtenteils Einzelfallberichte, die die histologischen Veränderungen im ZNS und PNS beschreiben. Wichtigstes Merkmal ist der Nachweis von metachromatischen Einschlüssen im Zytoplasma von Makrophagen oder Schwannzellen (Alves et al. 1986). Als Metachromasie wird ein brauner Farbumschlag von lysosomalen Ablagerungen nach der Färbung mit basischen und blauen Anilinfarbstoffen bezeichnet. Die Darstellung der metachromatischen Ablagerung gelingt jedoch nur im Kryogewebe (Ulrich 1971). In der vorliegenden Dissertation ist die Metachromasie in dem untersuchten formalinfixierten Material nicht mehr darstellbar.

Fenzi et al. (1983) untersuchten Biopsiegewebe vom *Nervus peroneus superficialis* und Autopsiegewebe vom Gehirn eines an MLD erkrankten sechs Jahre alten Jungen und Alves et al. (1986) untersuchten Biopsiegewebe vom *Nervus suralis* und Autopsiegewebe vom Gehirn von vier an MLD-erkrankten Familienmitgliedern. Im untersuchten ZNS-Gewebe

beschreiben sowohl Fenzi et al. (1983) als auch Alves et al. (1986) eine flächige und deutliche Demyelinisierung in der weißen Substanz, eine Ansammlung von pathologisch-granulärem Material und reichlich Makrophagen. Des Weiteren konnten Fenzi et al. (1983) eine reaktive Astrozytengliose in den betroffenen Bereichen darstellen. Auch Alves et al. (1986) beschreiben eine reaktive Astrozytengliose, die vor allem in den kortikalen Bereichen zur Darstellung kommt. In der Forschungsarbeit von Hageman et al. (1995) wurden mehrere Fälle von an MLD erkrankten Patienten beschrieben. Bei sieben dieser Patienten unterschiedlichen Alters wurde das Biopsiegewebe des *Nervus suralis* histopathologisch untersucht und die Patienten der jeweiligen Form der MLD (spät-infantile, früh-juvenile, spät-juvenile und adulte Form) zugeordnet. Hageman et al. (1995) konnten eine deutliche Demyelinisierung in allen untersuchten Fällen feststellen, wobei sie herausfanden, dass die Entmarkung bei der adulten Form der MLD nicht so ausgeprägt ist wie bei der spät-infantilen oder juvenilen Form der MLD. Zudem waren ähnlich zur Publikation von Alves et al. überwiegend die dick bemarkten Axone im peripheren Nerv von der Entmarkung betroffen. Entzündliche Infiltrate in Form von perivaskulär vorkommenden lymphozytären Cuffs in der weißen Substanz des ZNS wurden lediglich in der Arbeit von Alves et al. (1986) beschrieben (Fenzi et al. 1983; Alves et al. 1986; Hagemann et al. 1995).

Das Vorhandensein von Makrophagenapoptosen und das Fehlen einer kortikalen Entmarkung sind weitere histologische Kennzeichen der MLD, die nach dem aktuellen Kenntnisstand bisher noch nicht publiziert wurden.

4.1.2 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Die histologischen Charakteristika der X-ALD, die aus insgesamt sieben Fällen zusammengestellt werden konnten, sind zusammenfassend im Abschnitt 3.2.2.3. dargestellt (Seite 63).

Die umfangreichste Arbeit, die in der medizinischen Fachliteratur zu finden ist, stammt von Schaumburg und Kollegen. Schaumburg et al. veröffentlichten 1975 die histologischen Befunde von 17 an X-ALD erkrankten Patienten. In ihrer Arbeit beschreiben sie insbesondere die histologischen Veränderungen in der Großhirnhemisphäre. Sie teilten die betroffenen Areale in drei Zonen ein. In der ersten Zone fand sich eine Entmarkung mit gutem axonalen Besatz, und Makrophagen mit PAS- und sudanophilen Einschlüssen im Zytoplasma. An die erste Zone schließt sich eine zweite Zone an mit Entmarkung und mit deutlicher Reduktion des axonalen Besatzes sowie massiven perivaskulären mononuklearen Zellinfiltraten. Die beiden Zonen sind vor allem am Rand der betroffenen Areale zu finden. Die dritte Zone beschreiben

Schaumburg et al. (1975) als größte Zone, wobei hier eine vollständige Demyelinisierung, ein kompletter axonaler und oligodendroglialer Verlust und eine deutliche Fasergliose zur Darstellung kommen. Perivaskulär konnten PAS-positive und Oil Red O-positive Makrophagen gefunden werden. Die Oil red O (ORO)-Färbung dient der Darstellung von Triglyceriden in Zellen. Die verschiedenen von Schaumburg et al. (1975) beschriebenen Zonen sind auch im Autopsiegewebe der hier untersuchten X-ALD-Fälle darstellbar. In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Areale von jedem X-ALD-Fall ausgewertet. Die Auswahl des auszuwertenden Bereichs erfolgte anhand des Entmarkungsgrades, ähnlich zu den Zonen von Schaumburg et al. (1975). In den von Schaumburg et al. untersuchten Fällen konnten perivaskuläre Entzündungsinfiltrate nachgewiesen werden. Schaumburg et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die perivaskulären Entzündungsinfiltrate häufig in den Bereichen mit vollständiger Entmarkung und in geringerem Ausmaß in den weniger stark betroffenen Bereichen zu finden sind. Die in unserer Arbeit untersuchten X-ALD-Fälle wiesen sowohl in den stark entmarkten als auch in den weniger von der Entmarkung betroffenen Bereichen eine ausgeprägte entzündliche Infiltration mit perivaskulären Cuffs auf. Zwei der untersuchten Fälle von Schaumburg et al. (1975) wiesen Verkalkungen auf (Schaumburg et al. 1975). In der hier vorliegenden Dissertation zeigten sich bei einem der X-ALD-Autopsiefälle ebenfalls Verkalkungen.

Griffin et al. (1985) beschreiben in ihrer Publikation die zelluläre Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate im Großhirn anhand immunhistochemischer Färbungen. Die Gruppe von Griffin untersuchte Autopsiegewebe von 17 Patienten mit der Diagnose X-ALD. Nur vier der 17 Patienten wiesen deutliche mononukleare Entzündungsinfiltrate auf. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Mehrheit der Entzündungsinfiltrate im Großhirngewebe der an X-ALD erkrankten Patienten aus T-Zellen (93%) bestehen und die Mehrheit hiervon sich als T-Helferzellen identifizieren lassen. Zudem konnten sie nachweisen, dass die perivaskulären Entzündungsinfiltrate zu 16 bis 34% aus B-Zellen und im variablen Ausmaß aus Makrophagen (0-25%) bestanden (Griffin et al. 1985). In allen von uns untersuchten X-ALD-Fällen konnte anhand von immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass die entzündlichen Infiltrate hauptsächlich aus T-Lymphozyten und Makrophagen bestehen. In variablem Ausmaß finden sich B-Zellen und Plasmazellen.

Einige der hier untersuchten X-ALD Fälle wurden bereits von Kuhlmann et al. (2008) und Pfeifenbring et al. (2014) publiziert. Die Publikation von Kuhlmann und Kollegen ist ein Übersichtsartikel, der die histologischen Kennzeichen verschiedener Erkrankungen, die mit einer ZNS-Entmarkung einhergehen, aufzeigt. Pfeifenbring et al. (2014) beschreiben mithilfe

von histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen die charakteristischen Merkmale der X-ALD anhand von zwei Biopsiefällen, die bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung von X-ALD und Multiple Sklerose (MS) dienen können. Die von Kuhlmann et al. (2008) und Pfeifenbring et al. (2014) beschriebenen farblosen, nadelförmigen Hohlräume in den Makrophagen, die vor allem in der LFB-PAS Färbung zum Vorschein kamen (Kuhlmann et al. 2008; Pfeifenbring et al. 2014), konnten in allen hier untersuchten X-ALD-Fällen dargestellt werden. Pfeifenbring et al. (2014) konnten die farblosen und spindelförmigen Spalten auch in den Astrozyten nachweisen (Pfeifenbring et al. 2014), passend zu den Ergebnissen in der hier vorliegenden Dissertation.

4.1.3 Vanishing White Matter Disease

Drei VWMD-Fälle wurden histologisch aufgearbeitet. Neun histologische Charakteristika konnten beschrieben werden (Seite 77).

Besonders auffällig bei den untersuchten VWMD-Fällen sind dystrophe Astrozyten, an deren Fortsätzen sich IgG und Fibrinogen ablagert, was meinem Kenntnisstand nach bislang in der medizinischen Fachliteratur noch nicht beschrieben wurde. Das Austreten von IgG und Fibrinogen aus dem Blut in das Hirnparenchym weist daraufhin, dass die Bluthirnschranke zusammengebrochen ist, was sich am ehesten durch die Schädigung der Astrozyten erklären lässt, da Astrozyten Teil der Bluthirnschranke sind (Lüllmann-Rauch 2009). Ein Verlust der Aquaporin-4 Expression ist in keinem der VWMD-Fälle nachweisbar.

Dass eine Dysfunktion der Astrozyten eine zentrale Rolle in der Pathologie der VWMD spielt, wurde 2016 von Dooves et al. experimentell im Mausmodell gezeigt. Die Gruppe um Dooves beschrieb die Astrozyten in der VWMD als unreif mit abnormer Morphologie und abnormer Zusammensetzung der Intermediärfilamente. Mittels Zellkultur-Experimenten konnten sie zeigen, dass die VWMD-Astrozyten die Reifung der oligodendrogialen Vorläuferzellen stören durch die Sekretion von Stoffen, wie zum Beispiel Hyaluron (Dooves et al. 2016).

Ein weiteres interessantes histologisches Charakteristikum ist die kortikale Entmarkung, die in allen drei Fällen feststellbar ist und die vor allem die intrakortikalen Bereiche und teils die subpialen Areale betrifft. Dass eine kortikale Entmarkung bei der VWMD auftreten kann, wurde bereits von van der Knaap et al. (2006) beschrieben.

Ein VWMD-Fall (#2) wurde bereits von Brück et al. (2001) publiziert. In diesem Fallbericht von Brück et al. (2001) wurde gezeigt, dass Oligodendrozytenapoptosen ein wichtiges Charakteristikum der VWMD darstellen (Brück et al. 2001). Auch in den zwei weiteren hier unter-

suchten VWMD-Fällen konnten zahlreiche Oligodendrozytenapoptosen nachgewiesen werden.

Es ist zu erwähnen, dass der VWMD-Fall #1 bereits in der wissenschaftlichen Arbeit von van Knaap et al. (2003) publiziert wurde. In dieser Arbeit untersuchten van Knaap et al. (2003) neun Patienten genetisch auf eine EIF2B1- und EIF2B5- Mutation und stellten den klinischen und bildgebenden Phänotyp ausführlich dar (van Knaap et al. 2003).

4.1.4 Morbus Alexander

In der medizinischen Fachliteratur gibt es nur wenige Publikationen, die detailliert auf die Histopathologie der Alexander'schen Krankheit eingehen.

Mignot et al. (2004) führten neuropathologische Untersuchungen an Mausmodellen und an Autopsiegewebe von zwei an Morbus Alexander erkrankten Patienten durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl in den Mausmodellen, als auch im menschlichen Gehirn eine deutliche Mikrogliaaktivierung und massive Entzündungsinfiltrate in den betroffenen Arealen nachweisbar sind. Schaumzellige Makrophagen konnten nicht festgestellt werden. Mignot et al. (2004) konnten viele T-Lymphozyten perivaskulär und im Parenchym nachweisen. B-Zellen konnten nicht dargestellt werden. Diese Beobachtung machten sie sowohl in den betroffenen Arealen des menschlichen Gehirns als auch in den Gehirnen der Mäuse, wobei hier insbesondere der Hirnstamm untersucht wurde (Mignot et al. 2004). Auch in den betroffenen Bereichen der in der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten Morbus Alexander-Fälle sind neben einer Mikrogliaaktivierung deutliche entzündliche Infiltrate darstellbar, allerdings mit dem Ergebnis, dass ein Großteil der Zellen sich als Plasmazellen und B-Zellen identifizieren lassen mit nur wenigen T-Lymphozyten.

Kuhlmann et al. (2008) beschreiben in ihrem Übersichtsartikel das massenhafte Vorkommen von vor allem perivaskulär akkumulierenden Rosenthalfasern (Kuhlmann et al. 2008). Bei den in der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten Fälle kommen ebenfalls zahlreiche Rosenthalfasern zur Darstellung, perivaskulär, subependymal und subarachnoidal, was zu einer Verbreiterung der Hirnstruktur führt.

Olabarria et al. (2015) führten immunhistochemische Untersuchungen zur weiteren Beschreibung der Rosenthalfasern durch. Die Rosenthalfasern markierten sich positiv in der GFAP-, Ubiquitin-, alphaB-Kristallin- und dem Hitzeschockprotein 27-Färbung, zeigten jedoch keine Vimetin-Expression. In den hier untersuchten Fällen zeigten die Astrozyten eine regelrechte Aquaporin-4-Expression und markierten sich mit GFAP positiv.

Die histologischen Veränderungen wurden von Olabarria et al. (2015) vor allem im Hirnstamm und dem Telenzephalon beobachtet (Olabarria et al. 2015). In den beiden hier untersuchten Morbus Alexander-Fällen sind ebenfalls vor allem die infratentoriellen Bereiche, insbesondere der Hirnstamm, betroffen.

4.2 Differentialdiagnosen der Leukodystrophien

Differentialdiagnostisch müssen LD von einer Reihe von anderen entmarkenden ZNS-Erkrankungen abgegrenzt werden. Hierzu gehören entzündliche Entmarkungskrankheiten, wie die MS, NMO, ADEM, infektiöse Erkrankungen, wie die PML, mitochondriale Erkrankungen, wie der Morbus Leigh und Erkrankungen des ZNS durch Elektrolytschwankungen, wie die zentrale pontine Myelinolyse. In den folgenden Abschnitten werden die histopathologischen Merkmale der in Frage kommenden Differentialdiagnosen aufgeführt und mit der Histopathologie der Leukodystrophien verglichen.

4.2.1 Histopathologie der entzündlichen Entmarkungskrankheiten

4.2.1.1 Multiple Sklerose

Die MS ist die häufigste entzündliche Entmarkungskrankheit und betrifft sowohl die weiße als auch die graue Substanz (Weber und Köhler 2010). Histopathologische Merkmale sind Entzündungsinfiltrate von wechselnder Ausprägung, eine flächige Entmarkung, eine variable Reduktion des axonalen Besatzes und eine reaktive Astrozytengliose (Brück et al. 2003). In den frischen Läsionen können insbesondere perivaskulär Infiltrate von Entzündungszellen und schaumzellige Makrophagen mit Myelinabbauprodukten im Zytoplasma beobachtet werden. Die Entzündungsinfiltrate bestehen aus zahlreichen T-Zellen, in variablem Ausmaß B-Zellen und Plasmazellen. Die überwiegende Anzahl der T-Zellen lässt sich als CD8-positive zytotoxische T-Zellen identifizieren. In den späten, chronischen Läsionsarealen zeigt sich eine flächige Demyelinisierung mit einer variablen Reduktion der Axone. Eine fibrilläre Gliose, gebildet durch zahlreiche dicht stehende Astrozytenfortsätze, lässt sich nachweisen. Die Entzündungsinfiltrate sind in chronisch entmarkten Läsionen deutlich geringer ausgeprägt als in den frühen Stadien (Bitsch et al. 2000; Kuhlmann et al. 2008). Eine Remyelinisierung kann sowohl in den frischen als auch in den älteren MS-Läsionen nachgewiesen werden (Goldschmidt et al. 2009). Anhand der demyelinisierenden Aktivität erfolgt die Einteilung der Läsionen in frühaktive, spätaktive und inaktive Läsionen, die sich anhand des Fortschritts des Myelinproteinabbaus in den Makrophagen voneinander abgrenzen lassen. In der frühaktiven Läsion ist in den Makro-

phagen der Abbau der großen und kleinen Myelinproteine feststellbar, in der spätaktiven Läsion nur noch der großen Myelinproteine und in der inaktiven Läsion lassen sich weder kleine noch große Myelinproteinefragmente darstellen. Mithilfe der Beobachtungen von Luccinetti, Brück und Lassmann kann eine Einteilung in vier Muster, sog. Pattern, erfolgen. Für das Muster I und II ist vor allem der Nachweis von Makrophagen und T-Lymphozyten charakteristisch, wobei im Pattern II zusätzlich Ablagerungen von aktivierten Komplementkomponenten darstellbar sind. Kennzeichen von Muster III sind eine streifige Entmarkung, Oligodendrozytenapoptosen und ein bevorzugter Verlust der Myelinproteine CNP und MAG. Muster IV ist sehr selten. Hier lassen sich ein fast kompletter Oligodendrozytenverlust und eine verminderte bis fehlende Remyelinisierung darstellen. Ig und Komplementfaktoren sind im Muster IV nicht nachweisbar (Lucchinetti et al. 2000; Lassmann et al. 2001).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der MS mit denen der LD

Vergleicht man die histopathologischen Charakteristika der MS mit denen der LD findet man, sowohl bei der MS als auch bei den Leukodystrophien, eine flächige Entmarkung, eine variable Reduktion des axonalen Besatzes und eine reaktive Astrozytengliose. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der MS ist der Nachweis von Entzündungsinfiltraten (Kuhlmann et al. 2008), die insbesondere bei der X-ALD, aber auch zum Teil beim M. Alexander nachgewiesen werden können, wobei beim M. Alexander das Vorhandensein von reichlich Rosenthalfasern die Diagnosestellung vereinfacht. Aufgrund der teils sehr ausgeprägten Entzündungsreaktion und der ähnlichen histopathologischen Charakteristika ist es in der neuropathologischen Routinediagnostik nicht immer einfach, die beiden Erkrankungen X-ALD und MS voneinander zu unterscheiden, insbesondere bei spärlichen klinischen Angaben und kleiner Biopsiegröße. Beim Pattern II der MS findet man eine deutliche Ablagerung von IgG und aktivierten Komplementkomponenten (Lucchinetti et al. 2000). Das Fehlen von diesen Komplementablagerungen bei den X-ALDs und der Nachweis von zentral gelegenen schlanken, farblosen und spindelförmigen Spalten im Zytoplasma der Makrophagen und Astrozyten sind sehr wichtige histopathologische Merkmale zur histopathologischen Differenzierung der X-ALD von der MS. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist die Remyelinisierung. Dünn myelinisierte Nervenfasern und irregulär geformtes Myelin sind typische Kennzeichen einer Remyelinisierung, die insbesondere in frühen Stadien der MS-Erkrankung beobachtet werden kann (Goldschmidt et al. 2009). Hingegen zeigen die hier untersuchten LDs keine Remyelinisierung.

4.2.1.2 Akute disseminierte Enzephalomyelitis

Die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) ist eine Antikörper-mediierte, monophasisch verlaufende, demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die in der Regel Kinder betrifft. Auslöser der Erkrankung sind häufig Virusinfektionen, die zu einer Autoimmunreaktion führen (Pohl et al. 2016). Typisches histopathologisches Kennzeichen der ADEM ist eine perivaskuläre Entmarkung. Auch die Entzündungszellen, die aus Makrophagen sowie T- und B-Zellen bestehen, akkumulieren perivaskulär. Ebenso finden sich Ablagerungen von IgG und aktivierten Komplementkomponenten perivaskulär. Ungeachtet der Unterschiede in Klinik und Bildgebung zwischen Leukodystrophien und ADEM erleichtern die histologischen Kennzeichen der ADEM die differentialdiagnostische Abgrenzung (Kuhlmann et al. 2008).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der ADEM mit denen der Leukodystrophien

Die für die ADEM sehr charakteristische perivaskuläre Entmarkung (Kuhlmann et al. 2008) lässt sich bei den LDs nicht nachweisen. Hier ist zum Teil die gesamte weiße Substanz von einer fleckigen bis flächigen Entmarkung betroffen. Eine perivaskuläre Entmarkung zeigt sich in den hier vorliegenden Autopsie- und Biopsiegewebe von LDs nicht. Eine ausgeprägte perivaskuläre Entzündungsreaktion lässt sich insbesondere bei der X-ALD nachweisen. Auch hier sind der Nachweis von Spalten im Zytoplasma der Makophagen und der Astrozyten sowie das Fehlen von aktivierten Komplementfaktoren sehr hilfreich bei der Differenzierung der X-ALD von der ADEM.

4.2.1.3 Neuromyelitis Optica

Die *Neuromyelitis Optica* (NMO) ist eine chronisch entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Klinisch zeigen NMO-Patienten eine *longitudinal extensive transverse Myelitis* (LETM), eine Myelitis, deren Läsionen sich über mehr als 3 Segmente ausdehnen, und eine uni- oder bilaterale *Neuritis nervi optici*. Bei der Mehrzahl der Fälle liegen Antikörper gegen Aquaporin-4 im Serum vor. Das Antigen Aquaporin-4 ist ein Wasserkanalprotein und Bestandteil des Dystroglykankomplexes in den astrozytären Fußfortsätzen (Lee et al. 2010; Weber und Köhler 2010; Wrzos et al. 2014). Histologisch zeigt sich eine konfluierende scharf begrenzte Entmarkung der weißen Substanz. Im Randbereich der Läsionen wirkt das Myelin vakuolisiert. Die Läsion ist sehr destruktiv und die Axone sind stark reduziert. In den frühaktiv entmarkenden Läsionen sind dystrophe Astrozyten und ein deutlicher Astrozytenverlust samt Verlust der Aquaporin 4-Expression auf den noch vorhandenen Astrozyten nachweisbar. Des Weiteren kann ein deutlicher Oligodendrozytenverlust mit vielen Oligodendrozytenapoptosen beobach-

tet werden. Die kleinen Myelinproteine MAG und CNP sind bevorzugt verlustig, wobei die großen Myelinproteine MBP und PLP noch gut erhalten sind. Vor allem in den frühaktiv entmarkenden Läsionen kommen eosinophile und neutrophile Granulozyten zur Darstellung. Die Gefäße weisen pathologische Veränderungen auf wie Verdickungen und Hyalinisierungen. Perivaskulär können Immunglobuline sowie Ablagerungen von aktivierten Komplementkomponenten nachgewiesen werden (Lee et al. 2010; Weber und Köhler 2010; Brück et al. 2012).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der NMO mit denen der Leukodystrophien

Betrachtet man den deutlichen Astrozytenverlust und die dystrophen Astrozyten bei der NMO (Brück et al. 2012), kommt differentialdiagnostisch vor allem die VWMD in Betracht. Auch bei der VWMD lassen sich zahlreiche dystrophe Astrozyten nachweisen. Im Gegensatz zur NMO ist bei der VWMD die Aquaporin-4-Expression auf den Astrozyten erhalten. Eine deutliche Reduktion der Oligodendrozyten mit Nachweis von Oligodendrozytenapoptosen lassen sich bei der VWMD und der NMO nachweisen, wobei bei der VWMD zum Teil noch erhaltene Oligodendrozyten mit oftmals vergrößertem, gebläht wirkendem und eosinophilem Zelleib dargestellt werden können. Zudem sind bei der VWMD im Vergleich zur NMO keine lymphozytären Infiltrate feststellbar. Nur wenige und überwiegend kleine Makrophagen finden sich bei der VWMD, wohingegen eine frische NMO-Läsion in der Regel eine deutliche Infiltration durch schaumzellige Makrophagen aufweist in denen auch der Myelinabbau ersichtlich ist (Brück et al. 2012). Alle drei VWMD-Fälle zeigen eine kortikale Entmarkung, wobei subpiale und intrakortikale Areale betroffen sind. Eine kortikale Entmarkung ist bei der NMO bislang nicht beschrieben. Der Kortex kann bei der NMO betroffen sein, jedoch zeigen sich in diesen Bereichen neben einem fokalen Verlust von kortikalen Neuronen in den Kortextschichten II-IV, ein Verlust der Aquaporin 4- Expression auf den Astrozyten in der Kortextschicht I, eine Mikrogliaaktivierung in der Kortextschicht II und lymphozytäre Infiltrate in den Meningen. Entmarkt sind die betroffenen Kortextabschnitte nicht (Kawachi und Lassmann 2017).

4.2.2 Histopathologie der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie

Die PML ist eine opportunistische Infektion des ZNS (Aguzzi et al. 2008). Die Infektion wird durch eine Reaktivierung des JC-Virus verursacht. Das JC-Virus gehört zur Familie der humanen Polyomaviren und ist in der Bevölkerung stark verbreitet. Ein Erstkontakt mit dem JC-Virus verläuft in der Regel asymptomatisch. Eine Reaktivierung des JC-Virus führt vor allem bei immungeschwächten Patienten, zum Beispiel im Rahmen einer AIDS- oder Tuberkulose-Erkrankung oder bei Patienten mit therapiebedingter Immunsuppression, zum Ausbruch der

PML (Aksamit 1995; Berger und Major 1999). Das JC-Virus befällt bevorzugt die Oligodendrozyten, was zu einer Zerstörung der myelinbildenden Oligodendrozyten und somit zu einer Degeneration der Myelinfasern in der weißen Substanz führt (Radhakrishnan et al. 2003). Typisch ist eine multifokale, teilweise konfluierende Entmarkung im Marklager der weißen Substanz. Charakteristisch sind große bizarr und grotesk erscheinende astrozytäre Zellelemente und geschwollene Oligodendrozyten mit einem großen hyperchromatischen Zellkern und intranukleären JC-Virus-Einschlüssen (Kuhlmann et al. 2008; Weber und Köhler 2010). Zudem kann in den JC-Virus-infizierten Zellen eine hohe p53-Expression und Ki67-Proliferation nachgewiesen werden (Radhakrishnan et al. 2003). Einige schaumzellige Makrophagen können in den entmarkten Bereichen identifiziert werden. Das Ausmaß der lymphozytären Entzündung ist je nach Grunderkrankung variabel. Der Virusnachweis kann am Biopsie- oder Autopsiegewebe immunhistochemisch erfolgen (Kuhlmann et al. 2008; Weber und Köhler 2010).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der PML mit denen der Leukodystrophien

Charakteristisch für die PML sind unter anderen ein variabler Verlust von Oligodendrozyten und das Vorhandensein von bizarren Astrozyten (Kuhlmann et al. 2008). Diese Veränderungen findet man auch bei der VWMD, die somit differentialdiagnostisch am ehesten von den LDs in Frage kommt. Zur Differenzierung der VWMD von der PML ist vor allem die Betrachtung des Oligodendrozytenschädigungsmusters und der Astrozytenveränderungen von Bedeutung. Im Rahmen der PML zeigen die Oligodendrozyten oft einen großen Zellkern mit zentraler Aufhellung, sog. Milchglas-Oligodendrozyten, und intranukleäre JC-Virus-Einschlüsse, die immunhistochemisch nachgewiesen werden können (Kuhlmann et al. 2008). Die Oligodendrozyten bei der VWMD hingegen weisen einen geschwollenen, blass eosinophilen Zelleib auf, ohne Nachweis intranukleärer Einschlüsse. Im Gegensatz zu den bizarren Astrozyten bei der PML (Kuhlmann et al. 2008) erscheinen die Astrozyten bei der VWMD dystroph mit IgG und Fibrinogen-Ablagerungen an ihren Fortsätzen.

4.2.3 Histopathologie des Morbus Leigh

Morbus Leigh ist eine der häufigsten mitochondrialen Erkrankungen, die vor allem Kinder betrifft. Benannt wurde die Erkrankung nach ihrem Erstbeschreiber Denis Leigh. Die Erkrankung bricht in der Regel nach dem zweiten Lebensjahr aus, bei bislang vollkommen gesunden und sich regelrecht entwickelnden Kindern. Die Betroffenen entwickeln schnell progrediente Symptome, wie psychomotorische Entwicklungsstörungen, muskuläre Hypotonie, Ataxie, Hirnstammsymptomatik und respiratorische Insuffizienz, und sterben meistens im dritten Le-

bensjahr. Zudem wurden auch adulte Formen des Morbus Leigh beobachtet und beschrieben. Charakteristisch ist eine fokale bilaterale symmetrische Entmarkung, die vor allem den Hirnstamm und die Basalganglien betrifft. Mikroskopisch kann ein reduziertes und vakuolisiertes Neuropil mit einer deutlichen Entmarkung, Gliose, Kapillarproliferation und Gefäßwandverdickung beobachtet werden. Der Kortex kann auch von der Entmarkung betroffen sein. Eine Mikrogliaaktivierung kann nachgewiesen werden. Die Neurone sind relativ gut erhalten, jedoch können Areale mit neuronaler Degeneration beobachtet werden. Zudem kann ein Verlust an Oligodendrozyten in den betroffenen Bereichen dargestellt werden (Lake et al. 2015).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der Morbus Leigh mit denen der Leukodystrophien

Aufgrund der Lokalisation kommt differentialdiagnostisch die Morbus Alexander-Erkrankung in Frage. Die anderen LDs können durch den Nachweis von zahlreichen Makrophagen mit inkorporiertem Material differentialdiagnostisch abgegrenzt werden, da beim Morbus Leigh die Makrophagen in dieser Form nicht beschrieben werden. Eine Differenzierung zwischen Morbus Leigh und Morbus Alexander wird durch den Nachweis der massenhaften Rosenthalfasern, deren Vorhandensein sehr charakteristisch für den Morbus Alexander ist (Kuhlmann et al. 2008) ermöglicht. Des Weiteren können im Gegensatz zum Morbus Leigh beim Morbus Alexander entzündliche Infiltrate dargestellt werden.

4.2.4 Histopathologie der zentralen pontinen Myelinolyse

Die zentrale pontine Myelinolyse ist eine bilaterale symmetrisch entmarkende Erkrankung, die bevorzugt den Pons betrifft. Ursache sind Elektrolytschwankungen. Häufig tritt sie bei einem zu schnellen Ausgleich der Natriumkonzentration nach vorangegangener Hyponatriämie auf. Die betroffenen Bereiche weisen eine umfangreiche, scharf begrenzte Demyelinisierung mit einem kompletten Verlust der Oligodendrozyten auf. Der axonale Besatz ist von Patient zu Patient unterschiedlich stark reduziert. In älteren Läsionen können zentrale Zysten beobachtet werden. Auffallend ist eine astrogliale Dystrophie mit gut erhaltenen Neuronen. In den betroffenen Bereichen kommen einige schaumzellige Makrophagen zur Darstellung. Charakteristisch sind insbesondere große, dicht beladene Makrophagen. Die Makrophagendichte und das Vorhandensein von LFB-positivem Myelinabbauprodukten im Zytoplasma der Makrophagen sind vom Läsionsalter abhängig. Lymphozytäre Infiltrate sind selten (Kuhlmann et al. 2008; Fersini et al. 2015).

Vergleich der histopathologischen Charakteristika der zentrale pontine Myelinolyse mit denen der Leukodystrophien

Im Gegensatz zu den Leukodystrophien ist die Entmarkung bei der zentralen pontinen Myelinolyse scharf begrenzt und betrifft insbesondere die weiße Substanz des Pons. Ein deutlicher Oligodendrozytenverlust lässt sich bei der VWMD und MLD nachweisen, wobei es im Gegensatz zur zentralen pontinen Myelinolyse hier nicht zu einem kompletten Verlust an Oligodendrozyten kommt. Bei der VWMD weisen die erhaltenen Oligodendrozyten ein charakteristisches Oligodendrozytenschädigungsmuster auf mit einem vergrößerten und eosinophilen Zelleib sowie Oligodendrozytenapoptosen. Bei der MLD korreliert der Verlust der Entmarkung mit dem Verlust an Oligodendrozyten. Wichtiges histologisches Merkmal der MLD ist der Nachweis großer, dicht bepackter Makrophagen sowie von Makrophagenapoptosen. Die X-ALD kann differentialdiagnostisch aufgrund der Entzündungsinfiltrate, die bei der zentralen pontinen Myelinolyse selten sind, abgegrenzt werden sowie durch den Nachweis von farblosen Spalten im Zytoplasma der Astrozyten und Makrophagen. Auch der Morbus Alexander kann aufgrund der massenhaft vorkommenden Rosenthalfasern gut differentialdiagnostisch abgegrenzt werden.

4.3 Abgrenzung der Leukodystrophien von den Differentialdiagnosen

Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die histopathologischen Charakteristika der LD und ihrer Differentialdiagnosen.

Tabelle 17: Vergleich histopathologischer Merkmale der Leukodystrophien und ihrer Differentialdiagnosen.

Hier untersuchte Leukodystrophien	Entzündliche Entmarkungskrankheiten			Infektiöse Erkrankung	zentrale pontine Myelinolyse	Mitochondriale Erkrankung
	MS	NMO	ADEM			
Flächige, unvollständige bis vollständige DM <u>M. Alexander</u> : fleckige und gering ausgeprägte DM	flächige DM, fleckige DM möglich		perivaskuläre DM	flächige, teils fleckige DM	flächige scharf begrenzte DM	flächige DM
Noch stehende Myelinfasern oft vakuolisiert	einzelne stehende Myelinfasern möglich	vakuolisiertes Myelin in den Randbereichen der Läsion				
U-Fasern in der Regel ausgespart, aber von Makrophagen infiltriert	Kleine Läsionen, U-Fasern betroffen, wenn in Läsion liegend, leukokortikale Läsionen möglich	Kortikale DM nicht beschrieben		bevorzugt Großhirn, Hirnstamm und Kleinhirn betroffen	einige schaumzellige Makrophagen	Kortex kann betroffen sein, bevorzugt Hirnstamm und Basalganglien betroffen
kortikale Entmarkung nur bei VWMD	kortikale DM (subpiale, intrakortikale, leukokortikale Entmarkung)					
keine Remyelinisierung	Remyelinisierung, vor allem in den frühen Stadien der Erkrankung					
zahlreiche Makrophagen <u>Besonderheiten</u> : <u>MLD</u> : große, dicht bepackte Makrophagen, Ubiquitin-positives Material in den Makrophagen, Makrophagenapoptosen <u>X-ALD</u> : Spalten im Zelleib, MRP14-positive Makrophagen, perivaskuläre Cuffs, IgG-positive Makrophagen	zahlreiche schaumzellige Makrophagen in frühen Läsionen Myelin-Abbauprodukte innerhalb der Makrophagen	Myelin-Abbauprodukte innerhalb der Makrophagen	perivaskulär zahlreiche schaumzellige Makrophagen	schaumzellige Makrophagen		Mikrogliaaktivierung
Gleichmäßiger Verlust der Myelinproteine <u>M. Alexander</u> : MBP und MAG stärker betroffen als PLP und	Pattern III bevorzugter Verlust von MAG und CNPase,	MAG und CNPase bevorzugt verlustig in	Perivaskulärer Verlust der Myelinex-			

Hier untersuchte Leukodystrophien	Entzündliche Entmarkungskrankheiten			Infektiöse Erkrankung	zentrale pontine Myelinolyse	Mitochondriale Erkrankung
	MS	NMO	ADEM	PML		Morbus Leigh
MOG	Pattern I und II große und kleine Myelinproteine im gleichen Maße verlustig	frühen Läsionen	pression			
Reduzierter axonaler Besatz bis zum subtotalen axonalen Verlust <u>MLD, VWMD, M. Alexander</u> : keine nennenswerte akute axonale Schädigung <u>X-ALD</u> : variable akute axonale Schädigung	axonaler Besatz variabel reduziert, akute axonale Schädigung vor allem in frischen Läsionen	Ausgeprägter axonaler Verlust, akute axonale Schädigung nachweisbar	Perivaskuläre akute axonale Schädigung	Variable axonale Reduktion, akute axonale Schädigung nachweisbar	variable axonale Reduktion	Variable axonale Reduktion
<u>Faserглиose</u> <u>X-ALD</u> : Spalten im Zellinneren der Astrozyten <u>VWMD</u> : dystrophe Astrozyten mit IgG- und Fibrinogen-Ablagerungen an den Astrozytenfortsätzen, kein Verlust der AQP-4 Expression <u>M. Alexander</u> : zahlreiche Rosenthalfasern, AQP-4 wird exprimiert	frühe Stadien: gemistozytäre Astrogliose späte Stadien: zahlreiche, dicht stehende Astrozytenfortsätze	dystrophe Astrozyten, Verlust der AQP-4 Expression	Reaktive Astrozyten vor allem perivaskulär	bizarre Astrozyten		hypertrophe Astrozyten und deutliche Gliose
deutlicher Oligodendrozytenverlust, Oligodendrozytenapoptosen zum Teil nachweisbar <u>VWMD</u> : kompakter, geblähter, eosinophiler Zelleib der Oligodendrozyten	variabler Oligodendrozytenverlust	deutlicher Verlust an Oligodendrozyten	variabler Oligodendrozytenverlust vor allem perivaskulär	geschwollene Oligodendrozytenkerne, sog. Milchglasoligodendrozyten, infiziert mit JC-Virus	kompletter Oligodendrozytenverlust	Oligodendrozytenverlust

Hier untersuchte Leukodystrophien	Entzündliche Entmarkungskrankheiten			Infektiöse Erkrankung	zentrale pontine Myelinolyse	Mitochondriale Erkrankung
	MS	NMO	ADEM	PML		Morbus Leigh
<p><u>X-ALD</u>: massive entzündliche Infiltrate, viele T-Lymphozyten, einige B-Zellen und Plasmazellen</p> <p><u>Morbus Alexander</u>: deutliche Infiltrate bestehend aus vielen Plasmazellen, B-Zellen, wenige T-Zellen</p>	deutliche Entzündungsinfiltrate mit vielen T-Zellen, Anteil an B-Zellen und Plasmazellen variabel	perivaskulär eosinophile und neutrophile Granulozyten, Hyalinisierungen der Gefäßwände	perivaskulär einige T-Zellen, Plasmazellen und B-Zellen	entzündliche Infiltrate variabel	entzündliche Infiltrate selten	
<p>keine Komplementablagerungen</p> <p><u>X-ALD</u>: Makrophagen mit IgG-positiven Material im Zytoplasma</p> <p><u>VWMD</u>: Störung der Blut-Hirn-Schranke, IgG und Fibrinogen Ablagerung an Astrozyten</p>	<p>Pattern I + III: keinen Ablagerungen von IgG und aktiviertem Komplementkomponenten; Pattern II: Ablagerungen von IgG und aktiviertem Komplementkomponenten an Myelindebris in Makrophagen</p>	Ablagerungen von IgG, IgM und aktiviertem Komplementkomponenten perivaskulär	perivaskuläre Ablagerungen von IgG und aktivierten Komplementkomponenten	keine Komplementablagerungen		

(Brück et al. 1994; Brück et al. 1995; Brück et al. 1996; Bitsch et al. 2000; Lucchinetti et al. 2000; Schiffmann und Boespflug-Tanguy 2001; Kuhlmann et al. 2008; Goldschmidt et al. 2009; Weber und Köhler 2010; Brück et al. 2012; Lucchinetti et al. 2014; Pfeifenbring et al. 2014; Fersini et al. 2015; Lake et al. 2015; SantaCruz et al. 2016)

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die histologischen Charakteristika verschiedener Leukodystrophien herausgearbeitet. Leukodystrophien sind genetische Erkrankungen, die mit einer Störung der Myelinisierung einhergehen (Renaud 2016). In der medizinischen Fachliteratur finden sich oftmals lediglich Fallberichte und nur wenige umfangreiche und aktuelle histologische Studien.

Ziel der Arbeit ist es, mithilfe der aktuellen diagnostischen histologischen und immunhistochemischen Untersuchungsmethoden die histologischen Merkmale der verschiedenen LDs herauszuarbeiten, um die LDs voneinander und von ihren Differentialdiagnosen abzugrenzen.

Dazu wurden alle dem Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung stehenden Gewebeproben von Patienten mit einer Leukodystrophie neuropathologisch untersucht. Darunter fanden sich in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Biopsie- und Autopsieproben von insgesamt drei Patienten mit einer metachromatischen Leukodystrophie (MLD), sieben Patienten mit einer X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (X-ALD), drei Patienten mit einer *Vanishing White Matter Disease* (VWMD) und zwei Patienten mit einem Morbus Alexander. Die ZNS-Proben der Patienten wurden aufwendig aufgearbeitet, wobei von jedem Paraffinblock drei histologische Färbungen angefertigt wurden. Von ausgewählten Paraffinblöcken wurden anschließend bis zu 25 immunhistochemische Färbungen durchgeführt (pro Patient mindestens 1 Block) und ausgewertet. Hierbei wurden das Ausmaß der Entmarkung in der grauen und weißen Substanz und die axonale Schädigung beurteilt. Des Weiteren wurde die entzündliche Infiltration, die Makrophagenabräumreaktion, die reaktive Gliose und das Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung beurteilt und quantifiziert. Als Vergleich für die Quantifizierungen in den LD-Fällen dienten gleichaltrige Kontrollen, das heißt Patienten, deren neuropathologischer Autopsiebefund keine wesentlichen pathologischen Veränderungen ergab. Es wurden gesunde Patienten, die an einer nicht natürlichen Todesursache verstarben, und Patienten mit Vorerkrankungen ohne ZNS-Mitbeteiligung, eingeschlossen. Die vorhandenen klinischen Daten der LD-Fälle und Kontrollen wurden gesammelt und tabellarisch wiedergegeben. Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neuropädiatrie der Universitätsmedizin Göttingen versucht, die ZNS-Proben genetisch zu untersuchen, um die jeweilige Mutation festzustellen, was leider nicht möglich war. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen liegt vor.

Eine flächige, teils fleckige Entmarkung in der weißen Substanz des Großhirns ohne Mitbeteiligung der U-Fasern war bei den MLD-, VWMD- und X-ALD-Fällen feststellbar. Eine kortikale Entmarkung konnte lediglich bei der VWMD nachgewiesen werden. Typische Kennzeichen sind weiter zahlreiche Makrophageninfiltrate und Makrophagen mit inkorporiertem zytoplasmatischen Material. Am auffälligsten sind die Makrophagen bei der MLD, denn hier erscheinen sie groß, dicht bepackt, teils mit bläulichen zytoplasmatischen Vakuolen und einer oftmals unspezifischen Markierung in den verschiedenen immunhistochemischen Färbungen. Interessanterweise finden sich bei der MLD auch Makrophagenapoptosen. Die Diagnose der X-ALD sollte in Erwägung gezogen werden, wenn farblose, oftmals zentral liegende Spalten im Zelleib der Makrophagen und Astrozyten sowie eine lymphozytäre Entzündungsreaktion gefunden werden können. Das Ausmaß der axonalen Schädigung ist äußerst variabel sowohl zwischen den verschiedenen LDs als auch zwischen den einzelnen Patienten einer LD. Eine deutliche Gliose ist bei allen LD-Formen erkennbar. Am auffälligsten sind die Astrozyten bei der VWMD und dem M. Alexander. Bei der VWMD zeigen die Astrozyten nicht das typische histologische Bild einer reaktiven Veränderung, sondern erscheinen vielmehr dystroph und weisen Ablagerungen von IgG und Fibrinogen an ihrem Zelleib und Fortsätzen auf, hinweisend auf einen Zusammenbruch der Bluthirnschranke. Beim M. Alexander bewirkt eine Mutation im GFAP-Gen eine Akkumulation von zahlreichen Rosenthalfasern, vor allem im Hirnstamm. Die massenhaften Rosenthalfasern finden sich in hoher Dichte insbesondere perivaskulär, subependymal und subpial. Aquaporin-4 wird bei allen LD-Formen auf den Astrozyten regelrecht exprimiert, auch auf den dystrophen Astrozyten der VWMD. Bei der MLD, X-ALD und VWMD ist ein deutlicher Verlust an Oligodendrozyten, teils korrelierend zum Entmarkungsgrad, ersichtlich. Vereinzelt sind Oligodendrozytenapoptosen nachweisbar. Bei der VWMD weisen die Oligodendrozyten zudem einen deutlich vergrößerten, kompakten und blass eosinophil erscheinenden Zelleib auf. Entzündliche Infiltrate finden sich nur bei der X-ALD und dem M. Alexander, wobei Makrophagen und T-Zellen die zellreichen perivaskulären Cuffs bei der X-ALD dominieren, während T-Zellen und Plasmazellen dies beim M. Alexander tun.

Die in der vorliegenden Dissertation herausgearbeiteten histologischen Charakteristika helfen zum einen die verschiedenen LDs untereinander zu unterscheiden und zum anderen von deren Differentialdiagnosen abzugrenzen, wobei zu diesen entzündliche Entmarkungskrankheiten, wie Multiple Sklerose, akute disseminierte Enzephalomyelitis, *Neuromyelitis Optica*; infektiöse Erkrankungen, wie progressive multifokale Leukenzephalopathie; Erkrankungen des ZNS durch Elektrolytschwankungen, wie zentrale pontine Myelinolyse, und mitochondriale Erkrankungen, wie Morbus Leigh, gehören.

Die hier vorliegende Dissertation liefert einen entscheidenden Fortschritt für die neuropathologische Routinediagnostik und hilft bei der Diagnosestellung, insbesondere bei Patienten mit wenigen klinischen Angaben oder geringer Biopsiegröße.

6. Literaturverzeichnis

- Aguzzi A, Glatzel M, Tolnay M, Hans V, Wiestler OD: Zentrales Nervensystem. In: Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (Hrsg.): Pathologie. 4. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2008, 256-329
- Aksamit AJ (1995): Progressive multifocal leukoencephalopathy: A review of the pathology and pathogenesis. *Microsc Res Tech* 32, 302–311
- Alves D, Pires MM, Guimarães A, Miranda MC (1986): Four cases of late onset metachromatic leucodystrophy in a family: clinical, biochemical and neuropathological studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 1417–1422
- Berger J, Major E (1999): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Semin Neurol* 19, 193–200
- 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
- Boenisch T, Henne C, DakoCytomation GmbH (Hamburg): Handbuch immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation, Hamburg 2003
- Brück W, Schmied M, Suchanek G, Brück Y, Breitschopf H, Poser S, Piddlesden S, Lassmann H (1994): Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35, 65–73
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788–796
- Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H (1996): Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 195, 588–600
- Brück W, Herms J, Brockmann K, Schulz-Schaeffer W, Hanefeld F (2001): Myelinopathia centralis diffusa (vanishing white matter disease): evidence of apoptotic oligodendrocyte degeneration in early lesion development. *Ann Neurol* 50, 532–536
- Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003): Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206, 181–185

- Brück W, Popescu B, Lucchinetti CF, Markovic-Plese S, Gold R, Thal DR, Metz I (2012): Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate. *Ann Neurol* 72, 385–394
- Dooves S, Bugiani M, Postma NL, Polder E, Land N, Horan ST, van Deijk A-LF, van de Kreeke A, Jacobs G, Vuong C, et al. (2016): Astrocytes are central in the pathomechanisms of vanishing white matter. *J Clin Invest* 126, 1512-1524
- Fenzi F, Moretto G, Maleci A, Galiazzo Rizzuto S, Dalla Bernardina B, Bondavalli S, Rizzuto N (1983): Histopathological and ultrastructural study of a case of infantile metachromatic leukodystrophy. *Ital J Neurol Sci* 4, 503–507
- Fersini F, Govi A, Tsokos M (2015): Central pontine myelinolysis. *Forensic Sci Med Pathol* 11, 130–132
- Flint D, Brenner M: Alexander Disease. In: Raymond GV, Eichler F, Fatemi A, Naidu S (Hrsg.): *Leukodystrophies. (International review of child neurology series)*; Mac Keith Press, London 2011, 106-129
- Gärtner J, Kohlschütter A: Leukodystrophien. In: Hoffmann G, Grau A (Hrsg.): *Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie 1.Auflage*; Thieme, Stuttgart 2004, 20-29
- Gieselmann V (2008): Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr* 97, 15–21
- Gieselmann V, Krägeloh-Mann I (2010): Metachromatic leukodystrophy--an update. *Neuropediatrics* 41, 1–6
- Gieselmann V, Krägeloh-Mann I: Metachromatic Leukodystrophy. In: Raymond GV, Eichler F, Fatemi A, Naidu S (Hrsg.): *Leukodystrophies. (International review of child neurology series)*; Mac Keith Press, London 2011, 130-155
- Gieselmann V, Franken S, Klein D, Mansson JE, Sandhoff R, Lüllmann Rauch R, Hartmann D, Saravanan VPM, De Deyn PP, D’Hooge R, et al. (2003): Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr Suppl* 92, 74–79; discussion 45
- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T (2009): Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72, 1914–1921
- Griffin DE, Moser HW, Mendoza Q, Moench TR, O’Toole S, Moser AB (1985): Identification of the inflammatory cells in the central nervous system of patients with adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 18, 660–664

- Hageman AT, Gabreëls FJ, de Jong JG, Gabreëls-Festen AA, van den Berg CJ, van Oost BA, Wevers RA (1995): Clinical symptoms of adult metachromatic leukodystrophy and arylsulfatase A pseudodeficiency. *Arch Neurol* 52, 408–413
- Hirano A: *Praktischer Leitfaden der Neuropathologie*. Springer-Verlag, Berlin 1983
- Kawachi I, Lassmann H (2017): Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 137–145
- Kuhlmann T, Lassmann H, Brück W (2008): Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. *Acta Neuropathol* 115, 275–287
- Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A (2015): Leigh Syndrome: Neuropathology and Pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 74, 482–492
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115–121
- Lee D-H, Metz I, Berthele A, Stadelmann C, Brück W, Linker RA, Gold R, Schroeder A (2010): Supraspinal demyelinating lesions in neuromyelitis optica display a typical astrocyte pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36, 685–687
- 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, Guo Y, Popescu BFG, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T (2014): The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. *Brain Pathol* 24, 83–97
- Lüllmann-Rauch R: *Taschenlehrbuch Histologie*. 3., vollständig überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2009
- Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez D (2004): Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol Life Sci* 61, 369–385
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB: X-Linked Adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hrsg.): *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8. Auflage; McGraw-Hill, New York 2001, 3257–3301
- Nave K-A: Zentrale Myelinisierungsstörungen: Biologische Grundlagen, transgene Modelle und molekulare Pathologie. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): *Erkrankungen des*

- Zentralnervensystems. Handbuch der molekularen Medizin, Band 5; Springer, Berlin 1999, 370-394
- Olabarria M, Putilina M, Riemer EC, Goldman JE (2015): Astrocyte pathology in Alexander disease causes a marked inflammatory environment. *Acta Neuropathol* 130, 469–486
- Pfeifenbring S, von Baumgarten L, Schüller U, Rosewich H, Thal DR, Wirtz CR, Hecht M, Terpolilli NA, Brück W (2014): Biopsy findings of symptomatic cerebral X-linked adrenoleucodystrophy and histological differentiation from multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 658–661
- Pohl D, Alper G, Van Haren K, Kornberg AJ, Lucchinetti CF, Tenenbaum S, Belman AL (2016): Acute disseminated encephalomyelitis: Updates on an inflammatory CNS syndrome. *Neurology* 87, S38–45
- Pouwels PJ, Kruse B, Korenke GC, Mao X, Hanefeld FA, Frahm J (1998): Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of childhood adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics* 29, 254–264
- Radhakrishnan S, Otte J, Enam S, Del Valle L, Khalili K, Gordon J (2003): JC Virus-Induced Changes in Cellular Gene Expression in Primary Human Astrocytes. *J Virol* 77, 10638–10644
- Raymond GV: X-Linked Adrenoleukodystrophy. In: Raymond GV, Eichler F, Fatemi A, Naidu S (Hrsg.): *Leukodystrophies*. (International review of child neurology series); Mac Keith Press, London 2011, 75-89
- Renaud DL (2016): Adult-Onset Leukoencephalopathies. *Continuum (Minneapolis)* 22, 559–578
- SantaCruz KS, Roy G, Spigel J, Bearer EL (2016): Neuropathology of JC virus infection in progressive multifocal leukoencephalopathy in remission. *World J Virol* 5, 31–37
- Schaumburg HH, Powers JM, Raine CS, Suzuki K, Richardson EP (1975): Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol* 32, 577–591
- Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O (2001): An update on the leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* 14, 789–794
- Schiffmann R, Elroy-Stein O (2006): Childhood ataxia with CNS hypomyelination/vanishing white matter disease—A common leukodystrophy caused by abnormal control of protein synthesis. *Mol Genet Metab* 88, 7–15

- Shapiro LJ, Aleck KA, Kaback MM, Itabashi H, Desnick RJ, Brand N, Stevens RL, Fluharty AL, Kihara H (1979): Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency. *Pediatr Res* 13, 1179–1181
- Ulrich J: Die cerebralen Entmarkungskrankheiten im Kindesalter; diffuse Hirnsklerosen. Schriftenreihe Neurologie Band 6; Springer-Verlag, Berlin 1971
- van der Knaap MS, van Berkel CGM, Herms J, van Coster R, Baethmann M, Naidu S, Bolts-hauser E, Willemsen MAAP, Plecko B, Hoffmann GF, et al. (2003): eIF2B-related disorders: antenatal onset and involvement of multiple organs. *Am J Hum Genet* 73, 1199–1207
- van der Knaap MS, Pronk JC, Scheper GC (2006): Vanishing white matter disease. *Lancet Neurol* 5, 413–423
- von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J: Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hrsg.): *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8. Auflage; McGraw-Hill, New York 2001, 3695-3724
- Wang G, Achim CL, Hamilton RL, Wiley CA, Soontornniyomkij V (1999): Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods* 18, 459–464
- Weber T, Köhler W (2010): Entmarkungserkrankungen. *Nervenarzt* 81, 471–496
- Wegerhoff R: Mikroskopische Verfahren. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19. Auflage; Springer Spektrum, Berlin 2015, 1-25
- Wrzos C, Winkler A, Metz I, Kayser DM, Thal DR, Wegner C, Brück W, Nessler S, Bennett JL, Stadelmann C (2014): Early loss of oligodendrocytes in human and experimental neuromyelitis optica lesions. *Acta Neuropathol* 127, 523–538

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung für Neuropathologie durchführen zu können, bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. med. Dr. rer. nat. Sabine Pfeifenbring für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Danke für das motivierende Feedback, den wissenschaftlichen Elan, die kontinuierliche tatkräftige Unterstützung, die Zeit, die Geduld und stets freundliche Zusammenarbeit. Danke für die Mühe und die angenehme Atmosphäre während der ganzen Zeit. Eine bessere Betreuerin hätte ich nicht haben können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Brigitte Maruschak für ihre freundliche und liebe Hilfe, ihre endlose Geduld und die Beantwortung all meiner Fragen bedanken.

Für die freundliche Unterstützung, nette Atmosphäre und kleinen Hilfen zwischendurch bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Neuropathologie.

Zudem möchte ich mich bei Ina Günther für das Korrekturlesen und Norman Zschienger für die Formatierung meiner Dissertation bedanken.