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

Entzündung
und
axonale Schädigung
in
Läsionen der Multiplen Sklerose

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

vorgelegt von
Jens Rainer Pehlke
aus
Mülheim an der Ruhr

Göttingen 2006

Dekan : Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin : JProf. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

II. Berichterstatter/in :

III. Berichterstatter/in :

Tag der mündlichen Prüfung :

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Pathologie und Pathophysiologie	3
1.1.3.1	Stadien der Entmarkungsaktivität.....	4
1.1.3.2	Neuropathologische Muster.....	6
1.1.3.3	Tiermodelle der Multiplen Sklerose	8
1.1.4	Klinik	9
1.1.4.1	Verlaufsformen	11
1.1.4.2	Diagnostik.....	13
1.1.4.3	Therapie	15
1.2	Axonale Schädigung	17
1.2.1	Bedeutung der axonalen Schädigung bei Multipler Sklerose.....	17
1.2.2	Akute axonale Schädigung	18
1.2.3	CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	18
1.2.4	Makrophagen / Mikroglia.....	21
1.3	Fragestellung	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Gewebe.....	25
2.2	Immunhistochemie	28
2.2.1	Grundlagen	28
2.2.2	Detektierte Strukturen.....	28

2.2.2.1	Axonale Marker	29
2.2.2.2	T-Zell-Marker	30
2.2.2.3	Makrophagen-Marker	30
2.2.2.4	Sonstiges	31
2.2.3	Doppelmarkierungen	31
2.2.3.1	Allgemeines Protokoll	31
2.2.3.2	Verwendung zweier Primärantikörper gleicher Herkunftsspezies	33
2.2.3.2.1	„Biotinylierung“ des zweiten Primärantikörpers.....	33
2.2.3.2.2	Blockierung mit unkonjugierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten	35
2.2.3.2.3	Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA).....	37
2.2.3.2.4	Kombination von TSA und Blockierung mit F(ab)-Fragmenten	38
2.2.3.3	Die Doppelmarkierungen im Detail	39
2.2.4	Ergänzende immunhistochemische Färbungen	41
2.3	Antikörper und Chemikalien	42
2.3.1	Primärantikörper	42
2.3.2	Sekundärsysteme	42
2.3.3	Chromogene, Substrate, Puffer und Sonstiges	43
2.3.4	Häufig benutzte Lösungen und Puffer.....	44
2.4	Auswertung	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Allgemeine Läsionspathologie	47
3.2	Akute axonale Schädigung.....	47
3.3	T-Zellen.....	50
3.3.1	Doppelmarkierung CD3 / APP	50
3.3.2	Doppelmarkierung CD8 / APP	52
3.3.3	Doppelmarkierung Granzym-B / APP	55
3.3.4	Charakterisierung des T-Zell-Infiltrats	57
3.4	Makrophagen / Mikroglia.....	59
3.4.1	Doppelmarkierung Ki-M1P / APP	59
3.4.2	CD8 ⁺ -Makrophagen.....	62

3.5	Expression von MHC-I	64
3.6	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	65
4	Diskussion	66
4.1	Zahlreiche Kontakte zwischen CD8⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen in aktiven MS-Läsionen.....	66
4.2	Kontakte zwischen CD3⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen	68
4.3	Makrophagen / Mikroglia.....	70
4.4	Unterschiede zwischen den neuropathologischen Mustern der MS	72
4.5	Nachweis akuter axonaler Schädigung in viralen Enzephalitiden.....	75
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

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

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloidvorläuferprotein)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
DAB	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DM	demyelinisierte Läsion
EA	<i>early active lesion</i> (früh-aktive Läsion)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>expanded disability status scale</i> (Skala der Schwere der Behinderung bei MS nach KURTZKE)
ERM	<i>early remyelination</i> (früh-remyelinisierende Läsion)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HTLV-I	Humanes T-lymphotropes Virus I
IFN- γ /- β	Interferon gamma / beta
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G

IL-4	Interleukin 4
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> (induzierbare NO-Synthetase)
LA	<i>late active lesion</i> (spät-aktive Läsion)
LFB	<i>Luxol Fast Blue</i> (Färbung, bei der normales Myelin blau gefärbt wird)
LRM	<i>late remyelination</i> (spät-remyelinisierte Läsion)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHV	<i>murine hepatitis virus</i> (Hepatitis-Virus der Maus)
MOG	Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
PAS	<i>periodic acid - Schiff</i> (Periodsäure - Schiff-Reagens)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PLP	Proteolipid-Protein
PP-MS	<i>primary-progressive multiple sclerosis</i> (primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
PPWM	<i>periplaque white matter</i> (die Läsion umgebende weiße Substanz)
PR-MS	<i>progressive-relapsing multiple sclerosis</i> (progredient-schubförmiger Verlauf)
RR-MS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> (schubförmige Multiple Sklerose)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SP-MS	<i>secondary-progressive multiple sclerosis</i> (sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)

TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TMEV	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i> (Theiler-Enzephalomyelitisvirus der Maus)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSA	Tyramid-Signal-Amplifikation
VEP	visuell evoziertes Potential
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata (ED), zählt zu den häufigsten organischen Krankheiten des Nervensystems. Etwa 8 Prozent der in unseren Breitengraden in neurologischen Kliniken behandelten Patienten leiden an Multipler Sklerose [POECK und HACKE, 1998]. In Deutschland geht man von etwa 122.000 MS-Patienten aus, dies entspricht einer Prävalenzrate von 149,1 auf 100.000 Einwohner [HEIN und HOPFENMÜLLER, 2000]. An der schubförmigen Verlaufsform erkranken Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer, an der primär chronisch-progredienten Verlaufsform jedoch etwa gleich häufig [COTTRELL *et al.*, 1999].

Das Prädilektionsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei die Häufigkeit der Neuerkrankungen ab dem 45. Lebensjahr stetig absinkt. Hat man früher die Diagnose MS im Kindesalter praktisch ausgeschlossen, so sind pädiatrische MS-Fälle in den letzten Jahren immer mehr zum Gegenstand wissenschaftlichen Interesses geworden [BANWELL, 2004; TARDIEU und MIKAELOFF, 2004; POHL *et al.*, 2004].

Für die Region Süd-Niedersachsen sind in einer den Zeitraum von 1969 bis 1986 umfassenden epidemiologischen Studie eine deutlich steigende Prävalenz und ein deutlicher Anstieg der Inzidenz beschrieben worden; das mittlere Erkrankungsalter lag hier bei 31 Jahren [POSER *et al.*, 1989].

Die geographische Verteilung der Multiplen Sklerose stellt sich ungleichmäßig dar. Mit einer Prävalenz von mehr als 50 pro 100.000 Einwohner ist die MS häufig in Europa, Nordamerika, Süd-Australien und Neuseeland [KURTZKE, 1985]. Eine Prävalenz von weniger als zehn findet sich in Afrika und Südamerika [CALLEGARO *et al.*, 1992; RADHAKRISHNAN *et al.*, 1985]. Selten hingegen ist die MS mit einer Prävalenzrate von weniger als 5 auf 100.000 im fernen Osten [KUROIWA *et al.*, 1983]. Auf der Nordhalbkugel findet man mit zunehmender Entfernung vom Äquator eine zunehmende Erkrankungshäufigkeit [KURTZKE, 1980]. So ist die MS beispielsweise in Europa oberhalb des 46. Breitengrades, in den USA oberhalb des 38. Breitengrades, häufiger zu finden als darunter [POECK und HACKE, 1998]. Auffällig ist, daß die MS besonders häufig dort zu finden ist,

wo ein großer Bevölkerungsanteil der Menschen mit nordeuropäischer Abstammung vorliegt.

Unabhängig von dieser groben Beschreibung finden sich deutliche regionale Unterschiede wie z.B. Regionen mit relativ zur Umgebung betrachtet besonders großer Häufigkeit, sogenannte *Foci*, wie beispielsweise Sardinien [GRANIERI *et al.*, 1983], aber auch Regionen mit im Vergleich zur Umgebung besonders niedriger Häufigkeit wie z.B. Malta [DEAN *et al.*, 2002].

1.1.2 Ätiologie

Die genaue Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bislang unklar. Es finden sich Hinweise auf eine genetische Disposition und für die Einflußnahme eines Umweltfaktors in der Kindheit.

So ist die Multiple Sklerose, unabhängig vom betrachteten Gebiet, in der weißen Bevölkerung, insbesondere der nordeuropäisch-stämmigen, deutlich häufiger anzutreffen als in anderen ethnischen Gruppen [COMPSTON und EBERS, 1990; DEAN, 1967; DEAN *et al.*, 1994]. Nahezu resistent gegenüber der MS scheinen hingegen beispielsweise die Aborigines in Australien oder die Maori in Neuseeland zu sein, während in diesen Gebieten die MS bei der weißen Bevölkerung verhältnismäßig oft auftritt [CHANCELLOR *et al.*, 2003; EBERS und SADOVNICK, 1994; HAMMOND *et al.*, 1988; SKEGG *et al.*, 1987].

Geschwister von MS-Patienten erkranken deutlich häufiger als der Bevölkerungsdurchschnitt. Bei monozygoten Zwillingen findet sich eine Konkordanzrate von etwa 25%, bei dizygoten Zwillingen von etwa 3% [EBERS *et al.*, 1986; MUMFORD *et al.*, 1994; WILLER *et al.*, 2003]. Eine Assoziation mit HLA-DR2 gilt bei Kaukasiern als gesichert [HILLERT *et al.*, 1994; OLERUP und HILLERT, 1991].

Einen weiteren Beitrag zur Klärung der Ätiologie der Multiplen Sklerose leisten Migrationsstudien. Es wurde beobachtet, daß Migranten, die ihr Geburtsland vor dem 15. Lebensjahr verlassen haben, das Erkrankungsrisiko des neuen Heimatlandes aufweisen; sind sie bei der Auswanderung jedoch älter als 15 Jahre, behalten sie das Erkrankungsrisiko des Herkunftslandes [DEAN, 1967]. In der zweiten Generation verwischt sich dieser Unterschied. Diese Ergebnisse legen die Einflußnahme eines Umweltfaktors in

der Kindheit nahe. In diesem Zusammenhang wurde bereits die Beteiligung verschiedenster Erreger wie beispielsweise *Chlamydia pneumoniae* [STRATTON und SRIRAM, 2003], humanes Herpesvirus 6 [CLARK, 2004] und Epstein-Barr-Virus [CEPOK *et al.*, 2005; HAAHR *et al.*, 2004] diskutiert.

Die von LUCCHINETTI *et al.* (2000) gezeigte interindividuelle immunpathologische Heterogenität der MS-Läsionen (Abschnitt 1.1.3.2) zeigt allerdings die Möglichkeit auf, daß es sich bei der MS um verschiedene Entitäten mit ähnlicher klinischer Manifestation handeln könnte, für die entsprechend unterschiedliche Ätiologien angenommen werden könnten.

1.1.3 Pathologie und Pathophysiologie

Formal wurde die Multiple Sklerose bislang zu den Autoimmunerkrankungen gezählt, doch zeigen neuere Untersuchungen, daß es sich möglicherweise nicht um eine einzelne Erkrankung, sondern um verschiedene Entitäten mit ähnlicher klinischer Manifestation handelt (s. Abschn. 1.1.3.2). Betroffen ist vorwiegend – jedoch nicht ausschließlich – die weiße Substanz des gesamten Zentralnervensystems, wobei es zu einer herdförmigen Schädigung bzw. Auflösung der von den Oligodendrozyten gebildeten Markscheiden, aber auch, wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, zu einer klinisch relevanten Schädigung der Axone kommt. Die Entmarkungsherde (Läsionen, Plaques) – oft perivenös angeordnet [DOW und BERGLUND, 1942] – sind in unterschiedlicher Größe über das ZNS verteilt und können zu größeren Herden konfluieren. Prädilektionsstellen sind Nervi optici, Hirnstamm, insbesondere Brücke mit Augenmuskelkernen, Kleinhirn, weiße Substanz in Ventrikelnähe und die Hinterstränge des Rückenmarks. Es finden sich jedoch auch Läsionen in der grauen Substanz, insbesondere im zerebralen Cortex [INGLESE *et al.*, 2004; KIDD *et al.*, 1999; PETERSON *et al.*, 2001].

Nach erfolgter Demyelinisierung ist eine schnelle saltatorische Erregungsleitung nicht mehr möglich. Es kommt zu einer langsamen, kontinuierlichen Erregungsausbreitung mit Auftreten von Verlustströmen. Unter zusätzlichem Einfluß des entzündlichen Ödems treten temporäre Leitungsunterbrechungen auf, eine dauerhafte Leitungsunterbrechung wird durch axonale Schädigung bedingt (s. Abschn. 1.2).

Je nach Lokalisation führen größere Herde aufgrund der gestörten Nervenleitung zu Funktionsstörungen; kleinere Herde können klinisch „stumm“ und somit unerkannt bleiben [GILBERT und SADLER, 1983]. Dementsprechend zeigen bildgebende Verfahren oder auch eine Sektion häufig einen erheblich stärkeren Befall, als klinisch zu vermuten war.

Nach vorherrschender Vorstellung kommt es zu einer Aktivierung von T- und B-Zellen in der Peripherie durch aus dem ZNS stammende Antigene [DE VOS *et al.*, 2002] oder kreuzreaktive Fremdanigene – beispielsweise bei Virusinfektion – [TALBOT *et al.*, 1996; WUCHERPFENNIG und STROMINGER, 1995] mit anschließender klonaler Expansion, Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Infiltration des ZNS [HEMMER *et al.*, 2002; HICKEY 1991]. CD4⁺-T_H1-Zellen produzieren nach Erkennung ihres spezifischen, von Mikrogliazellen über MHC-II präsentierten Antigens Zytokine wie TNF- α und IFN- γ , welche zu einer verstärkten Einwanderung von Makrophagen und somit zur Verstärkung der Entzündung führen, wohingegen T_H2-Zellen über IL-4 der B-Zell-Aktivierung und damit der Immunglobulinbildung dienen. Auch CD8⁺-T-Zellen treffen auf ihr spezifisches, von Gliazellen und Neuronen über MHC-I präsentiertes Antigen, wobei die Erkennung des MHC-I/Peptid-Komplexes zur Schädigung der exprimierenden Zelle führt. B-Zellen proliferieren nach Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen zu Plasmazellen und produzieren große Mengen Antikörper [KENNEL DE MARCH *et al.*, 2003].

Angemerkt sei, daß in den letzten Jahren neben der schädigenden Komponente vermehrt auch Hinweise auf neuroprotektive Aspekte der Entzündung diskutiert wurden [KERSCHENSTEINER *et al.*, 1999; HOHLFELD *et al.*, 2000; STADELMANN *et al.*, 2002; SCHWARTZ und KIPNIS, 2005].

1.1.3.1 Stadien der Entmarkungsaktivität

Die Läsionen der Multiplen Sklerose durchlaufen nacheinander verschiedene Aktivitätsstadien von der Demyelinisierung bis hin zur Remyelinisierung, die anhand der Myelinabbauprodukte in Makrophagen und der Makrophagen-Aktivierungsmarker MRP14 und 27E10 in früh aktive, spät aktive, demyelinisierte / inaktive, früh remyelinisierende und spät remyelinisierte Läsionen eingeteilt werden können [BRÜCK *et al.*, 1994, 1995, 1996; LUCCHINETTI *et al.*, 1996], wie Tabelle 1 im Überblick zeigt.

Tabelle 1: Läsionsaktivität (modifiziert) nach LUCCHINETTI *et al.* (1996), S. 262

	MOG	PLP	LFB	PAS	Vakuolen	Makrophagen- marker	Remyel.
früh aktiv	+++	++	++	-	-	MRP14, 27E10	-
spät aktiv	-	+++	++	-	-	27E10	-
demyelinisiert / inakt.	-	-	-	+/-	+/-	-	-
früh remyelinisierend	-	+/-	+/-	+	+	-	++
spät remyelinisiert	-	-	-	+/-	+/-	-	+++

MOG = Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein; LFB = *Luxol Fast Blue*; PAS = *periodic acid Schiff reaction*; PLP = Proteolipid-Protein; Vakuolen: leere Vakuolen (neutrale Lipide)

In früh aktiven Läsionen sind wenige, partiell entmarkte Myelinscheiden erkennbar. Die Läsionen sind massiv von Makrophagen infiltriert, die eine stark positive Reaktion für die Aktivierungsmarker MRP14 und 27E10 zeigen und durch LFB anfärbbare Myelinabbauprodukte enthalten. Neben den prozentual häufigen Bestandteilen des Myelins wie MBP und PLP können immunhistochemisch auch weniger häufige Bestandteile wie MOG und CNPase in den Makrophagen nachgewiesen werden.

Spät aktive Läsionen sind den früh aktiven ähnlich, zeigen aber einen fortgeschrittenen Myelinabbau und sind daher von diesen immunhistochemisch durch nur noch prozentual häufige Myelinbestandteile wie MBP und PLP in den Makrophagen unterscheidbar; weniger häufige Myelinbestandteile wie etwa MOG und CNPase können bereits nicht mehr nachgewiesen werden. Ferner zeigen die Makrophagen nun nur noch für den Aktivierungsmarker 27E10 eine positive Reaktion.

In den inaktiven demyelinisierten Läsionen ist das Myelin vollständig entfernt, es findet sich aber weiterhin ein entzündliches Infiltrat aus T-Zellen und Makrophagen, deren Vakuolen entweder leer oder mit PAS-positiven Abbauprodukten gefüllt sind.

In den früh remyelinisierenden Läsionen sieht man bereits wieder erste neugebildete, dünne Myelinscheiden. Die Vakuolen der auch weiterhin vorhandenen Makrophagen sind nun zumeist leer, wobei auch PAS-positive Vakuolen noch zu finden sind. Gelegentlich lassen sich immunhistochemisch auch Myelinabbauprodukte in den Makrophagen nachweisen.

Spät remyelinisierte Läsionen, auch als *Shadow-Plaques* bezeichnet, weisen bereits wieder Myelinscheiden auf, die allerdings im Vergleich zur normalen weißen Substanz dünner und unregelmäßig erscheinen [BRÜCK *et al.*, 2003]. Es finden sich kaum noch Makrophagen, wohingegen nun eine Faserглиose beobachtet werden kann.

1.1.3.2 Neuropathologische Muster

Durch Untersuchungen zahlreicher bioptisch gewonnener Gewebeproben mit hohem Anteil aktiv entmarkender Läsionen konnte gezeigt werden, daß die pathologischen Veränderungen in den Plaques sich deutlich von Patient zu Patient unterscheiden, in zahlreichen Läsionen des selben Patienten allerdings sehr ähnlich sind; insgesamt konnten vier deutlich unterschiedliche Läsionsmuster identifiziert werden [LASSMANN *et al.*, 2001; LUCCHINETTI *et al.*, 1996, 1999, 2000], die Tabelle 2 im Überblick zeigt.

Allen Mustern gemein ist ein von Makrophagen und T-Zellen dominiertes entzündliches Infiltrat. Läsionen des Musters I sind in der Regel perivenös angeordnet, ihr Rand ist scharf begrenzt. Es kommt zu einer alle Myelinproteine im gleichen Maße betreffenden Reduktion derselben. Im weiteren Verlauf findet meist eine starke Remyelinisierung statt. Die Demyelinisierung wird als makrophagenvermittelt bzw. als durch Makrophagentoxine bewirkt angesehen; ebenso wird eine Beteiligung von T-Zellen angenommen.

Muster II weist große Ähnlichkeit mit Muster I auf, unterscheidet sich von diesem und allen anderen beschriebenen Mustern aber grundlegend durch die Ablagerung von Immunglobulinen, hauptsächlich vom Typ IgG, und des aktivierten terminalen Komplementkomplexes C9neo. Diese Charakteristika legen die ursächliche Beteiligung gegen Myelin gerichteter Antikörper mit anschließender komplementvermittelter Lyse des mit Antikörpern markierten Myelins nahe [STORCH *et al.*, 1998; GENAIN *et al.*, 1999].

Bei Läsionen des Musters III liegt keine perivenöse Anordnung der Entmarkung vor, die Ränder der Läsion sind diffus-unscharf. Im Vergleich zu den anderen Läsionsmustern, in denen es zu einem gleichmäßigen Verlust aller Myelinproteine kommt, steht hier der Verlust des weit distal in den Oligodendrozytenfortsätzen konzentrierten Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) [ITOYAMA *et al.*, 1980] zu Beginn deutlich im Vordergrund; man spricht daher von einer distalen Oligodendrogliopathie. Dort, wo der

selektive Verlust des MAG hauptsächlich zu finden ist, weisen die Nuclei der Oligodendrozyten mit Kondensation und Fragmentation typische Merkmale einer Apoptose auf. Ein starker Oligodendrozytenverlust findet sich hauptsächlich in der Grenzregion zwischen aktiver Läsion und umgebender weißer Substanz, wohingegen im inaktiven Zentrum kaum Oligodendrozyten zu finden sind; eine spätere Remyelinisierung erfolgt nur in einem sehr geringen Ausmaß. Dieses Muster weist pathologische Ähnlichkeiten mit einer ischämisch bedingten Schädigung der weißen Substanz auf [ABOUL-ENEIN *et al.*, 2003]. Es ist bislang unklar, ob hier eine Vaskulitis mit Störung der Mikrozirkulation vorliegt oder ob entzündungsmediierende Substanzen eine Störung der Mitochondrien mit folgender Energiedefizienz herbeiführen [LASSMANN, 2003].

Tabelle 2: Läsionsmuster (modifiziert) nach LUCCHINETTI *et al.* (2000), S. 709; ergänzt nach LUCCHINETTI (2004)

	Muster I	Muster II	Muster III	Muster IV
Entzündliches Infiltrat				
Makrophagen	+++	+++	+++	+++
T-Zellen	++	++	++	++
Aktiviertes Komplement (C9neo)	-	++	-	-
Demyelinisierung				
Perivenöse Anordnung	+	+	-	+/-
Läsionsrand	scharf	scharf	unscharf	scharf
Konzentrisches Muster	-	-	~ 1/3	-
Oligodendrozyten				
Anzahl in DM	+++	+++	+	+
DNA-Fragmentierung	+/-	+/-	++ (Apoptose)	++ (PPWM)
Apoptosen	-	-	~ 25%	-
Myelinprotein-Verlust	gleichmäßig	gleichmäßig	MAG > andere	gleichmäßig
Remyelinisierung				
Shadow-Plaques	++	++	+/-	+/-
Häufigkeit				
nach LUCCHINETTI (2004)	15 %	58 %	26 %	1 %

DM = demyelinisierte Läsion; MAG = Myelin-assoziiertes Glykoprotein; PPWM = *periplaque white matter*

Im Muster IV kommt es zu einem Oligodendrozytenuntergang in der die Läsion umgebenden weißen Substanz (*periplaque white matter*, PPWM) in unmittelbarer Nähe des Bereichs der Myelinzerstörung, wobei die Oligodendrozyten nicht die charakteristischen morphologischen Merkmale der Apoptose aufweisen. Zu einer Remyelinisierung kommt es aufgrund des nahezu vollständigen Oligodendrozytenverlustes sowohl in den aktiven als auch in den inaktiven Bereichen der Läsionen praktisch nicht. Hier wird eine Schädigung durch Makrophagentoxine vor dem Hintergrund einer metabolischen Störung der Oligodendrozyten, möglicherweise aufgrund eines genetischen Defekts, angenommen.

In nachfolgenden Studien sind weitere Hinweise für deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mustern gefunden worden. So zeigte sich im Vergleich der Muster II und III eine unterschiedliche Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR1 und CCR5 auf mononukleären phagozytischen Zellen, welche auf eine unterschiedliche Aktivierung dieser Zellen hinweist [MAHAD *et al.*, 2004]. Auch ist bereits ein gutes Ansprechen auf Plasmapherese von Fällen des Musters II gegenüber einem mangelnden Ansprechen von Fällen der Muster I und III demonstriert worden [KEEGAN *et al.*, 2004, 2005].

Auffallend ist, daß atypische Varianten der MS durchgehend große Ähnlichkeiten mit jeweils einem neuropathologischen Muster aufweisen, wenngleich natürlich Unterschiede vorhanden sind [STADELMANN und BRÜCK, 2004]. Die Neuromyelitis optica *DEVIC* repräsentiert möglicherweise den Prototyp einer Muster-II-Erkrankung [LUCCHINETTI *et al.*, 2002], wohingegen die konzentrische Sklerose *BALÓ* eine Dystrophie der Oligodendrozyten mit Expression von Hitzeschockprotein 70 und des hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α hauptsächlich in Oligodendrozyten aufweist und somit mit Muster III in Verbindung gebracht werden kann [STADELMANN *et al.*, 2005].

1.1.3.3 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Zur Sammlung weiterer Erkenntnisse über die Pathogenese der Multiplen Sklerose sowie zur Überprüfung etwaiger Therapieansätze bedient man sich verschiedener Tiermodelle, die in klinischer und pathologischer Hinsicht eine möglichst große Ähnlichkeit mit der MS aufweisen sollen.

Hauptsächlich ist hier die EAE (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) zu nennen, die durch Immunisierung mit Myelinantigenen in zahlreichen Nagetierspezies und auch in Affen hervorgerufen werden kann [GENAIN und HAUSER, 1997; RAO und SEGAL, 2004]. Insbesondere unter Verwendung verschiedener „Knockout“-Mäuse läßt sich die Einflußnahme einzelner Faktoren selektiv untersuchen.

Vor dem Hintergrund der Hypothese der Einflußnahme eines Umweltfaktors – z.B. einer Virusinfektion – in der Kindheit (s. Abschnitt 1.1.2) sind auch zwei virusinduzierte Modelle von besonderem Interesse. Zu nennen sind hier das TMEV-Modell (*Theiler's murine encephalomyelitis virus*) [OLESZAK *et al.*, 2004] und das MHV-Modell (*murine hepatitis virus*) [MATTHEWS *et al.*, 2002].

Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß einige Autoren die Tiermodelle aufgrund gravierender Unterschiede zur humanen Erkrankung sehr kritisch beurteilen [MESTAS und HUGHES, 2004; SRIRAM und STEINER, 2005]; zur Betrachtung von Teilaspekten pathologischer Vorgänge können sie jedoch dienen.

1.1.4 Klinik

Die Ausprägung klinischer Symptome zeigt eine große interindividuelle Variabilität. Gut ein Drittel der Patienten weist über eine lange Zeit nahezu keine Behinderung auf, ein weiteres Drittel nur eine leichte Behinderung. Im Gegensatz hierzu gibt es schwere Fälle, bei denen der Patient beispielsweise durch Bettlägerigkeit und einen gestörten Schluckakt schwerst pflegebedürftig ist.

Typisch für die MS sind zeitlich unabhängig auftretende verschiedenste neurologische Symptome als Ausdruck der Dissemination in Raum und Zeit – da die Erkrankung das gesamte Zentralnervensystem befallen kann, sind nahezu alle zerebralen und spinalen Krankheitszeichen denkbar. Häufige Initialsymptome sind motorische und sensible Störungen, retrobulbäre Optikusneuritis, Augenmotilitätsstörungen, zerebelläre Symptome (*CHARCOT-Trias*: Nystagmus, Intentionstremor, skandierendes Sprechen), vegetative Regulationsstörungen oder auch psychische Auffälligkeiten.

Als besonders belastend gilt das für die MS typische *Fatigue*-Syndrom, bei dem die Patienten unter ausgeprägtem Erschöpfungsgefühl leiden [GIOVANNONI, 2006].

Das Ausmaß der Symptomatik kann mit der *KURTZKE-Skala (expanded disability status scale, EDSS, Tabelle 3)* angegeben werden [KURTZKE, 1983]. Dabei werden Beeinträchtigungen acht funktioneller Systeme (FS) berücksichtigt: pyramidale Funktion, zerebelläre Funktion, Hirnstammfunktion, Sensorik, Darm- und Blasenfunktion, Funktion des visuellen Systems, zerebrale Funktion und eine Gruppe anderer Funktionen.

Tabelle 3: *Expanded disability status scale (EDSS)* nach McDONALD I und COMPSTON (2005), S. 289

Wert	Beschreibung
0,0	Unauffällige neurologische Untersuchung
1,0	Keine Einschränkung, minimale Symptome in einem FS
1,5	Keine Einschränkung, minimale Symptome in mehr als einem FS
2,0	Minimale Einschränkung in einem FS
2,5	Milde Einschränkung in einem FS oder minimale Einschränkung in zwei FS
3,0	Moderate Einschränkung in einem FS oder milde Einschränkung in drei bis vier FS; voll gehfähig
3,5	Voll gehfähig, aber moderate Einschränkung in einem FS und mehr als minimale Einschränkung in mehreren anderen FS
4,0	Voll gehfähig ohne Hilfe, selbständig, trotz relativ schwerer Einschränkung um 12 Stunden am Tag auf; kann ohne Hilfe oder Pause 500m gehen
4,5	Voll gehfähig ohne Hilfe, die meiste Zeit des Tages auf, in der Lage, den ganzen Tag zu arbeiten, aber andererseits Einschränkung der vollen Aktivität oder minimale Hilfe nötig; kann ohne Hilfe oder Pause 300m gehen
5,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause über 200m; Einschränkungen beeinträchtigen alltägliche Tätigkeiten
5,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause über 100m; Einschränkungen schließen manche alltäglichen Tätigkeiten aus
6,0	Intermittierend oder einseitig dauerhaft Gehhilfe nötig, um mit oder ohne Pause 100m gehen zu können
6,5	Dauerhaft beidseitige Gehhilfe nötig, um ohne Pause 20m gehen zu können
7,0	Auch mit Hilfe nur bis zu fünf Metern gehfähig; auf den Rollstuhl angewiesen; im Rollstuhl alleine mobil und etwa 12 Stunden auf
7,5	Nur wenige Schritte möglich; auf den Rollstuhl und zum Teil auch hier auf Hilfe angewiesen; nicht den gesamten Tag auf; evtl. motorgetriebener Rollstuhl notwendig
8,0	Hauptsächlich im Bett liegend oder im Rollstuhl sitzend; selbständige Körperpflege möglich; Arme im allgemeinen noch funktionsfähig
8,5	Hauptsächlich im Bett liegend; Funktion der Arme eingeschränkt; selbständige Körperpflege eingeschränkt
9,0	Bettlägerig, sprechen und essen möglich
9,5	Bettlägerig, völlig hilflos; unfähig, effektiv zu kommunizieren oder zu essen/zu schlucken
10,0	Tod in Folge der Multiplen Sklerose

FS = Funktionelles System

1.1.4.1 Verlaufsformen

Der zeitlichen Abfolge und der Art und Weise des Auftretens der Symptome nach wird die Multiple Sklerose in verschiedene Verlaufsformen eingeteilt, die LUBLIN und REINGOLD (1996) definiert haben (Abbildung 1).

Man unterscheidet

- einen Verlauf in Schüben (*relapsing-remitting, RR-MS*) mit vollständigen (Abb. 1 a) oder unvollständigen (Abb. 1 b) Remissionen,
- einen primär chronisch-progredienten Verlauf (*primary-progressive, PP-MS*) ohne Schübe und Remissionen (Abb. 1 c) oder mit Perioden von Stillstand und/oder gelegentlicher Besserung (Abb. 1 d),
- einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf (*secondary-progressive, SP-MS*), bei dem die Erkrankung nach einem initial schubförmigen Verlauf in einen chronisch-progredienten Verlauf (Abb. 1 e) oder einen chronisch-progredienten Verlauf mit gelegentlichen Schüben und leichten Remissionen (Abb. 1 f) übergeht,
- sowie einen progredient-schubförmigen Verlauf (*progressive-relapsing, PR-MS*), bei dem vom Beginn der Erkrankung an ein chronisches Fortschreiten mit Schüben und relativ zum Schub vollständigen (Abb. 1 g) oder auch unvollständigen Remissionen (Abb. 1 h) zu finden ist.

Bei dem weitaus größten Teil der Patienten findet man einen zunächst schubförmigen Verlauf, der bei der Hälfte dieser Patienten innerhalb von zehn Jahren in eine sekundär chronisch-progrediente Form übergeht; etwa 20% zeigen dagegen einen primär chronisch-progredienten Verlauf.

Darüber hinaus zählt man zum Formenkreis der Multiplen Sklerose einen schweren akuten Verlauf, der innerhalb von Wochen oder Monaten zum Tode führt und nach dem Erstbeschreiber als „*MARBURG-Typ*“ bezeichnet wird [MARBURG, 1906], die Neuromyelitis optica *DEVIC*, die konzentrische Sklerose *BALÓ* und die myelinoklastische Sklerose *SCHILDER*.

Abbildung 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose nach LUBLIN und REINGOLD (1996), S. 908 ff.

[x-Achse: Zeit; y-Achse: Symptomatik] **a)** schubförmiger Verlauf mit vollständigen Remissionen; **b)** schubförmiger Verlauf mit unvollständigen Remissionen; **c)** primär progredienter Verlauf; **d)** primär progredienter Verlauf mit Perioden von Stillstand und/oder gelegentlicher Besserung; **e)** sekundär progredienter Verlauf: nach wenigen Schüben stellt sich chronisches Fortschreiten ein; **f)** nach einigen Schüben chronisches Fortschreiten mit gelegentlichen leichten Schüben und Remissionen; **g)** progredient-schubförmiger Verlauf; **h)** ähnlicher Verlauf wie **g**, jedoch keine vollen Remissionen

1.1.4.2 Diagnostik

Die Diagnose der Multiplen Sklerose stützt sich im wesentlichen auf die Bewertung des klinischen Bildes und Verlaufs, bildgebende Diagnostik [CLANET und BERRY, 1998; MILANESE *et al.*, 1988; MUSHLIN *et al.*, 1993; YETKIN *et al.*, 1991], Liquoruntersuchung [CEPOK *et al.*, 2001; MEHTA, 1991] und Aufzeichnung evozierter Potentiale [FRIEDLI und FUHR, 1990; RAVNBORG *et al.*, 1992]. Von Bedeutung sind nach wie vor die von POSER CM *et al.* (1983) etablierten Kriterien, die aber immer mehr von den Kriterien nach McDONALD WI *et al.* (2001) verdrängt werden (Tabelle 4), für die hohe Spezifität und Sensitivität gezeigt werden konnten [DALTON *et al.*, 2002; TINTORE *et al.*, 2003].

Tabelle 4: Kriterien zur Diagnose der Multiplen Sklerose nach McDONALD WI *et al.* (2001), S. 124

Klinische Präsentation (Schübe)	Objektivierbare klinische Läsionen	Weitere erforderliche Kriterien
≥ 2	≥ 2	Keine; klinische Evidenz ausreichend
≥ 2	1	Räumliche Dissemination im MRT <i>oder</i> positiver Liquorbefund und ≥ 2 MS-typische Läsionen im MRT <i>oder</i> weiterer klinischer Schub
1	≥ 2	Zeitliche Dissemination im MRT <i>oder</i> zweiter klinischer Schub
1 (monosymptomatische Präsentation)	1	Räumliche Dissemination im MRT <i>oder</i> ≥ 2 MS-typische Läsionen im MRT mit positivem Liquorbefund <i>und</i> zeitliche Dissemination im MRT <i>oder</i> zweiter klinischer Schub
0 (PP-MS)	1	Positiver Liquorbefund <i>und</i> räumliche Dissemination im MRT ≥ 9 T2-Läsionen im Gehirn <i>oder</i> ≥ 2 Läsionen im Rückenmark <i>oder</i> 4-8 cerebrale und 1 Rückenmarks-Läsion <i>oder</i> positive VEPs mit 4-8 Läsionen im MRT <i>oder</i> positive VEPs mit <4 Gehirnläsionen und 1 Rückenmarksläsion <i>und</i> zeitliche Dissemination im MRT (kontinuierliche Progression für ein Jahr)

MRT = Magnetresonanztomographie; PP-MS = primär chronisch-progredienter Verlauf; VEP = visuell evoziertes Potential

Die Erfüllung der einzelnen Kriterien ist dabei an folgende Bedingungen geknüpft:

- Ein Schub ist definiert als neue klinische Ausfälle oder Reaktivierung bereits früher aufgetretener klinischer Ausfälle, die subjektiv berichtet oder durch Untersuchung objektiviert werden können; diese müssen mindestens 24 Stunden anhalten, dürfen frühestens 30 Tage nach einem vorausgegangenen Schub auftreten und dürfen nicht durch Änderung der Körpertemperatur oder durch Infektionen erklärbar sein.
- Für die Demonstration einer räumlichen Dissemination gelten die Kriterien nach BARKHOF *et al.* (1997) und TINTORE *et al.* (2000).
- Für die Demonstration einer zeitlichen Dissemination durch MRT muß nach ≥ 3 Monaten nach einem klinischen Schub eine Kontrastmittel aufnehmende Läsion an anderer Lokalisation als beim vorangegangenen klinischen Schub nachgewiesen werden, *oder*, falls nach ≥ 3 Monaten nach einem Schub keine Kontrastmittel aufnehmende Läsion nachgewiesen werden konnte, muß nach weiteren ≥ 3 Monaten eine neue Kontrastmittel aufnehmende oder T2-Läsion nachgewiesen werden.
- Als positiver Liquorbefund gilt der Nachweis oligoklonaler Banden bzw. ein erhöhter IgG-Index.
- Visuell evozierte Potentiale (VEP) werden als für die MS typisch pathologisch betrachtet, wenn sie verzögert sind, aber eine gut erhaltene Konfiguration aufweisen.

Vor dem Hintergrund der von LUCCHINETTI *et al.* (2000) identifizierten unterschiedlichen Läsionsmuster und des unterschiedlichen Ansprechens der einzelnen Verlaufsformen auf Therapieversuche (s. Abschn. 1.1.4.3) kann das Ziel formuliert werden, *In-vivo*-Marker zur Identifizierung des immunpathologischen Musters der MS zu finden, um in Zukunft eine differenziertere Therapie zu ermöglichen [BITSCH und BRÜCK, 2002]. Als im Liquor bestimmbarer Marker für Muster-III-Erkrankungen wird beispielsweise ein endogenes Epitop diskutiert, das mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein Nucleocapsid-Protein des Hundestaupevirus' detektierbar ist [LASSMANN *et al.*, 2003]. Auch konnten unterschiedliche Muster in der Liquor-Zytologie, bei der das Verhältnis von B-Zellen und Monozyten positiv mit der Progression der Erkrankung korreliert, gezeigt werden [CEPOK *et al.*, 2001].

1.1.4.3 Therapie

Eine kausale Therapie der Multiplen Sklerose ist bisher nicht verfügbar. Bislang macht man die Wahl der Therapie von der klinischen Verlaufsform der Erkrankung abhängig [CORBOY *et al.*, 2003; RIECKMANN *et al.*, 2004]. Jedoch unterstreicht insbesondere eine neuere Arbeit die von BITSCH und BRÜCK (2002) formulierte Notwendigkeit zur Ausrichtung der Behandlung nach dem vorliegenden neuropathologischen Muster: KEEGAN *et al.* (2004, 2005) demonstrierten ein gutes Ansprechen von Fällen des Musters II auf Plasmapherese gegenüber einem mangelnden Ansprechen von Fällen der Muster I und III.

Im akuten Schub werden Glukokortikoide gegeben [OHNO *et al.*, 1987], die sowohl anti-inflammatorisch wirken [JOYCE *et al.*, 1997] als auch die Blut-Hirn-Schranke stabilisieren [GAILLARD *et al.*, 2001]; es gibt ferner Hinweise, daß Glukokortikoide Oligodendrozyten vor TNF- α - und IFN- γ -vermittelter Apoptose schützen [MELCANGI *et al.*, 2000]. Darüber hinaus reduzieren sie die Produktion von Stickoxid (NO) durch Mikroglia dramatisch [GOLDE *et al.*, 2003]. Möglicherweise fördern sie jedoch auch neuronalen Zelltod [DIEM *et al.*, 2003, 2005].

Im Falle des Versagens der Therapie des akuten Schubes mit Glukokortikoiden kann ein Plasmaaustausch vorgenommen werden, auf den im Rahmen einer kürzlich veröffentlichten Studie 71% der Patienten ein gutes oder sehr gutes Ansprechen durchschnittlich nach der dritten Plasmapheresebehandlung zeigten [SCHILLING *et al.*, 2005; vgl. auch KEEGAN *et al.*, 2004, 2005].

Zur Langzeittherapie und Schubprophylaxe werden immunmodulatorische und immunsupprimierende Substanzen eingesetzt. So finden z.B. β -Interferone [BAYAS und GOLD, 2003] und Glatiramer-Acetat [WOLINSKY, 2006] ebenso wie Azathioprin und Methotrexat [FERNÁNDEZ *et al.*, 2004] oder Mitoxantron [EDAN *et al.*, 2004] Verwendung. Ferner kommt auch die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIg) in Betracht [STANGEL und GOLD, 2005].

Eine schubförmig verlaufende MS wird üblicherweise zunächst mit IFN- β oder Glatiramer-Acetat behandelt, auch eine sekundär chronisch-progrediente MS kann mit IFN- β behandelt werden [CORBOY *et al.*, 2003]. Zeigt dies keine hinreichende Wirkung, so wird eine Therapieeskalation [RIECKMANN *et al.*, 2004] – insbesondere zur Erhaltung der

Gehfähigkeit – betrieben und Mitoxantron verabreicht. Gegen die primär chronisch-progrediente MS gibt es derzeit keine belegbar effektive Therapie [LEARY und THOMPSON, 2005].

Darüber hinaus wird symptomatisch therapiert. Beispielsweise kann eine Spastik mit Baclofen oder Tizanidin behandelt werden.

Mit fortschreitender Kenntnis der pathologischen Mechanismen der MS rücken immer mehr mögliche therapeutische Ansätze in den Blickpunkt, die jedoch weiterer Überprüfung bedürfen. So wird der Einsatz von HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffen („Statinen“) gegen die Multiple Sklerose angedacht: Statine bewirken eine Reduktion der T_H1 -Antwort sowie eine Steigerung der T_H2 -Antwort [HAKAMADA-TAGUCHI *et al.*, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2002] und führen somit zu einer Verminderung der entzündlichen Infiltration, wie am EAE-Modell gezeigt werden konnte [AKTAS *et al.*, 2005].

Ein weiterer neuer Ansatzpunkt ist der NMDA-Rezeptor, dem eine wichtige Rolle beim Verlust der Integrität der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben wird – hier könnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten stabilisierend wirken [PAUL und BOLTON, 2002]. Darüber hinaus wird eine Beteiligung des NMDA-Rezeptors bei der Schädigung von Neuronen und Oligodendrozyten durch aktivierte Mikroglia diskutiert [PITT *et al.*, 2000; TAKEUCHI *et al.*, 2005].

1.2 Axonale Schädigung

1.2.1 Bedeutung der axonalen Schädigung bei Multipler Sklerose

Obwohl bereits früh auch axonale Schädigung beschrieben wurde [CHARCOT, 1868], ging man lange von einem „relativen Axonerhalt“, von einer weitgehenden Aussparung der Axone vom Krankheitsgeschehen aus [MARBURG, 1906]. In den letzten Jahren ist jedoch immer mehr auch deren Schädigung Gegenstand wissenschaftlichen Interesses geworden.

Im Tierversuch konnte belegt werden, daß es auch bei massiver Demyelinisierung nicht zwangsläufig zu Funktionsausfällen kommt [MURRAY *et al.*, 1998a; RIVERA-QUIÑONES *et al.*, 1998]. Als Ursache für die bleibenden Behinderungen bei der MS muß daher zumindest teilweise auch ein anderer Mechanismus als die Demyelinisierung alleine in Betracht gezogen werden.

Axonale Schädigung trägt signifikant zu den bleibenden klinischen Ausfällen bei, wie sowohl mittels bildgebender Verfahren [DE STEFANO *et al.*, 2001; LEE MA *et al.*, 2000] als auch durch das TMEV- [URE und RODRIGUEZ, 2002] und EAE-Modell [WUJEK *et al.*, 2002] der MS gezeigt werden konnte. Dabei korreliert die funktionelle Einschränkung bei MS eher mit der axonalen Schädigung als mit der Demyelinisierung [PENDLEBURY *et al.*, 2000].

Allem Anschein nach sind vor allem dünnere Axone von der Schädigung betroffen [DELUCA *et al.*, 2004; EVANGELOU *et al.*, 2001; GANTER *et al.*, 1999; LOVAS *et al.*, 2000]. Auffällig ist eine große interindividuelle Variabilität in der Ausprägung der axonalen Schädigung [BITSCH *et al.*, 2000a; MEWS *et al.*, 1998], die beträchtlich sein kann: so sind in chronischen Läsionen von MS-Patienten Verluste von bis zu 65% beobachtet worden [LOVAS *et al.*, 2000; MEWS *et al.*, 1998].

Eine neuere Untersuchung von DELUCA *et al.* (2004) ergab darüber hinaus Hinweise, daß die axonale Schädigung bei der MS möglicherweise traktspezifisch ist. So zeigte sich bei corticospinalen Bahnen eine Reduktion der Axondichte über die gesamte Länge des spinalen Myelons, wohingegen sensorische Bahnen eine signifikante Reduktion der Axondichte nur in den oberen Regionen des spinalen Myelons aufwiesen.

1.2.2 Akute axonale Schädigung

Akute Schädigung von Axonen trägt bereits ab frühesten Stadien der Erkrankung zur funktionellen Einschränkung des Patienten bei, wie u.a. Untersuchungen mit Proton-Magnetresonanztomographie und N-Acetylaspartat (NAA) als Marker für axonale Integrität gezeigt haben [DE STEFANO *et al.*, 2001; FILIPPI *et al.*, 2003]. Bei der schubförmigen und der sekundär chronisch-progredienten Verlaufsform ist die akute axonale Schädigung in den frühen Phasen der Erkrankung deutlich stärker ausgeprägt als im weiteren Verlauf, während es bei der primär chronisch-progredienten Verlaufsform keine signifikanten Unterschiede während des Verlaufs der Erkrankung gibt [KUHLMANN *et al.*, 2002]. Es wird angenommen, daß bei der schubförmigen Verlaufsform der MS die axonalen Ausfälle zunächst bis zu einem gewissen Maße funktionell kompensiert werden können; ist dies nicht mehr der Fall, geht die Erkrankung in die sekundär chronisch-progrediente Form über [PETZOLD *et al.*, 2005; TRAPP *et al.*, 1999b].

Vor allem in aktiv demyelinisierenden Läsionen, aber auf niedrigerem Niveau auch in inaktiven demyelinisierten sowie in remyelinisierenden Läsionen ist akute axonale Schädigung zu finden, nicht jedoch in bereits remyelinisierten Plaques [BITSCH *et al.*, 2000a; FERGUSON *et al.*, 1997; KORNEK *et al.*, 2000]. Auch aus dem TMEV- und MHV-Modell gibt es Hinweise, daß für die akute Schädigung eines Axons dessen Demyelinisierung notwendig ist bzw. die Demyelinisierung eine Schädigung begünstigt [DANDEKAR *et al.*, 2001; URE und RODRIGUEZ, 2002]. Neben der akuten axonalen Schädigung kommt es zu einer fortwährenden, chronischen Schädigung von Axonen auf deutlich geringerem Niveau in inaktiven Plaques [KORNEK *et al.*, 2000].

Als pathologisches Korrelat der akuten axonalen Schädigung sind APP⁺-Aufreibungen [z.B. FERGUSON *et al.*, 1997] oder gar axonale Durchtrennungen [TRAPP *et al.*, 1998] zu nennen (vgl. Abschn. 2.2.2.1).

1.2.3 CD8⁺-T-Lymphozyten

Zahlreiche Hinweise lassen eine besondere Bedeutung der CD8⁺-T-Zellen im Zusammenhang mit der axonalen Schädigung vermuten. TRAPP *et al.* (1998, 1999a) fanden eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der akuten axonalen

Schädigung und dem Ausmaß der Entzündung. Dabei zeigte vor allem die Anzahl CD8⁺-T-Lymphozyten in den Läsionen, nicht jedoch die gesamte CD3⁺-T-Zellpopulation oder die Expression von TNF- α oder iNOS einen Zusammenhang mit dem Ausmaß der axonalen Schädigung [BITSCH *et al.*, 2000a; KUHLMANN *et al.*, 2002].

Weitere Hinweise für eine Beteiligung der CD8⁺-T-Zellen geben nicht nur der Nachweis oligoklonaler Expansion und häufiger Dominanz von CD8⁺-T-Zellen in Läsionen bei MS-Patienten [BABBE *et al.*, 2000; JACOBSEN *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2003], sondern auch Ergebnisse aus dem TMEV-Modell. So zeigten trotz vorhandener Demyelinisierung CD8-defiziente Mäuse im Gegensatz zu CD4-defizienten Tieren keine oder nur minimale funktionelle Ausfälle [MURRAY *et al.*, 1998a], wie auch MHC-I-defiziente im Gegensatz zu MHC-II-defizienten Mäusen nahezu keine funktionellen Ausfälle boten [RIVERA-QUÍÑONES *et al.*, 1998]; Perforin-defiziente Tiere zeigten ebenfalls nur minimale neurologische Defizite [MURRAY *et al.*, 1998b]. Die Inhibition von viruspeptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellen führte zu einer deutlichen Verminderung der neurologischen Störungen [JOHNSON *et al.*, 2001]. Überraschenderweise zeigte eine neuere Arbeit jedoch, daß es bei β 2-Mikroglobulin-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der MOG- als auch rMBP-induzierten EAE zu einer erheblich stärkeren Ausprägung der Erkrankung mit deutlich stärkerer axonaler Schädigung kommt [LINKER *et al.*, 2005].

Die *In-vivo*-Expression von MHC-I-Molekülen wurde auf Neuronen und auch auf Oligodendrozyten, Mikroglia und Endothelzellen bei akuter MHV-Infektion nachgewiesen, wohingegen nur Mikrogliazellen auch MHC-II exprimiert haben [REDWINE *et al.*, 2001]. An der Ratte wurde gezeigt, daß Neurone MHC-I exprimieren, wenn sie IFN- γ ausgesetzt sind und ihre elektrische Aktivität geblockt wurde – also unter Bedingungen, wie sie in einer Läsion der MS mit entzündlichem Infiltrat und Demyelinisierung herrschen [NEUMANN *et al.*, 1995, 1997]. In aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen, insbesondere beim *MARBURG*-Typ, wurde die Expression von MHC-I auf Neuronen und auch Axonen nachgewiesen [HÖFTBERGER *et al.*, 2004].

Da die durch CD8⁺-T-Lymphozyten vermittelte Zellschädigung abhängig ist von der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-I/Peptid-Komplex [KÄGI *et al.*, 1996] läßt sich somit feststellen, daß Axone in MS-Läsionen die Voraussetzungen für die Schädigung durch CD8⁺-T-Zellen erfüllen.

Welcher Effektormechanismus bei der Schädigung von Neuronen durch antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen von Bedeutung ist, wird kontrovers diskutiert; während einige Gruppen Hinweise auf eine Beteiligung von Perforin und Granzym fanden [BIEN *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 1998b; NEUMANN *et al.*, 2002; RENSING-EHL *et al.*, 1996], sahen andere Hinweise für eine Beteiligung des Fas(APO-1/CD95)-Weges, nicht jedoch von Perforin [MEDANA *et al.*, 2000].

Die selektive Schädigung von MHC-I-exprimierenden Neuriten durch viruspeptid-spezifische CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten mit Ausbildung von Sphäroiden unter Aussparung der Zellkörper der Nervenzellen wurde bereits an Zellkulturen der Maus mit virustransfizierten Zellen demonstriert [MEDANA *et al.*, 2001].

Im Falle der Rasmussen-Enzephalitis demonstrierten BIEN *et al.* (2002) die Zerstörung von Neuronen durch CD8⁺-T-Zellen auch beim Menschen. Hier zeigte ein Anteil von 7% der CD8⁺-Zellen des lymphozytären Infiltrats eine enge Anlagerung an MHC-I-exprimierende Neurone; dabei wurde eine zu den Neuronen hin gerichtete polare Ausrichtung von Granzym B innerhalb der Lymphozyten nachgewiesen.

In MS-Hirngewebe konnten NEUMANN *et al.* (2002) Kontakte von demyelinisierten Axonen und CD8⁺-T-Zellen, deren Granzym-B-Granula zur Oberfläche des Axons hin orientiert waren, demonstrieren.

Im Gegensatz zu diesen MHC-I-abhängigen Schädigungen von Neuronen wurde von GIULIANI *et al.* (2003) auch die selektive, kontaktabhängige Schädigung von humanen fetalen Neuronen in Kultur über MHC-I-unabhängige Mechanismen durch polyklonal aktivierte syngene T-Zellen beschrieben. Dabei zeigten die T-Zellen eine Anlagerung an Axone und Zellkörper der Neurone; nicht aktivierte T-Zellen zeigten keinen zytotoxischen Effekt. Es wurde kein Unterschied in der Zytotoxizität zwischen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen gefunden. Oligodendrozyten und Astrozyten wurden nicht geschädigt.

Auch eine weitere Gruppe zeigte kürzlich eine MHC-unabhängige Schädigung von Neuronen durch T-Zellen in lebendem Hirngewebe [NITSCH *et al.*, 2004]. Hierbei führte direkter Kontakt zwischen Proteolipid-Protein- und Ovalbumin-spezifischen T-Zellen und Neuronen zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels in den Neuronen.

1.2.4 Makrophagen / Mikroglia

Wie auch zwischen T-Zellen und axonaler Schädigung, so findet sich auch eine deutliche positive Korrelation zwischen der Anzahl der Makrophagen / Mikroglia in den Läsionen und dem Ausmaß der akuten axonalen Schädigung [BITSCH *et al.*, 2000a; KUHLMANN *et al.*, 2002]. In einer neueren Untersuchung von HEPPNER *et al.* (2005) konnte gezeigt werden, daß mikrogliale Paralyse zu einer erheblichen Abschwächung von MOG-EAE mit starker Reduktion der Inflammation führt. Auch die Unterdrückung der Makrophagenaktivierung führt zu einer starken Abschwächung von EAE [MARTINEY *et al.*, 1998]. An kultivierten Neuronen der Maus in Co-Kultur mit Makrophagen konnte gezeigt werden, daß diese schnell eine Cytotoxizität entwickeln und zu axonaler Schädigung, jedoch ohne Zelltod der Neuronen führen können [ARANTES *et al.*, 2000].

Die schädigende Wirkung von Makrophagen / Mikroglia beruht nach überwiegender Ansicht auf der Schaffung eines entzündlichen Milieus durch Ausschüttung zahlreicher potentiell schädigender Substanzen. Hierzu zählen beispielsweise Cytokine, Chemokine, die extrazelluläre Matrix degradierende Enzyme, Komplementkomponenten sowie Verbindungen mit reaktiven Sauerstoffradikalen [RAIVICH und BANATI, 2004].

In aktiven MS-Läsionen wurde eine starke Expression von iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) in perivaskulären und parenchymständigen Makrophagen nachgewiesen [BÖ *et al.*, 1994; DE GROOT *et al.*, 1997]. Auch LIU *et al.* (2001) fanden eine von Fall zu Fall variable Expression von iNOS in Makrophagen ausschließlich in akuten Läsionen. BITSCH *et al.* (2000a) fanden allerdings zwar eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der entzündlichen Infiltration, nicht jedoch zwischen der Expression von iNOS oder TNF- α und dem Ausmaß der axonalen Schädigung.

Durch *In-vivo*-Versuche an der Ratte wurde gezeigt, daß elektrisch aktive Axone unter Einwirkung von Stickoxid (NO) degenerieren, wobei weder die elektrische Stimulation noch die Einwirkung von NO alleine zur Degeneration führte [SMITH *et al.*, 2001]. Im Tierversuch wurde ferner belegt, daß demyelinisierte Axone eigenständig bis zu über zehn Stunden elektrische Aktivität bis zu einer Frequenz von 45 Hz generieren können [SMITH und McDONALD, 1982] und somit in entzündlichen Läsionen, in denen durch vermehrte Aktivität der iNOS vermehrt NO gebildet wird, ihren eigenen Untergang fördern können.

Verschiedene Wege der Zellschädigung durch Stickoxid (NO) bei MS werden diskutiert [SHERMAN *et al.*, 1992; SMITH und LASSMANN, 2002], darunter auch die kompetitive Blockade mitochondrialer Cytochrom-Oxidasen mit resultierendem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration und schließlich Na^+ -Einstrom, gefolgt von Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Kanäle [GARTHWAITE *et al.*, 2002; GIOVANNONI *et al.*, 1998; KAPOOR *et al.*, 2003]. *In-vitro*-Versuche an *Nervi optici* aus der Ratte, die Stickoxid ausgesetzt wurden, zeigten, daß Axone eine höhere Empfindlichkeit gegenüber NO aufweisen als Oligodendro- und Astrozyten [GARTHWAITE *et al.*, 2002]; dabei konnte die axonale Schädigung durch Entfernung von Na^+ und Ca^{2+} aus dem Medium oder aber durch Zugabe eines Natrium-Kanal-Blockers verhindert werden. Auch Versuche mit EAE-Tieren ergaben bei Gabe von Natrium-Kanal-Blockern eine deutlich geringere axonale Schädigung [BECHTOLD *et al.*, 2004; KAPOOR *et al.*, 2003] wie auch eine Reduktion der Infiltration durch Entzündungszellen sowie der phagozytischen Aktivität von Makrophagen / Mikroglia [CRANER *et al.*, 2005]; entsprechende EAE-Versuche mit Calcium-Kanal-Blockern erbrachten ähnliche Ergebnisse [BRAND-SCHIEBER und WERNER, 2004]. Kürzlich konnte eine deutlich verstärkte Expression von Natrium-Kanälen durch aktivierte Makrophagen und Mikrogliazellen in MS-Läsionen gezeigt werden [CRANER *et al.*, 2005]; somit scheinen Na^+ -Ionen nicht nur am Untergang von Neuronen, sondern auch an der Aktivierung von Makrophagen / Mikroglia beteiligt zu sein.

Offenbar ist der Grad der schädigenden Wirkung von Makrophagen und Mikroglia abhängig von oxidativem Streß [BAL-PRICE und BROWN, 2001; BARTNIK *et al.*, 2000]; es wird eine Konkurrenz von NO und Sauerstoff an mitochondrialen Cytochrom-Oxidasen angenommen [MANDER und BROWN, 2004].

Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen vermutet, deren Expression in Makrophagen in aktiven MS-Läsionen nachgewiesen wurde [VOS *et al.*, 2003]. Auch wurde die Expression von TNF- α durch Makrophagen hauptsächlich in aktiven MS-Läsionen beschrieben [BITSCH *et al.*, 2000b].

Anhand von MOG-EAE-Versuchen wurde demonstriert, daß in aktiven Läsionen Makrophagen dominieren, während in inaktiven demyelinisierten Läsionen vorwiegend Mikroglia zu finden ist [STORCH *et al.*, 2002]; auffällig war ferner ein offensichtlicher genetischer Einfluß auf die Ausprägung eines von Makrophagen oder Mikroglia dominierten Läsionsphänotypen. Interessanterweise zeigten Mikroglia-dominierte

Läsionen hierbei bei vergleichbarer Demyelinisierung eine deutlich geringere axonale Schädigung.

1.3 Fragestellung

Obwohl zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre die große Bedeutung der axonalen Schädigung bei der MS verdeutlicht haben, liegen die Mechanismen dieser Schädigung weiterhin weitgehend im Dunkeln. Neuere Untersuchungen legen allerdings eine Beteiligung von $CD8^+$ -T-Zellen und Makrophagen nahe.

Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragen zu klären:

- Zeigen T-Zellen in den MS-Läsionen im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen – wie viralen Enzephalitiden – eine vermehrte Anlagerung an akut geschädigte Axone?
- Gibt es diesbezüglich signifikante Unterschiede zwischen der gesamten $CD3^+$ -T-Zell-Population und $CD8^+$ -T-Zellen?
- Ist bei engem räumlichen Kontakt zwischen $CD8^+$ -T-Zellen und akut geschädigten Axonen innerhalb der T-Zellen eine zum Axon hin polare Ausrichtung von Vesikeln mit Effektormolekülen wie Granzym-B nachweisbar?
- Gibt es vermehrt Kontakte zwischen aktivierten Makrophagen und akut geschädigten Axonen?
- Gibt es bezüglich dieser Punkte Unterschiede zwischen den neuropathologischen Subtypen der MS?

2 Material und Methoden

2.1 Gewebe

Untersucht wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes, bioptisch gewonnenes Gewebe von 20 MS-Patienten (Alter: 5-57 Jahre, Durchschnittsalter 38,3 Jahre; 7 männlich, 13 weiblich) aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie der Universität Göttingen. Entnommen wurde das Gewebe aus mit bildgebenden Verfahren dargestellten MS-Läsionen. Tabelle 5 zeigt zusammenfassend die klinischen und pathologischen Daten der MS-Patienten. Von den Patienten 13 und 17 wurde Material aus zwei Gewebeblöcken untersucht.

Hinsichtlich der in die Untersuchung eingegangenen inaktiven Läsionen ist zu berücksichtigen, daß diese nach den Kriterien für die Aktivitätsbeurteilung (s. Abschn. 1.1.3.1) zwar als inaktiv eingestuft werden müssen, jedoch immer noch verhältnismäßig frühe Areale repräsentieren und nicht mit chronischen MS-Läsionen vergleichbar sind.

Es muß angemerkt werden, daß eine Biopsieentnahme nicht zur Standarddiagnostik bei einem Verdacht auf MS gehört und somit möglicherweise vermehrt sich zunächst atypische präsentierende Fälle in die Untersuchung eingegangen sind. Eine neuere Untersuchung von PITTOCK *et al.* (2005) konnte allerdings belegen, daß der weitaus größte Teil der Patienten, bei denen bioptisch eine entzündliche Demyelinisierung diagnostiziert wurde, im weiteren Verlauf eine MS entwickeln; demnach sind Ergebnisse aus Untersuchungen, die sich auf Biopsiematerial stützen, höchstwahrscheinlich auch auf die „typische, nicht-biopsierte“ MS übertragbar.

Als Vergleichsmaterial dienten Biopsien von drei Enzephalitis-Patienten aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie der Universität Göttingen (Tabelle 6).

Tabelle 5: Klinische und pathologische Daten der untersuchten MS-Patienten

Pat.-Nr.	Gö-Nr.	Geschl.	Alter	Krankheitsdauer	Klin. Verlauf	Entmarkungsaktivität	Neuropatholog. Muster	Block-Nr.
1	69	m	37	-	-	aktiv	I	99 / 388 III
2	79	w	32	1,5 Jahre	RR-MS	aktiv	I	14 / 02 a
3	84	w	30	1 Monat	RR-MS	aktiv	I	6779 / 02
4	53	w	28	23 Tage	RR-MS	aktiv	I	N 1281 / 99 I
5	98	w	44	5 Monate	RR-MS	aktiv	I	03 / 56 1421 / 03
6	165	m	54	-	-	aktiv	II	05 / 599 II
7	157	m	5	-	-	aktiv	II	04 / 1103 I N 1972 / 04
8	139	m	57	1,5 Monate	monoph.	aktiv	II	392 / 04 I
9	134	m	39	2 Wochen	monoph.	aktiv	II	04 / 1068
10	169	w	52	-	-	aktiv	III	B 05 / 975 II
11	138	m	39	2 Wochen	monoph.	aktiv	III	684 / 01 II 04 / 623 II
12	117	w	47	2,5 Monate	monoph.	aktiv	III	04 / 100
13 a	105	m	36	1,5 Monate	-	aktiv	III	03 / 187 II E 1141 / 02 II
13 b	105	m	36	1,5 Monate	-	aktiv	III	03 / 187 III E 1141 / 02 I
14	10	w	41	3 Jahre	RR-MS	aktiv	III	1122 / 00 III
15	16	w	39	8 Jahre	PP-MS	nicht aktiv	n.b.	N 276 / 94 III
16	65	w	31	1,5 Monate	monoph.	nicht aktiv	n.b.	1634 / 01
17 a	78	w	32	~ 2 Jahre	SP-MS	nicht aktiv	n.b.	96 / 13061
17 b	78	w	32	~ 2 Jahre	SP-MS	nicht aktiv	n.b.	96 / 21790 - 2
18	48	w	41	8 Wochen	-	nicht aktiv	n.b.	N 949 / 98
19	68	w	44	-	-	nicht aktiv	n.b.	796 / 01
20	8	w	38	< 1 Jahr	RR-MS	nicht aktiv	n.b.	1781 / 99

Gö-Nr. = Fall-Nummer im MS-Biopsie-Archiv des Instituts für Neuropathologie Göttingen; Alter = Alter des Patienten bei Durchführung der Biopsie; Krankheitsdauer = Zeit seit Auftreten erster Symptome zum Zeitpunkt der Biopsiedurchführung; w = weiblich; m = männlich; monoph. = monophasischer Verlauf; n.b. = neuropatholog. Muster bei inaktiven Läsionen nicht beurteilbar; die Einteilung in Verlaufsform, Entmarkungsaktivität und neuropatholog. Muster wurde anhand der in den Abschnitten 1.1.3.1, 1.1.3.2 und 1.1.4.1 genannten Kriterien durchgeführt.

Tabelle 6: Enzephalitis-Patienten

Pat.-Nr.	Biopsie-Nr. und Block	Geschl.	Alter	Diagnose	Bemerkungen
A	01 / 540 III	m	32	Lymphozytäre Enzephalitis	HHV-6 pos., aber Bedeutung unklar, da auch bei nicht Erkrankten in 30% pos.
B	03 / 679 II	m	23	Lymphozytäre Meningoenzephalitis	Hinweis auf Enterovirus-Infektion
C	03 / 918 III	w	37	Lymphozytäre Meningoenzephalitis	Hinweise auf virale Genese

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Grundlagen

Mit Hilfe von Antikörpern, Enzymen und Chromogenen lassen sich verschiedenste antigene Strukturen spezifisch anfärben. Hierbei bindet ein Primärantikörper zunächst an die gewünschte Struktur. Bereits dieser Primärantikörper kann enzymgekoppelt sein – das Enzym setzt schließlich ein Chromogen um, womit die Anfärbung der entsprechenden Struktur abgeschlossen ist. Meist werden zur Amplifizierung des Signals jedoch an den F_c-Anteil des Primärantikörpers bindende Sekundärantikörper verwendet, welche ihrerseits enzymgekoppelt oder auch biotinyliert sein können, was aufgrund der starken Affinität von Avidin zu Biotin die anschließende Verwendung von Avidin-gekoppelten Enzymen ermöglicht. Gebräuchliche Enzyme sind die Peroxidase, die u.a. Diaminobenzidin umsetzt, und die Alkalische Phosphatase, die u.a. Fast Red umsetzt. In der Fluoreszenzmikroskopie wird die Stelle der Enzyme von Fluoreszenzfarbstoffen eingenommen.

Abbildung 2: Schematische Darstellung einer indirekten Zwei-Schritt-Immunmarkierung

2.2.2 Detektierte Strukturen

Gegenstand dieser Untersuchung sind die gesamte T-Zell-Population, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen / Mikroglia sowie akut geschädigte Axone. Nachfolgend werden die zur Identifizierung herangezogenen Strukturen erläutert.

2.2.2.1 Axonale Marker

Amyloid precursor protein (APP)

Das Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) findet sich in Axonen und unterliegt einem schnellen anterograden axonalen Transport [KOO *et al.*, 1989]. In Axonen mit normaler Funktion bewegt sich die APP-Konzentration in einem mit herkömmlichen immunhistochemischen Methoden nicht nachweisbaren Bereich. Kommt es zur Schädigung oder gar Durchtrennung eines Axons und somit zur Unterbrechung des axonalen Transports, sammelt sich APP proximal vom Ort der Schädigung unter Ausbildung sogenannter APP-positiver Sphäroide an [FERGUSON *et al.*, 1997; TRAPP *et al.*, 1998], die nur für einen Zeitraum von weniger als 30 Tagen bestehen bleiben und somit als guter Marker für *akute* axonale Schädigung zu betrachten sind, wie Untersuchungen nach Trauma und ischämischem Infarkt gezeigt haben [BRAMLETT *et al.*, 1997; GENTLEMAN *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1995; PIERCE *et al.*, 1996; SHERRIFF *et al.*, 1994a, 1994b; YAM *et al.*, 1997, 1998]. Bislang ist ein minimaler zeitlicher Abstand zwischen Schädigung und immunocytochemischer Nachweisbarkeit einer APP-Kumulation von zwei Stunden, zwischen Schädigung und Ausbildung APP⁺-Aufreibungen von drei Stunden belegt [MCKENZIE *et al.*, 1996].

Der hier verwendete Antikörper des Klons 22C11 erkennt die Aminosäuren 66-81 des N-terminalen Endes des prä-A4-Moleküls und somit alle drei Isoformen des APP [HILBICH *et al.*, 1993; HOFFMANN *et al.*, 2000].

Neurofilament H (phosphoryliert)

Zur Detektion von ungeschädigten Axonen wurde der SMI31-Antikörper eingesetzt, der mit massiv phosphoryliertem Neurofilament H und in geringerem Ausmaße mit Neurofilament M reagiert. Neurofilamente ungeschädigter Axone sind deutlich stärker phosphoryliert als Neurofilamente in Perikaryen oder Dendriten [STERNBERGER LA und STERNBERGER NH, 1983; LEE VM *et al.*, 1987]. Markiert werden daher nahezu ausschließlich Axone unter Aussparung der Nervenzellkörper.

2.2.2.2 T-Zell-Marker

CD3

CD3 wird von der gesamten T-Zell-Population exprimiert. Der hier verwendete Antikörper des Klons CD3-12 erkennt ein hochkonstantes intrazytoplasmatisches Epitop des CD3-Moleküls [JONES *et al.*, 1993].

CD8

CD8 wird von zytotoxischen T-Zellen als $\alpha\beta$ -Heterodimer exprimiert. Funktionell handelt es sich um einen Co-Rezeptor für MHC-I-Moleküle. Der in dieser Untersuchung verwendete Antikörper des Klons C8/144B bindet hauptsächlich an CD8 α [MASON *et al.*, 1992].

Granzym-B

Das 29kD-Monomerprotein Granzym B kann den Serinproteasen zugeordnet werden. Neben Perforin ist es Bestandteil sekretorischer Granula CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen und zählt zu den Effektoren aktivierter zytotoxischer T-Zellen. In dieser Untersuchung findet ein Antikörper des Klons GrB-7 [KUMMER *et al.*, 1993, 1995] Verwendung.

2.2.2.3 Makrophagen-Marker

Ki-M1P

Der Panmakrophagenmarker Ki-M1P eignet sich für formalinfixiertes Gewebe [RADZUN *et al.*, 1991] und markiert neben Makrophagen auch Mikroglia [PAULUS *et al.*, 1992].

2.2.2.4 Sonstiges

HLA-I / MHC-I

Der Antikörper HC-10 erkennt β_2 -Mikroglubulin-freie, jedoch nicht mit β_2 -Mikroglubulin assoziierte schwere α -Ketten des HLA-I bzw. MHC-I [STAM *et al.*, 1990; PEROSA *et al.*, 2003].

2.2.3 Doppelmarkierungen

Um eine Aussage über Kontakte zwischen Entzündungszellen und Axonen und ggf. deren Interaktion machen zu können, mußten Doppelmarkierungen mit einem Marker für die betreffende Population der Entzündungszellen sowie einem Marker für geschädigte Axone (APP) durchgeführt werden. Es ergaben sich somit die Kombinationen

- CD3 – APP
- CD8 – APP
- Granzym B – APP
- Ki-M1P – APP

2.2.3.1 Allgemeines Protokoll

Von den Gewebeblöcken wurden mit einem Mikrotom 1 μ m dicke Schnitte gewonnen, die auf silanisierte Objektträger aufgetragen wurden. Die Gewebeschnitte wurden mit Xylol (10 min), einer absteigenden Isopropylalkohol-Reihe (100%, 90%, 70%, 50%) und Aqua dest. (jeweils 5 min) entparaffiniert und rehydriert.

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte viermal für je vier Minuten in Citratpuffer (10 mM, pH 6) in einem handelsüblichen Haushalts-Mikrowellengerät (Bauknecht MWS 2819, 800 W) behandelt. Statt des Citratpuffers wurde bei Schnitten für die Granzym-B-Markierung 4 mM HCl verwendet.

Bei Schnitten für die Lichtmikroskopie oder zur Markierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation erfolgte nun die Blockierung der endogenen Peroxidase durch zehnminütige Inkubation mit 3% H₂O₂ in PBS bei Raumtemperatur.

Unspezifische Proteine wurden durch zehnminütige Inkubation mit 10% FCS (*fetal calf serum*) in PBS bei Raumtemperatur blockiert.

Als Verdünnungsmittel für die Antikörper diente 10% FCS in PBS. Zwischen den Inkubationen mit den einzelnen Antikörpern wurde jeweils für mindestens fünf Minuten mit PBS gespült. Sämtliche Inkubationen mit Antikörpern erfolgten in einer „feuchten Kammer“.

Abweichend hiervon wurde bei Schnitten für die Fluoreszenzmikroskopie zur Blockierung unspezifischer Proteine und zur Verdünnung der Antikörper 0,1% Tween[®] 20, 2% BSA (*Bovines Serum-Albumin / Albumin bovine Fraction V*), 1% FCS in PBS verwendet.

Schnitte für die Lichtmikroskopie wurden nach Abschluß der Immunmarkierung zuerst mit Diaminobenzidin (*25 mg DAB in 50 ml PBS + 16 µl 30% H₂O₂*), dann mit Fast Red (*50 mg Fast Red TR in 49 ml 0,1 M Tris + 10 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat in 1 ml N,N-Dimethylformamid + 50 µl 1 M Levamisol*) entwickelt. Der Entwicklung mit Fast Red ging mindestens 10 Minuten langes Spülen mit TBS voraus. Zum Abschluß wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Als Eindeck-Medium auf Wasserbasis wurde IMMU-Mount verwendet. Die Ränder der Deckgläser wurden nach Eintrocknen des Mediums mit Nagelklarlack versiegelt.

Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie wurden nach Abschluß der Immunmarkierung zur Unterdrückung der für humanes Hirngewebe typischen, hauptsächlich von Lipofuszinablagerungen verursachten extrem starken Autofluoreszenz für drei Minuten in 0,5% Sudanschwarz B in 70% Ethanol gefärbt und anschließend fünf Minuten in Aqua bidest. gespült. Sudanschwarz B färbt alle Arten von Lipiden, darunter auch Lipofuszin. Es wurde jedoch berichtet, daß es mit einigen gebräuchlichen *Antifading-Reagents* in kommerziellen Eindeck-Medien für die Fluoreszenzmikroskopie reagiert und so selbst eine Hintergrundfluoreszenz verursachen kann. Nachfolgend wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einer Lösung von Kupfersulfat (*60 mM CuSO₄*) in Ammoniumacetat-Puffer (*50 mM CH₃COONH₄, pH 5,0*) behandelt, anschließend für 5 Minuten in Aqua bidest. gewaschen und abschließend vor dem Eindecken für weitere 5 Minuten mit PBS gespült.

Zu diesen Verfahren vgl. BASCHONG *et al.* (2001), ROMIJN *et al.* (1999) und SCHNELL *et al.* (1999). Eingedeckt wurde mit dem *Fluorescent Mounting Medium* von DAKO.

2.2.3.2 Verwendung zweier Primärantikörper gleicher Herkunftsspezies

Sollen auf einem Schnitt zwei Strukturen spezifisch immunmarkiert werden und stehen für die entsprechenden Antigene nur Antikörper gleicher Herkunftsspezies und gleicher Immunglobulin-Subtypen zur Verfügung, so ergibt sich zwangsläufig das Problem, daß die eingesetzten Sekundärantikörper ohne weitere Maßnahmen beide Primärantikörper detektieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sind mehrere Doppelmarkierungen mit zwei Primärantikörpern aus der Maus durchgeführt worden. Hierbei kamen verschiedene Prozeduren zur Anwendung, die nachfolgend beschrieben sind.

2.2.3.2.1 „Biotinylierung“ des zweiten Primärantikörpers

Bei diesem Ansatz wird auf die Verwendung eines zweiten Sekundärantikörpers, der zwangsläufig beide Primärantikörper detektieren würde, verzichtet. Stattdessen wird der zweite Primär-AK seinerseits bereits vor Aufbringen auf die Schnitte mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten markiert, quasi „indirekt biotinyliert“, was den Einsatz von Avidin-konjugierten Enzymen und Fluoreszenzfarbstoffen zu seiner Detektion ermöglicht.

Nachteilig an diesem Verfahren ist jedoch die fehlende Amplifizierung des Signals des „indirekt biotinylierten“ Primär-AKs durch einen Sekundär-AK. Es ist somit notwendig, den „stärkeren“ der beiden Primär-AK für die „indirekte Biotinylierung“ zu verwenden.

Angewendet wurde folgendes Procedere:

- 1) Aufbringen des ersten, „schwächeren“ Primär-AKs auf die Schnitte
- 2) Aufbringen eines AP- bzw. Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Ziege-anti-Maus-Ig
- 3) Gründliches Spülen mit PBS
- 4) Inkubation des zweiten, „stärkeren“ Primär-AKs mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten (15 min, Raumtemperatur)

- 5) Abblocken der nicht gebundenen biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmente mit Normal-Maus-Serum (15 min, Raumtemperatur)
- 6) Aufbringen des so „indirekt biotinylierten“ zweiten Primär-AKs auf die Schnitte
- 7) Aufbringen mit Peroxidase bzw. Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Avidins auf die Schnitte.

Sowohl die biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmente („*Biotinylation Reagent*“) als auch das hier verwendete Normal-Maus-Serum („*Blocking Reagent*“) sind Bestandteil des DAKO *Animal Research Kit* „ARK™“. Die Menge der einzusetzenden F(ab)-Fragmente ist abhängig von der Konzentration der Immunglobuline und der Menge des zu modifizierenden Primär-AKs und richtet sich nach der dem Produkt beiliegenden Gebrauchsvorschrift.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Protokolls aus Abschnitt 2.2.3.2.1

2.2.3.2.2 Blockierung mit unkonjugierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten

Bei diesem Ansatz handelt es sich um ein Protokoll, das von LEWIS CARL *et al.* 1993 veröffentlicht und für diese Untersuchung modifiziert wurde (vgl. ferner NEGOESCU *et al.*, 1994). Nach Aufbringen von erstem Primär- und Sekundär-AK auf die Schnitte werden zunächst alle noch freien Bindungsstellen des Sekundär-AKs mit unspezifischen Maus-Immunglobulinen (Normal-Maus-Serum, DAKO) abgesättigt. Somit wird eine Interaktion von erstem Sekundär-AK und zweitem Primär-AK verhindert. Nachfolgend werden sämtliche Bindungsmöglichkeiten sowohl am ersten Primär-AK als auch an den unspezifischen Maus-Immunglobulinen mit monovalenten, polyklonalen, unkonjugierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten abgesättigt, was eine Interaktion von erstem Primär-AK und zweitem Sekundär-AK verhindert.

Der Vorteil dieses Protokolls liegt in der nahezu freien Adaptierbarkeit an alle Kombinationen primärer und sekundärer Antikörper.

Angewendet wurde folgendes Procedere:

- 1) Aufbringen des ersten, „schwächeren“ Primär-AKs auf die Schnitte
- 2) Aufbringen des ersten Sekundär-AKs auf die Schnitte
- 3) Absättigung noch freier Bindungsstellen am Sekundär-AK durch unspezifische Maus-Immunglobuline (Normal-Maus-Serum)
- 4) Absättigung aller Bindungsmöglichkeiten am Primär-AK und an den unspezifischen Maus-Immunglobulinen durch monovalente, polyklonale, unkonjugierte Ziege-anti-Maus-F(ab)-Fragmente
- 5) Gründliches Spülen mit PBS
- 6) Aufbringen des zweiten, „stärkeren“ Primär-AKs auf die Schnitte
- 7) Aufbringen des zweiten Sekundär-AKs auf die Schnitte.

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Protokolls aus Abschnitt 2.2.3.2.2

2.2.3.2.3 Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA)

Bei diesem Verfahren, gelegentlich auch als CARD (*catalyzed reporter deposition*) bezeichnet, nutzt man die Tatsache, daß Tyramid von Peroxidase zu hochreaktiven Tyramid-Radikalen umgesetzt wird, welche kovalent an Tyrosin-Seitenketten von Proteinen in unmittelbarer Umgebung binden. So kann beispielsweise ein Antigen mit einem unkonjugierten Primär-AK detektiert werden, welcher anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-AK detektiert wird, oder zur weiteren Verstärkung mit einem biotinylierten Sekundär-AK und nachfolgender Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase. Die Peroxidase setzt schließlich beispielsweise ein Tyramid-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat um, welches sich in unmittelbarer Umgebung absetzt, wobei es allerdings zu einer geringen diffusionsbedingten Verminderung der Auflösung kommt.

Die im Vergleich zu anderen immunhistochemischen Verfahren dramatisch höhere Verstärkung ermöglicht die Verwendung eines Primär-AKs in extremer Verdünnung. Wird das TSA-Verfahren bei Doppelmarkierungen unter Verwendung zweier Primär-AK aus der gleichen Herkunftsspezies als erstes System verwendet, kann der Primär-AK derart stark verdünnt werden, daß er für den zur Detektion des zweiten Primär-AKs verwendeten herkömmlichen Sekundär-AK so gut wie nicht zu detektieren ist, wobei mit TSA aber ein gutes Signal erzielt werden kann. Für eine genauere Beschreibung des Verfahrens vgl. beispielsweise SHINDLER und ROTH (1996), WANG *et al.* (1999), UCHIHARA *et al.* (2000) oder BROUNS *et al.* (2002).

Zur Anwendung kam folgendes Protokoll (zwei Primärantikörper aus der Maus):

- 1) Aufbringen des ersten Primär-AKs in einer deutlich stärkeren Verdünnung als üblicherweise bei Zwei-Schritt-Protokollen angewandt
- 2) Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-AK
- 3) Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Tyramid
- 4) Gründliches Spülen mit PBS
- 5) Aufbringen des zweiten Primär-AKs in herkömmlicher Verdünnung
- 6) Aufbringen des zweiten Sekundär-AKs.

2.2.3.3 Die Doppelmarkierungen im Detail

APP (Fast Red) – CD3 (DAB)

1. Maus-anti-APP, Klon 22C11, Chemicon International, 1:100 = 10 µg/ml, *und* Ratte-anti-CD3, Klon CD3-12, Serotec Ltd., 1:100 = 10 µg/ml, *in einem Schritt*, 4°C über Nacht
2. Ziege-anti-Ratte-Ig, biotinyliert, Amersham, 1:100, *und* Ziege-anti-Maus-Ig, AP-konjugiert, DAKO, 1:40 = 25 µg/ml, *in einem Schritt* eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Avidin, Peroxidase-konjugiert, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1:1.000 $\approx$ 2,25 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur

APP (ARK™ / DAB) – CD8 (Fast Red)

1. Maus-anti-CD8, Klon C8/144B, DAKO, 1:50 = 4 µg/ml, über Nacht bei 4°C
2. Ziege-anti-Maus-Ig, AP-konjugiert, DAKO, 1:40 = 25 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Maus-anti-APP, Klon 22C11, Chemicon International, 1:100 = 10 µg/ml; mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten aus dem DAKO *Animal Research Kit* „ARK™“ markiert gemäß Abschnitt 2.2.3.2.1; eine Stunde bei Raumtemperatur
4. Avidin, Peroxidase-konjugiert, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1:1.000 $\approx$ 2,25 µg/ml, 45 Minuten bei Raumtemperatur

APP (ARK™ / DAB) – Granzym-B (Fast Red)

1. Maus-anti-Granzym-B, Klon GrB-7, DAKO, 1:50 = 1,4 µg/ml, über Nacht bei 4°C
2. Ziege-anti-Maus-Ig, AP-konjugiert, DAKO, 1:40 = 25 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Maus-anti-APP, Klon 22C11, Chemicon International, 1:100 = 10 µg/ml; mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten aus dem DAKO *Animal Research Kit* „ARK™“ markiert gemäß Abschnitt 2.2.3.2.1; eine Stunde bei Raumtemperatur
4. Avidin, Peroxidase-konjugiert, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1:1.000 $\approx$ 2,25 µg/ml, 45 Minuten bei Raumtemperatur

APP (ARK™ / DAB) – Ki-M1P (Fast Red)

1. Maus-anti-Ki-M1P, Klon Ki-M1P, Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Göttingen, 1:1.500, über Nacht bei 4°C
2. Ziege-anti-Maus-Ig, AP-konjugiert, DAKO, 1:40 = 25 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Maus-anti-APP, Klon 22C11, Chemicon International, 1:100 = 10 µg/ml; mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten aus dem DAKO *Animal Research Kit* „ARK™“ markiert gemäß Abschnitt 2.2.3.2.1; eine Stunde bei Raumtemperatur
4. Avidin, Peroxidase-konjugiert, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1:1.000 ≈ 2,25 µg/ml, 45 Minuten bei Raumtemperatur

SMI31 (Cy™2) – CD8 (ARK™ / Cy™3)

1. Maus-anti-SMI31, Klon SMI31, Sternberger Monoclonals Inc., 1:1.000 = 10 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
2. Ziege-anti-Maus-IgG, Cy™2-konjugiert, Jackson ImmunoResearch, 1:400 = 3,75 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Maus-anti-CD8, Klon C8/144B, DAKO, 1:50 = 4 µg/ml; mit biotinylierten Anti-Maus-F(ab)-Fragmenten aus dem DAKO *Animal Research Kit* „ARK™“ markiert gemäß Abschnitt 2.2.3.2.1; eine Stunde bei Raumtemperatur
4. Avidin, Cy™3-konjugiert, Jackson ImmunoResearch, 1:50 = 36 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
5. Hoechst 33342, Fluka Chemie GmbH, 1:10.000, 30 Minuten bei Raumtemperatur

CD8 (Alexa Fluor® 555) – Ki-M1P (Cy™2)

1. Maus-anti-CD8, Klon C8/144B, DAKO, 1:5.000 = 40 ng/ml, 4°C über Nacht
2. Schaf-anti-Maus, Peroxidase-konjugiert, Amersham, 1:100, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Tyramid, konjugiert mit Alexa Fluor® 555, Molecular Probes, 1:75, 10 Minuten bei Raumtemperatur
4. Normal-Maus-Serum, DAKO, 1:50, eine Stunde bei Raumtemperatur
5. Ziege-anti-Maus-F(ab)-Fragment, Jackson ImmunoResearch, 1:10 = 0,13 mg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur

6. Ziege-anti-Ki-M1P, Klon Ki-M1P, Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Göttingen, 1:300, eine Stunde bei Raumtemperatur
7. Ziege-anti-Maus, CyTM2-konjugiert, Jackson ImmunoResearch, 1:400 = 3,75 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
8. Hoechst 33342, Fluka Chemie GmbH, 1:10.000, 30 Minuten bei Raumtemperatur

CD8 (CyTM3) – Granzym-B (CyTM2)

1. Maus-anti-Granzym-B, Klon GrB-7, DAKO, 1:50 = 1,4 µg/ml, 4°C über Nacht
2. Ziege-anti-Maus, CyTM3-konjugiert, Jackson ImmunoResearch, 1:400 = 3,5 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
3. Normal-Maus-Serum, DAKO, 1:50, eine Stunde bei Raumtemperatur
4. Ziege-anti-Maus-F(ab)-Fragmente, Jackson ImmunoResearch, 1:10 = 0,13 mg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
5. Maus-anti-CD8, Klon C8/144B, DAKO, 1:50 = 4 µg/ml, eine Stunde bei Raumtemperatur
6. Ziege-anti-Maus, CyTM2-konjugiert, Jackson ImmunoResearch, 1:400 = 3,75 µg/ml

2.2.4 Ergänzende immunhistochemische Färbungen

Neben den Doppelmarkierungen wurde auch eine Einfachmarkierung mit einem Maus-anti-MHC-I-Antikörper (Klon HC-10, Prof. Dr. Hidde Ploegh, Verdünnung 1:500, Inkubation über Nacht bei 4°C) durchgeführt. Detektiert wurde dieser mit einem biotinylierten Schaf-anti-Maus-Ig (Amersham, Verdünnung 1:200, Inkubation 1 h bei Raumtemperatur) und nachfolgend mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:1000 $\approx$ 2,25 µg/ml, Inkubation 45 min bei Raumtemperatur). Für sonstige Arbeitsschritte gilt Abschnitt 2.2.3.1 analog, jedoch wurden die Schnitte nach Entwicklung mit DAB abschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol dehydriert und mit DePeX eingedeckt.

2.3 Antikörper und Chemikalien

2.3.1 Primärantikörper

Humanes Antigen	Herkunfts-spezies	Klon	Ig-Typ	Kat.-Nr.	Hersteller
APP A4	Maus	22C11	IgG ₁	MAB 348	Chemicon International, Temecula, CA, USA
CD3	Ratte	CD3-12	IgG	MCA 1477	Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK
CD8	Maus	C8/144B	IgG ₁ κ	M 7103	DAKO, Glostrup, Dänemark
Granzym B	Maus	GrB-7	IgG _{2a} κ	M 7235	DAKO, Glostrup, Dänemark
HLA-I / MHC-I	Maus	HC-10	IgG _{2a}	-	Prof. Dr. Hidde Ploegh, Boston, MA, USA
Ki-M1P	Maus	Ki-M1P	IgG ₁	-	Prof. Dr. H.-J. Radzun, Göttingen
Neurofilament	Maus	SMI31	IgG ₁	SMI31	Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, ML, USA

Ig = Immunglobulin

2.3.2 Sekundärsysteme

Bezeichnung	Konjugiert mit	Kat.-Nr.	Hersteller
DAKO Animal Research Kit (ARK™)	-	K 3955	DAKO Corp., Carpinteria, CA 93013, USA
ExtrAvidin®	Peroxidase	E 2886	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Maus-Serum (normal)	-	X 0910	DAKO, Glostrup, Dänemark
Schaf-anti-Maus-Ig	Biotin	RPN 1001	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Schaf-anti-Maus-IgG	Peroxidase	NA931	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Streptavidin	Cy™3	016-160-084	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Tyramide Signal Amplification Kit #42	Alexa Fluor® 555	T 30955	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
Ziege-anti-Maus-Ig	AP	D 0486	DAKO, Glostrup, Dänemark

Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)	Cy TM 2	115-225-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)	Cy TM 3	115-165-146	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Maus-IgG-(H+L)-F(ab)-Fragmente	-	115-007-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Ratte-Ig	Biotin	RPN 1005	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

AP = Alkalische Phosphatase; Ig = Immunglobulin

2.3.3 Chromogene, Substrate, Puffer und Sonstiges

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Hersteller
Albumin bovine Fraction V	11950	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumacetat zur Analyse	A1030.0500	AppliChem GmbH, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	1.00244.0500	Merck KGaA, Darmstadt
DAB	D-5637	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DePeX mounting medium	361254D	VWR International Ltd., Poole, England
Essigsäure 100%	1.00063.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut zur Analyse	1.00983.2500	Merck KGaA, Darmstadt
Fast Red TR	F-2768	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fluorescent Mounting Medium	S3023	DAKO, Glostrup, Dänemark
Fötale bovines Serum	S 0115	BIOCHROM AG, Berlin
Glycerol	G-6279	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hoechst 33342	14533	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
IMMU-Mount	9990402	Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Kupfer(II)-sulfat	506 A934791	Merck KGaA, Darmstadt
Levamisol	L-9756	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mayers Hämlaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt
Naphthol AS-MX Phosphat	N-4875	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge, 1M	1.09137.1000	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid 99%	D15,855-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS DULBECCO Instamed 9,55g/l w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	L 182-50	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure, 1M	1.09057.1000	Merck KGaA, Darmstadt

Sudanschwarz B	Art. 1387	E. Merck, Darmstadt
TRIS PUFFERAN $\geq 99,9$ % p.a.	4855.1	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tween® 20	9127.1	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%, medizinisch reinst, stabilisiert	1.08597.1000	Merck KGaA, Darmstadt

2.3.4 Häufig benutzte Lösungen und Puffer

AP-Substrat (1 l)	<p><u>Lösung A:</u> 0,1 M Tris (12,114 g Tris in 900 ml Aqua bidest.; mit 1 M HCl pH 8,2 einstellen; Aqua bidest. ad 980 ml)</p> <p><u>Lösung B:</u> 200 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat in 20 ml N,N-Dimethylformamid</p> <p><u>Lösung C:</u> 1 ml 1 M Levamisol (0,2408 g Levamisol in 1 ml Aqua bidest.)</p>
Citrat-Puffer (10 mM)	2,1014 g Citronensäure-Monohydrat in 1 l Aqua bidest., pH auf 6,0 einstellen
DAB Entwicklungslösung	25 mg DAB in 50 ml PBS + 16 μ l 30% H ₂ O ₂
Fast Red Entwicklungslösung	50 mg Fast Red TR in AP-Substrat (49 ml Lösung A + 1 ml Lösung B + 50 μ l Lösung C), filtrieren
Kupfersulfat (60 mM) in Ammoniumacetat (50 mM) 0,5 l	1,925 g Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄) in 400 ml Aqua bidest.; mit Eisessig (CH ₃ COOH) pH 5 einstellen; Aqua bidest. ad 500 ml; hierin 4,77 g Kupfersulfat (CuSO ₄) lösen.
Sudanschwarz B (0,5%) in 70% Ethanol	0,5 g Sudanschwarz B werden in 100 ml 70% Ethanol unter Rühren bis zum Siedepunkt erhitzt, unter Lichtabschluß über Nacht ruhen gelassen und schließlich filtriert
Verdünnungsmedium für die Immunfluoreszenz (10 ml): 0,1% Tween® 20, 2% BSA, 1% FCS in PBS	9,89 ml PBS + 0,01 ml Tween® 20 + 0,2 g BSA (<i>Albumin bovine Fraction V</i>) + 0,1 ml FCS

2.4 Auswertung

Bei Schnitten für die Lichtmikroskopie wurde die Anzahl von

- CD3⁺-T-Zellen
- CD8⁺-T-Zellen
- Granzym-B⁺-T-Zellen
- APP⁺-Axonen
- Ki-M1P⁺-Makrophagen

sowie die Anzahl der Kontakte zwischen

- CD3⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen
- CD8⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen
- Granzym-B⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen
- Ki-M1P⁺-Makrophagen und APP⁺-Axonen

in standardisierten mikroskopischen Feldern bestimmt, wobei die teilweise geringe Größe des Biopsiematerials bzw. der zu untersuchenden Läsion keine einheitliche Anzahl an ausgewerteten Feldern zuließ. Anschließend erfolgte die Hochrechnung auf Zellen bzw. Kontakte pro mm². In die Auswertung gingen ausschließlich parenchymständige Zellen ein, vaskuläre und perivaskuläre Zellen wurden nicht berücksichtigt.

Da die Schnittdicke mit 1 µm den Durchmesser einer T-Zelle unterschreitet ist sichergestellt, daß nur tatsächliche Kontakte zwischen Entzündungszellen und Axonen auch als solche gezählt wurden und nicht Überlagerungen von Entzündungszellen und Axonen in verschiedenen Ebenen ohne echten Kontakt.

Die Färbungen für die Fluoreszenzmikroskopie dienten der qualitativen Auswertung.

Für die Auswertung wurde ein Mikroskop vom Typ BX-51 mit einem Gitterokular vom Typ PL100X0 (beides OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg) verwendet; die Fotodokumentation erfolgte mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen 3,3-Megapixel-CCD-Kamera vom Typ *ColorView II* und der zugehörigen Software *analySIS*[®] (Soft Imaging System GmbH, Münster).

Die Aufbereitung der erhobenen Daten erfolgte mit *Excel 2000* (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Die statistische Auswertung mittels One-Way-ANOVA-Test und anschließendem LSD-Test (Fisher) erfolgte mit *SPSS* (SPSS GmbH, München); als

statistisch signifikant wurden p-Werte von 0,05 und kleiner betrachtet. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) generiert.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden sämtliche Werte zur Darstellung in Tabellen und im Text auf ganze Zahlen gerundet; Werte kleiner als 0,5 wurden jedoch auf eine Nachkommastelle genau gerundet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Läsionspathologie

Alle untersuchten MS-Läsionen wiesen ein von Makrophagen dominiertes entzündliches Infiltrat mit zahlreichen T-Zellen und einem hohen Anteil $CD8^+$ -T-Zellen von je nach betrachteter MS-Gruppe etwa 30-50% auf. Bei zwei Fällen (Pat. Nr. 7, Muster II; Pat. Nr. 14, Muster III) fand sich ein besonders massives T-Zell-Infiltrat, das einem Mehrfachen desjenigen anderer untersuchter MS-Läsionen entsprach. Darüber hinaus wurden in allen MS-Läsionen APP^+ -Axone als pathologisches Korrelat akuter axonaler Schädigung gefunden.

Auch in den untersuchten Enzephalitis-Fällen fand sich ein entzündliches Infiltrat. Während die Anzahl der Makrophagen / Mikrogliazellen in den Enzephalitis-Fällen nur bei etwa einem Drittel bis einem Viertel derjenigen der untersuchten MS-Gruppen lag, fanden sich nur geringfügig weniger T-Zellen als in den MS-Läsionen; der Anteil $CD8^+$ -T-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat lag bei den Enzephalitis-Fällen bei 50%. Eine geringe akute axonale Schädigung konnte auch bei den viralen Enzephalitiden nachgewiesen werden.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der einzelnen Doppelmarkierungen detailliert dargestellt.

3.2 Akute axonale Schädigung

Zum Vergleich der untersuchten Gruppen (Muster I, II, III, aktiv, inaktiv, Enzephalitis) bzgl. akuter axonaler Schädigung wurde für jede Gruppe das arithmetische Mittel der Anzahl APP^+ -Axone in den Doppelmarkierungen $CD3-APP$, $CD8-APP$ und $Ki-M1P-APP$ gebildet.

Obwohl sich für eine einzelne betrachtete Gruppe in den drei Doppelmarkierungen unterschiedlich hohe absolute Werte für APP^+ -Axone fanden, so war doch das Verhältnis der Gruppen zueinander immer vergleichbar. Die Unterschiede in der absoluten Dichte APP^+ -Axone sind erklärbar mit unterschiedlichen Schnittebenen durch die Läsionen oder auch mit der Verwendung unterschiedlicher Darstellungsmethoden. So wurde APP in der Doppelmarkierung mit $CD3$ über eine durch das Enzym Alkalische Phosphatase mediierte

Reaktion mit dem Chromogen *Fast Red* visualisiert; hier zeigen sich für APP niedrigere Absolutwerte als in den Doppelmarkierungen mit CD8 und Ki-M1P, bei denen APP über das Enzym Peroxidase mit dem Chromogen *DAB* visualisiert wurde und deren APP-Werte vergleichbar sind.

Auffallend war, daß das Ausmaß akuter axonaler Schädigung, gemessen anhand der Anzahl APP⁺-Axone, im Muster II mit 299/mm² deutlich schwächer ausgeprägt war als in den anderen aktiven MS-Gruppen. Im Mittel fanden sich bei aktiven Läsionen 496 APP⁺-Axone pro mm², bei inaktiven Läsionen 322/mm².

Wenn auch nicht quantifiziert, so ergab sich bei der Auswertung der Eindruck, daß generell besonders kleinere APP⁺-Sphäroide zu finden waren. Möglicherweise waren somit vor allem dünnere Axone von akuter Schädigung betroffen, oder aber der Zeitpunkt der Schädigung lag bei diesen Axonen noch nicht lange genug zurück, als daß es zu einer nennenswerten APP-Kumulation hätte kommen können (vgl. Abschn. 2.2.2.1).

In den Enzephalitis-Vergleichsfällen war die Anzahl APP⁺-Axone – und damit das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung – deutlich geringer als in den MS-Fällen und betrug nur 11% derer in inaktiven bzw. 7% derer in aktiven MS-Läsionen.

Tabelle 7 und Abbildung 6 zeigen die Ergebnisse im Überblick.

Tabelle 7: Akute axonale Schädigung anhand der Anzahl APP⁺-Axone

Gruppe	APP pro mm ² in DM mit CD3	APP pro mm ² in DM mit CD8	APP pro mm ² in DM mit Ki-M1P	Arithmet. Mittel
Aktiv (n=14)	335 ± 183	593 ± 277	559 ± 264	496
Inaktiv (n=6)	247 ± 127	368 ± 140	351 ± 330	322
Muster I (n=5)	445 ± 126	698 ± 224	678 ± 262	607
Muster II (n=4)	175 ± 115	355 ± 235	367 ± 265	299
Muster III (n=5)	355 ± 206	679 ± 280	592 ± 223	542
Alle (n=20)	309 ± 170	526 ± 263	496 ± 293	444
Enzephalitis (n=3)	36 ± 32	56 ± 44	17 ± 14	36

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung. DM = Doppelmarkierung.

Abbildung 6: Akute axonale Schädigung anhand der Anzahl APP⁺-Axone (graph. Darst.)

Balken geben das arithmetische Mittel, T-Linien die Standardabweichung an. Dargestellt sind die Werte aus den einzelnen Doppelmarkierungen sowie der hieraus gebildete Mittelwert.

3.3 T-Zellen

3.3.1 Doppelmarkierung CD3 / APP

In allen MS-Läsionen wurde eine Infiltration mit CD3⁺-T-Zellen gesehen. Den höchsten Mittelwert erreichte die Gruppe des neuropathologischen Subtyps III (136/mm²), bei der sich etwa ein Drittel mehr T-Zellen als im Subtyp I (103/mm²) fand. Besonders viele T-Zellen fanden sich in je einem Muster-II-Fall (Pat. Nr. 7; 358 T-Zellen/mm²) und einem Muster-III-Fall (Pat. Nr. 14; 405 T-Zellen/mm²). Im Mittel fanden sich in aktiven Läsionen 122 T-Zellen/mm², in inaktiven Läsionen 77/mm². Das Ausmaß des T-Zell-Infiltrats bei den untersuchten Enzephalitiden ist mit 74/mm² vergleichbar mit dem inaktiver MS-Läsionen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Anzahl CD3⁺-T-Zellen waren statistisch nicht signifikant.

Die Anzahl APP⁺-Axone – und damit das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung – war bei aktiven Läsionen mit 335/mm² deutlich größer als bei inaktiven Läsionen mit 247/mm², jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Beim neuropathologischen Muster I fanden sich mit durchschnittlich 445/mm² mehr als doppelt so viele APP⁺-Axone wie im Subtyp II mit 175/mm² (p=0,018). Erheblich weniger APP⁺-Axone als in den MS-Läsionen wurden in den Enzephalitis-Fällen mit 36/mm² gesehen; in diesen fand sich keine Entmarkung. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl APP⁺ Axone fanden sich im Vergleich der Gruppen Muster I vs. Muster II (p=0,018), Muster I vs. Inaktiv (p=0,050), Enzephalitiden vs. Muster I (p=0,001), Enzephalitiden vs. Muster III (p=0,011) und Enzephalitiden vs. aktive MS-Läsionen (p=0,006).

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bzgl. der Anzahl der Kontakte zwischen CD3⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen waren statistisch nicht signifikant; im Vergleich der Gruppen Muster I vs. Enzephalitiden kann allerdings von einem Trend gesprochen werden (p=0,056). Auffällig ist jedoch, daß im neuropathologischen Muster I ein Anteil von 17% aller CD3⁺-T-Zellen einen räumlich engen Kontakt zu APP⁺-Axonen aufweist; ein so hoher Wert wird in keiner anderen untersuchten Gruppe erreicht. Beim Muster III fand sich mit nur 5% der niedrigste Wert aller untersuchten MS-Gruppen. Im Mittel wiesen in aktiven MS-Läsionen 10% der T-Zellen einen räumlich engen Kontakt zu APP⁺-Axonen auf, in inaktiven Läsionen 8%. Bei den Enzephalitis-Fällen war es lediglich 1% bei einem zumindest mit inaktiven MS-Läsionen durchaus vergleichbaren T-Zell-Infiltrat.

Tabelle 8 und Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse im Überblick. Abbildung 7 zeigt einen engen Kontakt einer CD3⁺-T-Zelle und eines APP⁺-Axons.

Abbildung 7: Doppelmarkierung CD3 / APP (Färbung)

Fall Nr. 4 (Biopsie einer 28-jährigen Patientin; Krankheitsdauer 23 Tage; aktive MS-Läsion des neuropathologischen Musters I): Enger Kontakt einer CD3⁺-T-Zelle (braun, DAB) und eines APP⁺-Axons (rot, *Fast Red*). Auffällig ist die konkave Verformung der T-Zelle, die so über einen großen Membranabschnitt in engem Kontakt zum APP⁺-Axon steht.

Tabelle 8: Doppelmarkierung CD3 / APP

Gruppe	APP pro mm ²	CD3 pro mm ²	Kontakte pro mm ²	CD3 mit Kontakt in % aller CD3	APP mit Kontakt in % aller APP
Aktiv (n=14)	335 ± 183	122 ± 119	12 ± 13	10	4
Inaktiv (n=6)	247 ± 127	77 ± 25	6 ± 5	8	2
Muster I (n=5)	445 ± 126	103 ± 55	18 ± 16	17	4
Muster II (n=4)	175 ± 115	128 ± 154	11 ± 14	9	6
Muster III (n=5)	355 ± 206	136 ± 157	7 ± 6	5	2
Alle (n=20)	309 ± 170	108 ± 102	10 ± 11	9	3
Enzephalitis (n=3)	36 ± 32	74 ± 80	1 ± 1	1	3

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung.

Abbildung 8: Doppelmarkierung CD3 / APP (graphische Darstellung)

Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

3.3.2 Doppelmarkierung CD8 / APP

In allen MS-Läsionen wurde eine Infiltration mit CD8⁺-T-Zellen gesehen. Besonders viele CD8⁺-T-Zellen fanden sich beim Pat. Nr. 7 (Muster II) mit 192/mm². Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen neuropathologischen Mustern. Ein vom Ausmaß her nur unwesentlich geringer ausgeprägtes Infiltrat fand sich ebenso in den Enzephalitis-Fällen, auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu den anderen untersuchten Gruppen.

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bzgl. der Anzahl der Kontakte zwischen CD8⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen waren statistisch nicht signifikant. Auffällig ist jedoch ein besonders hoher Anteil an CD8⁺-T-Zellen mit engem räumlichen Kontakt zu APP⁺-Axonen im neuropathologischen Muster II (21%); allerdings wiesen drei von vier untersuchten Muster-II-Fällen keinerlei Kontakte zwischen CD8⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen auf, einer jedoch mit 53 Kontakten pro mm² eine besonders große Anzahl. Im

Mittel wiesen 17% aller CD8⁺-T-Zellen in aktiven MS-Läsionen einen räumlich engen Kontakt zu APP⁺-Axonen auf, in inaktiven Läsionen waren es lediglich 4%. Bei den Enzephalitiden fand sich mit 5% ein deutlich kleinerer Anteil als in den aktiven MS-Läsionen.

Auch bei dieser Doppelmarkierung fanden sich mit 368/mm² weniger akut geschädigte APP⁺-Axone in den inaktiven Läsionen als in den aktiven Läsionen mit 593/mm²; dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Mit nur 355/mm² fanden sich besonders wenige APP⁺-Axone im neuropathologischen Muster II. Das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung bei den Enzephalitiden lag auch hier mit 56 APP⁺-Axonen pro mm² deutlich unter den MS-Gruppen. Statistisch signifikante Unterschiede zeigen sich im Vergleich der Gruppen Muster I vs. Muster II ($p=0,041$), Muster I vs. inaktive Läsionen ($p=0,030$), Muster III vs. inaktive Läsionen ($p=0,040$), Enzephalitiden vs. Muster I ($p=0,001$), Enzephalitiden vs. Muster III ($p=0,001$) sowie Enzephalitiden vs. aktive Läsionen ($p=0,001$); im Vergleich der Muster II und III kann zumindest von einem Trend gesprochen werden ($p=0,053$).

Während in allen anderen untersuchten Gruppen der Anteil APP⁺-Axone mit Kontakt zu CD8⁺-T-Zellen bei etwa einem Prozent lag, hatten bei den Enzephalitiden und beim neuropathologischen Muster II jeweils 4% aller APP⁺-Axone einen engen räumlichen Kontakt mit CD8⁺-T-Zellen. Bei einer im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen relativ niedrigen Anzahl APP⁺-Axone könnte dies auf einen spezifischen Befund hindeuten.

Tabelle 9 und Abbildung 10 zeigen die Ergebnisse im Überblick. Abbildung 9 zeigt einen engen Kontakt einer CD8⁺-T-Zelle und eines APP⁺-Axons.

Abbildung 9: Doppelmarkierung CD8 / APP (Färbung)

Fall Nr. 1 (Biopsie eines 37-jährigen Patienten; Krankheitsdauer unbekannt; aktive Läsion des neuropathologischen Musters I): Enger Kontakt einer CD8⁺-T-Zelle (rot, *Fast Red*) und eines APP⁺-Axons (braun, DAB).

Tabelle 9: Doppelmarkierung CD8 / APP

Gruppe	APP pro mm ²	CD8 pro mm ²	Kontakte pro mm ²	CD8 mit Kontakt in % aller CD8	APP mit Kontakt in % aller APP
Aktiv (n=14)	593 ± 277	53 ± 48	9 ± 14	17	2
Inaktiv (n=6)	368 ± 140	25 ± 20	1 ± 1	4	0,3
Muster I (n=5)	698 ± 224	47 ± 17	7 ± 4	15	1
Muster II (n=4)	355 ± 235	63 ± 86	13 ± 27	21	4
Muster III (n=5)	679 ± 280	50 ± 37	6 ± 4	12	1
Alle (n=20)	526 ± 263	44 ± 43	6 ± 12	14	1
Enzephalitis (n=3)	56 ± 44	37 ± 28	2 ± 4	5	4

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung.

Abbildung 10: Doppelmarkierung CD8 / APP (graphische Darstellung)

Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

3.3.3 Doppelmarkierung Granzym-B / APP

Diese Färbung wurde nur exemplarisch an zwei Muster I-Fällen, an einem Muster III-Fall sowie an den als Vergleichsfälle dienenden viralen Enzephalitiden durchgeführt. Eine Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede konnte aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Fälle nicht vorgenommen werden.

Auffällig ist, daß bei den MS-Fällen erheblich mehr Granzym-B⁺-Zellen direkten Kontakt zu APP⁺-Axonen haben als in den Enzephalitis-Vergleichsfällen.

Fall Nr. 14 (Muster III) weist ein erheblich stärkeres T-Zell-Infiltrat auf als die Mehrzahl der untersuchten MS-Fälle; möglicherweise ist die für diesen Fall bestimmte Anzahl Granzym-B⁺-Zellen nicht repräsentativ für das Muster III bzw. für aktive MS-Läsionen.

Eine eindeutige Polarisierung der Granzym-B⁺-Vesikel innerhalb der T-Zellen konnte bei den untersuchten Fällen nicht gesehen werden.

Tabelle 10 und Abbildung 11 zeigen die Ergebnisse im Überblick. Abbildung 12 demonstriert die Färbung.

Tabelle 10: Doppelmarkierung Granzym-B / APP

Gruppe	APP pro mm ²	Granzym-B pro mm ²	Kontakte pro mm ²	Grz-B mit Kontakt in % aller Grz-B	APP mit Kontakt in % aller APP
Aktiv (n=3)	1.212 ± 291	35 ± 28	6 ± 4	17	0,5
Muster I (n=2)	1.291 ± 362	22 ± 25	6 ± 6	27	0,5
Muster III (n=1)	1.053	61	8	13	0,8
Enzephalitis (n=3)	30 ± 12	18 ± 19	1 ± 1	6	0,03

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung.

Abbildung 11: Doppelmarkierung Granzym-B / APP (graphische Darstellung)

Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an.

Abbildung 12: Doppelmarkierung Granzym-B / APP (Färbung)

Fall Nr. 14 (Biopsie einer 41-jährigen Patientin mit schubförmiger MS; Krankheitsdauer 3 Jahre; aktive Läsion des neuropathologischen Musters III): Enger Kontakt von Zellen mit Granzym-B⁺-Granula (rot, *Fast Red*) und APP⁺-Axonen (braun, DAB). Eine eindeutige polare Ausrichtung der Granzym-B-enthaltenden Vesikel ist nicht zu erkennen.

3.3.4 Charakterisierung des T-Zell-Infiltrats

Die zusammenfassende Betrachtung (Tabelle 11, Abbildung 13) zeigt bei aktiven MS-Läsionen einen Anteil der CD8⁺-T-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat von 43%, bei inaktiven Läsionen von 32%. Auffällig sind die Fälle des neuropathologischen Musters III mit einem im Vergleich zu anderen aktiven Fällen relativ geringen Anteil von 37%. Bei den Enzephalitis-Fällen betrug der Anteil der CD8⁺-T-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat 50%.

Die Markierung für Granzym-B wurde lediglich exemplarisch an drei MS-Fällen sowie an den Enzephalitis-Fällen durchgeführt (Tabelle 12). Sowohl bei den aktiven MS-Fällen als auch bei den Enzephalitiden fand sich ein Anteil Granzym-B⁺-Zellen an den CD8⁺-T-Zellen von etwa 50%. Einen Eindruck davon, wie viele CD8⁺-T-Zellen positiv für Granzym-B sind, vermittelt die exemplarisch durchgeführte Doppelmarkierung für CD8 und Granzym (Abbildung 14).

Tabelle 11: Anteil CD8⁺ T-Zellen an der gesamten T-Zell-Population

Gruppe	CD3 pro mm ²	CD8 pro mm ²	Anteil CD8 an CD3 in %
Aktiv (n=14)	122 ± 119	53 ± 48	43
Inaktiv (n=6)	77 ± 25	25 ± 20	32
Muster I (n=5)	103 ± 55	47 ± 17	46
Muster II (n=4)	128 ± 154	63 ± 86	49
Muster III (n=5)	136 ± 157	50 ± 37	37
Alle (n=20)	108 ± 102	44 ± 43	41
Enzephalitis (n=3)	74 ± 80	37 ± 28	50

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung.

Tabelle 12: Anteil Granzym-B⁺-Zellen an CD8⁺-T-Zellen (exemplarische Fälle)

Fall-Nr.	Gruppe	CD3 pro mm ²	CD8 pro mm ²	Grz-B pro mm ²	Anteil CD8 an CD3 in %	Anteil Grz-B an CD8 in %
1	Muster I	112	58	5	52	9
3	Muster I	194	67	40	35	60
14	Muster III	405	83	61	20	73
1+3+14	Aktiv	237 ± 151	69 ± 13	35 ± 28	29	51
A	Enzephalitis	22	16	0	73	0
B	Enzephalitis	34	26	16	76	62
C	Enzephalitis	166	69	38	42	55
A+B+C	Enzephalitis	74 ± 80	37 ± 28	18 ± 19	50	49

Angegeben sind bei Gruppen die jeweiligen Mittelwerte ± Standardabweichung.

Abbildung 13: Anteil der CD8⁺-T-Zellen an der gesamten T-Zell-Population

Abbildung 14: Doppelmarkierung CD8 / Granzym-B

Fall Nr. 14 (Biopsie einer 41-jährigen Patientin mit schubförmiger MS; Krankheitsdauer 3 Jahre; aktive Läsion des neuropathologischen Musters III): CD8⁺-T-Zellen (CyTM2, grün); Granzym-B⁺-Granula (CyTM3, durch Überlagerung orange). Eine eindeutige polare Ausrichtung der Granzym-B-enthaltenden Vesikel ist nicht zu erkennen.

3.4 Makrophagen / Mikroglia

3.4.1 Doppelmarkierung Ki-M1P / APP

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl Ki-M1P⁺-Zellen zwischen aktiven (1.169/mm²) und inaktiven (1.267/mm²) MS-Läsionen konnte nicht festgestellt werden. Im Vergleich der einzelnen neuropathologischen Muster fällt auf, daß das Infiltrat Ki-M1P⁺-Zellen im Muster III mit 888 Zellen pro mm² schwächer ausgeprägt ist als in den Mustern I und II. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich zwischen den Gruppen Muster III vs. Muster I (p=0,003) und Muster III vs. inaktive Läsionen (p=0,031).

Auch in dieser Doppelmarkierung fanden sich in inaktiven Läsionen mit 351/mm² weniger APP⁺-Axone als in aktiven Läsionen mit 559/mm²; eine im Vergleich mit anderen aktiven MS-Läsionen geringere Anzahl APP⁺-Axone wurde beim Muster II gesehen (367/mm²). Statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl APP⁺-Axone fanden sich jedoch nur im Vergleich der Gruppen Muster I vs. inaktive Läsionen (p=0,048) sowie Enzephalitiden vs. Muster I (p=0,002), Muster III (p=0,005) und aktive Läsionen (p=0,003).

Die Anzahl der Kontakte zwischen Ki-M1P⁺-Zellen und APP⁺-Axonen war in aktiven Läsionen (94/mm²) geringfügig größer als in inaktiven Läsionen (68/mm²); statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten MS-Gruppen fanden sich nicht. Bemerkenswert ist, daß beim Muster II 24% aller APP⁺-Axone einen engen Kontakt zu Ki-M1P⁺-Zellen aufweisen; bei ähnlich stark ausgeprägtem Infiltrat Ki-M1P⁺-Zellen, jedoch deutlich geringerer Anzahl APP⁺-Axone, könnte es sich hier um einen statistischen Effekt handeln.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß bei den untersuchten MS-Fällen das Infiltrat durch Ki-M1P⁺-Zellen (Makrophagen / Mikroglia) zahlenmäßig deutlich über dem Infiltrat durch T-Zellen rangiert.

Zudem fiel in einigen MS-Fällen auf, daß die Ki-M1P⁺-Zellen im Läsionszentrum sich schwächer anfärben als diejenigen am Läsionsrand (Abbildung 16). Darüber hinaus fanden sich zwischen diesen Gruppen morphologische Unterschiede: Zellen am Läsionsrand zeigten die typische Mikroglia-Morphologie (kleiner, unregelmäßiger geformt, mit multiplen Fortsätzen), Zellen im Läsionszentrum die typische Makrophagen-Morphologie

(größer, regelmäßig-runder). Es ist denkbar, daß dies im Aktivierungszustand einzelner Läsionsregionen begündet liegt: So kann das Läsionszentrum bereits wieder verhältnismäßig inaktiv sein, während am Läsionsrand erst Mikrogliazellen aktiviert werden [vgl. BOVEN *et al.*, 2005].

In den Enzephalitis-Vergleichsfällen war das Makrophagen-Infiltrat mit 300 Zellen pro mm² deutlich geringer ausgeprägt als in allen untersuchten MS-Gruppen (Enzephalitiden vs. Muster I, II, III, aktive und inaktive Läsionen: $p < 0,008$). Auch die akute axonale Schädigung stellte sich mit 17 APP⁺-Axonen pro mm² deutlich geringer dar als in den MS-Fällen (Enzephalitiden vs. Muster I, III und aktive Läsionen: $p < 0,006$). Die Anzahl der Kontakte zwischen Ki-M1P⁺-Zellen und APP⁺-Axonen war bei den Enzephalitiden im Vergleich zu den MS-Gruppen statistisch signifikant niedriger (Enzephalitiden vs. Muster I, II, III und aktive Läsionen: $p < 0,006$; Enzephalitiden vs. inaktive Läsionen: $p < 0,02$). Gerade 0,3% aller Ki-M1P⁺-Zellen zeigte einen engen Kontakt zu APP⁺-Axonen; dieser niedrige Wert könnte allerdings ein Ausdruck der deutlich niedrigeren APP-Dichte in den Enzephalitis-Fällen sein.

Tabelle 13 und Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse im Überblick, Abbildung 15 demonstriert die Färbung.

Abbildung 15: Doppelmarkierung Ki-M1P / APP (Färbung)

Fall Nr. 15 (Biopsie einer 39-jährigen Patientin mit primär chronisch-progredienter MS, Krankheitsdauer 8 Jahre; nicht aktive Läsion): Enge Kontakte von Ki-M1P⁺-Zellen (rot, *Fast Red*) und APP⁺-Axonen (braun, DAB).

Abbildung 16: Doppelmarkierung Ki-M1P / APP (regionale Unterschiede)

Fall Nr. 2 (Biopsie einer 32-jährigen Patientin, Krankheitsdauer 1,5 Jahre; aktive MS-Läsion des neuropathologischen Musters I): Unterschiede in der Intensität der Anfärbung Ki-M1P⁺-Zellen (rot, *Fast Red*) zwischen Läsionsrand (links) und Läsionszentrum (rechts). Im Läsionszentrum finden sich blaß angefärbte, morphologisch eher Makrophagen entsprechende Zellen (größer, regelmäßig-runder), am Läsionsrand finden sich kräftig angefärbte, morphologisch eher Mikroglia entsprechende Zellen (kleiner, unregelmäßig geformt, mit multiplen Fortsätzen).

Abbildung 17: Doppelmarkierung Ki-M1P / APP (graphische Darstellung)

Horizontale Balken geben das arithmetische Mittel an; * = statistisch signifikant (p ≤ 0,05).

Tabelle 13: Doppelmarkierung Ki-M1P / APP

Gruppe	APP pro mm ²	Ki-M1P pro mm ²	Kontakte pro mm ²	Ki-M1P mit Kontakt in % aller Ki-M1P	APP mit Kontakt in % aller APP
Aktiv (n=14)	559 ± 264	1.169 ± 307	94 ± 38	8	17
Inaktiv (n=6)	351 ± 330	1.267 ± 366	68 ± 42	5	19
Muster I (n=5)	678 ± 262	1.441 ± 195	104 ± 42	7	15
Muster II (n=4)	367 ± 265	1.182 ± 302	88 ± 51	7	24
Muster III (n=5)	592 ± 223	888 ± 84	88 ± 28	10	15
Alle (n=20)	496 ± 293	1.199 ± 319	86 ± 40	7	17
Enzephalitis (n=3)	17 ± 14	300 ± 99	1 ± 1	0,3	6

Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± Standardabweichung.

3.4.2 CD8⁺-Makrophagen

In einer exemplarisch am Fall Nr. 2 durchgeführten Fluoreszenz-Doppelmarkierung (CD8, SMI31) fielen einige für CD8 leicht positive Zellen auf, die morphologisch eher Makrophagen als zytotoxischen T-Zellen entsprachen (Abbildung 18). In der neueren Literatur wurde bereits eine etwaige Bedeutung CD8⁺-phagozytischer Zellen bei der MS diskutiert [JANDER, 2000; SCHROETER *et al.*, 2003].

In einer daraufhin durchgeführten Doppelmarkierung für Ki-M1P und CD8 mit einem Verfahren, das bei Verwendung zweier Primärantikörper gleicher Herkunftsspezies eine Kreuzreaktivität von erstem und zweitem System bestmöglich unterdrückt und somit zur Darstellung etwaiger Colokalisationen gut geeignet ist (s. Abschn. 2.2.3.2.4), konnten derartige Zellen jedoch nicht gesehen werden (Abbildung 19).

Abbildung 18: Doppelmarkierung CD8 / SMI31

Fall Nr. 2 (Biopsie einer 32-jährigen Patientin, Krankheitsdauer 1,5 Jahre; aktive MS-Läsion des neuropathologischen Musters I); Morphologisch eher Makrophagen entsprechende $CD8^+$ -Zellen (weiße Pfeile) neben typischen $CD8^+$ -zytotoxischen T-Zellen (gelbe Pfeile), beide CyTM3 (rot); Axone markiert mit SMI31 (CyTM2, grün); Zellkerne in blau.

Abbildung 19: Doppelmarkierung Ki-M1P / CD8

Fall Nr. 2 (Biopsie einer 32-jährigen Patientin, Krankheitsdauer 1,5 Jahre; aktive MS-Läsion des neuropathologischen Musters I), zentraler Läsionsabschnitt: Morphologisch Makrophagen entsprechende, blaßgrün (CyTM2) markierte Zellen; morphologisch Mikroglia entsprechende kräftiger grün (CyTM2) markierte Zellen; $CD8^+$ -T-Zellen, rot markiert (AlexaFluor[®] 555); Zellkerne in blau.

3.5 Expression von MHC-I

Exemplarisch wurden Schnitte der Fälle 1, 3 und 6 sowie die Enzephalitis-Vergleichsfälle mit dem Antikörper HC-10, der MHC-I erkennt, gefärbt. Unter zahlreichen positiven Zellen färbten sich auch vereinzelt Neurone und Axone an.

Abbildung 20: MHC-I⁺-Axon

Fall Nr. 14 (Biopsie einer 41-jährigen Patientin mit schubförmiger MS; Krankheitsdauer 3 Jahre; aktive Läsion des neuropathologischen Musters III): MHC-I⁺-Axon (braun, DAB).

3.6 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Zum besseren Überblick sind die erhobenen Ergebnisse nachfolgend in Tabellenform zusammengefaßt.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse

	Aktive Läsionen				Inaktive Läsionen (n = 6)	Enzephalitis (n = 3)
	Muster I (n = 5)	Muster II (n = 4)	Muster III (n = 5)	Alle (n = 14)		
T-Zellen						
CD3	103 ± 55	128 ± 154	136 ± 157	122 ± 119	77 ± 25	74 ± 80
CD3 an APP	17 %	9 %	5 %	10 %	8 %	1 %
CD8	47 ± 17	63 ± 86	50 ± 37	53 ± 48	25 ± 20	37 ± 28
CD8 an APP	15 %	21 %	12 %	17 %	4 %	5 %
Anteil CD8 an CD3	46 %	49 %	37 %	43 %	32 %	50 %
Makrophagen						
Anzahl	1.441 ± 195	1.182 ± 302	888 ± 84	1.169 ± 307	1.267 ± 366	300 ± 99
Makroph. an APP	7 %	7 %	10 %	8 %	5 %	0,3 %
Akute axonale Schädigung						
APP ⁺ -Axone	607	299	542	496	322	36
APP an CD3	4 %	6 %	2 %	4 %	2 %	3 %
APP an CD8	1 %	4 %	1 %	2 %	0,3 %	4 %
APP an Makroph.	15 %	24 %	15 %	17 %	19 %	6 %

Alle absoluten Werte geben die Anzahl pro mm² ± Standardabweichung an; „... an APP“ meint den prozentualen Anteil aller Zellen der jeweiligen Population, die eine enge Anlagerung an akut geschädigte APP⁺-Axone zeigen; „APP an ...“ meint den prozentualen Anteil aller APP⁺-Axone, die einen engen Kontakt zu jeweils bezeichneten Entzündungszellen zeigen; als Anzahl APP⁺-Axone als Maß akuter axonaler Schädigung ist das arithmetische Mittel der Werte aus den Doppelmarkierungen CD3–APP, CD8–APP und Ki-M1P–APP angegeben.

4 Diskussion

4.1 Zahlreiche Kontakte zwischen CD8⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen in aktiven MS-Läsionen

Zahlreiche Veröffentlichungen legen eine besondere Bedeutung CD8⁺-T-Zellen in Bezug auf die axonale Schädigung bei MS nahe (ausführliche Darlegung s. Abschn. 1.2.3). Insbesondere die von mehreren Gruppen demonstrierte Korrelation zwischen der Anzahl CD8⁺-T-Zellen in den Läsionen und der beobachteten akuten axonalen Schädigung [TRAPP *et al.*, 1998, 1999a; BITSCH *et al.*, 2000a; KUHLMANN *et al.*, 2002] unterstreicht dies.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß in aktiven MS-Läsionen ein beachtlicher Anteil (17%) aller in der Läsion vorhandenen CD8⁺-T-Zellen direkten räumlichen Kontakt zu akut geschädigten APP⁺-Axonen aufweist; in inaktiven Läsionen sind es lediglich 4%. Auffällig erscheint hier, daß der Anteil CD8⁺-T-Zellen mit Kontakt zu APP⁺-Axonen mit 21% im Muster II deutlich größer ausfällt als in den Mustern I (15%) und III (12%).

Die von CD8⁺-T-Zellen vermittelte Zellschädigung ist abhängig von der Erkennung eines spezifischen Antigens, das im MHC-I/Peptid-Komplex präsentiert wird [JANEWAY *et al.*, 2001]. HÖFTBERGER *et al.* (2004) haben gezeigt, daß Axone in aktiven MS-Läsionen MHC-I exprimieren. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten exemplarisch MHC-I⁺-Axone in aktiven MS-Läsionen demonstriert werden.

Die Ausschüttung cytotoxischer Granula, die u.a. Perforin und Granzym enthalten, gilt als hauptsächlicher Effektormechanismus CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen [JANEWAY *et al.*, 2001]. NEUMANN *et al.* (2002) demonstrierten bereits exemplarisch in einer MS-Läsion einen Kontakt zwischen einem demyelinisierten Axon und einer CD8⁺-T-Zelle, deren cytotoxische, Granzym-B enthaltende Granula zur Oberfläche des Axons hin polarisiert waren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß offenbar ein hoher Anteil der CD8⁺-T-Zellen Granzym-B⁺-Granula besitzt und somit als aktiviert zu betrachten ist. Eine eindeutige polare Ausrichtung der Granzym-B-enthaltenden Granula konnte jedoch zumindest bei den exemplarisch untersuchten Patienten 1 (Muster I), 3 (Muster I) und 14 (Muster III) nicht gesehen werden.

Vor dem dargestellten Hintergrund könnte der hohe Anteil $CD8^+$ -T-Zellen mit Kontakt zu akut geschädigten APP^+ -Axonen als Hinweis auf eine spezifische Attacke gewertet werden. Insbesondere die vergleichende Betrachtung von aktiven MS-Läsionen und viralen Enzephalitiden bietet Unterstützung für diese Hypothese. Gerade bei virusinfizierten Zellen wäre eine Präsentation von Viruspeptiden über MHC-I mit folgendem Angriff $CD8^+$ -T-Zellen zu erwarten [vgl. JANEWAY *et al.*, 2001]. Doch der Anteil $CD8^+$ -T-Zellen mit Kontakt zu APP^+ -Axonen liegt mit 5% in den untersuchten viralen Enzephalitiden deutlich unterhalb des Wertes der aktiven MS-Läsionen (17%), jedoch noch oberhalb des Wertes inaktiver MS-Läsionen (4%). Es muß allerdings angemerkt werden, daß die Enzephalitiden im Vergleich zu MS-Läsionen zwar ein ähnlich stark ausgeprägtes T-Zell-Infiltrat aufweisen, jedoch erheblich weniger APP^+ -Axone; somit ist die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes bereits durch die erheblich niedrigere APP-Dichte reduziert. Darüber hinaus zeigten die untersuchten Enzephalitiden keine Entmarkung, die nach der Ansicht zahlreicher Autoren eine axonale Schädigung zumindest begünstigt, wenn nicht gar deren Voraussetzung ist (ausführliche Darlegung s. Abschn. 1.2.2).

$CD8^+$ -T-Zellen besitzen neben der Ausschüttung cytotoxischer Granula noch einen weiteren Effektormechanismus, über den eine Zielzelle durch Auslösung der Apoptose geschädigt werden kann: den Fas-Liganden [KÄGI *et al.*, 1994, 1996; LOWIN *et al.*, 1994; JANEWAY *et al.*, 2001]. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß über diesen Mechanismus eine lokale, selektive Schädigung eines Axons ausgelöst werden kann. Zumindest was Angriffe auf Neuronen anbelangt, spricht sich die Mehrheit der Autoren für den Weg über Perforin/Granzym aus (s. Abschn. 1.2.3).

Möglicherweise gibt es allerdings auch MHC-I-unabhängige Mechanismen der Zielzellenschädigung durch T-Zellen. In den letzten Jahren veröffentlichten zwei Gruppen entsprechende Daten [GIULIANI *et al.*, 2003; NITSCH *et al.*, 2004], die jedoch kontrovers diskutiert werden.

Es kann durchaus in Frage gestellt werden, ob die beobachteten Kontakte zwischen $CD8^+$ -T-Zellen und APP^+ -Axonen überhaupt diejenigen Kontakte sind, die zur Schädigung des Axons geführt haben. MEDANA *et al.* (2001) zeigten in Kultur die komplette Durchtrennung eines Neuriten durch eine zytotoxische T-Zelle innerhalb von 25 Minuten. Es ist fraglich, ob zytotoxische T-Zellen tatsächlich bis zur Ausbildung APP^+ -Aufreibungen – bislang ist ein minimaler zeitlicher Abstand zwischen Schädigung und

immunocytochemischer Nachweisbarkeit einer APP-Kumulation von zwei Stunden, zwischen Schädigung und Ausbildung APP⁺-Aufreibungen von drei Stunden belegt [MCKENZIE *et al.*, 1996] – am Ort der Schädigung verweilen, oder ob die in dieser Untersuchung beobachteten Kontakte jeweils weitere Entzündungszellen zeigen. MEDANA *et al.* (2001) zeigten die zytotoxische T-Zelle auch 55 Minuten nach Erstkontakt noch am Ort der Schädigung.

Zahlreiche Autoren lieferten Hinweise darauf, daß für die akute Schädigung eines Axons dessen Demyelinisierung notwendig ist (vgl. Abschn. 1.2.2). Demnach sind bereits geschädigte – und somit auch demyelinisierte – Axone auch weiterhin Ziele einer etwaigen Attacke durch Entzündungszellen. Die beobachteten Kontakte zwischen Entzündungszellen und APP⁺-Axonen erscheinen demnach trotz der oben aufgeführten Einwände als valides Maß eines etwaigen Angriffs durch Entzündungszellen auf demyelinisierte Axone geeignet zu sein.

4.2 Kontakte zwischen CD3⁺-T-Zellen und APP⁺-Axonen

Auch bei der Betrachtung sämtlicher T-Zellen fällt auf, daß ein mit 10% beachtenswerter Anteil in aktiven Läsionen einen engen räumlichen Kontakt zu APP⁺-Axonen aufweist. Die Differenz von CD3⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen läßt auf die ungefähre Anzahl CD4⁺-T-Zellen schließen. Auch CD4⁺-T_H1-Zellen besitzen prinzipiell die Möglichkeit, über den in ihrer Membran vorhandenen Fas-Liganden zellschädigend zu wirken, indem sie die Apoptose der Zielzelle auslösen [JANEWAY *et al.*, 2001]. Es erscheint jedoch fraglich, ob über diesen Mechanismus auch eine lokale, selektive Schädigung eines Axons ausgelöst werden kann. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen der Anzahl der T-Zellen in den Läsionen und dem Ausmaß der akuten axonalen Schädigung nur für die Subpopulation der CD8⁺-T-Zellen, nicht jedoch für die Gesamtheit CD3⁺-T-Zellen demonstriert [BITSCH *et al.*, 2000a; KUHLMANN *et al.*, 2002]. Eine direkt schädigende Wirkung von CD4⁺-T-Zellen auf Axone mittels „klassischer“ Mechanismen erscheint daher unwahrscheinlich. Möglicherweise könnte es sich bei den beobachteten T-Zellen mit Kontakt zu APP⁺-Axonen um entzündungsmediierende T_H1-Zellen handeln [vgl. HEMMER *et al.*, 2002; SOSPEDRA und MARTIN, 2005], die über proinflammatorische Zytokine zu einer verstärkten Infiltration durch Makrophagen führen, die ihrerseits schädigende

Substanzen ausschütten. Eine indirekte Schädigung durch T_H1 -Zellen ist somit durchaus denkbar. Jedoch bleibt fraglich, welches Antigen von diesen Zellen erkannt wird; bei fehlender MHC-II-Expression auf Axonen [HÖFTBERGER *et al.*, 2004; REDWINE *et al.*, 2001], jedoch nachgewiesener Expression von MHC-II auf Makrophagen und Mikrogliazellen wäre denkbar, daß letztere in unmittelbarer Nähe von geschädigten Axonen phagozytierte Moleküle präsentieren.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß im Muster I 17% aller $CD3^+$ -T-Zellen einen engen Kontakt zu APP^+ -Axonen aufweisen; in Muster-II-Fällen (9%) und Muster-III-Fällen (5%) sind es deutlich weniger. Jedoch waren die beobachteten Unterschiede bzgl. Anzahl $CD3^+$ -T-Zellen und Kontakte von $CD3^+$ -T-Zellen mit APP^+ -Axonen zwischen allen untersuchten MS-Gruppen statistisch nicht signifikant. Beachtenswert ist, daß mehrere Gruppen in neuerer Zeit MHC-unabhängige Schädigungen von Axonen und Neuronen durch aktivierte T-Zellen nachwiesen. GIULIANI *et al.* (2003) demonstrierten eine MHC-unabhängige, kontaktabhängige Schädigung von Axonen durch $CD4^+$ -T-Zellen. Auch NITSCH *et al.* (2004) zeigten kontaktabhängige Schädigungen von Neuronen durch $CD4^+$ -T-Zellen, die sowohl MHC-unabhängig waren, als auch unabhängig von der Spezifität der T-Zellen selbst; es kam zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in der Zielzelle, der letztlich zum Zelltod führte. Ob ein ähnlicher Mechanismus auch im Muster I der MS eine Rolle spielt, bleibt fraglich. Die Annahme, es handele sich im Muster I um entzündungsmediierende T_H1 -Zellen, wäre vereinbar mit der von LUCCHINETTI *et al.* (2000) formulierten Hypothese, daß die Schädigung im Muster I hauptsächlich durch Makrophagentoxine verursacht werde (vgl. Abschn. 1.1.3.2); eine etwaige Schädigung von Neuronen und Axonen durch T_H1 -Zellen über Mechanismen wie von GIULIANI *et al.* (2003) und NITSCH *et al.* (2004) beschrieben könnte als „Kollateralschaden“ auftreten.

Der niedrige Anteil $CD3^+$ -T-Zellen mit Kontakt zu APP^+ -Axonen in den Muster-III-Fällen von 5% böte Unterstützung für die Hypothese, daß es sich beim Muster III nicht um einen autoimmunen Prozeß, sondern um eine ischämisch bedingte Schädigung [ABOUL-ENEIN *et al.*, 2003; LASSMANN, 2003; vgl. Abschn. 1.1.3.2] mit postischämischer Inflammation [vgl. JANDER, 2000] handeln könnte.

4.3 Makrophagen / Mikroglia

Sämtliche untersuchten Läsionen zeigten ein ausgeprägtes Infiltrat von Makrophagen sowie aktivierte Mikroglia. Ein signifikanter Unterschied bzgl. des Ausmaßes der Infiltration zwischen aktiven und inaktiven Läsionen war nicht zu finden; dies deckt sich mit den Beobachtungen von BRÜCK *et al.* (1995). Jedoch fand sich im Muster III ein im Vergleich zu Muster I (1.441 Zellen/mm²) und Muster II (1.182 Zellen/mm²) schwächer ausgeprägtes Infiltrat von 888 Zellen/mm², das auch unter dem Infiltrat in den untersuchten inaktiven Läsionen (1.267/mm²) rangiert; im Vergleich der Muster III und I ($p=0,003$) sowie des Musters III mit den inaktiven Läsionen ($p=0,031$) war dieser Unterschied statistisch signifikant. Vergleichbare Unterschiede zwischen den Mustern bzgl. der Anzahl von Makrophagen und Mikrogliazellen sind bereits von LUCCHINETTI *et al.* (2000) beschrieben worden. Hierin könnte ein Hinweis auf die möglicherweise unterschiedlichen Pathogenesen der einzelnen Muster gesehen werden: autoimmunes Geschehen in den Mustern I und II, während Muster III Ähnlichkeiten zu ischämisch geschädigtem Gewebe aufweist [ABOUL-ENEIN *et al.*, 2003; vgl. Abschn. 1.1.3.2] und somit möglicherweise eine postischämische Inflammation vorliegt [vgl. JANDER, 2000]. Für eine unterschiedliche Aktivierung der Makrophagen im Vergleich der Muster II und III konnte mit dem Nachweis einer unterschiedlichen Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR1 und CCR5 auf mononukleären phagozytischen Zellen bereits ein Anhaltspunkt gefunden werden [MAHAD *et al.*, 2004].

In den aktiven Läsionen zeigten etwa 8% aller Makrophagen eine enge Anlagerung an APP⁺-Axone, in den inaktiven Läsionen etwa 5%. Hingegen fand sich in aktiven Läsionen ein Anteil von etwa 17% APP⁺-Axone mit Kontakt zu Makrophagen / Mikroglia, in inaktiven Läsionen von etwa 19%. Möglicherweise handelt es sich hier – insbesondere in den inaktiven Läsionen – um eine Abräumreaktion.

Unter diesem Gesichtspunkt ist interessant, daß im Muster II, bei dem eine Schädigung durch Antikörper und Komplement angenommen wird (vgl. Abschn. 1.1.3.2), mit 24% ein deutlich größerer Anteil der APP⁺-Axone einen engen Kontakt zu Makrophagen aufweist als es in den Mustern I und III (jeweils 15%) der Fall ist; jedoch könnte es sich hier um einen statistischen Effekt bei vergleichbarem entzündlichen Infiltrat, jedoch geringerer Anzahl APP⁺-Axone im Muster II handeln. KUHLMANN und BRÜCK (1999) haben an Zellkulturen der Maus demonstriert, daß Immunglobuline die Phagozytose von

Myelinbestandteilen durch Makrophagen verstärken. Die klonale Expansion von B-Zellen im Liquor von MS-Patienten [ZHANG *et al.*, 2005a] sowie die Infiltration von MS-Läsionen durch klonal expandierte Plasmazellen [ZHANG *et al.*, 2005b] konnten kürzlich gezeigt werden; es fand sich eine Anlagerung der von diesen Zellen produzierten Antikörper an Axone in MS-Läsionen [ZHANG *et al.*, 2005a, 2005b]. Die Annahme, der große Anteil APP⁺-Axone mit Kontakt zu Makrophagen in Muster-II-Fällen sei Ausdruck einer gesteigerten Phagozytose axonaler Bestandteile, die durch spezifische Antikörper markiert wurden, erscheint daher nicht völlig abwegig.

In einer neueren Untersuchung konnten BOVEN *et al.* (2005) zeigen, daß Makrophagen in MS-Läsionen, die mit phagozytierten Myelinbestandteilen beladen sind, verschiedene anti-inflammatorische Moleküle exprimieren, während pro-inflammatorische Cytokine nicht mehr nachzuweisen sind. Möglicherweise könnte dies die Beobachtung erklären, daß sich in den aktiven Läsionen des Musters II mit 299/mm² deutlich weniger APP⁺-Axone und damit eine weniger stark ausgeprägte akute axonale Schädigung fanden als in aktiven Läsionen der Muster I (607/mm²) und III (542/m²). Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß von zweien der insgesamt vier untersuchten Muster-II-Fälle nur sehr wenig Gewebe vorlag.

Interessant ist die Beobachtung von BOVEN *et al.* (2005) auch im Hinblick auf das in einigen Fällen beobachtete unterschiedliche Anfärbeverhalten der Ki-M1P⁺-Zellen im Läsionszentrum und dem Läsionsrand, bei dem sich im Läsionszentrum große, sich nur schwach anfärbende Zellen darstellten, während am Läsionsrand sich stark anfärbende, kleinere Zellen mit Ausläufern zu finden waren; möglicherweise handelt es sich im Läsionszentrum um myelinbeladene – und damit nach BOVEN *et al.* (2005) anti-inflammatorische – Makrophagen, während sich am Läsionsrand aktivierte Zellen finden. Die Unterschiede im Anfärbeverhalten könnten somit möglicherweise einem unterschiedlichen Grad der Aktivierung entsprechen.

Als hauptsächlicher Schädigungsmechanismus der Makrophagen / Mikroglia wird die Ausschüttung potentiell schädigender Substanzen wie diverser Cytokine, Chemokine, Enzyme und Verbindungen mit reaktiven Sauerstoffradikalen angenommen (ausführliche Darlegung s. Abschn. 1.2.4). Diese Schädigung durch Schaffung eines toxischen Milieus in der Läsion ist zum einen längst nicht in dem Ausmaße von einem direkten Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle abhängig wie es bei der Schädigung durch zytotoxische

T-Zellen der Fall ist, zum anderen ist sie auch längst nicht so spezifisch. Die Aussagekraft der Anzahl enger Kontakte zwischen Makrophagen / Mikrogliazellen und APP⁺-Axonen kann vor diesem Hintergrund hinsichtlich einer Schädigung durch Makrophagen als verhältnismäßig gering betrachtet werden; anders verhält es sich jedoch hinsichtlich einer möglichen Phagozytose.

4.4 Unterschiede zwischen den neuropathologischen Mustern der MS

Wie in Abschnitt 1.1.3.2 ausführlich dargelegt, haben LUCCHINETTI *et al.* (2000) die Pathologie aktiv entmarkender MS-Läsionen in vier klar unterscheidbare Läsionstypen eingeteilt, wobei in einem einzelnen Patienten alle Läsionen dem selben Typ entsprechen, welcher – zumindest über einen Zeitraum von vier Jahren – konstant bleibt [LUCCHINETTI *et al.*, 2004]. Diese Ergebnisse, ein unterschiedliches Ansprechen einzelner Patienten auf standardisierte Therapien [CORBOY *et al.*, 2003; PARRY *et al.*, 2003] sowie neuere Studien, die eine Korrelation von neuropathologischem Muster und Therapieerfolg belegen [KEEGAN *et al.*, 2004, 2005], lassen die Betrachtung der Multiplen Sklerose als einzelne Erkrankung obsolet erscheinen. Vielmehr scheint es sich um verschiedene Entitäten mit ähnlicher klinischer Manifestation zu handeln, somit wäre am ehesten von Erkrankungen aus dem Formenkreis der Multiplen Sklerose zu sprechen.

Der weitaus größte Teil der vorliegenden Literatur kennt jedoch diese Einteilung noch nicht. Die uneingeschränkte Verwertbarkeit der in der Literatur beschriebenen Befunde muß somit zumindest kritisch betrachtet werden, da nicht auszuschließen ist, daß mehrere Entitäten als Gruppe betrachtet wurden.

Von besonderem Interesse im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob sich im Vergleich der von LUCCHINETTI, BRÜCK und LASSMANN etablierten neuropathologischen Muster unterschiedliche Ergebnisse erheben lassen. Bestandteil dieser Untersuchung waren aktive Läsionen der Muster I, II und III. Im Muster I wird von einer Schädigung durch toxische Makrophagenprodukte ausgegangen. Für das Muster II nimmt man eine Schädigung durch Antikörper und Komplement an. Beim Muster III imponieren ein selektiver Verlust des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG), das sich weit distal in den Fortsätzen der Oligodendrozyten befindet, sowie apoptotische Oligodendrozyten;

insgesamt weisen die Merkmale des Musters III Ähnlichkeiten auf mit denen, die bei ischämischer Schädigung zu finden sind [ABOUL-ENEIN *et al.*, 2003].

Tatsächlich ließen sich mehrere auffällige Unterschiede belegen, die Tabelle 15 im Überblick zeigt.

Tabelle 15: Unterschiede zwischen den neuropathologischen Mustern

	Muster I (n = 5)	Muster II (n = 4)	Muster III (n = 5)
T-Zellen			
CD3 an APP	17 %	9 %	5 %
CD8 an APP	15 %	21 %	12 %
Anteil CD8 an CD3	46 %	49 %	37 %
Makrophagen			
Anzahl	1.441 ± 195	1.182 ± 302	888 ± 84
Akute axon. Schädigung			
APP ⁺ -Axone	607	299	542
APP an CD3	4 %	6 %	2 %
APP an CD8	1 %	4 %	1 %
APP an Makrophagen	15 %	24 %	15 %

Alle absoluten Werte geben die Anzahl pro mm² (± Standardabweichung) an; „... an APP“ meint den prozentualen Anteil aller Zellen der jeweiligen Population, die eine enge Anlagerung an akut geschädigte APP⁺-Axone zeigen; „APP an ...“ meint den prozentualen Anteil aller APP⁺-Axone, die einen engen Kontakt zu jeweils bezeichneten Entzündungszellen zeigen; als Anzahl APP⁺-Axone als Maß akuter axonaler Schädigung ist das arithmetische Mittel der Werte aus den Doppelmarkierungen CD3–APP, CD8–APP und Ki-M1P–APP angegeben. Im Vergleich der Muster auffällige Werte sind rot hervorgehoben.

Im Muster I wies mit 17% ein besonders großer Anteil der CD3⁺-T-Zellen einen engen Kontakt zu APP⁺-Axonen auf. Angesichts der Betrachtung des Muster I als T_H1-mediertes autoimmunes Geschehen wäre es denkbar, daß es sich hierbei um entzündungsmediierende T_H1-Zellen handeln könnte. Mehrere Gruppen demonstrierten in den letzten Jahren die von

MHC und Antigenspezifität der T-Zelle unabhängige Schädigung von Neuronen und Axonen durch CD4⁺-T-Zellen [GIULIANI *et al.*, 2003; NITSCH *et al.*, 2004].

Im Muster II zeigten 21% aller CD8⁺-T-Zellen und somit ein deutlich größerer Anteil als in anderen aktiven MS-Läsionen eine enge Anlagerung an APP⁺-Axone; ferner zeigte mit 4% ein größerer Anteil APP⁺-Axone als in den Mustern I und III einen Kontakt zu CD8⁺-T-Zellen. Angesichts der Tatsache, daß im Muster II das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung von allen aktiven MS-Läsionen am geringsten ausfiel, lenkt dies den Blick auf mögliche protektive Effekte CD8⁺-T-Zellen [KERSCHENSTEINER *et al.*, 1999; HOHLFELD *et al.*, 2000; STADELMANN *et al.*, 2002; SCHWARTZ und KIPNIS, 2005]. Auch Makrophagen könnte im Muster II, bei dem die Schädigung nach LUCCHINETTI *et al.* (2000) durch Antikörper und Komplement mediert wird, zumindest zum Teil eine protektive Funktion zukommen: KUHLMANN und BRÜCK (1999) demonstrierten eine durch Immunglobulin gesteigerte Phagozytose von Myelinbestandteilen, während eine neuere Untersuchung von BOVEN *et al.* (2005) zeigte, daß Makrophagen in MS-Läsionen, die mit phagozytierten Myelinbestandteilen beladen sind, verschiedene anti-inflammatorische Moleküle exprimieren. Die Existenz gegen axonale Strukturen gerichteter Antikörper bei MS-Patienten konnte mittlerweile gesichert werden [ZHANG *et al.*, 2005a, 2005b].

Läsionen des Musters III – mit Ähnlichkeiten zu ischämisch geschädigtem Gewebe [ABOUL-ENEIN *et al.*, 2003] – weisen mit 888 Zellen/mm² im Vergleich zu Läsionen der Muster I (1.441/mm²) und II (1.182/mm²) das am wenigsten stark ausgeprägte Makrophageninfiltrat auf. Interessant ist dies vor allem vor dem Hintergrund, daß die Schädigung durch Makrophagen und Mikroglia über Stickstoffmonoxid (NO) – einen wesentlichen Mechanismus im Repertoire von Makrophagen / Mikroglia (ausführliche Darstellung s. Abschn. 1.2.4) – die Empfindlichkeit eines Neurons gegenüber einer Hypoxie drastisch steigert, da Stickoxid und Sauerstoff um mitochondriale Cytochrom-Oxidasen konkurrieren [MANDER und BROWN, 2004]. Als Hinweis auf eine unterschiedliche Aktivierung mononukleärer phagozytischer Zellen im Vergleich der Muster II und III zeigte sich eine unterschiedliche Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR1 und CCR5 [MAHAD *et al.*, 2004]. Auffällig ist ferner ein Anteil CD3⁺-T-Zellen mit Kontakt zu APP⁺-Axonen von nur 5%, verglichen mit 17% im Muster I und 9% im Muster II, bei allerdings gleichzeitig von allen Mustern stärkster Infiltration durch CD3⁺-T-Zellen. Der Anteil der CD8⁺-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat ist mit 37% im Muster III verglichen mit 46% im Muster I und 49% im Muster II am niedrigsten. Möglicherweise

spiegelt sich in diesen Auffälligkeiten der Unterschied zwischen autoimmunen Prozessen in den Mustern I und II einerseits und einer postischämischen Inflammation im Muster III andererseits wider.

4.5 Nachweis akuter axonaler Schädigung in viralen Enzephalitiden

Bei den untersuchten Enzephalitis-Fällen mit höchstwahrscheinlich viraler Genese fand sich bei ähnlicher T-Zell-Dichte wie in den untersuchten MS-Läsionen eine erheblich geringer als in den MS-Fällen ausgeprägte akute axonale Schädigung; pro mm² konnten etwa 36 APP⁺-Axone gezählt werden. Im Rahmen viral verursachter ZNS-Erkrankungen wurden APP⁺-Axone bislang in Hirngewebe von HIV-Patienten [RAJA *et al.*, 1997; GRAY *et al.*, 2001] bzw. im SIV-Modell [MANKOWSKI *et al.*, 2002] sowie bei HTLV-I-assoziiierter Myelopathie [UMEHARA *et al.*, 2000] nachgewiesen.

Die Anzahl CD3⁺-T-Zellen in den Enzephalitiden ist vergleichbar mit dem T-Zell-Infiltrat in inaktiven MS-Läsionen und etwas geringer ausgeprägt als in aktiven MS-Läsionen. Nur 1% der CD3⁺-T-Zellen weist einen Kontakt zu APP⁺-Axonen auf – entscheidend weniger als bei aktiven (10%) oder inaktiven (8%) MS-Läsionen. Auffallend ist ferner ein Anteil von 5% CD8⁺-T-Zellen mit Kontakt zu APP⁺-Axonen. Dieser Wert liegt unter dem der aktiven MS-Läsionen (17%), aber geringfügig über dem der inaktiven MS-Läsionen (4%). Mit 50% ist der Anteil der CD8⁺-T-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat bei den viralen Enzephalitiden vergleichbar mit MS-Läsionen der autoimmunen Muster I und II.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß 4% aller APP⁺-Axone einen engen Kontakt zu CD8⁺-T-Zellen aufweisen, während es in MS-Läsionen erkennbar weniger sind. Bei im Vergleich zu MS-Läsionen ähnlicher T-Zell-Dichte und deutlich geringerer APP-Dichte könnte dies auf einen spezifischen Effekt hindeuten. Wie bereits erwähnt, wäre gerade bei virusinfizierten Zellen eine Präsentation von Viruspeptiden über MHC-I mit folgendem spezifischen Angriff CD8⁺-T-Zellen zu erwarten [vgl. JANEWAY *et al.*, 2001]; die erhobenen Befunde sind mit dieser Vorstellung vereinbar.

Im Vergleich zu den MS-Fällen zeigen die Enzephalitis-Fälle eine deutlich geringere Aktivierung von Makrophagen / Mikroglia. Auch eine Entmarkung, die eine akute axonale Schädigung zumindest deutlich begünstigt (vgl. Abschn. 1.2.2), wurde nicht beobachtet.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist die axonale Schädigung bei der MS immer mehr in den Focus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Für die Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen fanden sich bislang zahlreiche Hinweise, wie beispielsweise eine oligoklonale Expansion von CD8⁺-T-Zellen und eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl von CD8⁺-T-Zellen und der Anzahl akut geschädigter APP⁺-Axone in MS-Läsionen. Die vorliegende Arbeit bietet weiteren Anhalt für eine Mitbeteiligung von CD8⁺-T-Zellen am axonalen Untergang.

Erstmals konnte eine Häufung von Kontakten zwischen CD8⁺-T-Zellen und akut geschädigten APP⁺-Axonen in humanem Gewebe biopsierter MS-Patienten gezeigt werden. In aktiv demyelinisierenden Läsionen wiesen 17% aller CD8⁺-T-Zellen einen solchen Kontakt auf, in inaktiven Läsionen waren es mit 4% bei insgesamt geringerer Ausprägung der akuten axonalen Schädigung deutlich weniger; hierbei waren 43% aller T-Zellen in aktiv demyelinisierenden Läsionen CD8-positiv, in inaktiven Läsionen waren es 32%. Ein großer Anteil der beobachteten CD8⁺-T-Zellen in exemplarisch untersuchten aktiven Läsionen zeigte Granzym-B enthaltende Granula und ist somit als aktiviert zu betrachten.

Darüber hinaus fanden sich deutliche Unterschiede zwischen den neuropathologischen Mustern I, II und III nach *LUCCHINETTI*, *BRÜCK* und *LASSMANN*. So stellte sich das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung im Muster II geringer dar als in den anderen untersuchten Mustern, während im Muster III ein schwächeres Makrophagen-Infiltrat gesehen wurde. Auch zeigte ein erheblich größerer Anteil der CD3⁺-T-Zellen in Läsionen des Musters I eine enge Anlagerung an APP⁺-Axone, als es in den Mustern II und III der Fall war. Somit bieten die vorliegenden Ergebnisse weitere Unterstützung für die These, daß es sich bei der MS um verschiedene Entitäten mit ähnlicher klinischer Manifestation handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner eine – wenn auch gering ausgeprägte – akute axonale Schädigung in viralen Enzephalitiden nachgewiesen werden. Das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung belief sich auf etwa ein Zehntel dessen in den untersuchten MS-Läsionen.

6 Literaturverzeichnis

- ABOUL-ENEIN F**, RAUSCHKA H, KORNEK B, STADELMANN C, STEFFERL A, BRÜCK W, LUCCHINETTI C, SCHMIDBAUER M, JELLINGER K, LASSMANN H (2003): *Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases*. J Neuropathol Exp Neurol 62, 25-33
- AKTAS O**, WAICZIES S, SMORODCHENKO A, DÖRR J, SEEGER B, PROZOROVSKI T, SALLACH S, ENDRES M, BROCKE S, NITSCH R, ZIPP F (2005): *Treatment of Relapsing Paralysis in Experimental Encephalomyelitis by Targeting Th1 Cells through Atorvastatin*. J Exp Med 197, 725-733
- ARANTES RM**, LOURENSSEN S, MACHADO CR, BLENNERHASSETT MG (2000): *Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro*. Neuroreport 11, 177-181
- BABBE H**, ROERS A, WAISMAN A, LASSMANN H, GOEBELS N, HOHLFELD R, FRIESE M, SCHRÖDER R, DECKERT M, SCHMIDT S, RAVID R, RAJEWSKY K (2000): *Clonal Expansions of CD8+ T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction*. J Exp Med 192, 393-404
- BAL-PRICE A**, BRWON GC (2001): *Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity*. J Neurosci 21, 6480-6491
- BANWELL BL** (2004): *Pediatric multiple sclerosis*. Curr Neurol Neurosci Rep 4, 245-252
- BARKHOF F**, FILIPPI M, MILLER DH, SCHELTENS P, CAMPI A, POLMAN CH, COMI G, ADER HJ, LOSSEFF N, VALK J (1997): *Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis*. Brain 120, 2059-2069
- BARTNIK BL**, JUURLINK BH, DEVON RM (2000): *Macrophages: their myelinotrophic or neurotoxic actions depend upon tissue oxidative stress*. Mult Scler 6, 37-42
- BASCHONG W**, SUETTERLIN R, LAENG RH (2001): *Control of Autofluorescence of Archival Formaldehyd-fixed, Paraffin-embedded Tissue in Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*. J Histochem Cytochem 49, 1565-1571
- BAYAS A**, GOLD R (2003): *Lessons from 10 years of interferon beta-1b (Betaferon®/Betaseron®) treatment*. J Neurol 250 Suppl. 4, IV/3-IV/8
- BECHTOLD DA**, KAPOOR R, SMITH KJ (2004): *Axonal protection using flecainid in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol 55, 607-616
- BIEN CG**, BAUER J, DECKWERTH TL, WIENDL H, DECKERT M, WIESTLER OD, SCHRAMM J, ELGER CE, LASSMANN H (2002): *Destruction of Neurons by Cytotoxic T Cells: A New Pathogenetic Mechanism in Rasmussen's Encephalitis*. Ann Neurol 51, 311-318
- BITSCH A**, BRÜCK W (2002): *Differentiation of multiple sclerosis subtypes: implications for treatment*. CNS Drugs 16, 405-418
- BITSCH A**, SCHUCHARDT J, BUNKOWSKI S, KUHLMANN T, BRÜCK W (2000a): *Acute axonal*

injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. Brain 123, 1174-1183

BITSCH A, KUHLMANN T, DA COSTA C, BUNKOWSKI S, POLAK T, BRÜCK W (2000b): *Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Expression in Early Multiple Sclerosis Lesions: Correlation With Demyelinating Activity and Oligodendrocyte Pathology. Glia* 29, 366-375

BÖ L, DAWSON TM, WESSELINGH S, MÖRK S, CHOI S, KONG PA, HANLEY D, TRAPP BD (1994): *Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. Ann Neurol* 36, 778-786

BOVEN LA, VAN MEURS M, VAN ZWAM M, WIERENGA-WOLF A, HINTZEN RQ, BOOT RG, AERTS JM, AMOR S, NIEUWENHUIS EE, LAMAN JD (2005): *Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. Brain*, im Druck

BRAMLETT HM, KRAYDIEH S, GREEN EJ, DIETRICH WD (1997): *Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. J Neuropathol Exp Neurol* 56, 1132-41

BRAND-SCHIEBER E, WERNER P (2004): *Calcium channel blockers ameliorate disease in a mouse model of multiple sclerosis. Exp Neurol* 189, 5-9

BROUNS I, VAN NASSAUW L, VAN GENECHTEN J, MAJEWSKI M, SCHEUERMANN DW, TIMMERMANNS JP, ADRIAENSEN D (2002): *Triple Immunofluorescence Staining with Antibodies Raised in the Same Species to Study the Complex Innervation Pattern of Intrapulmonary*

Chemoreceptors. J Histochem Cytochem 50, 575-582

BRÜCK W, SCHMIED M, SUCHANEK G, BRÜCK Y, BREITSCHOPF H, POSER S, PIDDLESSEN 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, KUHLMANN T, STADELMANN C (2003): *Remyelination in multiple sclerosis. J Neurol Sci* 206, 181-185

CALLEGARO D, DE LOLIO CA, RADVANY J, TILBERY CB, MENDONCA RA, MELO AC (1992): *Prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, in 1990. Neuroepidemiology* 11, 11-14

CEPOK S, JACOBSEN M, SCHOCK S, OMER B, JAEKEL S, BODDEKER I, OERTEL WH, SOMMER N, HEMMER B (2001): *Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. Brain* 124, 2169-2176

CEPOK S, ZHOU D, SRIVASTAVA R, NESSLER S, STEI S, BÜSSOW K, SOMMER N, HEMMER B (2005): *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. J Clin Invest* 115, 1352-1360

- CHANCELLOR AM**, ADDIDLE M, DAWSON K (2003): *Multiple sclerosis is more prevalent in northern New Zealand than previously reported.* Intern Med J 33, 79-83
- CHARCOT JM** (1868): *Histologie de la sclérose en plaques.* Gaz Hop 141, 554-558
- CLANET M**, BERRY I (1998): *Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis.* Curr Opin Neurol 11, 299-303
- CLARK D** (2004): *Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis.* Herpes 11, 112a-119a
- COMPSTON DAS**, EBERS GC: *The genetics of multiple sclerosis;* in: Handbook of neurology; hrsg. v. COOK SD; Decker, New York 1990, 25-39
- CORBOY JR**, GOODIN DS, FROHMAN EM (2003): *Disease-modifying Therapies for Multiple Sclerosis.* Curr Treat Options Neurol 5, 35-54
- COTTRELL DA**, KREMENCHUTZKY M, RICE GP, KOOPMAN WJ, HADER W, BASKERVILLE J, EBERS GC (1999): *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis.* Brain 122, 625-639
- CRANER MJ**, DAMARJIAN TG, LIU S, HAINS BC, LO AC, BLACK JA, NEWCOMBE J, CUZNER ML, WAXMAN SG (2005): *Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS.* Glia 49, 220-229
- DALTON CM**, BREX PA, MISZKIEL KA, HICKMAN SJ, MACMANUS DG, PLANT GT, THOMPSON AJ, MILLER DH (2002): *Application of the New McDonald Criteria to Patients with Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis.* Ann Neurol 52, 47-53
- DANDEKAR AA**, WU GF, PEWE L, PERLMAN S (2001): *Axonal Damage is T Cell Mediated and Occurs Concomitantly with Demyelination in Mice Infected with a Neurotropic Coronavirus.* J Virol 75, 6115-6120
- DEAN G** (1967): *Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South African-born and in white immigrants to South Africa.* BMJ 1967, 2, 724-730
- DEAN G**, BHIGJEE AI, BILL PL, FRITZ V, CHIKANZA IC, THOMAS JE, LEVY LF, SAFFER D (1994): *Multiple sclerosis in black South Africans and Zimbabweans.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 57, 1064-1069
- DEAN G**, ELIAN M, GALEA DE BONO A, PACE ASCIAK R, VELLA N, MIFSUD V, AQUILINA J (2002): *Multiple sclerosis in Malta in 1999: an update.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 73, 256-260
- DE GROOT CJA**, RUULS SR, THEEUWES JWM, DIJKSTRA CD, VAN DER VALK P (1997): *Immunocytochemical Characterization of the Expression of Inducible and Constitutive Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions.* J Neuropathol Exp Neurol 56, 10-20
- DELUCA GC**, EBERS GC, ESIRI MM (2004): *Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts.* Brain 127, 1009-1018
- DE STEFANO N**, NARAYANAN S, FRANCIS GS, ARNAOUTELIS R, TARTAGLIA MC, ANTEL JP, MATTHEWS PM, ARNOLD DL (2001): *Evidence of*

Axonal Damage in the Early Stages of Multiple Sclerosis and Its Relevance to Disability. Arch Neurol 58, 65-70

DE VOS AF, VAN MEURS M, BROK HP, BOVEN LA, HINTZEN RQ, VAN DER VALK P, RAVID R, RENSING S, BOON L, 'T HART BA, LAMAN JD (2002): *Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs.* J Immunol 169, 5415-5423

DIEM R, HOBOM M, MAIER K, WEISSERT R, STORCH MK, MEYER R, BÄHR M (2003): *Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway.* J Neurosci 23, 6993-7000

DIEM R, SÄTTLER MB, MERKLER D, DEMMER I, MAIER K, STADELMANN C, EHRENREICH H, BÄHR M (2005): *Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis.* Brain 128, 375-385

DOW RS, BERGLUND G (1942): *Vascular pattern of lesions of multiple sclerosis.* Arch Neurol Psychiatr 47, 1-18

EBERS GC, SADOVNICK AD (1994): *The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility.* J Neuroimmunol 54, 1-17

EBERS GC, BULMAN DE, SADOVNICK AD, PATY DW, WARREN S, HADER W, MURRAY TJ, SELAND TP, DUQUETTE P, GREY T, *et al.* (1986): *A population-based study of multiple sclerosis in twins.* N Engl J Med 315, 1638-1642

EDAN G, MORRISSEY S, LE PAGE E (2004): *Rationale for the use of mitoxantrone in multiple sclerosis.* J Neurol Sci 223, 35-39

EVANGELOU N, KONZ D, ESIRI MM, SMITH S, PALACE J, MATTHEWS PM (2001): *Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis.* Brain 124, 1813-1820

FERGUSON B, MATYSZAK MK, ESIRI MM, PERRY VH (1997): *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions.* Brain 120, 393-399

FERNÁNDEZ O, FERNÁNDEZ V, DE RAMÓN E (2004): *Azathioprine and methotrexate in multiple sclerosis.* J Neurol Sci 223, 29-34

FILIPPI M, BOZZALI M, ROVARIS M, GONEN O, KESAVADAS C, GHEZZI A, MARTINELLI V, GROSSMAN RI, SCOTTI G, COMI G, FALINI A (2003): *Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis.* Brain 126, 433-437

FRIEDLI WG, FUHR P (1990): *Electrocutaneous reflexes and multimodality evoked potentials in multiple sclerosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 53, 391-397

GAILLARD PJ, VAN DER MEIDE PH, DE BOER AG, BREIMER DD (2001): *Glucocorticoid and type 1 interferon interactions at the blood brain barrier: relevance for drug therapies for multiple sclerosis.* Neuroreport 12, 2189-2193

GANTER P, PRINCE C, ESIRI MM (1999): *Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study.* Neuropathol Appl Neurobiol 25, 459-467

GARTHWAITE G, GOODWIN DA, BATCHELOR AM, LEEMING K, GARTHWAITE J (2002): *Nitric oxide toxicity in CNS white matter: an in vitro study using rat optic nerve.* Neuroscience 109, 145-155

- GENAIN CP**, HAUSER SL (1997): *Creation of a model for multiple sclerosis in Callithrix jacchus marmosets*. J Mol Med 75, 187-197
- GENAIN CP**, CANNELLA B, HAUSER SL, RAINE CS (1999): *Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis*. Nat Med 5, 170-175
- GENTLEMAN SM**, NASH MJ, SWEETING CJ, GRAHAM DI, ROBERTS GW (1993): *Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury*. Neurosci Lett 160, 139-144
- GILBERT JJ**, SADLER M (1983): *Unsuspected multiple sclerosis*. Arch Neurol 40, 533-536
- GIOVANNONI G** (2006): *Multiple sclerosis related fatigue*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77, 2-3
- GIOVANNONI G**, HEALES SJ, LAND JM, THOMPSON EJ (1998): *The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis*. Mult Scler 4, 212-216
- GIULIANI F**, GOODYER CG, ANTEL JP, YONG VW (2003): *Vulnerability of Human Neurons to T Cell-Mediated Cytotoxicity*. J Immunol 171, 368-379
- GOLDE S**, COLES A, LINDQUIST JA, COMPSTON A (2003): *Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury in vitro*. Eur J Neurosci 18, 2527-2537
- GRANIERI E**, ROSATI G, TOLA R, PINNA L, CARRERAS M, MANCA M, BOLDRINI P (1983): *The frequency of multiple sclerosis in Mediterranean Europe: An incidence and prevalence study in Barbagia, Sardinia, insular Italy*. Acta Neurol Scand 68, 84-89
- GRAY F**, ADLE-BIASSETTE H, CHRETIEN F, LORIN DE LA GRANDMAISON G, FORCE G, KEOHANE C (2001): *Neuropathology and neurodegeneration in human immunodeficiency virus infection. Pathogenesis of HIV-induced lesions of the brain, correlations with HIV-associated disorders and modifications according to treatments*. Clin Neuropathol 20, 146-155
- HAAHR S**, PLESNER AM, VESTERGAARD BF, HÖLLSBERG P (2004): *A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand 109, 270-275
- HAKAMADA-TAGUCHI R**, UEHARA Y, KURIBAYASHI K, NUMABE A, SAITO K, NEGORO H, FUJITA T, TOYO-OKA T, KATO T (2003): *Inhibition of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase Reduces Th1 Development and Promotes Th2 Development*. Circ Res 93, 948-956
- HAMMOND SR**, MCLEOD JG, MILLINGEN KS, STEWART-WYNNE EG, ENGLISH D, HOLLAND JT, MCCALL MG (1988): *The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart*. Brain 111, 1-25
- HEIN T**, HOPFENMÜLLER W (2000): *Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland*. Nervenarzt 71, 288-294
- HELTBERG A**, HOLM NV (1982): *Concordance in twins and recurrence in sibships in multiple sclerosis*. Lancet 1982, 1, 1068
- HEMMER B**, ARCHELOS JJ, HARTUNG HP (2002): *New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Rev Neurosci 3, 291-301

- HEPPNER FL**, GRETER M, MARINO D, FALSIG J, RAIVICH G, HÖVELMEYER N, WAISMAN A, RÜLICHE T, PRINZ M, PRILLER J, BECHER B, AGUZZI A (2005): *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. Nat Med 11, 146-152
- HICKEY WF** (1991): *Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation*. Brain Pathol 1, 97-105
- HILBICH C**, MÖNNING U, GRUND C, MASTERS CL, BEYREUTHER K (1993): *Amyloid-like Properties of Peptides Flanking the Epitope of Amyloid Precursor Protein-specific Monoclonal Antibody 22C11*. J Biol Chem 268, 26571-26577
- HILLERT J**, KALL T, VRETHEM M, FREDRIKSON S, OHLSON M, OLERUP O (1994): *The HLA-Dw2 haplotype segregates closely with multiple sclerosis in multiplex families*. J Neuroimmunol 50, 95-100
- HOFFMANN J**, TWIESELMANN C, KUMMER MP, ROMAGNOLI P, HERZOG V (2000): *A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation*. Eur J Cell Biol 79, 905-914
- HÖFTBERGER R**, ABOUL-ENEIN F, BRÜCK W, LUCCHINETTI C, RODRIGUEZ M, SCHMIDBAUER M, JELLINGER K, LASSMANN H (2004): *Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on the Different Cell Types in Multiple Sclerosis Lesions*. Brain Pathol 14, 43-50
- HOHLFELD R**, KERSCHENSTEINER M, STADELMANN C, LASSMANN H, WEKERLE H (2000): *The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol 107, 161-166
- INGLESE M**, GE Y, FILIPPI M, FALINI A, GROSSMAN RI, GONEN O (2004): *Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Neuroimage 21, 1825-1829
- ITOYAMA Y**, STERNBERGER NH, WEBSTER HD, QUARLES RH, COHEN SR, RICHARDSON EP JR. (1980): *Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol 7, 167-177
- JACOBSEN M**, CEPOK S, QUAK E, HAPPEL M, GABER R, ZIEGLER A, SCHOCK S, OERTEL WH, SOMMER N, HEMMER B (2002): *Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients*. Brain 125, 538-550
- JANDER S**: *Inflammation und Zytokininduktion in der ischämischen Hirnläsion*. Med. Habil.-Schr., Düsseldorf 2000
- JANEWAY CA**, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M: *Immunobiology*, 5. Auflage; Garland Publishing, New York 2001
- JOHNSON AJ**, UPSHAW J, PAVELKO KD, RODRIGUEZ M (2001): *Preservation of motor function by inhibition of CD8+ virus peptide-specific T cells in Theiler's virus infection*. FASEB J 15, 2760-2762
- JONES M**, CORDELL JL, BEYERS AD, TSE AG, MASON DY (1993): *Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies*. J Immunol 150, 5429-5435
- JOYCE DA**, STEER JH, ABRAHAM LJ (1997): *Glucocorticoid modulation of human*

monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res* 46, 447-451

KÄGI D, VIGNAUX F, LEDERMANN B, BÜRKI K, DEPRAETERE V, NAGATA S, HENGARTNER H, GOLSTEIN P (1994): *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity.* *Science* 265, 528-530

KÄGI D, LEDERMANN B, BÜRKI K, ZINKERNAGEL RM, HENGARTNER H (1996): *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo.* *Annu Rev Immunol* 14, 207-232

KAPOOR R, DAVIES M, BLAKER PA, HALL SM, SMITH KJ (2003): *Blockers of Sodium and Calcium Entry Protect Axons from Nitric Oxide-Mediated Degeneration.* *Ann Neurol* 53, 174-180

KEEGAN M, KÖNIG F, BITSCH A, BRÜCK W, LASSMANN H, PANITCH H, BURLINGTON VT, RODRIGUEZ M, WEINSHENKER B, PARISI J, LUCCHINETTI CF (2004): *Multiple sclerosis pathological subtype predicts response to therapeutic plasma exchange.* *Neurology* 62 (suppl 5), S29.A259

KEEGAN M, KÖNIG F, MCCLELLAND R, BRÜCK W, MORALES Y, BITSCH A, PANITCH H, LASSMANN H, WEINSHENKER B, RODRIGUEZ M, PARISI J, LUCCHINETTI CF (2005): *Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange.* *Lancet* 366, 526-527

KENNEL DE MARCH A, DE BOUWERIE M, KOLOPP-SARDA MN, FAURE GC, BENE MC, BERNARD CC (2003): *Anti-myelin oligodendrocyte glycoproteine B-cell responses in multiple sclerosis.* *J Neuroimmunol* 135, 117-125

KERSCHENSTEINER M, GALLMEIER E, BEHRENS L, LEAL VV, MISGELD T, KLINKERT WE, KOLBECK R, HOPPE E, OROPEZA-WEKERLE RL, BARTKE I, STADELMANN C, LASSMANN H, WEKERLE H, HOHLFELD R (1999): *Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?* *J Exp Med* 189, 865-870

KIDD D, BARKHOF F, MCCONNELL R, ALGRA PR, ALLEN IV, REVESZ T (1999): *Cortical lesions in multiple sclerosis.* *Brain* 122, 17-26

KOO EH, SISODIA SS, ARCHER DR, MARTIN LJ, WEIDEMANN A, BEYREUTHER K, FISCHER P, MASTERS CL, PRICE DL (1989): *Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport.* *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1561-1565

KORNEK B, STORCH MK, WEISSERT R, WALLSTROEM E, STEFFERL A, OLSSON T, LININGTON C, SCHMIDBAUER M, LASSMANN H (2000): *Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. A Comparative Quantitative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions.* *Am J Pathol* 157, 267-276

KUHLMANN T, BRÜCK W (1999): *Immunoglobulins induce increased myelin debris clearance by mouse macrophages.* *Neurosci Lett* 275, 191-194

KUHLMANN T, LINGFELD G, BITSCH A, SCHUCHARDT J, BRÜCK W (2002): *Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time.* *Brain* 125, 2202-2212

- KUMMER JA**, KAMP AM, VAN KATWIJK M, BRAKENHOFF JP, RADOSEVIC K, VAN LEEUWEN AM, BORST J, VERWEIJ CL, HACK CE (1993): *Production and characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant human granzymes A and B and showing cross reaction with natural proteins*. J Immunol Methods 163, 77-83
- KUMMER JA**, KAMP AM, TADEMA TM, VOS W, MEIJER CJ, HACK CE (1995): *Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood*. Clin Exp Immunol 100, 164-172
- KUROIWA Y**, SHIBASAKI H, IKEDA M (1983): *Prevalence of multiple sclerosis and its north-to-south gradient in Japan*. Neuroepidemiology 2, 62-69
- KURTZKE JF** (1980): *Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview*. Neurology 30, 61-79
- KURTZKE JF** (1983): *Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology 33, 1444-1452
- KURTZKE JF**: *Epidemiology of multiple sclerosis*; in: Handbook of Clinical Neurology, vol 3, no 47; hrsg. v. Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL; Elsevier, Amsterdam 1985, 259-287
- LASSMANN H** (2003): *Heterogene Mechanismen der Entmarkung und Axondegeneration in Multiple-Sklerose-Herden: diagnostische und therapeutische Konsequenzen*. J Neurol Neurochir Psychiatr 4, 11-15
- LASSMANN H**, BRÜCK W, LUCCHINETTI CF (2001): *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends Mol Med 7, 115-121
- LASSMANN H**, REINDL M, RAUSCHKA H, BERGER J, ABOUL-ENEIN F, BERGER T, ZURBRIGGEN A, LUTTEROTTI A, BRÜCK W, WEBER JR, ULLRICH R, SCHMIDBAUER M, JELLINGER K, VANDEVELDE M (2003): *A new paraclinical marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions*. Brain 126, 1347-1357
- LEARY SM**, THOMPSON AJ (2005): *Primary progressive multiple sclerosis: current and future treatment options*. CNS Drugs 19, 369-376
- LEE MA**, BLAMIRE AM, PENDLEBURY S, HO KH, MILLS KR, STYLES P, PALACE J, MATTHEWS PM (2000): *Axonal injury or loss in the internal capsule and motor impairment in multiple sclerosis*. Arch Neurol 57, 65-70
- LEE VM**, CARDEN MJ, SCHLAEPFER WW, TROJANOWSKI JQ (1987): *Monoclonal antibodies distinguish several differential phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats*. J Neurosci 7, 3474-3488
- LEWIS CE**, MCCARTHY SP, LORENZEN J, MCGEE JO (1990): *Differential effects of LPS, IFN-gamma and TNF alpha on the secretion of lysozyme by individual human mononuclear phagocytes: relationship to cell maturity*. Immunology 69, 402-408
- LEWIS CARL SA**, GILLETE-FERGUSON I, FERGUSON DG (1993): *An Indirect Immunofluorescence Procedure for Staining the Same Cryosection with Two Mouse Monoclonal*

Primary Antibodies. J Histochem Cytochem 41, 1273-1278

LI GL, FAROOQUE M, HOLTZ A, OLSSON Y (1995): *Changes of beta-amyloid precursor protein after compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using immunohistochemistry*. J Neurotrauma 12, 269-277

LINKER RA, ROTT E, HOFSTETTER HH, HANKE T, TOYKA KV, GOLD R (2005): *EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune response*. Neurobiol Dis 19, 218-228

LIU JSH, ZHAO ML, BROSNAN CL, LEE SC (2001): *Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Multiple Sclerosis Lesions*. Am J Pathol 158, 2057-2066

LOVAS G, SZILÁGYI N, MAJTÉNYI K, PALKOVITS M, KOLOMY S (2000): *Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques*. Brain 123, 308-317

LOWIN B, HAHNE M, MATTMANN C, TSCHOPP J (1994): *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways*. Nature 370, 650-652

LUBLIN FD, REINGOLD SC (1996): *Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey*. Neurology 46, 907-911

LUCCHINETTI C (2004): *Update on the international project on pathologic correlates in MS*. ACTRIMS 2004 – Ninth annual meeting of the Americas Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis. Toronto, Ontario, Canada, 3. Oktober 2004

LUCCHINETTI C, BRÜCK W, RODRIGUEZ M, LASSMANN H (1996): *Distinct Patterns of Multiple Sclerosis Pathology Indicates Heterogeneity in Pathogenesis*. Brain Pathol 6, 259-274

LUCCHINETTI C, BRÜCK W, PARISI J, SCHEITHAUER B, RODRIGUEZ M, LASSMANN H (1999): *A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases*. Brain 122, 2279-2295

LUCCHINETTI C, BRÜCK W, PARISI J, SCHEITHAUER B, RODRIGUEZ M, LASSMANN H (2000): *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Ann Neurol 47, 707-717

LUCCHINETTI C, MANDLER RN, MCGAVERN D, BRÜCK W, GLEICH G, RANSOHOFF RM, TREBST C, WEINSHENKER B, WINGERCHUK D, PARISI JE, LASSMANN H (2002): *A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica*. Brain 125, 145-1461

MAHAD DJ, TREBST C, KIVISAKK P, STAUGAITIS SM, TUCKY B, WEI T, LUCCHINETTI CF, LASSMANN H, RANSOHOFF RM (2004): *Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol 63, 262-273

MANDER P, BROWN GC (2004): *Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation*. Biochem Soc Trans 32, 1068-1069

MANKOWSKI JL, QUEEN SE, TARWATER PM, FOX KJ, PERRY VH (2002): *Accumulation of beta-amyloid precursor protein in axons correlates with CNS expression of SIV gp41*. J Neuropathol Exp Neurol 61, 85-90

- MARBURG O** (1906): *Die sogenannte "akute multiple Sklerose" (Encephalomyelitis peraxialis scleroticans)*. Jahrb Neurol Psych 27, 211-312
- MARTINEY JA**, RAJAN AJ, CHARLES PC, CERAMI A, ULRICH PC, MACPHAIL S, TRACEY KJ, BROSNAN CF (1998): *Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by CNI-1493, a macrophage-deactivating agent*. J Immunol 160, 5588-5595
- MASON DY**, CORDELL JL, GAULARD P, TSE AGD, BROWN MH (1992): *Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence*. J Clin Pathol 45, 1084-1088
- MATTHEWS AE**, WEISS SR, PATERSON Y (2002): *Murine hepatitis virus – a model for virus-induced CNS demyelination*. J Neurovirol 8, 76-85
- MCDONALD I**, COMPSTON A: *The symptoms and signs of multiple sclerosis*; in: McAlpine's multiple sclerosis; hrsg. v. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H; Churchill Livingstone Elsevier, Oxford 2005, 287-346
- MCDONALD WI**, COMPSTON A, EDAN G, GOODKIN D, HARTUNG H, LUBLIN F, MCFARLAND HF, PATY DW, POLMAN CH, REINGOLD SC, SANDBERG-WOLLHEIM M, SIBLEY W, THOMPSON A, VAN DEN NOORT S, WEINSHENKER BY, WOLINSKY JS (2001): *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Ann Neurol 50, 121-127
- MCKENZIE KJ**, MCLELLAN DR, GENTLEMAN SM, MAXWELL WL, GENNARELLI TA, GRAHAM DL (1996): *Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury?* Acta Neuropathol (Berl) 92, 608-613
- MEDANA IM**, GALLIMORE A, OXENIUS A, MARTINIC MM, WEKERLE H, NEUMANN H (2000): *MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway*. Eur J Immunol 30, 3623-3633
- MEDANA I**, MARTINIC MA, WEKERLE H, NEUMANN H (2001): *Transection of Major Histocompatibility Complex Class I-Induced Neurites by Cytotoxic T Lymphocytes*. Am J Pathol 159, 809-815
- MEHTA PD** (1991): *Diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. Crit Rev Clin Lab Sci 28, 233-251
- MELCANGI RC**, CAVARRETTA I, MAGNAGHI V, CIUSANI E, SALMAGGI A (2000): *Corticosteroids protect oligodendrocytes from cytokine-induced cell death*. Neuroreport 11, 3969-3972
- MESTAS J**, HUGHES CCW (2004): *Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology*. J Immunol 172, 2731-2738
- MEWS I**, BERGMANN M, BUNKOWSKI S, GULLOTTA F, BRÜCK W (1998): *Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions*. Mult Scler 4, 55-62
- MILANESE C**, SAVOIARDO M, LA MANTIA L, CAMPI A, VISCIANI A, SALMAGGI A, TAJOLI MALESANI L (1988): *Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: diagnostic value and clinical correlations*. Ital J Neurol Sci 9, 127-134

- MONTEIRO J**, HINGORANI R, PEROGLIZZI R, APATOFF B, GREGERSEN PK (1996): *Oligoclonality of CD8⁺ T cells in multiple sclerosis*. *Autoimmunity* 23, 127-138
- MUMFORD CJ**, WOOD NW, KELLAR-WOOD HE, THORPE J, MILLER D, COMPSTON DAS (1994): *The British Isles survey of multiple sclerosis in twins*. *Neurology* 44, 11-15
- MURRAY PD**, PAVELKO KD, LEIBOWITZ J, LIN X, RODRIGUEZ M (1998a): *CD4⁺ and CD8⁺ T cells Make Discrete Contributions to Demyelination and Neurologic Disease in a Viral Model of Multiple Sclerosis*. *J Virol* 72, 7320-7329
- MURRAY PD**, MCGAVERN DB, LIN X, NJENGA NK, LEIBOWITZ J, PEASE LR, RODRIGUEZ M (1998b): *Perforin-Dependent Neurologic Injury in a Viral Model of Multiple Sclerosis*. *J Neurosci* 18, 7306-7314
- MUSHLIN AI**, DETSKY AS, PHELPS CE, O'CONNOR PW, KIDO DK, KUCHARCZYK W, GIANG DW, MOONEY C, TANSEY CM, HALL WJ (1993): *The accuracy of magnetic resonance imaging in patients with suspected multiple sclerosis. The Rochester-Toronto Magnetic Resonance Imaging Study Group*. *JAMA* 269, 3146-3151
- NEGOESCU A**, LABAT-MOLEUR F, LORIMIER P, LAMARCQ L, GUILLERMET C, CHAMBAZ E, BRAMBILLA E (1994): *F(ab) Secondary Antibodies: A General Method for Double Immunolabeling with Primary Antisera from the Same Species. Efficiency Control by Chemiluminescence*. *J Histochem Cytochem* 42, 433-437
- NEUMANN H**, CAVALIE A, JENNE DE, WEKERLE H (1995): *Induction of MHC class I genes in neurons*. *Science* 270, 720-721
- NEUMANN H**, SCHMIDT H, CAVALIE A, JENNE D, WEKERLE H (1997): *Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha*. *J Exp Med* 185, 305-316
- NEUMANN H**, MEDANA IM, BAUER J, LASSMANN H (2002): *Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases*. *Trends Neurosci* 25, 313-319
- NITSCH R**, POHL EE, SMORODCHENKO A, INFANTE-DUARTE C, AKTAS O, ZIPP F (2004): *Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue*. *J Neurosci* 24, 2458-2464
- OHNO R**, HAMAGUCHI K, SOWA K, TANAKA H, WATANABE Y (1987): *High-dose intravenous corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis*. *Jpn J Med* 26, 212-216
- OLERUP O**, HILLERT J (1991): *HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: A critical evaluation*. *Tissue Antigens* 38, 1-15
- OLESZAK EL**, CHANG JR, FRIEDMAN H, KATSETOS CD, PLATSOUKAS CD (2004): *Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis*. *Clin Microbiol Rev* 17, 174-207
- PARRY A**, CORKILL R, BLAMIRE AM, PALACE J, NARAYANAN S, ARNOLD D, STYLES P, MATTHEWS PM (2003): *Beta-Interferon treatment*

does not always slow the progression of axonal injury in multiple sclerosis. J Neurol 250, 171-178

PAUL C, BOLTON C (2002): *Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine.* J Pharmacol Exp Ther 302, 50-57

PAULUS W, ROGGENDORF W, KIRCHNER T (1992): *Ki-M1P as a marker for microglia and brain macrophages in routinely processed human tissues.* Acta Neuropathol (Berl.) 84, 538-544

PENDLEBURY ST, LEE MA, BLAMIRE AM, STYLES P, MATTHEWS PM (2000): *Correlating magnetic resonance imaging markers of axonal injury and demyelination in motor impairment secondary to stroke and multiple sclerosis.* J Magn Reson Imaging 18, 369-78

PEROSA F, LUCCARELLI G, PRETE M, FAVOINO E, FERRONE S, DAMMACCO F (2003): *β_2 -Microglobulin-Free HLA Class I Chain Epitope Mimicry by Monoclonal Antibody HC-10-Specific Peptide.* J Immunology 171, 1918-1926

PETERSON JW, BÖ L, MÖRK S, CHANG A, TRAPP BD (2001): *Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions.* Ann Neurol 50, 389-400

PETZOLD A, EIKELENBOOM MJ, KEIR G, GRANT D, LAZERON RH, POLMAN CH, UITDEHAAG BM, THOMPSON EJ, GIOVANNONI G (2005): *Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, 206-211

PIERCE JE, TROJANOWSKI JQ, GRAHAM DI, SMITH DH, MCINTOSH TK (1996): *Immunohistochemical characterization of alternations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat.* J Neurosci 16, 1083-90

PITT D, WERNER P, RAINE CS (2000): *Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis.* Nat Med 6, 67-70

PITTOCK SJ, MCCLELLAND RL, ACHENBACH SJ, KÖNIG F, BITSCH A, BRÜCK W, LASSMANN H, PARISI JE, SCHEITHAUER BW, RODRIGUEZ M, WEINSHENKER BG, LUCCHINETTI CF (2005): *Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, 1693-1697

POECK K, HACKE W: *Neurologie*, 10. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1998

POHL D, ROSTASY K, REIBER H, HANEFELD F (2004): *CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis.* Neurology 63, 1966-1967

POSER CM, PATY DW, SCHEINBERG L, McDONALD I, DAVIS FA, EBERS GC, JOHNSON KP, SIBLEY WA, SILBERBERG DH, TOURTELLOTTE WW (1983): *New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols.* Ann Neurol 13, 227-231

POSER S, STICKEL B, KRITSCH U, BURCKHARDT D, NORDMAN B (1989): *Increasing Incidence of Multiple Sclerosis in South Lower Saxony, Germany.* Neuroepidemiology 8, 207-213

RADHAKRISHNAN K, ASHOK PP, SRIDHARAN R, MOUSA ME (1985): *Prevalence and pattern of*

multiple sclerosis in Benghazi, North-Eastern Libya. J Neurol Sci 70, 39-46

RADZUN HJ, HANSMANN ML, HEIDEBRECHT HJ, BÖDEWADT-RADZUN S, WACKER HH, KREIPE H, LUMBECK H, HERNANDEZ C, KUHN C, PARWARESCH MR (1991): *Detection of a Monocyte/Macrophage Differentiation Antigen in Routinely Processed Paraffin-Embedded Tissues by Monoclonal Antibody Ki-M1P.* Lab Invest 65, 306-315

RAIVICH G, BANATI R (2004): *Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune disease.* Brain Res Rev 46, 261-281

RAJA F, SHERRIFF FE, MORRIS CS, BRIDGES LR, ESIRI MM (1997): *Cerebral white matter damage in HIV infection demonstrated using beta-amyloid precursor protein immunoreactivity.* Acta Neuropathol (Berl) 93, 184-189

RAO P, SEGAL BM (2004): *Experimental autoimmune encephalomyelitis.* Methods Mol Med 102, 363-376

RAVNBORG M, LIGUORI R, CHRISTIANSEN P, LARSSON H, SORENSEN PS (1992): *The diagnostic reliability of magnetically evoked motor potentials in multiple sclerosis.* Neurology 42, 1296-1301

REDWINE JM, BUCHMEIER MJ, EVANS CF (2001): *In Vivo Expression of Major Histocompatibility Complex Molecules on Oligodendrocytes and Neurons during Viral Infection.* Am J Pathol 159, 1219-1224

RENSING-EHL A, MALIPIERO U, IRMLER M, TSCHOPP J, CONSTAM D, FONTANA A (1996):

Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. Eur J Immunol 26, 2271-2274

RIECKMANN P, TOYKA KV, BASSETTI C, BEER K, BUETTNER U, CHOFFLON M, GOTSCHI-FUCHS M, HESS K, KAPPOS L, KESSELRING J ET AL. – MULTIPLE SCLEROSIS THERAPY CONSENSUS GROUP (2004): *Escalating immunotherapy of multiple sclerosis – new aspects and practical application.* J Neurol 251, 1329-1339

RIVERA-QUIÑONES C, MCGAVERN D, SCHMELZER JD, HUNTER SF, LOW PA, RODRIGUEZ M (1998): *Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis.* Nat Med 4, 187-193

ROMIJN HJ, VAN UUM JFM, BREEDIJK I, EMMERING J, RADU I, POOL CW (1999): *Double Immunolabeling of Neuropeptides in the Human Hypothalamus as Analyzed by Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy.* J Histochem Cytochem 47, 229-235

SCHILLING S, LINKER RA, KÖNIG FB, KOZIOLEK M, BÄHR M, MÜLLER GA, PAULUS W, GÄRTNER J, BRÜCK W, CHAN A, GOLD R (2005): *Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben. Klinische Erfahrung an 16 Patienten.* Nervenarzt, im Druck

SCHNELL SA, STAINES WA, WESSENDORF MW (1999): *Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue.* J Histochem Cytochem 47, 719-730

SCHROETER M, STOLL G, WEISSERT R, HARTUNG HP, LASSMANN H, JANDER S (2003): *CD8⁺ Phagocyte Recruitment in Rat*

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Am J Pathol 163, 1517-1524

SCHWARTZ M, KIPNIS J (2005): *Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases.* J Neurol Sci 233, 163-166

SHERMAN MP, GRISCAVAGE JM, IGNARRO LJ (1992): *Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis.* Med Hypotheses 39, 143-146

SHERRIFF FE, BRIDGES LR, SIVALOGANATHAN S (1994a): *Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein.* Acta Neuropathol (Berl) 87, 55-62

SHERRIFF FE, BRIDGES LR, GENTLEMAN SM, SIVALOGANATHAN S, WILSON S (1994b): *Markers of axonal injury in post mortem human brain.* Acta Neuropathol (Berl) 88, 433-439

SHINDLER KS, ROTH KA (1996): *Double Immunofluorescent Staining Using Two Unconjugated Primary Antisera Raised in the Same Species.* J Histochem Cytochem 44, 1331-1335

SKEGG DCG, CORWIN PA, CRAVEN RS, MALLOCH JA, POLLOCK M (1987): *Occurrence of multiple sclerosis at the north and south of New Zealand.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 50, 134-139

SMITH KJ, LASSMANN H (2002): *The role of nitric oxide in multiple sclerosis.* Lancet Neurol 1, 232-241

SMITH KJ, McDONALD WI (1982): *Spontaneous and evoked electrical discharges from a central demyelinating lesion.* J Neurol Sci 55, 39-47

SMITH KJ, KAPOOR R, HALL SM, DAVIES M (2001): *Electrically Active Axons Degenerate When Exposed to Nitric Oxide.* Ann Neurol 49, 470-476

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

SRIRAM S, STEINER I (2005): *Experimental Allergic Encephalomyelitis: A Misleading Model of Multiple Sclerosis.* Ann Neurol 58, 939-945

STADELMANN C, BRÜCK W (2004): *Lessons from the neuropathology of atypical forms of multiple sclerosis.* Neurol Sci 25 Suppl 4, S319-322

STADELMANN C, KERSCHENSTEINER M, MISGELD T, BRÜCK W, HOHLFELD R, LASSMANN H (2002): *BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?* Brain 125, 75-85

STADELMANN C, LUDWIN S, TABIRA T, GUSEO A, LUCCHINETTI CF, LEEL-OSSY L, ORDINARIO AT, BRÜCK W, LASSMANN H (2005): *Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo's type of multiple sclerosis.* Brain 128, 979-987

STAM NJ, VROOM TM, PETERS PJ, PASTOORS EB, PLOEGH HL (1990): *HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy.* Int Immunol 2, 113-125

STANGEL M, GOLD R (2005): *Hochdosierte intravenöse Immunglobuline in der Behandlung der Multiple Sklerose.* Nervenarzt 76, 1267-1272

- STERNBERGER LA**, STERNBERGER NH (1983): *Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ*. Proc Natl Acad Sci USA 80, 6126-6130
- STORCH MK**, PIDDLESSEN S, HALTIA M, IIVANAINEN M, MORGAN P, LASSMANN H (1998): *Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination*. Ann Neurol 43, 465-471
- STORCH MK**, WEISSERT R, STEFFER A, BIRNBACHER R, WALLSTROM E, DAHLMAN I, OSTENSSON CG, LININGTON C, OLSSON T, LASSMANN H (2002): *MHC gene related effects on microglia and macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis determine the extent of axonal injury*. Brain Pathol 12, 287-299
- STRATTON CW**, SRIRAM S (2003): *Association of Chlamydia pneumoniae with central nervous system disease*. Microbes Infect 5, 1249-1253
- TAKEUCHI H**, MIZUNO T, ZHANG G, WANG J, KAWANOKUCHI J, KUNO R, SUZUMURA A (2005): *Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport*. J Biol Chem 280, 10444-10454
- TALBOT PJ**, PAQUETTE JS, CIURLI C, ANTEL JP, OUELLET F (1996): *Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis*. Ann Neurol 39, 233-240
- TARDIEU M**, MIKAELOFF Y (2004): *Multiple sclerosis in children*. Int MS J 11, 36-42
- TINTORE M**, ROVIRA A, MARTINEZ MJ, RIO J, DIAZ-VILLOSLADA P, BRIEVA L, BORRAS C, GRIVE E, CAPELLADES J, MONTALBAN X (2000): *Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis*. Am J Neuroradiol 21, 702-706
- TINTORE M**, ROVIRA A, RIO J, NOS C, GRIVE E, SASTRE-GARRIGA J, PERICOT I, SANCHEZ E, COMABELLA M, MONTALBAN X (2003): *New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelination episode*. Neurology 60, 6-7
- TRAPP BD**, PETERSON J, RANSOHOFF M, RUDICK R, MÖRK S, BÖ L (1998): *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med 338, 278-285
- TRAPP BD**, BÖ L, MÖRK S, CHANG A (1999a): *Pathogenesis of tissue injury in MS lesions*. J Neuroimmunol 98, 49-56
- TRAPP BD**, RANSOHOFF R, RUDICK R (1999b): *Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability*. Curr Opin Neurol 12, 295-302
- UCHIHARA T**, NAKAMURA A, NAGAOKA U, YAMAZAKI M, MORI O (2000): *Dual enhancement of double immunofluorescent signals by CARD: participation of ubiquitin during formation of neurofibrillary tangles*. Histochem Cell Biol 114, 447-451
- UMEHARA F**, ABE M, KOREEDA Y, IZUMO S, OSAME M (2000): *Axonal damage revealed by accumulation of β -amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy*. J Neurol Sci 176, 95-101
- URE DR**, RODRIGUEZ M (2002): *Preservation of neurological function during inflammatory*

demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis. Neuroscience 111, 399-411

VOS CM, VAN HAASTERT ES, DE GROOT CJ, VAN DER VALK P, DE VRIES HE (2003): *Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytic macrophages in active multiple sclerosis lesions.* J Neuroimmunol 138, 106-114

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

WILLER CJ, DYMENT DA, RISCH NJ, SADOVNICK AD, EBERS GC (2003): *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis.* Proc Natl Acad Sci 100, 12877-12882

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

WUCHERPFENNIG KW, STROMINGER JL (1995): *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein.* Cell 80, 695-705

WUJEK JR, BJARTMAR C, RICHER E, RANSOHOFF RM, YU M, TUOHY VK, TRAPP BD (2002): *Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis.* J Neuropathol Exp Neurol 61, 23-32

YAM PS, TAKASAGO T, DEWAR D, GRAHAM DI, MCCULLOCH J (1997): *Amyloid precursor protein*

accumulates in white matter at the margin of a focal ischaemic lesion. Brain Res 760, 150-157

YAM PS, PATTERSON J, GRAHAM DI, TAKASAGO T, DEWAR D, MCCULLOCH J (1998): *Topographical and quantitative assessment of white matter injury following a focal ischaemic lesion in the rat brain.* Brain Res Brain Res Protoc 2, 351-322

YETKIN FZ, HAUGHTON VM, PAPKE RA, FISCHER ME, RAO SM (1991): *Multiple sclerosis: specificity of MR for diagnosis.* Radiology 178, 447-451

YOUSSEF S, STÜVE O, PATARROYO JC, RUIZ PJ, RADOSEVICH JL, MI HUR E, BRAVO M, MITCHELL DJ, SOBEL RA, STEINMAN L, ZAMVIL SS (2002): *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease.* Nature 420, 78-84

ZHANG Y, DA RR, GUO W, REN HM, HILGENBERG LG, SOBEL RA, TOURTELLOTTE WW, SMITH MA, OLEK M, GUPTA S, ROBERTSON RT, NAGRA R, VAN DEN NOORT S, QIN Y (2005a): *Axon reactive B cells clonally expanded in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.* J Clin Immunol 25, 254-264

ZHANG Y, DA RR, HILGENBERG LG, TOURTELLOTTE WW, SOBEL RA, SMITH MA, OLEK M, NAGRA R, SUDHIR H, VAN DEN NOORT S, QIN Y (2005b): *Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS-Lesions.* J Neuroimmunol 167, 120-130

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück und Frau JProf. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für die Anregung zu dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück danke ich darüber hinaus für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Neuropathologie im Zentrum Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen sowie für die interessierte Unterstützung, die mir stets entgegengebracht wurde.

Besonderer Dank gilt Frau JProf. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für die hervorragende und ungemein engagierte Betreuung meines Dissertationsvorhabens, für stete Diskussionsbereitschaft und eine ansteckende Begeisterung. Sie hatte großen Anteil daran, daß mir die Anfertigung der Dissertation mehr Freude als Arbeit war. Ich durfte viel von ihr lernen.

Herrn Dr. med. Doron Merkler danke ich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie.

Frau Doris Bode und Frau Jutta Laufenberg danke ich für die geduldige Einführung in immunohistochemische Techniken und die fortwährende Unterstützung bei großen und kleinen Problemen.

Auch allen nicht genannten Mitarbeitern der Abteilung Neuropathologie des Zentrums Pathologie des Uniklinikums Göttingen gilt mein Dank für ein sehr angenehmes Arbeitsklima in der Abteilung und für viele kleine Hilfen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die in jeglicher Hinsicht großartige Unterstützung meines Studiums und meines Dissertationsvorhabens sowie für korrigierende Anmerkungen zum Manuskript.

Lebenslauf

Am 17. November 1977 wurde ich, Jens Rainer Pehlke, als Sohn des Maschinenbautechnikers Rainer Wilhelm Pehlke und dessen Ehefrau Christa Pehlke, geb. Markus, in Mülheim an der Ruhr geboren.

Dort besuchte ich von 1984 bis 1988 die städt. Gemeinschaftsgrundschule „Auf dem Bruch“ und von 1988 bis 1997 das städt. Gymnasium Karl-Ziegler-Schule, das ich im Juni 1997 mit der allgemeinen Hochschulreife verließ.

Im Anschluß daran leistete ich von Juli 1997 bis April 1998 meinen Grundwehrdienst bei der Fernmeldetruppe des Heeres im Führungsunterstützungsregiment 30 in Hilden und Düsseldorf ab.

In der Zeit von August 1998 bis April 1999 arbeitete ich als Büro- und Schreibkraft für Herrn Andreas Schmidt, MdB, in dessen Wahlkreisbüro in Mülheim an der Ruhr.

Im April 1999 schließlich begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Im September 2001 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab, im August 2002 folgte der erste Abschnitt der ärztlichen Prüfung, im September 2004 der zweite Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Von Oktober 2004 bis September 2005 absolvierte ich das Praktische Jahr am Universitätsklinikum Göttingen mit dem Wahlfach Neurologie. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich im Oktober 2005.

Am 9. November 2005 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt. Seit Dezember 2005 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Universitätsklinik Göttingen tätig.