

Aus dem NeuroCure Clinical Research Center  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuronaler Schaden in der Multiplen Sklerose –  
eine stereologische und histomorphologische Untersuchung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Sarah Hütker, geb. Müller-Wielsch  
aus Bad Säckingen

Datum der Promotion: 9. Dezember 2016

*Meinem Sohn Jonathan Samuel gewidmet*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>0. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Multiple Sklerose – ein Überblick</b>	<b>7</b>
1.1.1 Epidemiologie der MS	8
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der MS	9
1.1.3 Klinische Präsentation und Verlaufsformen der MS	10
1.1.4 Therapie der MS	11
1.1.5 Pathologische Charakteristika der MS	12
<b>1.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der MS</b>	<b>13</b>
1.2.1 Methodik der EAE	13
1.2.2 Parallelen und Unterschiede zur MS	14
<b>1.3 Neuronale Schädigung bei Multipler Sklerose</b>	<b>15</b>
1.3.1 Historischer Rückblick	15
1.3.2 Neuere Forschung	16
1.3.3 Periphere neuronale Schädigung bei MS	17
1.3.4 Neurofilamentphosphorylierung als Indikator für neuronale Schädigung	18
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>3.0 Überblick</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Stereologische Quantifizierung und Vermessung spinaler Neurone im Vorder- (und Zwischen-)horn bei MS</b>	<b>21</b>
3.1.1 Gegenstand der Untersuchung	21
3.1.2 Schnitt und Färbung	22
3.1.3 Festlegung des Untersuchungsbereichs	23
3.1.4 Stereologische Untersuchung	24
3.1.5 Auswertung und Statistik	29

---

<b>3.2 Immunhistochemische Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofilamenten der spinalen Vorderhornneurone bei MS und EAE</b>	<b>29</b>
3.2.1 Gegenstand der Untersuchung	29
3.2.2 Schnitt und HE-Färbung	32
3.2.3 Immunhistochemie	33
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Quantitative Analyse der Neuronenzahl mittels stereologischer Messungen</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Qualitative Untersuchung neuronaler Schädigung mittels Immunhistochemie</b>	<b>39</b>
4.2.1 Neurofilamentphosphorylierung in spinalen Neuronen bei MS	39
4.2.2 Neurofilamentphosphorylierung in spinalen Neuronen bei EAE	45
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Kritische Bewertung der angewandten Methoden</b>	<b>46</b>
5.1.1 Stereologie	46
5.1.2 Neurofilamentphosphorylierung	47
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>48</b>
5.2.1 Beteiligung des peripheren Nervensystems bei MS	48
5.2.2 Mögliche Pathomechanismen der peripheren neuronalen Schädigung	49
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse bei EAE	51
5.2.4 Weitere Untersuchungen spinaler neuronaler Schädigung bei MS	52
5.2.5 Klinische Bedeutung spinaler neuronaler Schädigung bei MS	54
<b>5.3 Fazit</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>57</b>
<b>I. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>68</b>
<b>II. LEBENS LAUF</b>	<b>70</b>
<b>III. PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>71</b>
<b>IV. DANKSAGUNG</b>	<b>72</b>

---

## **0. Zusammenfassung/Abstract**

### **0.1 Zusammenfassung (deutsch)**

#### **Einleitung**

Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems. Sie zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters. MS ist nicht heilbar, durch die verfügbaren Therapien konnte jedoch die Langzeitprognose deutlich verbessert werden. Neuropathologisch ist die MS durch multifokale (disseminierte) Entmarkungsherde in Gehirn und Rückenmark gekennzeichnet. Lange Zeit herrschte die Ansicht, die Erkrankung betreffe nur die Myelinscheiden und damit die weiße Substanz des ZNS. Neuere Studien belegen jedoch, dass es auch zu einer Schädigung des neuronalen Gewebes, insbesondere der Axone, kommt. Hierbei stand meist das Hirngewebe im Zentrum der Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit widmet sich einem zuvor kaum untersuchten Aspekt, nämlich der Schädigung von Nervenzellkörpern im Rückenmark.

#### **Methodik**

Bei einer Post-mortem-Analyse an 9 MS-Patienten und 9 neurologisch gesunden Kontrollpersonen wurden Perikaryen im lumbalen Vorder- und thorakalen Vorder- und Seitenhorn quantifiziert und vermessen. Durch die Verwendung stereologischer Methoden konnten systematische Fehler auf ein Minimum reduziert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die spinalen Vorderhornneurone hinsichtlich pathologischer Veränderungen der Neurofilamentphosphorylierung analysiert. Hier umfasste das untersuchte Kollektiv 13 MS-Patienten und 6 teils gesunde, teils von anderen neurologischen Erkrankungen betroffene Kontrollpersonen. Außerdem wurden auch 15 Mäuse mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, sowie 3 gesunde Mäuse als Kontrollen untersucht.

## **Ergebnisse**

Bei der MS-Gruppe zeigte sich eine signifikant niedrigere Gesamtneuronenzahl von  $25 \pm 3$  % des Durchschnittswerts der Kontrollgruppe. Im lumbalen Bereich wurden die neuronalen Subpopulationen getrennt untersucht, hier zeigte sich eine Reduktion der  $\alpha$ -Motoneurone um  $48 \pm 10$  %, der  $\gamma$ -Motoneurone um  $81 \pm 2$  % und der Interneurone um  $67 \pm 5$  %.

Mittels immunohistochemischer Methoden wurden bei 61,5 % der MS-Patienten Veränderungen der Neurofilamentphosphorylierung nachgewiesen, die auf eine Schädigung der betroffenen Neuronen hinweisen. Pathologisch phosphorylierte Neurofilamente zeigten sich besonders in chronisch aktiven Stadien und waren in caudalen Rückenmarksbereich stärker ausgeprägt als in rostralen. Weder bei den gesunden Kontrollpersonen noch bei den Negativkontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen zeigten sich diese Veränderungen. Bei der EAE-Studie konnten keine Unterschiede zwischen den erkrankten und den gesunden Mäusen gefunden werden.

## **Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse zeigen, dass auch Perikaryen im Rückenmark von der neuronalen Schädigung bei MS erfasst werden. Dies ist besonders interessant, da die entsprechenden Neuronen des motorischen Systems mit ihren Fortsätzen dem peripheren Nervensystem angehören, das in der Regel bei MS nicht betroffen ist. Hierdurch können z.B. die bei einigen MS-Patienten beschriebenen peripheren Neuropathien erklärt werden. Mögliche Implikationen für neuroprotektive Therapieansätze sind zu prüfen.

## **0.2 Abstract (English)**

### **Introduction**

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and one of the most common neurological diseases among young adults. There is no cure, but the available therapies lead to a remarkable improvement of the long-term prognosis. The neuropathological characteristics of MS are multifocal (disseminated) areas of demyelination in brain and spinal cord. For a long time one assumed that the disease

affected only the myelin sheaths, i.e. the white matter of the CNS. However, recent studies show that there is also damage to neuronal tissue, particularly axons. In most cases, these studies focussed on the brain. The work presented here deals with an aspect rarely examined before: damage of spinal cord perikarya.

## Methods

In a post mortem analysis of 9 MS patients and 9 neurologically healthy controls perikarya in the lumbar anterior, thoracic anterior and lateral horns were counted and measured. Using stereological methods the systematic bias was minimized. In part 2, neurons in the spinal anterior horn were analyzed with regard to pathological alterations of neurofilament phosphorylation. 13 MS patients and 6 controls were studied. In addition, 15 mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) and 3 healthy controls were examined.

## Results

In the MS group, a significantly lower total neuronal number was found that equalled  $25 \pm 3$  % of the average of controls. In the lumbar area, the neuronal subpopulations were analyzed separately, showing a reduction of  $\alpha$ -motor neurons by  $48 \pm 10$  %, of  $\gamma$ -motor neurons by  $81 \pm 2$  % and of interneurons by  $67 \pm 5$  %. Immunohistochemical methods revealed alterations of neurofilament phosphorylation indicative of damage in the affected neurons in 61,5 % of MS patients. Pathologically phosphorylated neurofilaments were noted particularly in chronic active stages and were more prominent in distal areas of the spinal cord than in proximal ones. Neither in healthy controls nor in controls with other neurological diseases these changes became apparent. In the EAE study, no differences between affected animals and healthy controls were found.

## Discussion

The results show that spinal perikarya are affected by neuronal damage in MS. This is particularly interesting because the respective motor neurons with their axons are part of the peripheral nervous system, which usually remains uninvolved in MS. This finding may

---

explain e.g. the peripheral neuropathies described in some MS patients. Possible implications for neuroprotective therapeutic strategies need to be studied.



# 1. Einleitung

*Auf dem Globus gibt es fast keine weißen Flecken mehr. Unerforschte Gebiete existieren nur noch unter der Schädeldecke. (Hans Reimann)*

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Thema der neuronalen Schädigung im Rückenmark bei Multipler Sklerose. Dabei sind die einzelnen Kapitel wie folgt unterteilt: In Kapitel 1 wird zunächst grundlegendes Wissen über Multiple Sklerose und ihr Tiermodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, vermittelt. Anschließend wird der Aspekt der neuronalen Schädigung mittels eines historischen Rückblicks und der Darstellung des aktuellen Wissensstandes erläutert, woraus sich die in Kapitel 2 entwickelte Fragestellung der vorliegenden Arbeit ergibt. In Kapitel 3 werden die zur Bearbeitung der Fragestellung verwendeten Methoden erläutert. Darauf folgt in Kapitel 4 eine Darstellung der Ergebnisse, die dann in Kapitel 5 interpretiert und hinsichtlich ihrer Relevanz diskutiert werden. Ein Verzeichnis der verwendeten Literatur findet sich am Ende der Arbeit.

## 1.1 Multiple Sklerose – ein Überblick

Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist nicht nur die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), sondern auch die häufigste nichttraumatische Ursache einer Behinderung im jungen Erwachsenenalter in Europa und den USA (1). Aufgrund der im Verlauf meist zunehmenden Einschränkungen der privaten und beruflichen Aktivität stellt sie sowohl eine große Belastung für die Betroffenen und ihr persönliches Umfeld als auch eine volkswirtschaftliche Herausforderung dar (2).

Bereits seit über 150 Jahren ist die Multiple Sklerose als Krankheit beschrieben. Jedoch ist das Wissen über diese Erkrankung trotz intensiver Forschungsbemühungen noch immer unvollständig. Im Folgenden werden wesentliche Aspekte der Erkrankung vorgestellt.

### 1.1.1 Epidemiologie der MS

Weltweit sind etwa 2 Mio. Menschen an MS erkrankt (3). In der Bundesrepublik Deutschland wurde die Zahl der Patienten im Jahr 2000 auf 122.000 geschätzt (4). Eine aktuelle Studie auf Basis von Abrechnungsdaten der Gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) geht sogar von etwa 200.000 MS-Patienten in Deutschland aus; das entspricht einer Prävalenz von 289 Patienten pro 100.000 GKV-Versicherte (5).

Aus demographischer Sicht sind Alter, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit wichtige Einflussgrößen. Das Prädilektionsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren, wobei die Erkrankung auch schon im Kindes- und Jugendalter (6) oder erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter bzw. im Senium (7) auftreten kann. Frauen erkranken – bei schubförmiger MS (8) – häufiger als Männer (2-3:1), Personen kaukasischen Ursprungs häufiger als Angehörige anderer Ethnien, wobei die Prävalenz bestimmter ethnischer Populationen unterschiedlich hoch ist (9).

Bei einer weltweiten geographischen Betrachtung fällt auf, dass die Prävalenz mit zunehmender Entfernung vom Äquator zunimmt. In wirtschaftlich hochentwickelten Ländern der gemäßigten Breiten ist die MS am meisten verbreitet. Bei einer Migration vor dem 15. Lebensjahr passt sich die Erkrankungswahrscheinlichkeit des Immigranten der des Einwanderungslandes an, in späteren Jahren zeigt die Migration hingegen keinen Einfluss mehr auf die Erkrankungshäufigkeit (10).

Nach neueren Untersuchungen weicht die Lebenserwartung mit den verbesserten Therapiemöglichkeiten immer weniger von jener der Allgemeinbevölkerung ab, wobei die Streubreite je nach Ausprägung der Krankheit groß ist (11). Aktuelle europäische Daten zeigen jedoch bei Menschen mit MS im Vergleich mit der Allgemeinbevölkerung noch immer eine Reduktion der Lebenserwartung um durchschnittlich 10-12 Jahre (12, 13). Die Erkrankung führt bei etwa 40% der Patienten zu einer vorzeitigen Berentung und bei 6% zur Arbeitslosigkeit (2) und stellt somit neben der individuellen Belastung der Betroffenen und ihres persönlichen Umfelds auch einen volkswirtschaftlich bedeutsamen Faktor dar.

## 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der MS

Zur Ätiologie der MS existieren verschiedene Theorien, wobei die Frage nach der Ursache bzw. den Ursachen der Erkrankung bislang jedoch noch nicht umfassend geklärt werden konnte. Zusammenfassend wird eine multikausale Genese mit einer zu Grunde liegenden genetischen Suszeptibilität gekoppelt mit einem Einwirken von Umweltfaktoren angenommen. Auch eine infektiöse Ätiologie wird diskutiert. Die bisherigen Erkenntnisse sprechen für eine komplexe Autoimmunreaktion als pathogenetischen Mechanismus.

Aus genetischer Perspektive handelt es sich bei der MS um eine komplexe Erkrankung, die sowohl familiär gehäuft als auch sporadisch auftritt. Bei der Mehrzahl der Familien liegt ein komplexer oligogener Erbgang mit modifizierenden Genen, epigenetischen Regulationsmechanismen, unvollständiger Penetranz<sup>1</sup> (14) und variabler Expressivität<sup>2</sup> vor. Eine Assoziation zu bestimmten Haplotypen des HLA-Komplexes (HLA-DRB1) konnte nachgewiesen werden (15).

Die in Kap. 1.1.1 angeführten epidemiologischen Daten (geographische Gradienten, Migrationsstudien) legen nahe, dass neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse ätiologisch von Bedeutung sind. So wird beispielsweise vermutet, dass Vitamin D-Mangel zum Entstehen einer MS beiträgt, was die geringere MS-Prävalenz in Ländern mit hoher Sonneneinstrahlung erklären könnte (16).

Schon früh wurde die Vermutung einer infektiösen Ätiologie der MS formuliert, die sich bis heute in wechselnder Ausprägung erhalten hat. Es wurden und werden u.a. Zusammenhänge zu bakteriellen (Spirochäten, Chlamydia pneumoniae) und viralen Infektionen (EBV, Masern, HIV, HHV-6) hergestellt (17). Diese Theorie könnten das seltene cluster- oder epidemieartige Auftreten von MS-Erkrankungen (wie z.B. auf den Faröer-Inseln) erklären (10), dessen Bedeutung allerdings wie auch die Infektionstheorie selbst umstritten ist.

Der überwiegenden Forschungsmeinung zufolge zählt die MS pathogenetisch zu den sog. Autoimmunerkrankungen. Nach traditionellem Verständnis richten sich autoreaktive T<sub>H</sub>1-

---

<sup>1</sup> Ein Beispiel ist die Konkordanz von 25,3% bei monozygoten Zwillingen.

<sup>2</sup> Hierunter werden unterschiedliches Manifestationsalter, variabler klinischer Verlauf und heterogenes Entmarkungsmuster zusammengefasst.

Lymphozyten gegen Myelinbestandteile des ZNS und induzieren dort einen Entzündungsprozess mit nachfolgender Myelindestruktion (18). Neuere Daten legen nahe, dass die Immunpathogenese der MS komplexer ist als zunächst angenommen (19) und auch eine Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (20) sowie Elemente des humoralen Immunsystems (21) beinhaltet.

### **1.1.3 Klinische Präsentation und Verlaufsformen der MS**

Das Erscheinungsbild der Krankheit ist entsprechend dem Auftreten und Abklingen entzündlicher Herde an verschiedenen Lokalisationen im ZNS durch eine räumliche und zeitliche Dissemination charakterisiert. Grundsätzlich können MS-Läsionen an jeder Stelle des ZNS auftreten. Prädilektionsstellen für die Lokalisation der Entmarkungsherde sind Sehnerven, Corpus callosum, Hirnstamm, Kleinhirn, Pyramidenbahn und Hinterstränge des Rückenmarks. Dementsprechend kommt es häufig zu spastischen Paresen, spinaler oder cerebellärer Ataxie, zentraler Visusminderung, Doppelbildern, Parästhesien, Dysarthrie sowie zu Beeinträchtigungen der Blasen- und Sexualfunktionen und psychischen Veränderungen (22). Sehr häufig und für die Patienten oft sehr belastend sind auch kognitive Störungen (23-25), Schlafstörungen (26) und eine abnorme Müdigkeit oder Erschöpfung, die sog. „Fatigue“ (27, 28). Der Schweregrad der Behinderung wird häufig mit Hilfe der von John F. Kurtzke entwickelten Expanded Disability Status Scale (EDSS) angegeben. Unter Berücksichtigung verschiedener funktioneller Systeme (Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Blasen-/Mastdarmfunktion, Sehfunktion, cerebrale Funktionen, andere Funktionen) erfolgt dabei eine Einteilung auf der Skala von 0,0 (keinerlei Einschränkung) über 4,0 (Einschränkung der Gehfähigkeit) und 7,0 (weitgehende Rollstuhlpflichtigkeit) bis 10,0 (Tod durch MS) (29).

Der Krankheitsverlauf der MS ist äußerst variabel und schwer vorhersehbar. Im Wesentlichen unterscheidet man schubförmige und chronisch-progrediente Verläufe, jeweils mit oder ohne vollständige Remission. Zu Beginn der Krankheit überwiegen mit 90% schubförmige Verläufe (relapsing-remitting MS = RRMS). Unbehandelt geht etwa die Hälfte dieser Fälle innerhalb von 10-15 Jahren in eine sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform (secondary progressive MS = SPMS) mit schleichender Zunahme der Symptomatik über (11). Deutlich seltener mit 10% ist die primär progrediente Verlaufsform (primary progressive MS = PPMS), die von Anfang an durch eine sukzessive

---

Verschlechterung gekennzeichnet ist. Das erstmalige Auftreten einer Schubsymptomatik bezeichnet man als sog. klinisch isoliertes Syndrom (CIS). Es wird als Anfangsstadium der MS betrachtet (3).

### **1.1.4 Therapie der MS**

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist Multiple Sklerose nicht heilbar. Der Krankheitsverlauf kann aber durch verschiedene Therapieoptionen positiv beeinflusst werden.

Im akuten Schub ist die intravenöse Glucocorticosteroid-Pulstherapie als Therapie der ersten Wahl etabliert. Durch eine Hemmung der Entzündungsreaktion und Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke wird eine beschleunigte Rückbildung der Symptome erreicht (3). Bei nicht ausreichender Wirkung der Corticoidpulstherapie ist eine Plasmapherese bzw. Immunadsorption zu erwägen (30).

Zur Langzeittherapie stehen in erster Linie verschiedene immunmodulierende Wirkstoffe zur Verfügung. Als Medikamente der ersten Wahl werden gemäß aktueller DGN/KKNMS-Leitlinie (Stand August 2015) beim klinisch isolierten Syndrom Beta-Interferone (31) oder Glatirameracetat eingesetzt. Bei RRMS sind daneben bei milder/moderater Verlaufsform auch die neueren Medikamente Dimethylfumarat und Teriflunomid zugelassen. Bei (hoch-) aktiver Verlaufsform werden zur immunmodulierenden Eskalationstherapie Natalizumab, Fingolimod oder Alemtuzumab als Medikamente der 1. Wahl empfohlen. Als Medikament der 2. Wahl wird ebenso wie bei der SPMS Mitoxantron, selten auch Cyclophosphamid, angewandt. Bei Sonderindikationen kommen auch Azathioprin oder intravenöse Immunglobuline zum Einsatz (3).

Von großer Bedeutung für die Lebensqualität ist die Linderung symptomatischer Beschwerden wie beispielsweise Spastik, Fatigue oder Störungen der Blasen- und Sexualfunktion. Bei deren Behandlung spielen neben Medikamenten auch Physio- und Ergotherapie sowie psychologische Begleitung eine wichtige Rolle (3).

### 1.1.5 Pathologische Charakteristika der MS

Strukturelles Äquivalent der in Kap. 1.1.3 beschriebenen Symptomatik sind multifokale, scharf begrenzte Läsionen (Plaques). Sie treten in der weißen und grauen Substanz auf (32) und durchlaufen verschiedene Aktivitätsstadien. Akute und chronisch aktive Plaques weisen sich durch Zeichen der aktiven Demyelinisierung aus, erkennbar an einer ausgeprägten Infiltration durch Makrophagen, in deren Zytoplasma sich Myelinabbauprodukte finden. Demgegenüber sind chronisch inaktive Plaques hypozellulär und durch eine astrozytäre Gliose charakterisiert (19).

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit intakter Oligodendrozyten kommt es gleichzeitig zu einer Remyelinisierung, erkennbar an einer schwächeren Anfärbung der Markscheiden im Präparat. In akuten Plaques erfasst sie oft noch die gesamte Läsion, in chronischen Läsionen hingegen ist die Remyelinisierung häufig auf die Randzone beschränkt.

Bei genauer Untersuchung der Demyelinisierung lässt sich eine interindividuelle Heterogenität beobachten, wobei vier Entmarkungsmuster unterschieden werden können: Autoimmumentmarkung (vermittelt durch T-Zellen und Makrophagen (Typ 1) oder durch Antikörper und Komplementsystem (Typ 2)) oder Oligodendrozytendystrophie (distale Oligodendropathie und Apoptose (Typ 3) oder primäre Oligodendrozytendegeneration (Typ 4)) (33, 34).

Auch in nicht von Plaques betroffenem Gewebe finden sich pathologische Veränderungen: In der sog. normal erscheinenden weißen Substanz (normal-appearing white matter, NAWM) zeigen sich vor allem bei Patienten mit primär und sekundär progredienten Verlaufsformen diffuse Schädigungen mit entzündlicher Infiltration, Mikroglia-Aktivierung und Reduktion der Dichte von sowohl Axonen als auch Myelin. Die chronisch-progredienten Verlaufsformen sind darüber hinaus im Vergleich zu schubförmigen Verläufen von ausgeprägter corticaler Demyelinisierung betroffen (35).

Neben der Demyelinisierung im ZNS als *dem* pathologischen Charakteristikum tritt bei der Multiplen Sklerose auch eine neuronale Schädigung auf. Es handelt sich um eine sowohl Axone als auch Perikaryen betreffende Schädigung, die (im Gegensatz zu der teilweise reversiblen Demyelinisierung) irreversibel ist und als ursächlich für das Auftreten einer

bleibenden neurologischen Behinderung angesehen wird (36). In Abschnitt 1.3 wird der Aspekt der neuronalen Schädigung ausführlicher beleuchtet, da dies zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit hinführt. Zuvor soll jedoch das am breitesten eingesetzte Tiermodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), vorgestellt werden.

## **1.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der MS**

Eine Erforschung der Pathologie der Multiplen Sklerose gestaltet sich wie bei vielen Erkrankungen aufgrund der geringen Verfügbarkeit geeigneten humanen Untersuchungsmaterials als schwierig. Demzufolge werden Tiermodelle zur Erforschung einzelner Aspekte der Erkrankung als unabdingbar erachtet (37). Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis<sup>3</sup> (EAE) ist das weitverbreitetste und am intensivsten untersuchte Tiermodell der MS (38). Auf Beobachtungen von Impfkomplicationen bei Tollwutimpfungen basierend (39) wurde sie vor mehr als 80 Jahren entwickelt (40, 41) und seither in zahlreichen Modifikationen angewandt. Um die Möglichkeiten und Grenzen ihrer Anwendung beurteilen zu können, werden im Folgenden das methodische Grundprinzip der EAE erläutert und die Parallelen und Unterschiede zur MS aufgezeigt.

### **1.2.1 Methodik der EAE**

Im Wesentlichen existieren zwei verschiedene Methoden der EAE-Induktion: Bei der aktiven EAE wird dem untersuchten Tier ein Antigen oder Antigengemisch aus emulgiertem ZNS-Gewebe, Myelin oder Myelinbestandteilen subkutan verabreicht, worauf es zu einer Immunreaktion gegen die entsprechenden Antigene kommt. Heutzutage werden als Antigene meist isolierte Proteine der Myelinscheide<sup>4</sup> verwendet, zur Steigerung der Enzephalitogenität werden komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA)<sup>5</sup> (42) und Pertussistoxin hinzugefügt. Die passive EAE wird durch Transfer von autoreaktiven T-Zellen ausgelöst (37).

---

<sup>3</sup> Die ursprüngliche Bezeichnung lautete experimentelle allergische Enzephalomyelitis.

<sup>4</sup> z.B. basisches Myelinprotein (MBP), Proteolipidprotein (PLP) oder oligodendrogliales Myelin-Glykoprotein (MOG).

<sup>5</sup> Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis*.

Der Verlauf der Autoimmunreaktion und damit auch die klinische Symptomatik und die pathologischen Charakteristika sind abhängig von der Tierspezies<sup>6</sup> und der Art des enzephalitogenen Proteins. Je nach Protokoll können akute oder chronisch schubförmige Verläufe induziert werden (43).

### **1.2.2 Parallelen und Unterschiede zur MS**

Als Modell für die Multiple Sklerose erreichen heutige EAE-Protokolle bereits eine nennenswerte Übereinstimmung in zahlreichen klinischen und pathologischen Aspekten (43). Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass die Charakteristika der EAE wie auch der MS einer beträchtlichen Variabilität unterworfen sind und unterschiedliche EAE-Modelle jeweils spezifische Aspekte der MS widerspiegeln. So existiert z.B. kein EAE-Modell für die primär progressive Verlaufsform der MS, und auch der Einfluss von CD8-positiven Lymphozyten wird in den meisten EAE-Modellen nicht ausreichend repräsentiert (44). Dies muss bei der Anwendung von Erkenntnissen aus Untersuchungen an EAE auf die MS berücksichtigt werden, um Fehlschlüsse möglichst zu vermeiden (38). Ebenso ist die Tatsache von Belang, dass die histopathologischen Merkmale der EAE bei einer Vielzahl von Enzephalitiden verschiedener Ätiologie auftreten (38) und insofern nicht zwangsläufig als MS-spezifisch zu werten sind.

In der Vergangenheit hat die EAE bereits sowohl zum Verständnis der Pathogenese der MS als auch zur Entwicklung therapeutisch wirksamer Substanzen in entscheidender Weise beigetragen<sup>7</sup> (38). Auch in Zukunft ist angesichts der Limitierungen für Untersuchungen an MS-Gewebsproben eine Forschung am Tiermodell notwendig (37). Untersuchungen der EAE können jedoch nur dann den größten Ertrag für die MS-Forschung erbringen, wenn bei der Interpretation der Ergebnisse die Summe des experimentell erworbenen Wissens sowie die Grenzen des jeweiligen Modells berücksichtigt werden (38).

---

<sup>6</sup> Als Modell der MS wird die EAE meist in Mäusen oder Ratten induziert.

<sup>7</sup> Mit Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab wurden drei wesentliche therapeutische Substanzen für die MS am EAE-Modell entwickelt.



## 1.3 Neuronale Schädigung bei Multipler Sklerose

### 1.3.1 Historischer Rückblick

Bereits in den Anfängen der MS-Forschung war neben der Entmarkung auch eine Schädigung des Axons selbst beschrieben worden. Eine Übersicht hierzu wurde von Kornek und Lassmann 1999 veröffentlicht (45)<sup>8</sup>. Charcot definierte die Demyelinisierung bei gleichzeitigem Erhaltenbleiben der Axone als ein wesentliches diagnostisches Kriterium der Multiplen Sklerose (46). Frommann hingegen beschrieb, dass „die Bildung der Heerdschubstanz [...] gleich mit ihrer Entwicklung nicht nur zu Defekten der Markscheide, sondern auch zu Continuitätstrennungen der Axenzylinder geführt hatte“ und betonte, man dürfe „das Persistieren oder Nichtpersistieren von Axenzylindern [...] nicht als ein Kriterium für oder gegen das Bestehen des einen [...] der [...] Krankheitsprozesse verwerthen“ (47). Später räumte auch Charcot ein, dass tatsächlich eine gewisse axonale Beteiligung vorliegen könnte (48). Auch Marburg wies im Verlauf darauf hin, „daß die Achsenzylinder relativ intakt bleiben [...]. Der Ton in diesem Satze liegt aber nicht nur auf intakt, sondern auch auf relativ. Denn es drängt sich immer mehr die Tatsache hervor, daß bei der multiplen Sklerose mehr Achsenzylinder zugrunde gehen, als man gemeinhin dachte“ (49). Putnam betonte, dass das Erhaltenbleiben der Axone zwar einen kardinalen Punkt des vorherrschenden Bildes der pathologischen Zusammenhänge der MS darstelle. Jedoch sei in zahlreichen Untersuchungen gezeigt worden, dass Axone bei der MS selten unbeschädigt bleiben, sondern oft sogar vollständig zerstört werden. Er wies darüber hinaus auf das häufige Auftreten der sekundären Degeneration hin (50). Dieser Aspekt war jedoch strittig, verschiedene Autoren waren der Ansicht, es handele sich bei den beobachteten Phänomenen der axonalen Unterbrechungen und terminalen Schwellungen vielmehr um Zeichen der *Regeneration* (z. B. (51)) und diese seien das Korrelat für die beobachteten klinischen Remissionen nach einem Schub (52). Zum Teil wurden Vermutungen geäußert, Befunde wie beispielsweise eine reduzierte Axonendichte in MS-Läsionen seien auf nicht ausreichend sensitive Färbemethoden zurückzuführen (wiedergegeben in (8)). So trat der Aspekt der neuronalen Schädigung in den folgenden Jahrzehnten immer mehr in den Hintergrund.

---

<sup>8</sup> Die folgenden historischen Zitate sind dieser Arbeit entnommen.

### 1.3.2 Neuere Forschung

Seit ca. 15 Jahren stehen neuronale bzw. axonale Veränderungen wieder verstärkt im Fokus der MS-Forschung. Axonale Dystrophie als Folge chronischer Demyelinisierung bei EAE wurde bereits in den 1980er Jahren beschrieben (53). Ende der 1990er Jahre wurden mittels histologischer Post-Mortem-Untersuchungen bei MS-Patienten Akkumulationen von Amyloidvorläuferprotein APP (54) sowie axonale Unterbrechungen und terminale Auftreibungen (55) in MS-Läsionen entdeckt und als Zeichen einer axonalen Schädigung interpretiert. Nicht nur die Zellfortsätze, auch die Zellkörper (Perikaryen) selbst sind betroffen und weisen Apoptosezeichen auf (32).

Neuronale Schädigung wurde sowohl im Rahmen akuter entzündlicher Aktivität (55) als auch sekundär als Folge chronischer Demyelinisierung (1, 36, 56, 57) beschrieben. Sie wird mittlerweile weithin als Hauptursache der irreversiblen neurologischen Behinderung bei MS-Patienten betrachtet (36).

Unklar ist, ab welchem Zeitpunkt der Erkrankung bzw. in welcher Reihenfolge Demyelinisierung und neuronale Schädigung auftreten. Viele Autoren gehen davon aus, dass die neuronale Schädigung als Folge der Demyelinisierung oder auch unabhängig davon auftritt. Auch die Möglichkeit, dass MS eine primär neurodegenerative Erkrankung mit erst sekundär auftretender entzündlicher Demyelinisierung sein könnte, wird diskutiert (8).

Zeichen der neuronalen Schädigung bei Multipler Sklerose wurden nicht nur post mortem, sondern auch in vivo nachgewiesen. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie und –spektroskopie wurden z. B. erniedrigte Konzentrationen von N-Acetylaspartat (NAA), einer in Neuronen vorhandenen Aminosäure (58), und eine mit einem Fortschreiten der Erkrankung korrelierende Atrophie sowohl des Gehirns als auch des Rückenmarks (59, 60) sowie der Retina (61) als Zeichen neuronalen Untergangs festgestellt. In verschiedenen Studien fanden sich Hinweise, dass eine Korrelation des Ausmaßes der Degeneration der grauen Substanz (Läsionslast, Atrophie) mit dem Grad an körperlicher Behinderung (z.B. EDSS) und kognitiver Beeinträchtigung besteht (62). Dies gilt nicht nur für kortikale Areale, sondern auch insbesondere für die spinale graue Substanz (63, 64).

### 1.3.3 Periphere neuronale Schädigung bei MS

Eine Sonderstellung in diesem Forschungsgebiet nehmen die Arbeiten über Veränderungen im peripheren Nervensystem (PNS) ein. Gemeinhin wird die Multiple Sklerose als eine Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) betrachtet (19). Dennoch finden sich auch im peripheren Nervensystem vielfältige, oft subklinische pathologische Veränderungen. Die zugrundeliegende Definition des peripheren Nervensystems ist hierbei nicht ganz einheitlich: Anatomisch werden die Perikaryen der zweiten Motoneurone aufgrund ihrer Lage im Rückenmark noch dem zentralen Nervensystem zugeordnet (65). Betrachtet man hingegen das gesamte Motoneuron als funktionelle Einheit, so sind die sog. ersten Motoneurone dem zentralen Nervensystem zuzurechnen, und das zweite Motoneuron ist in seiner Gesamtheit – also einschließlich des Perikaryons – Teil des peripheren Nervensystems.

Muskelatrophie ist ein häufiges Symptom bei MS im fortgeschrittenen Stadium. Als mögliche Ursache werden neben einer Inaktivitätsatrophie auch Rückenmarksläsionen im Bereich des zweiten Motoneurons vermutet (66). Dieser Zusammenhang wurde bereits in den 1930er Jahren erstmalig gezeigt (67). Auch im weiteren Verlauf des peripheren Nervensystems außerhalb des Rückenmarks wurden in histopathologischen Untersuchungen Anzeichen einer peripheren Neuropathie (68), segmentale Demyelinisierung oder Reduktion des Nervenscheidendurchmessers in distalen sensiblen Nerven (69-71) sowie eine hypertrophische Neuropathie in Spinalwurzeln, Hirnnerven (72, 73) und distalen Nerven (74) gezeigt.

Die post mortem Studien korrespondieren mit Untersuchungen bei MS-Patienten in vivo. Im Verlauf des späten 20. Jahrhunderts wurden diverse Fallberichte und klinische Studien von MS-Patienten mit einer z.T. subklinischen Beteiligung des PNS publiziert (70, 75-83).

Auch mit elektrophysiologischen Methoden ließen sich Anzeichen einer Beteiligung des peripheren Nervensystems nachweisen. Shefner et al. zeigten pathologische Befunde in Elektromyographie (EMG) und/oder peripheren Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) bei MS-Patienten mit Handmuskelatrophie. Sie führten diese auf Läsionen im Bereich der motorischen Wurzeln oder Vorderhornzellen zurück, wiesen dabei jedoch darauf hin, dass diese nicht nur demyelinisierend sein können, sondern auch mit einem axonalen Schaden

---

einhergehen (79). Erniedrigte CMAP<sup>9</sup>-Amplituden und ein geringerer Schätzwert der motorischen Einheiten (MUNE) bei MS-Patienten legen ebenfalls eine Beteiligung des peripheren motorischen Nervensystems nahe (84).

### **1.3.4 Neurofilamentphosphorylierung als Indikator für neuronale Schädigung**

Das neuronale Zytoskelett enthält Neurofilamente (NF) als eine zentrale strukturelle Komponente. Sie sind aus drei Untergruppen zusammengesetzt, die anhand ihres Molekulargewichts eingeteilt werden: leichte (NF-L für light), mittelschwere (NF-M für medium) und schwere (NF-H für heavy) Neurofilamente (85, 86). In gesunden Neuronen sind die Neurofilamente in den Axonen phosphoryliert, die in den Zellkörpern nicht (87). Bei pathologischen Veränderungen kehrt sich die Situation um: Hier zeigt sich eine Phosphorylierung der Neurofilamente in den Perikaryen, die axonalen Neurofilamente hingegen bleiben unphosphoryliert (86, 88). Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach genutzt, um eine neuronale Schädigung bei verschiedenen Erkrankungen nachzuweisen (55, 89, 90).

---

<sup>9</sup> CMAP: compound muscle action potential

---

## 2. Fragestellung

Wie oben ausgeführt, liegen bereits einige Hinweise auf das Auftreten einer neuronalen Schädigung bei MS nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark und peripheren Nervensystem vor. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob mit der Schädigung auch ein Untergang der spinalen Moto- und Interneurone einhergeht. Dies war in einer vorigen Untersuchung bereits bei EAE gezeigt worden (84). Hierzu wurden Zellen im spinalen Vorder- und Zwischenhorn auf verschiedenen Höhen des Rückenmarks quantifiziert und die Zahlen bei MS-Patienten denen gesunder Kontrollpersonen gegenübergestellt.

Des Weiteren wurde geprüft, ob sich in den spinalen Motoneuronen auch Zeichen der neuronalen Schädigung auf molekularer Ebene nachweisen lassen. Hierzu wurden Veränderungen der Phosphorylierung von Neurofilamenten gezielt untersucht. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen waren diese zwar bereits bei anderen neurologischen Erkrankungen des Menschen, z.B. der Amyotrophen Lateralsklerose, nicht aber bei MS untersucht worden. Bei der EAE, dem Tiermodell der MS, waren bis dahin nur Veränderungen der Phosphorylierung von Neurofilamenten in Axonen nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus der Untersuchung auf die Perikaryen gelegt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden histopathologische und immunhistochemische Methoden an humanem und murinem Rückenmarksgewebe angewandt, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

## 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zu Anfang ein Überblick über das gesamte Untersuchungsverfahren gegeben (Kap. 3.0). Danach folgt eine ausführliche Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte.

### 3.0 Überblick

#### *Teil I: Quantifizierung und Vermessung spinaler Neurone im Vorder- (und Zwischen-) horn als Hinweis auf neuronalen Untergang.*

Neun MS-Patienten wurden anhand von Alter und Geschlecht neun Kontrollpersonen mit gesundem Nervensystem zugeordnet. Das post mortem entnommene und eingefrorene Rückenmark wurde am Kryostat in 10 µm dicke Transversalschnitte geschnitten und mit Cresylviolett angefärbt. Um die Höhenlokalisierung der Rückenmarksschnitte von Patienten und Kontrollpersonen präzise aufeinander abzustimmen, wurde der zu untersuchende Bereich in einem aufwendigen Verfahren anhand anatomischer Kriterien ausgewählt. Von jedem Paar wurden auf gleicher Höhe bestimmte Areale des Rückenmarks hinsichtlich ihrer Neuronenpopulationen mittels stereologischer Messmethoden untersucht. Anschließend wurden die ermittelten Werte statistisch ausgewertet.

#### *Teil II: Immunhistochemische Untersuchung des Phosphorylierungsmusters der Neurofilamente in spinalen Motoneuronen als Hinweis auf neuronale Schädigung.*

13 MS-Patienten und sechs Kontrollpersonen (drei gesunde, drei mit anderen neurologischen Erkrankungen) sowie 18 Mäuse (15 mit EAE, drei gesunde Kontrollen) wurden in die Studie einbezogen. Von jedem Individuum wurde Rückenmark gefriereschnitten und immunhistochemisch weiterverarbeitet. Dabei wurden phosphorylierte und nichtphosphorylierte Epitope des Neurofilaments H markiert und mittels Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) gefärbt.

## **3.1 Stereologische Quantifizierung und Vermessung spinaler Neurone im Vorder- (und Zwischen-)horn bei MS**

### **3.1.1 Gegenstand der Untersuchung**

Das untersuchte Rückenmark wurde von der Gewebebank von C.S. Raine, Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, USA (Gruppe 1) sowie vom Institut für Rechtsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin (Gruppe 2) zur Verfügung gestellt und unterlag den für das jeweilige Institut gültigen Richtlinien für Untersuchungen von humanem Gewebe.

Untersucht wurde das Rückenmark von je neun MS-Patienten und Kontrollpersonen. Eine Übersicht über die Proben gibt Tab. 3.1. Alle Patienten stimmten in Geschlecht und Alter (Toleranzbereich  $\pm 10$  Jahre) mit den ihnen zugeordneten Kontrollpersonen überein. In der Kontrollgruppe lagen keine neurologischen Erkrankungen oder andere das Nervensystem erwiesenermaßen schädigenden Einflüsse vor. Die zwischen Zeitpunkt des Todes und Entnahme des Rückenmarks liegende Zeitspanne (sog. Post-Mortem-Zeit) lag in Gruppe 1 bei  $1,2 \pm 1,0$  Tagen, in Gruppe 2 bei  $6,6 \pm 1,0$  Tagen (Kühlung ab max. 3 h post mortem). Direkt nach Entnahme im Rahmen der Autopsie wurde das Rückenmark in 2-3 cm lange Teilstücke geschnitten, unter Beibehaltung der Orientierung in Längsrichtung in ein Gefriermedium (TissueTek OCT Compound; Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA) gegeben und auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt.

Patient	Alter	Geschlecht	Pathologie	Todesursache	Spinale Höhe	Kontrolle	Alter	Geschlecht	Todesursache
MS1	55	w	chronisch inaktiv	Sepsis	lumbal	HC1	49	w	Suizid
MS2	45	w	chronisch aktiv	Apnoe	lumbal	HC2	45	w	Suizid
MS3	46	m	chronisch inaktiv	Herzstillstand	lumbal	HC3	44	m	Herzversagen
MS4	73	w	chronisch inaktiv	Pneumonie	lumbal	HC4	72	w	Myokardinfarkt
MS5	32	w	chronisch aktiv	Pneumonie	thorakal	HC5	42	w	Myokardinfarkt
MS6	69	m	chronisch inaktiv	Pneumonie	thorakal	HC6	66	m	Hypoxie
MS7	31	w	chronisch aktiv/akut	Apnoe	thorakal	HC7	35	w	Suizid
MS8	27	w	chronisch (in)aktiv	Sepsis	thorakal	HC8	28	w	Polytrauma
MS9	56	w	chronisch inaktiv	Urosepsis/ Pneumonie	lumbal	HC9	50	w	Suizid

**Tab. 3.1 Daten der Patienten und Kontrollpersonen.** *MS* Multiple Sklerose, *HC* gesunde Kontrolle. *w* weiblich, *m* männlich.

### 3.1.2 Schnitt und Färbung

Am Kryostat (Leica CM 1900, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) wurden bei einer Temperatur von -23 bis -25 °C Transversalschnitte von 10 µm Dicke erstellt und auf einen gelatinisierten Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden in einem Fixativ aus 4 % Paraformaldehyd, 0,75 % Glutaraldehyd und 15 % Pikrinsäure in Phosphatpuffer 1 h fixiert und in einer 0,075 %-igen Cresylviolettlösung 20 min gefärbt. Das Färbeprotokoll samt Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zeigt Tab. 3.2.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Die Anwendung dieses Protokolls ergab für Gruppe 1 gut auswertbare Schnitte, führte bei Gruppe 2 jedoch zu Verarbeitungsschäden (Gefrierartefakten), welche die Morphologie stark veränderten und dadurch das Gewebe für die Untersuchungen nutzlos machten. Daher wurde für diese Schnitte hier folgendes Alternativprotokoll entwickelt und angewandt: Nach einer Dehydrierung des Gewebes mit aufsteigender Saccharose-Lösung (10 %, 20 %, 30 % in Phosphatpuffer je 24 h) wurde das Gewebe in einem Fixativ aus 4 % Paraformaldehyd, 0,75 % Glutaraldehyd und 15 % Pikrinsäure in Phosphatpuffer für 24 h fixiert und anschließend eingefroren. Es folgten Schnitt und Färbung nach obigem Protokoll. Diese Verarbeitungsmethode ergab gut erhaltene Schnitte ohne Schädigungsartefakte. Da die entsprechenden Proben aus der Gruppe 1 bereits in unfixiert gefrorenem Zustand (fresh frozen) vorlagen, war ein analoger Protokollwechsel in dieser Gruppe nicht möglich.



Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1. Trocknen der Schnitte		20 min bei 20 °C
2. Puffer	40 ml 1M Natriumacetatpuffer 9,6 ml 100 % Essigsäure 950,4 ml Aqua bidest.	20 min
3. Entfettungslösung	0,5 ml 10 % Triton X-100 49,5 ml Aqua bidest. 150 ml 100 % Ethanol	20 min
4. Puffer	siehe 2.	20 min
5. Färbelösung	1g/l Cresylviolett in Färbepuffer	20 min
6. Puffer	siehe 2.	3x 1 min
7. Dehydrieren	100 % Ethanol 2x 100 % Isopropanol 2x 100 % Xylol	30 sec je 5 min je 5 min
8. Deckglas aufbringen	Deckmedium: Entellan in Xylol	
9. Trocknen unter Abzug bei 20 °C		

**Tab. 3.2 Arbeitsprotokoll der Nissl-Färbung.**

### 3.1.3 Festlegung des Untersuchungsbereichs

Von den MS-Patienten stand jeweils ein Rückenmarksteilstück von 200 µm Dicke zur Verfügung. Um einen Höhenunterschied als systematische Fehlerquelle bei der quantitativen Analyse auszuschließen, wurde die Höhe des untersuchten Kontrollmaterials mit der des Patientenmaterials mit größter Präzision abgestimmt. Dazu wurde ein dreistufiges Verfahren angewandt:

1. Zunächst wurde das vorliegende Patientengewebe bezüglich seiner Höhe im Rückenmark (sakral, lumbal, thorakal, zervikal) eingeteilt. Der entsprechende Bereich im Kontrollgewebe wurde geschnitten und gefärbt. Dabei wurden von jedem Teilstück zunächst 15-20 Schnitte aus dem Anfangsbereich zur Orientierung angefertigt und mit dem Patientengewebe verglichen. Anhand dieser Voruntersuchung wurden 1-3 Teilstücke ausgewählt, komplett geschnitten und gefärbt.
2. Von den gefärbten Schnitten wurden mit einer an einem Lichtmikroskop (Olympus BX50 mit UPlanApo-Linsen; Olympus, Tokyo, Japan) angebrachten CCD-Farbvideokamera (HV-C20AMP; Hitachi, Tokyo, Japan) Übersichtsaufnahmen

angefertigt. Zur vergleichenden Orientierung war zuvor eine photographische Übersichtsskala aus Transversalschnitten eines gesamten neurologisch gesunden Rückenmarks erstellt worden. Mit diesem Bildmaterial erfolgte eine zweite, genauere Eingrenzung anhand anatomischer Charakteristika wie Größe und Form der grauen und weißen Substanz sowie Anordnung der Motoneuron-Formationen in Lamina IX des Rückenmarks (91, 92).

3. Die endgültige Eingrenzung des Kontrollgewebes auf einen Bereich von 200  $\mu\text{m}$  Gesamtdicke erfolgte am Lichtmikroskop in 12,5- bis 100-facher Vergrößerung nach den unter 2. genannten Kriterien.

### **3.1.4 Stereologische Untersuchung**

#### ***Theoretischer Hintergrund***

Stereologie ist eine Methodik zur Abschätzung geometrischer Quantitäten. Ursprünglich bezeichnet der Begriff ein Set mathematischer Methoden, das anhand von Beobachtungen in zweidimensionalen Schnitten Aussagen über dreidimensionale Strukturen erlaubt. Diese Definition trifft allerdings auf die meisten neueren Methoden nicht mehr zu, da hier auch im dreidimensionalen Raum Beobachtungen gemacht werden (93). Ziel der Anwendung stereologischer Methoden ist es, systematische Fehler bei der quantitativen morphologischen Analyse so weit wie möglich zu vermeiden.

Es gibt im Wesentlichen zwei Gruppen stereologischer Methoden: Der ursprünglichen „modellbasierten“ Stereologie liegen Kenntnisse oder Annahmen bzgl. der Morphologie und Verteilung der untersuchten Population zu Grunde. Demgegenüber arbeitet die weiterentwickelte „designbasierte“ Stereologie mit randomisierten Auswahlregeln, die unabhängig von solchen Annahmen funktionieren. Designbasierte Methoden zeichnen sich gegenüber modellbasierten dadurch aus, dass sie systematische Fehler aufgrund falscher Annahmen zur Morphologie der untersuchten Struktur vermeiden (94). Von manchen Autoren wird die designbasierte Stereologie gegenüber modellbasierten Methoden für grundsätzlich überlegen erachtet (95). Andere empfehlen, die Wahl der besten Methode für jede Fragestellung individuell zu treffen (94). Der Hauptvorteil der designbasierten Stereologie gegenüber anderen Methoden der quantitativen Auswertung besteht in der

Reduktion systematischer Fehler auf ein Minimum (93). Um eine größtmögliche Genauigkeit der quantitativen Aussagen zu gewährleisten, wurde daher für die vorliegende Untersuchung ein designbasierter stereologischer Ansatz gewählt.

### ***Anwendung***

Der stereologische Messplatz bestand aus einem modifizierten Lichtmikroskop (Olympus BX50 mit UPlanApo-Linsen; Olympus, Tokyo, Japan) mit motorgetriebenem Objektträgertisch (Ludl Electronics; Hawthorne, NY, USA), einer CCD-Farbvideokamera (HV-C20AMP; Hitachi, Tokyo, Japan) sowie einem Computer zur Auswertung und Steuerung mittels Stereologie-Software (StereoInvestigator; MicroBrightField Inc., Williston, Vermont, USA).

Die stereologische Messung erfolgte in folgenden Schritten:

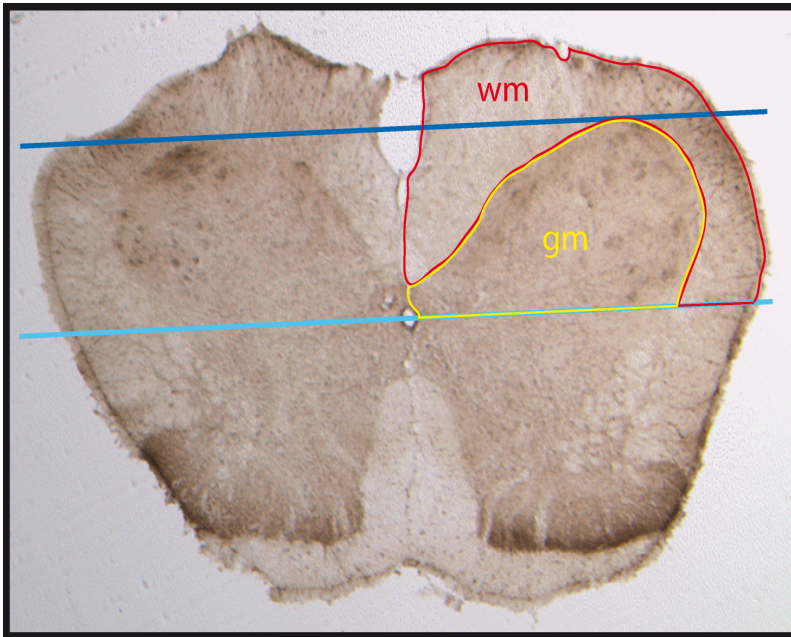
1. Systematische Zufallsauswahl der zu untersuchenden Schnitte:

Aus einem Rückenmarksbereich von 200µm Dicke wurde systematisch jeder vierte Schnitt zur weiteren Untersuchung ausgewählt, wobei der Beginn (Schnitt 1, 2, 3 oder 4) zufällig gewählt wurde.

2. Definition der zu untersuchenden Region (Region of Interest, ROI):

Bei lumbalen Schnitten wurde das Vorderhorn als ROI eingegrenzt (s. Abb. 3.1).

Im thorakalen Bereich war aufgrund des schmalen Vorderhorns nur eine sehr geringe Neuronenzahl zu erwarten. Um die Qualitätskriterien der designbasierten Stereologie zu erfüllen, wurden daher Ncl. intermedius und Ncl. thoracicus (Ncl. Stilling-Clarke) im Bereich des Seitenhorns ebenfalls stereologisch analysiert.



**Abb. 3.1 Festlegung der zu untersuchenden Region (Region of Interest, ROI) im spinalen Vorderhorn.**

Zunächst werden die anterioren Enden der beiden Vorderhörner tangential verbunden (dunkelblau). Eine Parallele hierzu wird durch die Mitte des Zentralkanals gezogen (hellblau). Anschließend werden graue Substanz (*gm*, gelb) und weiße Substanz (*wm*, rot) umgrenzt. Die ROI ergibt sich aus der gelb umrandeten Fläche, abgeschlossen durch die hellblaue Grenzlinie. (Abb. aus (96) mit freundlicher Genehmigung der Autorin).

### 3. Ablauf der stereologischen Messung (s. Abb. 3.2):

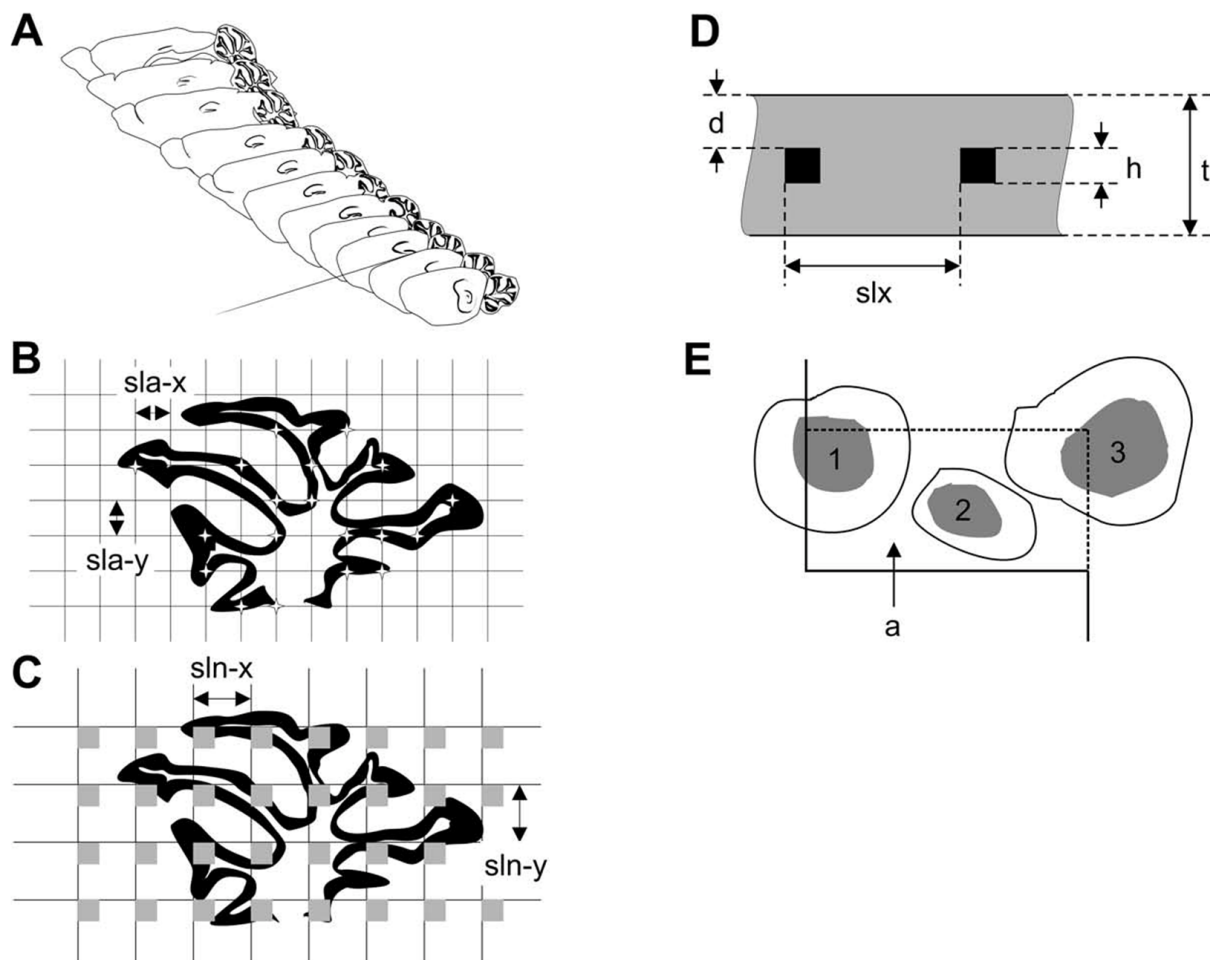
Nach der Markierung eines Referenzpunktes (hier: Zentralkanal des Rückenmarks) und der ROI wird auf jeden Schnitt ein virtuelles rechtwinkliges Gitter mit festgelegten Seitenlängen  $s_{ln-x}$  und  $s_{ln-y}$  und zufälliger Positionierung im Raum projiziert. In jedem Gitterfeld befindet sich ein ebenfalls virtuelles Zählfeld mit festgelegter Seitenlänge und zufälliger Positionierung innerhalb des Gitterfeldes. (In der vorliegenden Untersuchung sind die Seitenlängen des Zählfeldes gleich  $s_{ln-x}$  und  $s_{ln-y}$ ). Innerhalb der Schnittdicke  $t$  wird eine (geringere) virtuelle Schichtdicke  $h$  festgelegt, innerhalb derer gemessen wird. Zwischen der virtuellen Schichtdicke  $h$  und dem Ober- und Unterrand des Schnitts wird ein Schutzabstand  $d$  eingerichtet, um Fehler aufgrund von technisch bedingten Unregelmäßigkeiten an der Schnittoberfläche zu vermeiden. Aus dem virtuellen Zählfeld  $a$  und der virtuellen Schichtdicke  $h$  ergibt sich ein dreidimensionales Zählvolumen, der „counting space“.

Während der Messung fährt der Objektträgertisch automatisch von Zählfeld zu Zählfeld. Zur eindeutigen Markierung einer Nervenzelle mittels Optical Fractionator-Methode ist der Nucleolus des Zellkerns definiert. Eine Zelle wird gezählt, sofern der Nucleolus

innerhalb des Zählvolumens liegt und die Zellgrenzen nicht die Exklusionslinien des Zählfelds überschreiten. (siehe Abb. 3.2 E) Dann wird mittels Nucleator-Methode eine Oberflächenbestimmung der Zelle vorgenommen. Nach Abschluss der Markierung kann eine Liste aller markierten Zellen samt Oberflächenprofil abgerufen werden.

Die Parameter der vorliegenden stereologischen Messung sind Tab. 3.3 zu entnehmen.

Die Markierung der ROI erfolgte in 100-facher, die Zählprozedur in 200-facher Vergrößerung.<sup>11</sup>



**Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Schätzung von Volumen einer Hirnregion und Anzahl der Neurone in einer Hirnregion mittels designbasierter Stereologie**, hier am Beispiel der cerebellären Körnerzellschicht im Rattenhirn. **A** Systematische Auswahl einer Serie von Schnitten mit festem Abstand und zufälligem Beginn (z.B. Schnitt 1,5,9... oder Schnitt 3,7,11,...). **B** Schätzung der Querschnittsfläche der zu untersuchenden Hirnregion: Projektion eines zufällig positionierten rechtwinkligen Gitters mit festgelegten Seitenlängen  $sla-x$  und  $sla-y$  und Zählen der Kreuzungen des Gitters mit der untersuchten Region (hier: Körnerzellschicht der Kleinhirnrinde). **C-E** Schätzung der Anzahl der Neurone in der Körnerzellschicht: **C** Projektion eines zufällig positionierten rechtwinkligen Gitters mit

<sup>11</sup> Die stereologischen Messungen wurden nach den hier geschilderten standardisierten und untersucherunabhängigen Methoden von zwei Untersuchern durchgeführt.

festgelegten Seitenlängen  $s_{ln-x}$  und  $s_{ln-y}$ . Dadurch werden die Positionen der virtuellen Zählfelder mit der Fläche  $a$  auf dem Schnitt (hellgraue Quadrate in C, schwarze Quadrate in D) festgelegt. **D** Das Zählvolumen ergibt sich aus der Fläche  $a$  und der Höhe  $h$  und steht in einem Sicherheitsabstand von  $d$  zur Ober- und Untergrenze der Schnittdicke  $t$ . **E** Gezählt werden Neurone, die sich entweder komplett innerhalb des Zählfeldes befinden (Neuron 2) oder die Inklusionslinien (gestrichelte Linien) kreuzen (Neuron 3). Neurone, welche die Exklusionslinien (durchgezogene Linien) kreuzen, werden nicht gezählt (Neuron 1). (Abb. aus (93) mit freundlicher Genehmigung der Autoren.)

	Lumbales Rückenmark	Thorakales Rückenmark
$\bar{S}$	5	5
Linse	20×	20×
$s_{ln-x}, s_{ln-y}$ [ $\mu\text{m}$ ]	200×200	200×200
$a$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	40000	40000
$h$ [ $\mu\text{m}$ ]	5	5
$d$ [ $\mu\text{m}$ ]	1	1
$\bar{t}$ [ $\mu\text{m}$ ]	8.74	8.62
$\overline{\sum c_{ROI}^S}$	892	491
$\overline{\sum n_{ROI}}$	287	166
$\overline{CE}$	0.064	0.102

**Tab. 3.3 Stereologische Parameter.**

#### Legende

$\bar{S}$	Anzahl gezählter Schnitte pro Fall
Linse	verwendete Vergrößerung
$s_{ln-x}, s_{ln-y}$ [ $\mu\text{m}$ ]	Seitenlängen von Gitterfeld bzw. Zählfeld
$a$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	Zählfeldfläche
$h$ [ $\mu\text{m}$ ]	Höhe des Zählvolumens
$d$ [ $\mu\text{m}$ ]	Schutzzone ab Schnittoberfläche
$\bar{t}$ [ $\mu\text{m}$ ]	mittlere Schnittdicke
$\overline{\sum c_{ROI}^S}$	mittlere Anzahl von Zählfeldern pro Fall
$\overline{\sum n_{ROI}}$	mittlere Anzahl gezählter Neurone pro Fall
$\overline{CE}$	durchschnittlicher Standardfehler der (stereologisch ermittelten) Neuronenzahl

### **3.1.5 Auswertung und Statistik**

Die Einteilung der Neurone in Untergruppen erfolgte anhand des Durchmessers in  $\alpha$ -Motoneurone ( $\geq 33 \mu\text{m}$ ),  $\gamma$ -Motoneurone ( $\geq 24 - 33 \mu\text{m}$ ) und Interneurone ( $\geq 10 - 24 \mu\text{m}$ ) (97).

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Zur statistischen Analyse wurden Einstichproben-t-Test und Mann-Whitney-U-Test verwendet.

## **3.2 Immunhistochemische Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofilamenten der spinalen Vorderhornneurone bei MS und EAE**

### **3.2.1 Gegenstand der Untersuchung**

#### ***MS***

Das untersuchte Rückenmark wurde von der Gewebekbank von C.S. Raine, Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, NY, USA zur Verfügung gestellt und unterlag den gültigen institutsinternen Richtlinien für Untersuchungen von humanem Gewebe (Protokoll #1989-031-004).

Untersucht wurde das Rückenmark von 13 MS-Patienten (neun weiblich, vier männlich, Alter  $48,3 \pm 11,6$  Jahre), drei Kontrollpersonen mit anderen neurologischen Erkrankungen (eine weiblich, zwei männlich, Alter  $51 \pm 21$  Jahre) sowie drei Kontrollpersonen mit gesundem Nervensystem (eine weiblich, zwei männlich, Alter  $67 \pm 29$  Jahre) (s. Tab. 3.4). Die Post-Mortem-Zeit lag bei den MS-Fällen bei  $9,0 \pm 5,8$  h und bei den Kontrollen bei  $4,9 \pm 1,9$  h. Das im Rahmen der Autopsie freipräparierte Rückenmark wurde in 2 cm dicke Blöcke geschnitten, unter Beibehaltung der Orientierung in Längsrichtung in ein Gefriermedium (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA) eingebettet und auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt.

Code	Alter	Geschlecht	Diagnose	Pathologische Klassifikation	Todesursache
MS1	31	w	MS, chronisch-progredient	akut	Apnoe
MS2	45	w	MS	chronisch aktiv	Apnoe
MS3	32	w	MS, chronisch-progredient	chronisch aktiv	Pneumonie
MS4	27	w	MS, chronisch-progredient	chronisch aktiv	Sepsis
MS5	56	w	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Urosepsis, Pneumonie
MS6	55	w	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Sepsis
MS7	46	m	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Herzstillstand
MS8	69	m	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Pneumonie, Adenokarzinom
MS9	72	m	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Colonkarzinom
MS10	36	w	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Pneumonie
MS11	46	m	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Pneumonie
MS12	54	w	MS, chronisch-progredient	chronisch inaktiv	Pneumonie
MS13	35	m	MS	chronisch inaktiv	Pneumonie
OND1	74	m	Polyglucosan-Einschluss- körperchen-Erkrankung	-	Urosepsis
OND2	31	m	Olivopontocerebelläre Degeneration	-	Pneumonie
OND3	49	w	Amyotrophe Lateralsklerose	-	Apnoe
HC1	81	m	ZNS gesund	-	Myokardinfarkt
HC2	86	w	ZNS gesund	-	Lungenembolie
HC3	34	m	ZNS gesund	-	AML

**Tab. 3.4 Daten der MS-Patienten und Kontrollen.** *MS* Multiple Sklerose, *OND* andere neurologische Erkrankung, *HC* gesunde Kontrolle. *w* weiblich, *m* männlich. *ZNS* Zentrales Nervensystem. *AML* Akute Myeloische Leukämie.



***EAE-Modell***

In diesem Teil der Studie wurden 15 C57BL/6-Mäuse (11 Weibchen, vier Männchen) mit EAE sowie drei gesunde Weibchen als Kontrollen untersucht (s. Tab. 3.5). Die Tiere wurden in einem AAALAC<sup>12</sup>-akkreditierten Tierstall unter sorgfältiger täglicher Beobachtung sowie tierärztlicher Betreuung gehalten. Alle Protokolle wurden durch das Institutional Animal Care and Use Committee des Albert Einstein College of Medicine genehmigt (Aktenzeichen IACUC/AIC # 20020509, Datum: 19/06/2005).

Tier	Perfusionstag	Geschlecht	EAE-Score
EAE1	15	w	1/1.5
EAE2	15	w	3.0
EAE3	15	w	2.5
EAE4	20	w	0.5/1
EAE5	20	w	2/2.5
EAE6	20	w	0.5/1
EAE8	40	w	3.5/4
EAE9	40	w	1.5/2.0
EAE10	22	m	2.5/3
EAE11	22	m	2.0
EAE12	64	m	1/1.5
EAE13	64	m	2/2.5
EAE14	64	w	1.5
EAE15	64	w	3.0
HC1	2	w	(0)
HC2	5	w	(0)
HC3	13	w	(0)

**Tab. 3.5 Daten der untersuchten Mäuse.** *EAE* Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, *HC* gesunde Kontrolle. *w* weiblich, *m* männlich. EAE-Score: Grad 0, keine Abnormalitäten; Grad 1, Parese des Schwanzes; Grad 2, Plegie des Schwanzes und Schwäche der Hinterbeine; Grad 3, komplette Paraparese der Hinterbeine; Grad 4, Tetraplegie; Grad 5, Tier moribund oder tot. (98).

Die aktive EAE wurde im Alter von 8-12 Wochen durch subkutane Injektion von 200-400 µg enzephalitogenem MOG<sub>35-55</sub> Peptid in inkompletem Freund'schem Adjuvans ergänzt mit *Mycobacterium tuberculosis* an zwei Stellen im Bereich der dorsalen Flanken an Tag 0 sowie 500 ng Pertussistoxin an Tag 0 und 2 post injectionem induziert (98). Die Tiere wurden bis zu 60 Tage post injectionem (15, 20, 40, 60 d) täglich beobachtet und nach

<sup>12</sup> AAALAC = Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

ihrem klinisch-neurologischen Status eingeteilt (EAE-Score: Grad 0, keine Abnormalitäten; Grad 1, Parese des Schwanzes; Grad 2, Plegie des Schwanzes und Schwäche der Hinterbeine; Grad 3, komplette Paraparese der Hinterbeine; Grad 4, Tetraplegie; Grad 5, Tier moribund oder tot. (98)). Das Rückenmark der 3 gesunden Kontrolltiere wurde im Alter von 8-14 Wochen entnommen.

Die Tiere wurden unter Äthernästhesie über den linken Ventrikel mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) perfundiert, danach wurde das Rückenmark freipräpariert und in Blöcke geschnitten. Diese wurden unter Beibehaltung der Orientierung in Längsrichtung in ein Gefriermedium (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA) eingebettet und auf -80 °C heruntergekühlt.<sup>13</sup>

### 3.2.2 Schnitt und HE-Färbung

Am Kryostat (Shandon Cryotome; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) wurden die Blöcke bei einer Temperatur von -23 °C in 10 µm dicke Transversalschnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

Zur Evaluation von allgemeinen Gewebepathologien wurde je ein Schnitt pro Fall/Kontrolle mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Das Färbeprotokoll zeigt Tab. 3.6.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1. Trocknen der Schnitte		20 min bei 20 °C
2. Fixieren	95 % Ethanol in 3.7 % Formalin	20 min, dann Waschen (4x2 min in ddH <sub>2</sub> O)
3. Färben mit Hämatoxylin		30 sec, dann Waschen
4. Inkubieren in Ammoniumhydroxid	2-3 Tropfen NH <sub>3</sub> OH in 100 ml ddH <sub>2</sub> O	1 min, dann Waschen
5. Inkubieren in Ethanol	70 % Ethanol in ddH <sub>2</sub> O	2 min
6. Färben mit Eosin	25 ml Eosin, 75 ml 80 % Ethanol, 0.5 ml Eisessig	30 sec
7. Dehydrieren	50 %, 70 %, 2x 95 %, 2x 100 % Ethanol, 2x 100 % Xylol	2 min
8. Deckglas aufbringen	Deckmedium: Entellan in Xylol	
9. Trocknen unter Abzug		24 h bei 20 °C

**Tab. 3.6 Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

ddH<sub>2</sub>O                    deionisiertes destilliertes Wasser

<sup>13</sup> Die Induktion der EAE, das Scoring und die Perfusion und Präparation der Tiere wurden freundlicherweise durch Kakuri M. Omari und Cedric S. Raine durchgeführt.

### 3.2.3 Immunhistochemie

#### *Methodisches Prinzip*

Die Immunhistochemie dient dem Sichtbarmachen von in einem Gewebe vorhandenen Proteinen mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Zielstruktur wird dabei von einem Antikörper gebunden, der entweder schon selbst mit einem Enzym zur Färbereaktion oder einer fluoreszierenden Substanz verbunden ist (sog. direkte Immunhistochemie) oder aber das Antigen für einen zweiten Antikörper bildet, der gekoppelt an ein Enzym oder einen fluoreszierenden Farbstoff zur Färbung führt (sog. indirekte Immunhistochemie).

Weit verbreitet ist die sog. Avidin-Biotin-Methode, eine indirekte Methode, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Hierbei wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet, an dem im nächsten Schritt unter Ausnutzung der Affinität von Avidin für Biotin ein Komplex aus Avidin, Biotin und einem Enzym (hier: Peroxidase) gebildet wird, das anschließend mit einer zugeführten chromogenen Substanz reagiert.

#### *Durchführung*

Die Immunhistochemie diente der Visualisierung des Neurofilament-Phosphorylierungsstatus als Ausdruck pathologischer Veränderungen der entsprechenden Neurone (s. Kapitel 1, S. 12). Als primäre Antikörper wurden monoklonale IgG der Maus zum Nachweis von phosphoryliertem NF-H (SMI-31; Sternberger Monoclonals, Inc., Baltimore, Maryland, USA) und zum Nachweis von unphosphoryliertem NF-H (SMI-32; Sternberger Monoclonals, Inc.) verwendet, als sekundäre Antikörper biotinylierte anti-Maus-IgG der Ziege (Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, USA). Die Antikörperbindung wurde mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Reaktion (Vectastain ABC solution; Vector Laboratories, Inc.) und 3,3'-Diaminobenzidin (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) visualisiert. Bei der Untersuchung des murinen Gewebes wurde ein Mouse-On-Mouse-Kit (M.O.M. Immunodetection Kit Basic; Vector Laboratories, Inc.) gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers verwendet. Das ausführliche Protokoll ist Tab. 3.7 a/b zu entnehmen.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1. Trocknen der Schnitte		30 min bei 20 °C
2. Fixieren	2 % Paraformaldehyd in PBS	5 min, dann Waschen (in TBS/Tween, 3x5 min)
3. Blockieren der endogenen Peroxidase	0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in TBS/Tween	30 min, dann Waschen
4. Pap-Stift-Markierung kleiner Felder		
<i>Die folgenden Schritte erfolgen in feuchter Kammer zur Vermeidung von Austrocknung der Schnitte</i>		
5. Blockieren unspezifischer Bindungen	10 % NGS in TBS/Tween	30 min, dann Abblotten
6. Inkubation des Primärantikörpers	- SMI-31: 1:1000 in 2 % NGS in TBS/Tween - SMI-32: 1:1000 in 2 % NGS in TBS/Tween	16 h bei 4 °C, dann Waschen
7. Inkubation des Sekundärantikörpers	Biotinierter anti-Maus-AK der Ziege: 1:300 in 2 % NGS in TBS/Tween	90 min, dann Waschen
8. Inkubation der ABC-Lösung	1:100 in TBS/Tween	90 min, dann Waschen (TBS)
9. Inkubation der DAB-Lösung	0,5 mg/ml DAB, 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O	10 min, dann Waschen (ddH <sub>2</sub> O)
10. Dehydrieren	Ethanol (50 %, 70 %, 2x 95 %, 2x 100 %), 2x 100 % Xylol	je 2 min
11. Auflegen eines Deckglases	Deckmedium: Entellan in Xylol	
12. Trocknen der Schnitte (Abzug)		24 h

**Tab. 3.7a Protokoll Immunhistochemie MS.**

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1. Trocknen der Schnitte		30 min bei 20 °C
2. Fixieren	2 % Paraformaldehyd in PBS	5 min, dann Waschen (in TBS, 2x2 min)
3. Blockieren der endogenen Peroxidase	0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in TBS/Tween	30 min, dann Waschen
4. Pap-Stift-Markierung kleiner Felder		
<i>Die folgenden Schritte erfolgen in feuchter Kammer zur Vermeidung von Austrocknung der Schnitte</i>		
5. Blockieren unspezifischer Bindungen	M.O.M. Blocking Reagent	1 h, dann Waschen
6. Inkubation des M.O.M. Diluent		5 min, dann Abblotten
7. Inkubation des Primärantikörpers	- SMI-31: 1:1000 in M.O.M. Diluent - SMI-32: 1:1000 in M.O.M. Diluent	30 min, dann Waschen
8. Inkubation des Sekundärantikörpers	M.O.M. biotinierter anti-Maus-IgG: 1:300 in 2 % NGS in TBS/Tween	90 min, dann Waschen
9. Inkubation der ABC-Lösung	1:100 in TBS	10 min, dann Waschen
10. Inkubation der DAB-Lösung	0,5 mg/ml DAB, 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O	10 min, dann Waschen (ddH <sub>2</sub> O, 3x5 min)
11. Dehydrieren	Ethanol (50 %, 70 %, 2x 95 %, 2x 100 %), 2x 100 % Xylol	je 2 min
12. Auflegen eines Deckglases	Deckmedium: Entellan in Xylol	
13. Trocknen der Schnitte (Abzug)		24 h bei 20 °C

**Tab. 3.7b Protokoll Immunhistochemie EAE.****Legende:**

ABC	Avidin-Biotin-Complex (Vectastain ABC Kit Elite)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (KPL DAB solution)
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes destilliertes Wasser
M.O.M.	Mouse-on-Mouse (M.O.M.-Kit)
NGS	Serum der Ziege (normal goat serum)
Pap-Stift	hydrophobe Substanz zur Begrenzung
PBS	Phosphatpuffer
TBS	Trispuffer
TBS/Tween	Tris-/Tweenpuffer

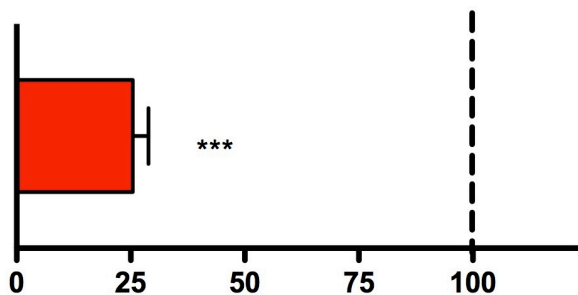
### **3.2.4 Mikroskopie und Auswertung**

Pro Patient/Kontrolle bzw. Versuchstier wurden jeweils 1-2 Schnitte mit einer der drei Methoden bzw. Antikörper (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, phosphoryliertes NF-H, unphosphoryliertes NF-H) gefärbt. Der am besten erhaltene Schnitt wurde zur Auswertung übernommen, so dass pro untersuchtes Individuum jeweils ein Schnitt mit phosphoryliertem und einer mit unphosphoryliertem NF-H ausgewertet wurde. Die Schnitte wurden am Lichtmikroskop (Axioskop; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, New York State, USA) in 200- bzw. 400-facher Vergrößerung begutachtet. War in den im Schnitt vorhandenen Perikaryen der Vorderhornneurone phosphoryliertes NF-H nachweisbar, so wurde der Schnitt diesbezüglich als positiv gewertet; war in keinem Perikaryon phosphoryliertes NF-H nachweisbar, wurde der Schnitt als negativ gewertet. Analog erfolgte die Auswertung hinsichtlich des Nachweises von unphosphoryliertem NF-H. Das Bildmaterial wurde mit einer Digitalkamera (Axiocam inkl. Software; Carl Zeiss, Inc.) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Quantitative Analyse der Neuronenzahl mittels stereologischer Messungen<sup>14</sup>

Mit Hilfe der im vorigen Kapitel beschriebenen stereologischen Methoden wurden morphometrische Analysen des Rückenmarks von je 9 MS-Patienten und in Alter und Geschlecht übereinstimmenden Kontrollen durchgeführt. Dabei wurden auf lumbaler Höhe die Neurone des Vorderhorns und auf thorakaler Höhe die Neurone des Vorder- und Zwischenhorns gezählt und vermessen (s. Kapitel 3). Vergleicht man die Gesamtanzahl der Neurone aller Fall-Kontroll-Paare, so ergibt sich bei der Gruppe der MS-Patienten verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen eine signifikante Reduktion der Gesamtneuronenzahl auf  $25 \pm 3 \%$  (s. Abb. 4.1)<sup>15</sup>.



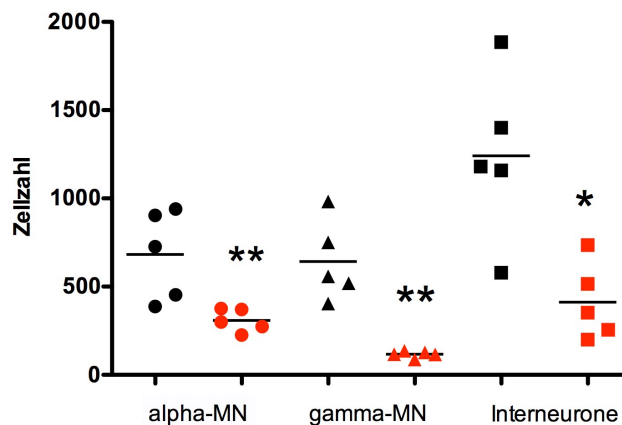
**Abb. 4.1 Gesamtzahl der Neurone bei MS-Patienten (n=9) im Verhältnis zu gesunden Kontrollen (n=9).** Die Summe aller gezählten Neurone pro MS-Patient wurde jeweils ins Verhältnis zur Summe aller gezählten Neurone der korrespondierenden Kontrolle gesetzt. Gezeigt wird hier der Mittelwert aller 9 Fall-Kontroll-Paare. \*\*\*  $p < 0,001$  (Einstichproben-t-Test:  $p < 0,0001$ ). Fehlerbalken = Standardfehler (*standard error of the mean*).

<sup>14</sup> Die in 4.1 vorgestellten Ergebnisse wurden bereits im Vorfeld in einer Fachzeitschrift publiziert, die Verfasserin der Dissertation war Mitautorin der Publikation (84). Die Abbildungen wurden dieser Publikation entnommen und ggf. leicht modifiziert.

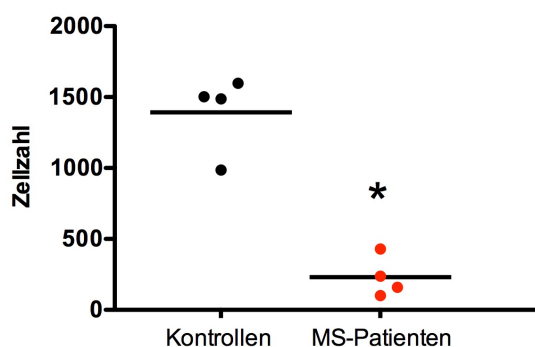
<sup>15</sup> Als Streumaß wurde i.d.R. der Standardfehler (*standard error of the mean*) verwendet, im thorakalen Bereich wurde die Standardabweichung (*standard deviation*) verwendet. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise durch Johannes Vogt durchgeführt.

Von 5 Fall-Kontroll-Paaren lagen Gewebeproben aus dem lumbalen Rückenmark vor, bei den übrigen 4 Paaren stammten die Gewebeproben aus thorakalen Rückenmarkssegmenten. Diese beiden Gruppen wurden im folgenden Schritt getrennt voneinander untersucht. Dabei wurden außerdem die Neurone anhand ihrer Größe in Subpopulationen aufgeteilt.

Im lumbalen Bereich zeigte sich bei den MS-Fällen im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine Reduktion der  $\alpha$ -Motoneurone um  $48 \pm 10 \%$ , der  $\gamma$ -Motoneurone um  $81 \pm 2 \%$  und der Interneurone um  $67 \pm 5 \%$  (s. Abb. 4.2). Im thorakalen Bereich zeigte sich eine Reduktion der Gesamtneuronenzahl um  $83 \pm 9 \%$ . Da die Summe der gezählten Neurone in thorakalen Rückenmarkssegmenten deutlich geringer ist als in lumbalen Segmenten, konnte in dieser Gruppe keine Untergliederung in Neuron-Subpopulationen erfolgen (s. Abb. 4.3).

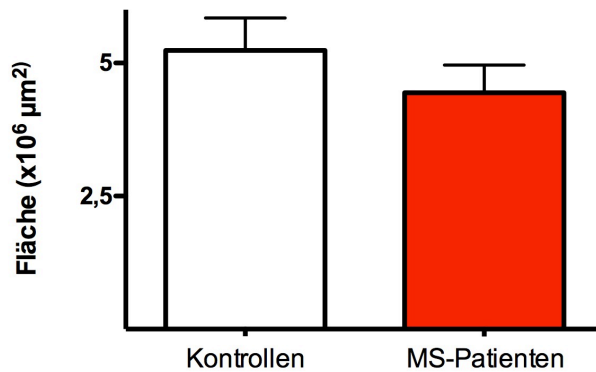


**Abb. 4.2 Vergleich der Neuronenzahl von MS-Patienten (n=5) und Kontrollen (n=5) auf lumbaler Ebene.** Gezeigt werden die absoluten Zahlen der lumbalen Neurone von MS-Patienten (rot) und Kontrollen (schwarz), unterteilt in die Subpopulationen  $\alpha$ -,  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone. Die Einteilung erfolgte anhand der Neuronengröße (s. Kap. 3). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (Mann-Whitney-U-Test:  $p(\text{alpha-MN}) = 0,0079$ ;  $p(\text{gamma-MN}) = 0,0079$ ;  $p(\text{Interneurone}) = 0,0159$ ). MN = Motoneurone.

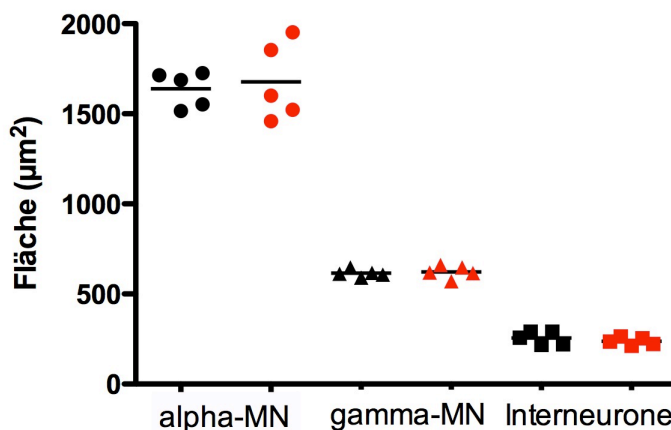


**Abb. 4.3 Vergleich der Neuronenzahl von MS-Patienten (n=4) und Kontrollen (n=4) auf thorakaler Ebene.** Gezeigt werden die absoluten Zahlen der thorakalen Neurone von MS-Patienten (rot) und Kontrollen (schwarz). \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,0286$ ).

Ein Vergleich der mittleren Oberfläche der grauen Substanz in der lumbalen Fall-Kontroll-Gruppe ergab eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion bei den MS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. (s. Abb. 4.4). Die mittlere Oberfläche der Neuron-Subtypen war in beiden Gruppen gleich groß (s. Abb. 4.5). Es darf daher angenommen werden, dass keine systematischen Fehler aufgrund einer unspezifischen Schrumpfung des gesamten Gewebes oder der Zellen aufgetreten sind.



**Abb. 4.4 Vergleich der Oberfläche der spinalen grauen Substanz bei MS-Patienten (n=5) und Kontrollen (n=5).** Gezeigt wird die stereologisch ermittelte Oberfläche der grauen Substanz im Rückenmark bei den lumbalen MS-Patienten (rot) und Kontrollen (schwarz). Es zeigt sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Differenz zu Ungunsten der MS-Gruppe (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,4206$ ). Fehlerbalken = Standardfehler (*standard error of the mean*).



**Abb. 4.5 Vergleich der neuronalen Oberfläche der Neuron-Subpopulationen bei MS-Patienten (n=5) und Kontrollen (n=5).** Gezeigt wird die stereologische ermittelte mittlere Oberfläche der Neuron-Subpopulationen bei den lumbalen MS-Patienten (rot) und Kontrollen (schwarz). Es zeigt sich keine signifikante Differenz zwischen MS-Patienten und Kontrollen, so dass ein systematischer Fehler aufgrund einer Schrumpfung des neuronalen Gewebes ausgeschlossen werden kann (Mann-Whitney-U-Test:  $p(\text{alpha-MN}) = 1,0$ ;  $p(\text{gamma-MN}) = 0,5476$ ;  $p(\text{Interneurone}) = 0,5296$ ). MN = Motoneurone.



Zusammenfassend wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Neuronenzahl bei MS-Patienten festgestellt. Diese betrifft alle Subpopulationen ( $\alpha$ -Motoneurone,  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone), wobei die Gruppe der  $\gamma$ -Motoneurone prozentual am stärksten betroffen ist.

## **4.2 Qualitative Untersuchung neuronaler Schädigung mittels Immunhistochemie<sup>16</sup>**

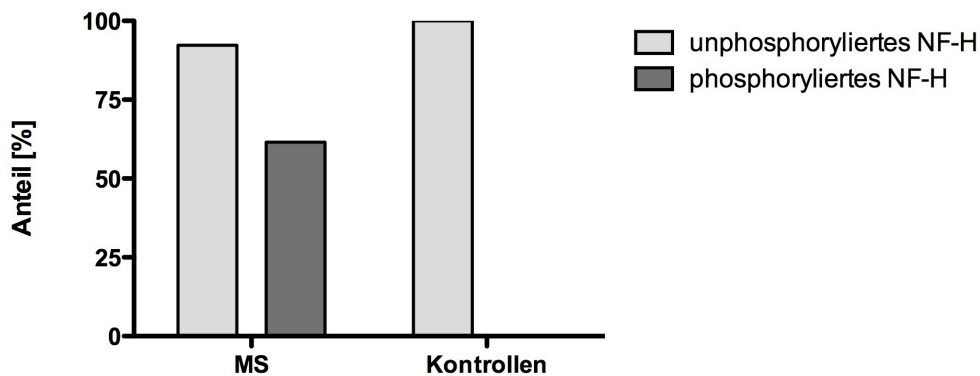
### **4.2.1 Neurofilamentphosphorylierung in spinalen Neuronen bei MS**

Die in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse belegen eine quantitative Reduktion der spinalen Neurone bei MS-Patienten, lassen aber keine Hinweise auf den Zustand der vorhandenen Neurone zu. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung der Neurofilamente als Hinweis auf Schädigung der betreffenden Neurone untersucht. Im physiologischen Zustand liegen die Neurofilamente in den Perikaryen unphosphoryliert vor. Hingegen weisen phosphorylierte Neurofilamente in Perikaryen auf neuronale Schädigung hin (86, 87).

In der Auswertung der Immunreaktion zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Gruppe der MS-Patienten und der Kontrollgruppe. Bei 61,5 % der MS-Patienten wurde phosphoryliertes (also pathologisch verändertes) NF-H in den Perikaryen nachgewiesen, während die gesunden Kontrollen durchweg keine Reaktion zeigten (Abb. 4.6).

---

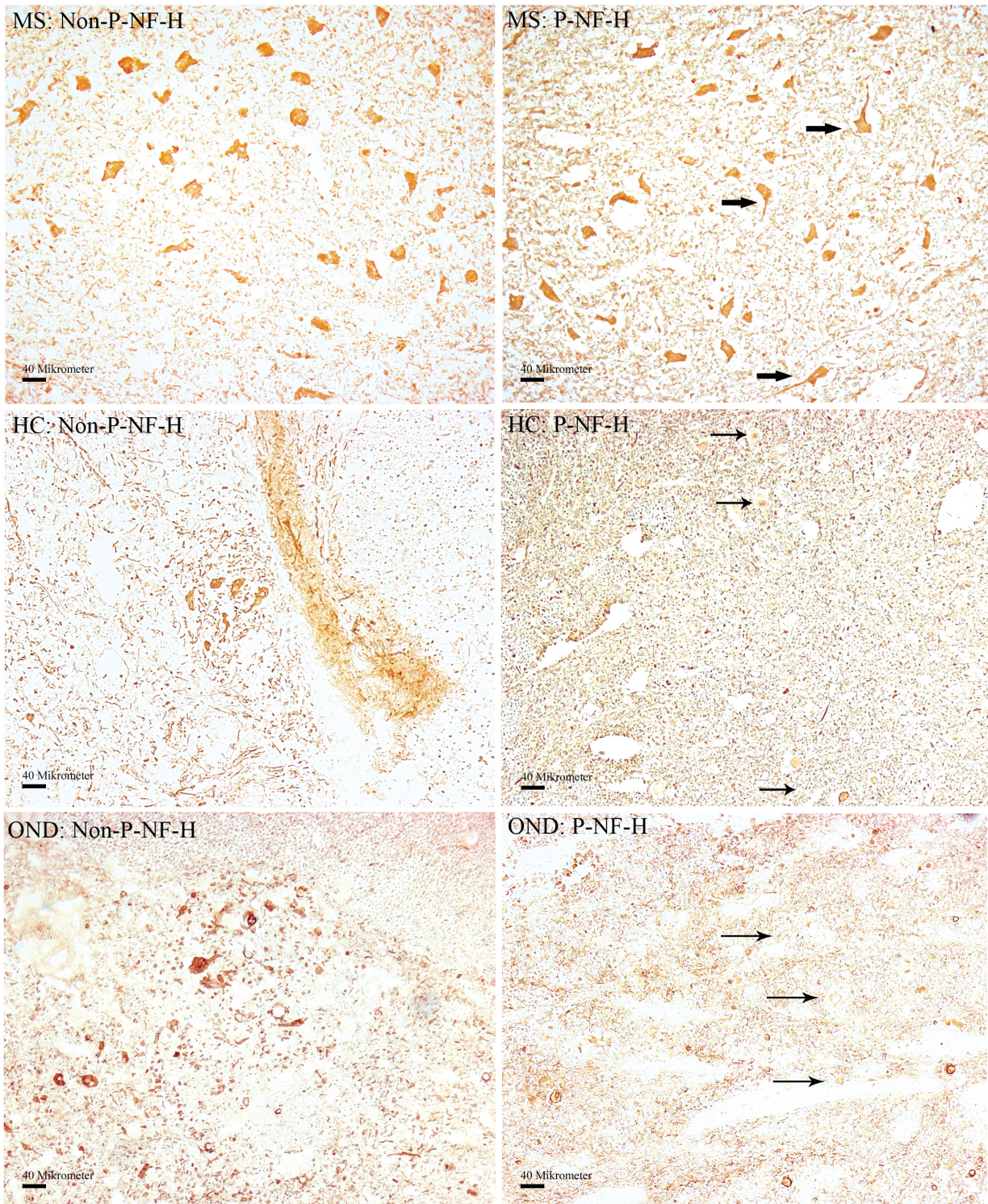
<sup>16</sup> Die in 4.2 vorgestellten Ergebnisse werden ebenfalls in einer Fachzeitschrift publiziert, die Veröffentlichung ist noch nicht abgeschlossen. Die Verfasserin der Dissertation ist Erstautorin dieser Publikation (s. Publikationsliste im Anhang). Die Abbildungen wurden z.T. dieser Publikation entnommen und ggf. leicht modifiziert.



**Abb. 4.6 Neurofilamentphosphorylierung in spinalen Vorderhornneuronen (gesamt).** Übersicht über den Anteil an MS-Patienten (n = 13) bzw. Kontrollen (n = 5), bei denen in den Perikaryen des spinalen Vorderhorns phosphoryliertes bzw. unphosphoryliertes NF-H nachweisbar ist.

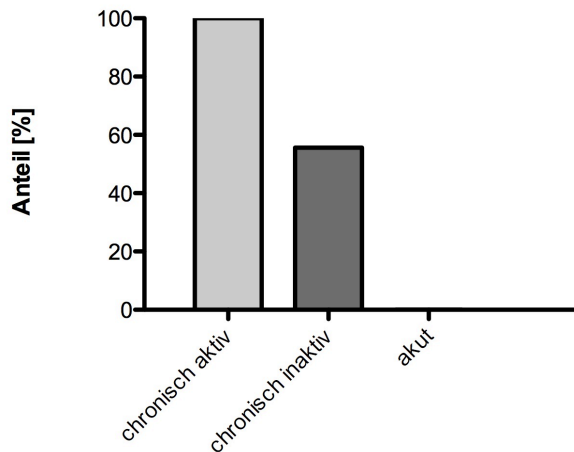
Unter den Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen ließ sich in den beiden Negativkontrollen (Olivopontocerebelläre Degeneration, Polyglucosan-Einschlusskörperchen-Erkrankung) lediglich vereinzelt phosphoryliertes NF-H in Perikaryen darstellen. In der Positivkontrolle (Amyotrophe Lateralsklerose) war das Vorderhorn leider nicht komplett im Schnitt enthalten. In den am Rand des Schnitts erhaltenen Perikaryen konnte aber phosphoryliertes NF-H nachgewiesen werden, analog zu (90).

Unphosphoryliertes (also physiologisches) NF-H in den Perikaryen wiederum ließ sich bei allen MS-Patienten nachweisen bis auf einen Fall, bei dem allerdings weder phosphoryliertes noch unphosphoryliertes NF-H exprimiert wurde. Auch bei allen Kontrollen konnte unphosphoryliertes NF-H nachgewiesen werden (s. Abb. 4.7).



**Abb. 4.7 Exemplarische Darstellung der Neurofilamentphosphorylierung in Neuronen des spinalen Vorderhorns.** Obere Reihe: MS-Fall (MS), mittlere Reihe: gesunde Kontrolle (HC), untere Reihe: Negativkontrolle mit anderer neurologischer Erkrankung (OND). Linke Spalte: Unphosphoryliertes Neurofilament H (Non-P-NF-H), rechte Spalte: Phosphoryliertes Neurofilament H (P-NF-H). Bei MS enthält die überwiegende Mehrzahl der Perikaryen der Motoneurone phosphoryliertes, also pathologisch verändertes NF-H (dicke Pfeile), bei den beiden Kontrollen weisen die Perikaryen keine Reaktion auf (dünne Pfeile). Aufnahmen in 100facher Vergrößerung.

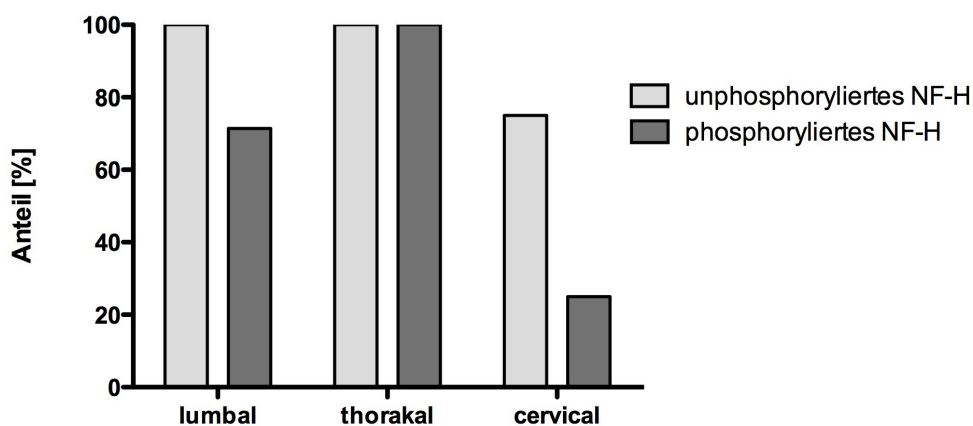
In der Untergruppe mit chronisch aktiver MS zeigte sich in sämtlichen Fällen phosphoryliertes NF-H in den Perikaryen, unabhängig von der spinalen Höhe. Bei den chronisch inaktiven Fällen zeigte sich dies nur in 55,6 %. Der einzige Fall von akuter MS wies keine Reaktivität auf (s. Abb. 4.8).



**Abb. 4.8 Phosphoryliertes NF-H bei MS in verschiedenen Aktivitätsstadien der jeweiligen MS-Läsion.**

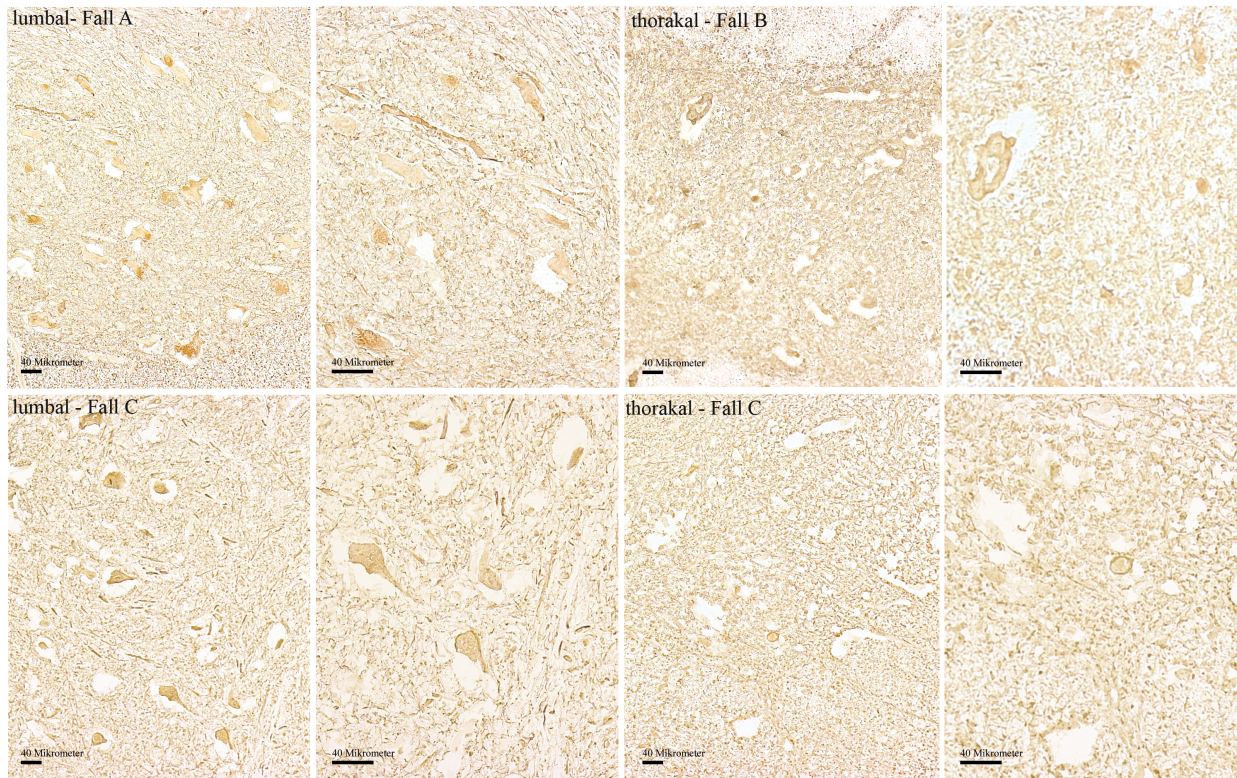
Chronisch aktiv (n = 3) mit hellgrauer Füllung, chronisch inaktiv (n = 9) mit dunkelgrauer Füllung, akut (n = 1).

Perikaryen, die phosphoryliertes NF-H exprimierten, fanden sich auf jeder spinalen Höhe. Bei einem Vergleich der spinalen Höhen zeigte sich ein Nachweis von phosphoryliertem NF-H in der Gruppe aus dem lumbalen Bereich bei 71,4 % der Patienten, in der Gruppe der thorakalen Segmente bei 100,0 % und in der zervikalen Gruppe bei 25,0 % der Patienten (s. Abb. 4.9).



**Abb. 4.9 Prozentuale Verteilung der NF-H-Phosphorylierung bei MS-Patienten im lumbalen (n = 7), thorakalen (n = 2) und zervikalen (n = 4) Rückenmark.**

Dabei war der stärkste Nachweis von phosphoryliertem NF-H in lumbalen bzw. lumbosakralen Schnitten zu finden, bei thorakalen und zervikalen Schnitten war die Reaktion schwächer ausgeprägt. Dieser Unterschied zeigte sich auch beim Vergleich von Schnitten aus verschiedenen spinalen Höhen bei demselben Patienten (s. Abb. 4.10).



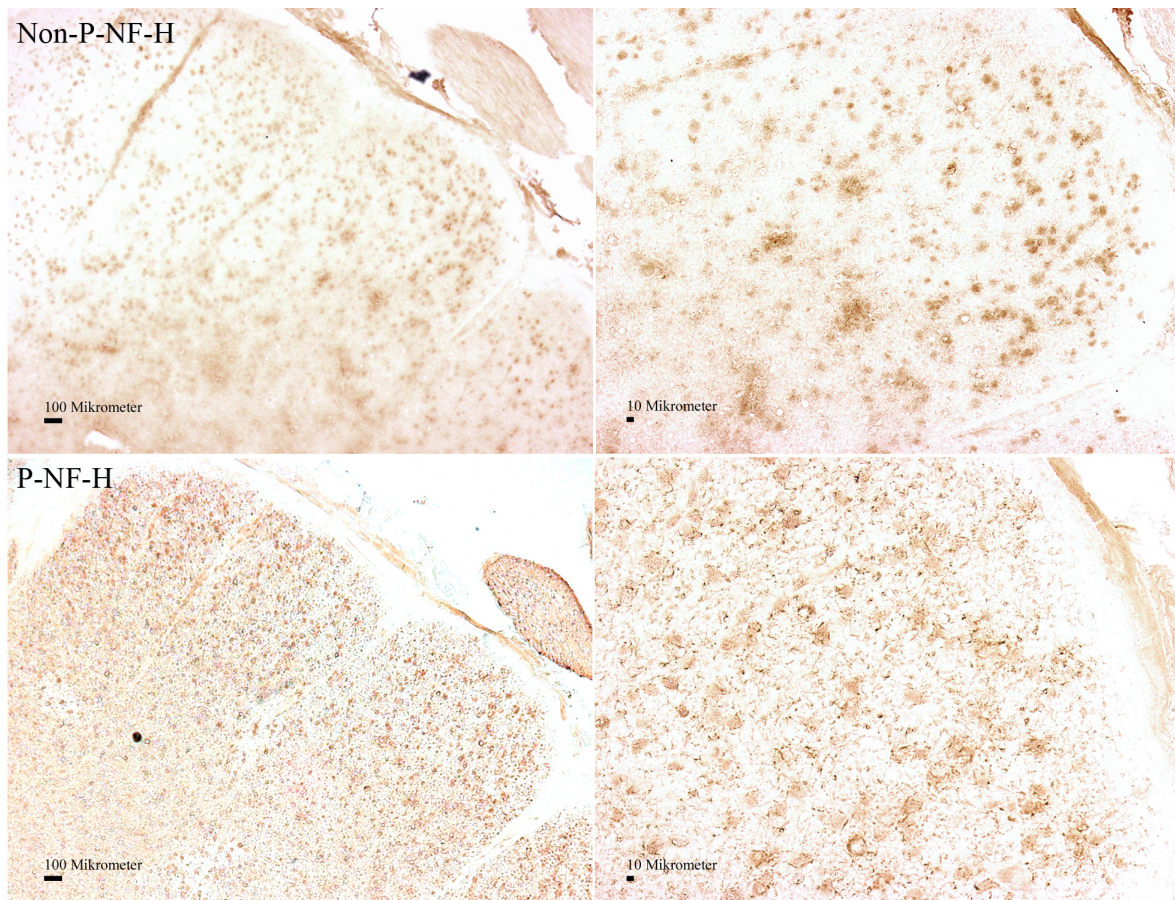
**Abb. 4.10 Phosphoryliertes NF-H in Perikaryen bei MS-Patienten im lumbalen und thorakalen Rückenmark.**

Vergleich der Intensität der Reaktion auf lumbaler (linke Hälfte) und thorakaler Ebene (rechte Hälfte), jeweils zunächst als Übersicht und daneben als vergrößerter Ausschnitt dargestellt. Obere Reihe: 2 verschiedene MS-Fälle, links Fall A, rechts Fall B. Untere Reihe: Vergleich beider Höhen innerhalb eines MS-Falls (Fall C). Die Intensität der Reaktion ist in den lumbalen Perikaryen deutlich stärker als in den thorakalen, sowohl im interindividuellen als auch im intraindividuellen Vergleich. Aufnahmen in 100- bzw. 200facher Vergrößerung.

In Axonen verhält es sich mit der Neurofilamentphosphorylierung genau umgekehrt: Physiologisch liegen die Neurofilamente dort in phosphoryliertem Zustand vor. Bei axonaler Schädigung weisen die Neurofilamente hingegen unphosphorylierte Epitope auf (86).

In dem einzigen Fall mit einer als akut klassifizierten MS-Läsion (MS1, Tab. 3.4) fielen Axone mit erweitertem Durchmesser auf, ein Hinweis auf axonale Schädigung. In einigen dieser geschwollenen Axone ließ sich unphosphoryliertes NF-H nachweisen, was ebenfalls auf eine stattfindende Schädigung hindeutet (s. Abb. 4.11). In den anderen Fällen mit

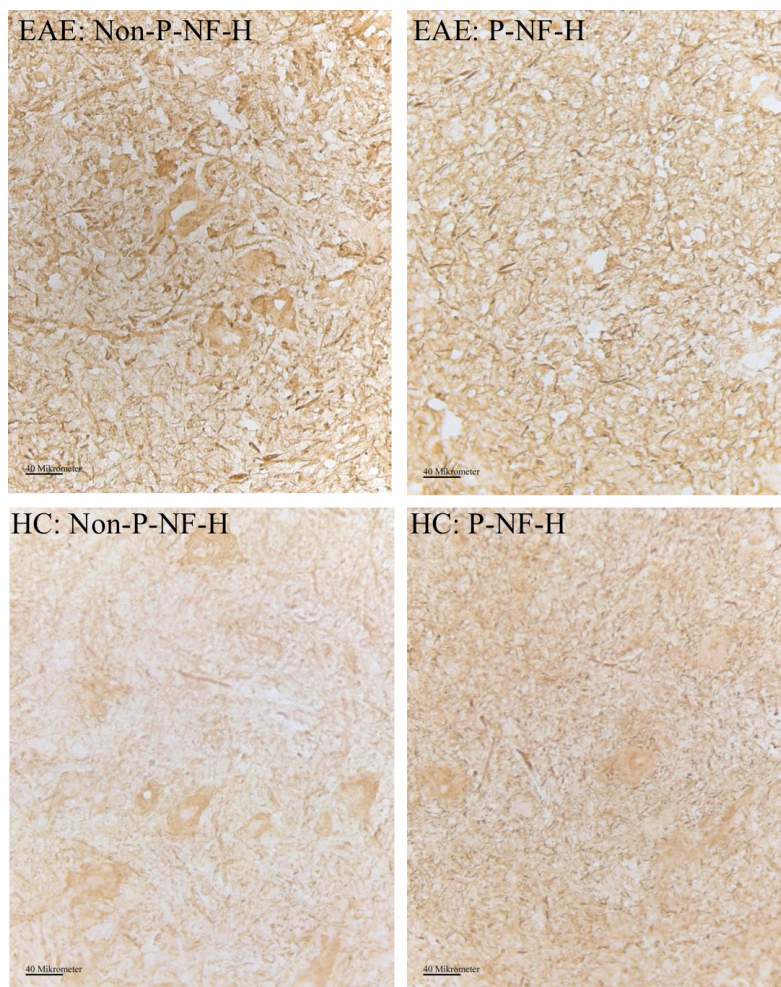
chronisch aktiven oder inaktiven Läsionen konnte keine pathologisch veränderte Phosphorylierung der axonalen Neurofilamente festgestellt werden.



**Abb. 4.11 Axone in den spinalen Hintersträngen eines MS-Patienten.** Gezeigt wird die Immunreaktivität auf unphosphoryliertes (Non-P-NF-H, oben) und phosphoryliertes (P-NF-H, unten) Neurofilament H. Die pathologische Anreicherung von unphosphoryliertem NF-H in den axonalen Querschnitten ist deutlich zu sehen. Links jeweils Übersichtsaufnahme, rechts Vergrößerung eines Ausschnitts. Aufnahmen in 25- bzw. 100facher Vergrößerung.

### 4.2.2 Neurofilamentphosphorylierung in spinalen Neuronen bei EAE

Phosphoryliertes, also pathologisches NF-H in Perikaryen ließ sich selten und insbesondere bei längerer Krankheitsdauer nachweisen. Perikaryen mit positivem Nachweis von unphosphoryliertem NF-H traten häufiger auf. Eine eindeutige Differenz zwischen EAE-Tieren und gesunden Kontrollen zeigte sich in beiden Färbungen jedoch nicht (s. Abb. 4.12). Dies änderte sich weder durch eine Veränderung der Antikörper-Konzentrationen oder der Inkubationszeiten noch durch andere Modifikationen des Protokolls. Insgesamt war die Reaktion schwächer als bei der Untersuchung des Materials von MS-Patienten.



**Abb. 4.12 NF-H-Phosphorylierung in Neuronen des spinalen Vorderhorns bei EAE.**

Obere Reihe: EAE, untere Reihe: gesunde Kontrolle (HC). Links Immunoreaktivität auf unphosphoryliertes NF-H (Non-P-NF-H), rechts auf phosphoryliertes NF-H (P-NF-H). Die Reaktion ist generell schwächer ausgeprägt, und es zeigt sich kein eindeutiger Unterschied zwischen EAE und gesunder Kontrolle. Aufnahmen in 400facher Vergrößerung.

## 5. Diskussion

Die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse zeigen im ersten Teil eine ausgeprägte Reduktion der Anzahl von Perikaryen im Vorder- und Seitenhorn des Rückenmarks bei MS-Patienten. Diese betrifft sowohl  $\alpha$ - als auch  $\gamma$ -Motoneurone sowie Interneurone.

Im zweiten Teil wurde bei MS-Patienten eine erhöhte Expression von phosphoryliertem Neurofilament H in Perikaryen des spinalen Vorderhorns nachgewiesen, die hinweisend auf pathologische Veränderungen in den entsprechenden Neuronen ist (86). Weder die gesunden Kontrollen, noch die Proben von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, bei denen spinale Motoneurone nicht betroffen sind, zeigten solche Veränderungen. Diese Veränderungen zeigten sich vor allem im chronisch aktiven Stadium und waren in den kaudalen Rückenmarksbereichen stärker ausgeprägt als in den rostralen.

Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass Multiple Sklerose zum einen mit einer ausgeprägten Schädigung, zum anderen mit einem substantiellen Verlust spinaler Neurone inklusive ihrer Zellkörper einhergeht. Im Folgenden werden die verwendeten Methoden kritisch bewertet und die daraus gewonnenen Ergebnisse im Vergleich im Licht des aktuellen Forschungsstands diskutiert.

### 5.1 Kritische Bewertung der angewandten Methoden

#### 5.1.1 Stereologie

Bei der designbasierten Stereologie handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung morphologischer Strukturen, die sich im Vergleich zu anderen Quantifizierungsmethoden durch eine größtmögliche Reduktion systematischer Fehler auszeichnet (93). Im Detail wurden diese bereits in Kapitel 3 dargestellt.

Da die post mortem-Analyse per se eine einzeitige Untersuchung ist, ist bei der Anwendung dieser Methode keine Verlaufsbeurteilung möglich. Dass die geringere Anzahl nachgewiesener spinaler Vorderhornneurone bei MS-Patienten tatsächlich auf einem Verlust dieser Zellen beruht, lässt sich also strenggenommen nicht belegen, da keine Daten



aus früheren Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs vorliegen können. Da Alter und Geschlecht der untersuchten MS-Patienten mit denen der Kontrollgruppe übereinstimmen, lässt sich ein diesbezüglicher systematischer Fehler jedoch ausschließen.

Zur Einteilung der Neurone in die Untergruppen  $\alpha$ -,  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone wurde die Neuronengröße herangezogen. Dabei ist einschränkend anzumerken, dass Größe ohne Erhebung funktionaler Parameter nur ein bedingtes Kriterium für diese Gruppenzuordnung ist. Es können sich also, insbesondere an den Rändern der Verteilungskurve, Überschneidungen zwischen den Gruppen ergeben. Die überwiegende Mehrzahl der Neurone befindet sich jedoch im angegebenen Größenspektrum (97).

Der Vergleich der mittleren neuronalen Oberfläche sowie der Querschnittsfläche der gesamten grauen Substanz diente zur zusätzlichen Validitätsprüfung der Ergebnisse. Die unveränderte mittlere neuronale Oberfläche zeigt, dass die Messwerte nicht durch eine unspezifische Schrumpfung der Zellen verfälscht wurden und somit die Einteilung der Neurone in Untergruppen anhand ihrer Größe tatsächlich anwendbar ist (84).

Die Querschnittsfläche der grauen Substanz ist ebenfalls in beiden verglichenen Gruppen weitgehend gleich groß, so dass davon auszugehen ist, dass auch hier kein systematischer Fehler zugrunde liegt (84). Die (nicht signifikante) leichte Reduktion der Querschnittsfläche der grauen Substanz ist am ehesten als Zeichen der bei MS bereits mehrfach beschriebenen spinalen Atrophie (99, 100) zu werten und angesichts des beträchtlichen Verlusts an Neuronen durchaus plausibel.

### **5.1.2 Neurofilamentphosphorylierung**

Änderungen in der Phosphorylierung der Neurofilamente sind ein zuverlässiger Marker für neuronale Schädigung sowohl in Axonen als auch in Perikaryen (86). Antikörper gegen phosphorylierte und unphosphorylierte Epitope von Neurofilament H wurden vor gut 30 Jahren von Ludwig und Nancy Sternberger beschrieben (87) und seither zum Nachweis von neuronalem Schaden nicht nur bei MS und EAE (55, 89), sondern auch bei anderen Erkrankungen, z.B. Amyotropher Lateralsklerose, angewendet (90). Bei den hier verwendeten Antikörpern, SMI-31 und SMI-32, handelt es sich um monoklonale Maus-

Antikörper. Bei der Verwendung auf Mausgewebe wurde daher ein M.O.M. Kit verwendet, ein für solche Zwecke bereits etabliertes Verfahren (89).

Die Untersuchung wurde lediglich limitiert durch die geringe Fallzahl, die auf die eingeschränkte Verfügbarkeit entsprechender Gewebeproben zurückzuführen ist.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Beteiligung des peripheren Nervensystems bei MS

Spinale Motoneurone sind, anatomisch betrachtet, sowohl dem zentralen als auch dem peripheren Nervensystem zugehörig. Ihre Perikaryen liegen im Rückenmark und sind damit noch Teil des zentralen Nervensystems (ZNS). Das (motorische) periphere Nervensystem (PNS) beginnt dieser Definition folgend an der Austrittsstelle der motorischen Nervenfasern aus dem Rückenmark und umfasst dann den Verlauf der peripheren Nerven bis hin zur motorischen Endplatte (65). Legt man jedoch funktionelle Kriterien zugrunde, so ist das sogenannte zweite Motoneuron in seiner Gesamtheit als peripher zu betrachten, in Abgrenzung zum zentralen, sogenannten ersten Motoneuron. Zum Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge ist diese Sichtweise besser geeignet. Im Folgenden wird daher die funktionelle Definition gewählt, nach der auch die Perikaryen der spinalen Motoneurone Teil des PNS sind.

Traditionell wird die Multiple Sklerose als eine ausschließlich das ZNS betreffende Erkrankung angesehen. Diverse bereits veröffentlichte Arbeiten stellen diese Annahme jedoch in Frage. Es existieren einige Fallstudien, in denen z.B. bei Patienten mit ätiologisch ungeklärten Symptomen einer peripheren motorischen Neuropathie die Diagnose MS gestellt wurde (81, 82) oder – andersherum – bei einem MS-Patienten ohne klinische Symptome einer peripheren Beteiligung die Obduktion dennoch ausgedehnte Demyelinisierung und Entzündung in den spinalen Wurzeln zeigte (76).

Manche Autoren interpretieren diese Fallberichte als Beispiele für eine sog. „kombinierte zentrale und periphere Demyelinisierung“ (*combined central and peripheral demyelination*, CCPD), die aus ihrer Sicht eine vergleichsweise seltene und von MS abzugrenzende

klinische Entität darstellt (101, 102). Ergebnisse elektrophysiologischer Studien größerer Patientenkollektive mit und ohne klinische Symptome einer peripheren Neuropathie legen jedoch nahe, dass es sich bei diesen Fallbeispielen nicht um einzelne Ausnahmen handelt. So zeigten in einer Studie von Sarova-Pinhas et al. 45,5% der 22 untersuchten MS-Patienten elektrophysiologische Zeichen einer peripheren Neuropathie, die aber nur bei 27,3% auch eine klinische Symptomatik hervorrief (80). Pogorzelski et al. untersuchten 70 MS-Patienten ohne jegliche klinische Zeichen einer peripheren Neuropathie und fanden bei 74,2% der Patienten pathologische elektrophysiologische Befunde mindestens eines peripheren Nerven, bei 42,8% waren sogar mehrere Nerven betroffen (83). In einer Studie mit 69 Patienten zeigte sich eine signifikante Reduktion des CMAP (compound muscle action potential) und eine Reduktion der MUNE (estimated number of motor units) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, wobei die periphere Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) nicht verändert war (84). Shefner et al. führten elektrophysiologische Untersuchungen an 13 MS-Patienten mit Handmuskelatrophie durch, von denen 46,2% Auffälligkeiten im Elektromyogramm (EMG) oder NLG-Veränderungen aufwiesen, die eher mit Läsionen auf Ebene der Wurzeln oder des Vorderhorns vereinbar waren als mit fokaler oder generalisierter peripherer Neuropathie (79).

Das Ausmaß der peripheren Beteiligung ist in den genannten Studien einer hohen Schwankungsbreite unterworfen. Dies liegt möglicherweise daran, dass ein Teil der Veränderungen subklinisch ist, also zu gering ist, um klinische Symptome hervorzurufen (103). Sarova-Pinhas et al. postulierten, dass eine (periphere) Neuropathie noch häufiger ist, als die elektrophysiologischen Studien zeigen. Dies sei insbesondere dann der Fall, wenn nicht oder nur dünn myelinisierte Fasern betroffen seien (80). Vor diesem Hintergrund erstaunt es nicht, dass die meisten MS-Patienten bei Routine-Untersuchungen keine Zeichen einer PNS-Beteiligung aufweisen.

### **5.2.2 Mögliche Pathomechanismen der peripheren neuronalen Schädigung**

Als mögliche Ursachen für eine Einschränkung peripher-nervöser Funktionen bei MS wurden Demyelinisierung von oligodendrozytärem Myelin in den Spinalwurzeln (79, 80) sowie von peripherem, von Schwann-Zellen gebildetem Myelin (69, 104) beschrieben. Da peripheres und zentrales Myelin ein Protein gemeinsam haben (Myelin P1 bzw. *Myelin*

*Basic Protein*, MBP), ist es gut vorstellbar, dass eine immunologische Attacke beide Myelintypen angreifen kann (105). Bereits 1934 zeigten Davison et al. an 12 MS-Fällen, dass auch eine direkte Schädigung und Verlust von Vorderhornneuronen aufgrund von Plaques in der grauen Substanz des Rückenmarks zu Muskelatrophie führen kann (67). Bei der EAE wiesen Smith et al. eine direkte lymphozytäre Schädigung der Vorderhornneurone nach (106). Auch allgemeine Faktoren wie Inaktivität (77), Ernährungsweise oder Zufuhr toxischer Substanzen (68, 107) oder mechanische Schädigung z.B. durch Kompression der Nerven (107) wurden diskutiert.

In Anbetracht der hier vorgestellten Ergebnisse erscheint neben einer direkten Schädigung der Vorderhornneurone durch angrenzende oder die graue Substanz mit einschließende Läsionen insbesondere ein Verlust synaptischen Inputs (Deafferenzierung) als wesentliche Ursache für die Beteiligung spinaler Neurone bei MS plausibel: Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neurone erhalten ihre Afferenzen aus dem ZNS. Eine Beeinträchtigung dieser afferenten Bahnen durch Demyelinisierung und/oder axonale Schädigung könnte also Ursache der Schädigung dieser Neurone sein. Ginsberg et al. beschrieben 2002 in einer Studie am Rattenmodell, dass es nach direkter axonaler Transektion zu einer anterograden transsynaptischen Degeneration kommt.<sup>17</sup> Anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen sich in den betroffenen Neuronen sowohl Zeichen transsynaptischer persistierender Atrophie mit intrazellulären Vakuolen als auch transsynaptischer neuronaler Apoptose nachweisen. Die Zahl der Neurone im untersuchten Gebiet war 30 Tage nach Transektion um 20% reduziert. Die Autoren weisen darauf hin, dass es auch nach nondisruptiven Läsionen der weißen Substanz zu einer axonalen Schädigung kommt, jedoch mit zeitlicher Verzögerung. Als mögliche Mechanismen werden glutamaterge Exzitotoxizität und Verlust der durch die Afferenzen erfolgenden trophischen Versorgung genannt (108). Auch im lumbalen Vorderhorn wurde nach Transektion des thorakalen Rückenmarks bei adulten Ratten eine Reduktion der Motoneuronzahl um 25 % gezeigt (109). Jedoch gibt es auch Studien, die eine solche Reduktion verneinen (110, 111).

---

<sup>17</sup> Bei diesem Tiermodell wurden mittels Fimbria-Fornix-Transektion die Afferenzen des Nucleus mamillaris medialis im Hypothalamus unterbrochen und dann die Folgen im entsprechenden Kerngebiet untersucht.

Gestützt wird die Hypothese der Schädigung spinaler Neurone durch Deafferenzierung bei MS durch den in der hier vorgelegten Studie nach caudal hin zunehmenden Nachweis von phosphoryliertem NF-H in den Perikaryen: Je länger die Strecke der zuführenden motorischen Bahnen, umso höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass auf der Strecke eine beeinträchtigte Leitung vorliegt. Es bleibt jedoch anzumerken, dass im humanen Rückenmark eine solche anterograde transsynaptische Degeneration der Vorderhornneurone bislang nicht nachgewiesen werden konnte, wobei hier bislang nur wenige kleine Studien an Patienten mit spinalem Querschnitt, ALS oder Zustand nach Schlaganfall publiziert wurden (112, 113).

Zur Erklärung von MS-Läsionen der grauen Substanz im ZNS wurde bereits durch Peterson et al. eine Deafferenzierung als mögliche Ursache herangezogen (32). In ihrer Arbeit weisen die Autoren darauf hin, dass zwar in ihrer Arbeit die Zahl nachgewiesener apoptotischer Neurone gering ist, dass jedoch der langfristige Effekt als deutlich höher einzuschätzen ist, da apoptotische Neurone innerhalb von 24h abgeräumt werden. Dieser langfristige Effekt spiegelt sich in der vergleichsweise ausgeprägten Reduktion der Neuronenzahl in der hier dargestellten Untersuchung wider. Möglich ist auch, dass aus diesem Grund manche der untersuchten MS-Proben keine Neurofilament-Veränderungen in den Perikaryen aufweisen, da zum Zeitpunkt der Entnahme des Rückenmarks die entsprechend geschädigten Neurone schon abgebaut waren.

### **5.2.3 Diskussion der Ergebnisse bei EAE**

Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis zeigten sich in zwei Publikationen von Bannerman et al. (89, 114) vergleichsweise geringe Veränderungen in spinalen Motoneuronen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde in der ersten Studie bei den EAE-Tieren eine Größenreduktion der Perikaryen sowie eine abnorme Neurofilamentphosphorylierung entdeckt. Eine Reduktion der Neuronenzahl wurde – abweichend von einer Studie von Smith et al. (106) – nicht festgestellt (114). In der zweiten Studie zeigte sich bei den EAE-Tieren vereinzelt hyperphosphoryliertes NF-H in den Perikaryen und einige der Zellkörper wiesen strukturellen Veränderungen auf (89). Insgesamt waren die von Bannerman et al. beschriebenen Veränderungen der Zellkörper

eher dezent, unterschieden sich aber dennoch von der Kontrollgruppe. Jedoch kam es im Verlauf (98 Tage p.i.) zu einer Normalisierung dieser Veränderungen (114).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Untersuchung der Neurofilamentphosphorylierung spinaler Neurone bei EAE ergab interessanterweise keine eindeutigen Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Tieren. Da die Ausprägung der Reaktion insgesamt geringer war als bei den MS-Untersuchungen, liegt dem möglicherweise eine schlechtere Wirkung der Maus-Antikörper auf murinem Gewebe (trotz Verwendung des Mouse-on-Mouse-Kits) zugrunde. Daneben sind auch andere Einflussfaktoren wie Alter der Tiere bzw. EAE-Erkrankungsstadium denkbar. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Erforschung der MS und nicht des Tiermodells EAE lag, wurden zur Klärung dieser Ursachen jedoch keine weitergehenden Untersuchungen durchgeführt.

#### **5.2.4 Weitere Untersuchungen spinaler neuronaler Schädigung bei MS**

In einem ähnlichen Zeitraum wie die hier vorgestellten Untersuchungen wurden weitere Studien zu spinaler neuronaler Schädigung bei MS durchgeführt und veröffentlicht, die im Folgenden detaillierter vorgestellt werden sollen.

Gilmore et al. untersuchten das Rückenmark von 37 MS-Patienten und 22 Kontrollen hinsichtlich Neuronenzahl im Vorderhorn und Demyelinisierung (115). Hierbei wurden an Nissl-gefärbten Schnitten Absolutzahlen erhoben und mit der Abercrombie-Methode korrigiert. Die Autoren fanden eine Reduktion der Neuronenzahlen um ca. 24% im oberen zervikalen und um ca. 30% im oberen thorakalen Bereich, nicht aber im lumbalen Bereich. Im Unterschied zu der hier vorgestellten Untersuchung wurden aber keine Fall-Kontroll-Paare gebildet, die auf identischer Höhe direkt miteinander verglichen wurden, sondern es wurde die gesamte Gruppe der MS-Patienten mit der gesamten Gruppen der Kontrollen verglichen. Die Autoren selbst weisen darauf hin, dass aufgrund der im lumbalen Rückenmark vorhandenen hohen Variabilität der Neuronenzahlen auf den verschiedenen Rückenmarksniveaus sowie zwischen verschiedenen Individuen eine gewisse Reduktion der Neuronenzahl mit ihrer Methode unentdeckt bleiben könnte.

Darüber hinaus beobachteten die Autoren die Reduktion der Neuronenzahl in erster Linie in demyelinisierten Schnitten und schlossen daraus, dass die Schädigung hier nicht durch transneuronalen Degeneration zustande kommt (115).

Schirmer et al. untersuchten zwischenzeitlich ebenfalls Schädigung und Verlust spinaler Neurone und zogen dabei u.a. auch Phosphorylierungsveränderungen der Neurofilamente zur Beurteilung heran (116, 117). In ihrer ersten Arbeit (116) beschreiben die Autoren eine signifikant reduzierte Anzahl der zervikalen (um 36 %) und lumbalen (um 23 %) Vorderhornneurone bei MS-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen. Im thorakalen Bereich waren die Vorderhornneurone ebenfalls vermindert (um 15%), jedoch nicht signifikant. Das Ausmaß des neuronalen Verlusts war unabhängig davon, ob das Vorderhorn bzw. der Bereich der ventralen Wurzel von einer MS-Läsion betroffen war oder nicht, was darauf schließen lässt, dass es andere Ursachen für den Zelluntergang geben muss. Geschädigte Neurone mit Zeichen retrograder Degeneration zeigten sich v.a. in der Nähe von aktiven MS-Läsionen. In deren Perikaryen ließ sich teilweise phosphoryliertes Neurofilament-H nachweisen, jedoch wurde dieser Aspekt in der betreffenden Studie nicht weiter beleuchtet.

In der zweiten Studie von Schirmer et al. (117) wird in den Perikaryen spinaler Vorderhornneurone vor allem in Schnitten mit älteren inaktiven Läsionen ein Verlust von Immunreaktivität auf unphosphoryliertes NF-H beschrieben. In diesen Somata stellten die Autoren allerdings abweichend von den hier vorgestellten Ergebnissen keine Akkumulation von phosphoryliertem NF-H fest. Die weitere Arbeit konzentriert sich auf axonale Veränderungen, namentlich Reduktion der axonalen Immunreaktivität auf phosphoryliertes NF-H, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

In der Zusammenschau bleibt festzuhalten, dass bei MS ein signifikanter Untergang der Neurone im spinalen Vorderhorn auf verschiedenen Höhen nachweisbar ist. Über die Ursachen dafür gibt es verschiedene Hypothesen, die von direkter Schädigung im Rahmen einer Demyelinisierung der grauen Substanz zu sekundärer Schädigung durch axonale Transektion (retrograde Degeneration) oder Deafferenzierung (anterograde transneuronalen Degeneration) reichen. Eine eindeutige Antwort kann hierzu gegenwärtig noch nicht gegeben werden. Möglicherweise spielt auch eine Kombination der genannten Mechanismen eine Rolle.

### 5.2.5 Klinische Bedeutung spinaler neuronaler Schädigung bei MS

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, ist die neuronale Schädigung als Ursache der chronischen irreversiblen Behinderung bei MS anzusehen (36). Läsionslast sowie Atrophie der kortikalen grauen Substanz korrelieren mit dem Ausmaß an körperlicher Behinderung und kognitiver Dysfunktion (62). Ausgehend von dieser Erkenntnis und den zuvor ausführlich dargestellten histopathologischen Studien zur spinalen neuronalen Beteiligung bei MS (84, 115-117) wurden kürzlich auch zwei MRT-Studien *in vivo* durchgeführt, die die klinische Relevanz spinaler Veränderungen bei MS untersuchten (63, 64). Schlaeger et al. konnten an 113 MS-Patienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe zeigen, dass eine Atrophie der spinalen grauen Substanz (auf Höhe von C2/C3) sogar ein stärkerer Prädiktor für klinische Behinderung ist als z.B. Atrophie der grauen Substanz des Gehirns (NGMV, *normalized gray matter volume*). Diese Atrophie wird von den Autoren zum Teil auf einen Neuronenverlust zurückgeführt (63). In der hier vorgestellten stereologischen Untersuchung war die Fläche der spinalen grauen Substanz bei den MS-Fällen etwas kleiner als bei den gesunden Kontrollen, wobei die Differenz nicht signifikant war (s. Abb. 4.4). Schlaeger et al. weisen in ihrer Studie darauf hin, dass zwischen der *in vivo* gemessenen Atrophie und der Atrophie in *post mortem*-Studien wie der vorliegenden Untersuchung ein Unterschied besteht, so dass sie in letzteren i.d.R. unterschätzt wird. Es ist also davon auszugehen, dass die tatsächliche Atrophie passend zum ausgeprägten Neuronenverlust in der vorliegenden Untersuchung von größerem Ausmaß ist. Auch Lukas et al. stellten in ihrer klinischen Studie an 440 MS-Patienten fest, dass MRT-Veränderungen der spinalen Substanz wie z.B. die Reduktion der *UCCA* (*upper cervical cord cross-sectional area*) mit dem Grad an klinischer Behinderung korrelieren (64).

## 5.3 Fazit

Die hier vorgestellten Forschungsergebnisse belegen klar, dass eine Beteiligung der spinalen Vorderhornneurone als Teil der pathologischen Veränderungen bei MS zu sehen ist. Hierbei kommt es zu strukturellen Veränderungen der Perikaryen, v.a. in aktiven Stadien der Erkrankung. Darüber hinaus findet ein signifikanter Verlust der Neurone statt. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen konnten bislang nicht aufgeklärt werden. Die vorliegenden Untersuchungen lassen vermuten, dass neben einer Schädigung der Neurone



durch assoziierte MS-Läsionen eine transsynaptische Degeneration (Deafferenzierung) der betreffenden Neurone eine Rolle spielt.

Für zukünftige Untersuchungen wäre interessant zu sehen, ob sich dies auch in pathologischen Veränderungen der entsprechenden Axone im peripheren Nervensystem niederschlägt und ob sich ähnliche Veränderungen bei anderen Neurontypen des Rückenmarks, z.B. bei sensiblen Neuronen im Spinalganglion, ebenfalls zeigen. Hinweise auf eine solche Beteiligung bietet z.B. eine Studie von Shefner et al. zu pathologischen Veränderungen im sensiblen peripheren Nervensystem (118), jedoch ist dieses Feld noch nicht gut untersucht. Möglicherweise zeigen die von Lucchinetti et al. anhand von pathologischen Kriterien klassifizierten Subtypen (34) auch Unterschiede in der Neurofilament-Phosphorylierung. Um diese Frage zu untersuchen, wäre allerdings eine größere Fallzahl erforderlich.

Aufgrund der zunehmend erkannten klinischen Bedeutung der Schädigung grauer Substanz in Gehirn und Rückenmark für das Ausmaß an Behinderung stellt sich die Frage nach einem adäquaten Monitoring des neuronalen Schadens *in vivo*. Bei einer kombinierten Studie aus MRT und Mikroskopie zeigte sich, dass mit einer *double inversion recovery* (DIR)-Sequenz zwar mehr Läsionen in der grauen Substanz entdeckt werden konnten als mit einer FLAIR (*fluid-attenuated inversion recovery*)-Sequenz. Dennoch wurden mehr als 80% der post mortem mikroskopisch nachgewiesenen Läsionen auch in der DIR-Sequenz nicht erfasst (119). Auch Lukas et al. weisen darauf hin, dass hinsichtlich der Detektion spinaler Läsionen eine Diskrepanz zwischen den Möglichkeiten histopathologischer Studien und denen der konventionellen MRT-Bildgebung besteht (64).

Neben der Entwicklung neuer MRT-Sequenzen zur verbesserten Beurteilung der Läsionslast in der grauen Substanz wird – bislang lediglich im Rahmen klinischer Studien – die Ultrahochfeld-MRT mit einer Feldstärke von 7 Tesla eingesetzt, mit der eine sowohl qualitativ als auch quantitativ verbesserte Erkennung corticaler Läsionen erreicht wird (120-122). Bei der Detektion spinaler Läsionen liefert diese Methode jedoch aufgrund technischer Hindernisse wie z.B. Feldinhomogenitäten bislang keine überzeugenden Resultate.

---

Ein alternativer Lösungsversuch besteht in der Forschung nach validen Biomarkern. Hier haben z.B. Teunissen et al. Neurofilamente im Liquor als Marker für Neurodegeneration untersucht und NF-L als Marker für akuten axonalen Schaden sowie NF-H als Marker für chronisch irreversible Behinderung vorgeschlagen (123). Die Ergebnisse bedürfen jedoch noch weiterer Optimierung und Standardisierung.

Von großer klinischer Relevanz ist darüber hinaus die Frage nach Möglichkeiten zur neuroprotektiven Therapie. Bei der EAE haben laut einer Studie von Smith et al. AMPA-Rezeptor-Antagonisten einen positiven Effekt auf den Erhalt neuronaler Funktionen gezeigt (106). Ähnlich wirksame neuroprotektive Wirkstoffe zu entwickeln, ist eine große Herausforderung für zukünftige Untersuchungen. Insbesondere, da die irreversible Behinderung bei MS v.a. auf neuroaxonaler Schädigung beruht, steckt darin großes Potential.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;68(22 Suppl 3):S22-31; discussion S43-54. Epub 2007/07/20.
2. Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, et al. Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Deutsches Arzteblatt international*. 2008;105(7):113-9. Epub 2008/02/01.
3. Gold R, Hanschke S, Hemmer B, Wiendl H. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS2012, aktualisiert 2014, verlängert 2015.
4. Hein T, Hopfenmuller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Der Nervenarzt*. 2000;71(4):288-94. Epub 2000/05/05. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland.
5. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Gopffarth D. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Der Nervenarzt*. 2014;85(8):990-8. Epub 2014/07/16. Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland : Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung.
6. Huppke B, Ellenberger D, Rosewich H, Friede T, Gartner J, Huppke P. Clinical presentation of pediatric multiple sclerosis before puberty. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2014;21(3):441-6. Epub 2013/12/18.
7. Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Comi G. Late onset multiple sclerosis: clinical characteristics, prognostic factors and differential diagnosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2004;25 Suppl 4:S350-5. Epub 2005/02/25.
8. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience*. 2008;31:247-69. Epub 2008/06/19.
9. Flachenecker P, Zettl UK. Epidemiologie. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 4-11.
10. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical microbiology reviews*. 1993;6(4):382-427. Epub 1993/10/01.
11. Flachenecker P, Zettl UK. Krankheitsverlauf und Prognose. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 50-60.

12. Ragonese P, Aridon P, Salemi G, D'Amelio M, Savettieri G. Mortality in multiple sclerosis: a review. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2008;15(2):123-7. Epub 2008/01/26.
13. Bronnum-Hansen H, Stenager E, Hansen T, Koch-Henriksen H. Survival and mortality rates among Danes with MS. *International MS journal / MS Forum*. 2006;13(2):66-71. Epub 2006/04/26.
14. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12877-82. Epub 2003/10/22.
15. Hardt C, Stephan C, Stille W. Genetik und Umweltfaktoren. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 12-25.
16. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(Pt 7):1869-88. Epub 2010/06/30.
17. Schmidt RM. Geschichte der Multiplen Sklerose. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 1-3.
18. Martin R, McFarland HF. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 1995;32(2):121-82. Epub 1995/01/01.
19. Brück W. Pathologie und Pathophysiologie. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 26-34.
20. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 ( Pt 6):1174-83. Epub 2000/05/29.
21. Cepok S. Charakterisierung der humoralen Immunantwort bei der Multiplen Sklerose [Dissertation]. Marburg: Philipps-Universität; 2004.
22. Hoffmann F, Schmidt RM. Klinik. In: Schmidt RM, Hoffmann F, editors. *Multiple Sklerose*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2002. p. 44-9.
23. Hoffmann S, Tittgemeyer M, von Cramon DY. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*. 2007;20(3):275-80. Epub 2007/05/15.
24. Bellmann-Strobl J, Wuerfel J, Aktas O, Dorr J, Wernecke KD, Zipp F, et al. Poor PASAT performance correlates with MRI contrast enhancement in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;73(20):1624-7. Epub 2009/11/18.

25. Urbanek C, Weinges-Evers N, Bellmann-Strobl J, Bock M, Dorr J, Hahn E, et al. Attention Network Test reveals alerting network dysfunction in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(1):93-9. Epub 2009/12/10.
26. Veauthier C, Paul F. Sleep disorders in multiple sclerosis and their relationship to fatigue. *Sleep medicine.* 2014;15(1):5-14. Epub 2013/12/24.
27. Bakshi R. Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management. *Mult Scler.* 2003;9(3):219-27. Epub 2003/06/20.
28. Weinges-Evers N, Brandt AU, Bock M, Pfueller CF, Dorr J, Bellmann-Strobl J, et al. Correlation of self-assessed fatigue and alertness in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(9):1134-40. Epub 2010/07/09.
29. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33(11):1444-52. Epub 1983/11/01.
30. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Annals of neurology.* 1999;46(6):878-86. Epub 1999/12/10.
31. Filippini G, Munari L, Incorvaia B, Ebers GC, Polman C, D'Amico R, et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet.* 2003;361(9357):545-52. Epub 2003/02/25.
32. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology.* 2001;50(3):389-400. Epub 2001/09/18.
33. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996;6(3):259-74. Epub 1996/07/01.
34. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology.* 2000;47(6):707-17. Epub 2000/06/14.
35. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology.* 2005;128(Pt 11):2705-12. Epub 2005/10/19.
36. Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of neurology.* 2000;48(6):893-901. Epub 2000/12/16.

37. Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Current opinion in neurology*. 2008;21(3):242-7. Epub 2008/05/03.
38. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(11):904-12. Epub 2007/10/06.
39. Stuart G, S. KK. The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 1928;22(1):327-77.
40. Rivers TM, Sprunt DH, P. BG. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *The Journal of experimental medicine*. 1933;58(1):39-53.
41. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *The Journal of experimental medicine*. 1947;85(1):117-30.
42. Freund J, Casals J, P. HE. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1937;37(1):509-13.
43. Steinman L. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron*. 1999;24(3):511-4. Epub 1999/12/14.
44. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 8):1953-71. Epub 2006/04/25.
45. Kornek B, Lassmann H. Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol*. 1999;9(4):651-6. Epub 1999/10/12.
46. Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des Hôpitaux*. 1868;41:554-5, 7-8, 66.
47. Frommann C. Untersuchungen über die Gewebsveränderungen bei der multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks. Jena: G. Fischer; 1878.
48. Charcot JM. Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière. Paris: Adrien Delahaye et E. Lecrosnier 1880.
49. Marburg O. Die sogenannte "akute multiple Sklerose" (Encephalomyelitis peraxialis scleroticans). *Jahrb Neurol Psych*. 1906;27:211-312.
50. Putnam TJ. Studies in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol Psych*. 1936;35:1289-308.
51. Greenfield JG, King LS. Observations on the Histopathology of the Cerebral Lesions in Disseminated Sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1936;59:445-58.

52. Erben S. Zur Histologie und Pathologie der inselförmigen Sklerose. *Neurol Centralbl.* 1898;14:626-35.
53. Raine CS, Cross AH. Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1989;60(5):714-25. Epub 1989/05/01.
54. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology.* 1997;120 ( Pt 3):393-9. Epub 1997/03/01.
55. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine.* 1998;338(5):278-85. Epub 1998/01/29.
56. Ganter P, Prince C, Esiri MM. Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathology and applied neurobiology.* 1999;25(6):459-67. Epub 2000/01/13.
57. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain : a journal of neurology.* 2000;123 ( Pt 2):308-17. Epub 2000/01/29.
58. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain : a journal of neurology.* 1998;121 ( Pt 8):1469-77. Epub 1998/08/26.
59. Losseff NA, Wang L, Lai HM, Yoo DS, Gawne-Cain ML, McDonald WI, et al. Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study. *Brain : a journal of neurology.* 1996;119 ( Pt 6):2009-19. Epub 1996/12/01.
60. Losseff NA, Webb SL, O'Riordan JI, Page R, Wang L, Barker GJ, et al. Spinal cord atrophy and disability in multiple sclerosis. A new reproducible and sensitive MRI method with potential to monitor disease progression. *Brain : a journal of neurology.* 1996;119 ( Pt 3):701-8. Epub 1996/06/01.
61. Oberwahrenbrock T, Ringelstein M, Jentschke S, Deuschle K, Klumbies K, Bellmann-Strobl J, et al. Retinal ganglion cell and inner plexiform layer thinning in clinically isolated syndrome. *Mult Scler.* 2013;19(14):1887-95. Epub 2013/05/25.
62. Geurts JJ, Calabrese M, Fisher E, Rudick RA. Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet neurology.* 2012;11(12):1082-92. Epub 2012/11/17.

63. Schlaeger R, Papinutto N, Panara V, Bevan C, Lobach IV, Bucci M, et al. Spinal cord gray matter atrophy correlates with multiple sclerosis disability. *Annals of neurology*. 2014;76(4):568-80. Epub 2014/08/05.
64. Lukas C, Sombekke MH, Bellenberg B, Hahn HK, Popescu V, Bendfeldt K, et al. Relevance of spinal cord abnormalities to clinical disability in multiple sclerosis: MR imaging findings in a large cohort of patients. *Radiology*. 2013;269(2):542-52. Epub 2013/06/06.
65. Trepel M. *Neuroanatomie*. 3 ed. München: Urban & Fischer; 2004.
66. Bashir K, Whitaker JN. *Handbook of Multiple Sclerosis*. 1 ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
67. Davison C, Goodhart SP, Lander J. Multiple sclerosis and amyotrophies. *Arch Neurol Psych*. 1934;31(2):270-89.
68. Hasson J, Terry RD, Zimmerman HM. Peripheral neuropathy in multiple sclerosis. *Neurology*. 1958;8(7):503-10. Epub 1958/07/01.
69. Pollock M, Calder C, Allpress S. Peripheral nerve abnormality in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1977;2(1):41-8. Epub 1977/07/01.
70. Ro YI, Alexander CB, Oh SJ. Multiple sclerosis and hypertrophic demyelinating peripheral neuropathy. *Muscle & nerve*. 1983;6(4):312-6. Epub 1983/05/01.
71. Thomas PK, Walker RW, Rudge P, Morgan-Hughes JA, King RH, Jacobs JM, et al. Chronic demyelinating peripheral neuropathy associated with multifocal central nervous system demyelination. *Brain : a journal of neurology*. 1987;110 ( Pt 1):53-76. Epub 1987/02/01.
72. Rosenberg NL, Bourdette D. Hypertrophic neuropathy and multiple sclerosis. *Neurology*. 1983;33(10):1361-4. Epub 1983/10/01.
73. Schoene WC, Carpenter S, Behan PO, Geschwind N. 'Onion bulb' formations in the central and peripheral nervous system in association with multiple sclerosis and hypertrophic polyneuropathy. *Brain : a journal of neurology*. 1977;100(4):755-73. Epub 1977/12/01.
74. Rubin M, Karpati G, Carpenter S. Combined central and peripheral myelinopathy. *Neurology*. 1987;37(8):1287-90. Epub 1987/08/01.
75. Weir AI, Hansen S, Ballantyne JP. Motor unit potential abnormalities in multiple sclerosis: further evidence for a peripheral nervous system defect. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1980;43(11):999-1004. Epub 1980/11/01.



76. Lassmann H, Budka H, Schnaberth G. Inflammatory demyelinating polyradiculitis in a patient with multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 1981;38(2):99-102. Epub 1981/02/01.
77. Fisher M, Long RR, Drachman DA. Hand muscle atrophy in multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 1983;40(13):811-5. Epub 1983/12/01.
78. Mathers SE, Ingram DA, Swash M. Electrophysiology of motor pathways for sphincter control in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1990;53(11):955-60. Epub 1990/11/01.
79. Shefner JM, Mackin GA, Dawson DM. Lower motor neuron dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Muscle & nerve*. 1992;15(11):1265-70. Epub 1992/11/01.
80. Sarova-Pinhas I, Achiron A, Gilad R, Lampl Y. Peripheral neuropathy in multiple sclerosis: a clinical and electrophysiologic study. *Acta neurologica Scandinavica*. 1995;91(4):234-8. Epub 1995/04/01.
81. Gilchrist RV, Bhagia SM, Lenrow DA, Chou LH, Chow D, Slipman CW. Painless foot drop: an atypical etiology of a common presentation. *Pain physician*. 2002;5(4):419-21. Epub 2006/08/04.
82. Siao Tick Chong P, Vucic S, Cros DP. Multiple sclerosis presenting as lower motor neuron wasting and weakness of the distal upper extremity. *Neurology*. 2003;61(9):1303-4. Epub 2003/11/12.
83. Pogorzelski R, Baniukiewicz E, Drozdowski W. [Subclinical lesions of peripheral nervous system in multiple sclerosis patients]. *Neurologia i neurochirurgia polska*. 2004;38(4):257-64. Epub 2004/09/24. Subkliniczne uszkodzenie obwodowego układu nerwowego u chorych na stwardnienie rozsiane.
84. Vogt J, Paul F, Aktas O, Muller-Wielsch K, Dorr J, Dorr S, et al. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology*. 2009;66(3):310-22. Epub 2009/10/03.
85. Schlaepfer WW. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1987;46(2):117-29. Epub 1987/03/01.
86. Gotow T. Neurofilaments in health and disease. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. 2000;33(4):173-99. Epub 2002/01/26.
87. Sternberger LA, Sternberger NH. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America. 1983;80(19):6126-30. Epub 1983/10/01.
88. Giasson BI, Mushynski WE. Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(48):30404-9. Epub 1996/11/29.
89. Bannerman PG, Hahn A. Enhanced visualization of axonopathy in EAE using thyl-YFP transgenic mice. *Journal of the neurological sciences*. 2007;260(1-2):23-32. Epub 2007/05/12.
90. Mendonca DM, Chimelli L, Martinez AM. Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2005;38(6):925-33. Epub 2005/06/04.
91. Haines DE. *Neuroanatomy. An Atlas of Structures, Sections, and Systems*. 5 ed. Philadelphia, Pennsylvania.2000.
92. Schoenen J, Faull RLM. Spinal Cord: Cytoarchitectural, Dendroarchitectural, and Myeloarchitectural Organization. In: Paxinos G, editor. *The Human Nervous System*. 1 ed. Waltham, Massachusetts: Academic Press, Inc.; 1990. p. 19-53.
93. Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 2005;130(4):813-31. Epub 2005/01/18.
94. Geuna S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system. *The Journal of comparative neurology*. 2000;427(3):333-9. Epub 2000/10/31.
95. West MJ. Design-based stereological methods for counting neurons. *Progress in brain research*. 2002;135:43-51. Epub 2002/07/30.
96. Tysiak E. *Kinetics of T cell invasion in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Berlin: Charité Universitätsmedizin Berlin; 2007.
97. Kawamura Y, O'Brien P, Okazaki H, Dyck PJ. Lumbar motoneurons of man II: the number and diameter distribution of large- and intermediate-diameter cytons in "motoneuron columns" of spinal cord of man. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1977;36(5):861-70. Epub 1977/09/01.
98. Omari KM, Lutz SE, Santambrogio L, Lira SA, Raine CS. Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1. *The American journal of pathology*. 2009;174(1):164-76. Epub 2008/12/20.

- 
99. Lin X, Tench CR, Evangelou N, Jaspan T, Constantinescu CS. Measurement of spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2004;14(3 Suppl):20S-6S. Epub 2004/07/02.
100. Bakshi R, Dandamudi VS, Neema M, De C, Bermel RA. Measurement of brain and spinal cord atrophy by magnetic resonance imaging as a tool to monitor multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2005;15(4 Suppl):30S-45S. Epub 2005/12/31.
101. Kamm C, Zettl UK. Autoimmune disorders affecting both the central and peripheral nervous system. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(3):196-202. Epub 2011/05/31.
102. Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, et al. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology*. 2013;81(8):714-22. Epub 2013/07/26.
103. Antonini G, Millefiorini E, Borsellino G, Morino S, Rasura M, Pozzilli C. Subclinical peripheral nervous system involvement in multiple sclerosis. *Muscle & nerve*. 1995;18(10):1216-7. Epub 1995/10/01.
104. Hopf HC, Eysholdt M. Impaired refractory periods of peripheral sensory nerves in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1978;4(6):499-501. Epub 1978/12/01.
105. Falcone M, Scalise A, Minisci C, Romito D, Cancelli I, Gigli GL. Spreading of autoimmunity from central to peripheral myelin: two cases of clinical association between multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2006;27(1):58-62. Epub 2006/05/12.
106. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nature medicine*. 2000;6(1):62-6. Epub 1999/12/29.
107. Miglietta O, Lowenthal M. A study of peripheral nerve involvement in fifty-four patients with multiple sclerosis. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1961;42:573-8. Epub 1961/08/01.
108. Ginsberg SD, Martin LJ. Axonal transection in adult rat brain induces transsynaptic apoptosis and persistent atrophy of target neurons. *Journal of neurotrauma*. 2002;19(1):99-109. Epub 2002/02/21.
109. Eidelberg E, Nguyen LH, Polich R, Walden JG. Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions. *Brain research bulletin*. 1989;22(1):39-45. Epub 1989/01/01.

110. McBride RL, Feringa ER. Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection. *Brain research bulletin*. 1992;28(1):57-60. Epub 1992/01/01.
111. Bjugn R, Nyengaard JR, Rosland JH. Spinal cord transection--no loss of distal ventral horn neurons. Modern stereological techniques reveal no transneuronal changes in the ventral horns of the mouse lumbar spinal cord after thoracic cord transection. *Experimental neurology*. 1997;148(1):179-86. Epub 1997/12/24.
112. Kaelan C, Jacobsen PF, Kakulas BA. An investigation of possible transsynaptic neuronal degeneration in human spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences*. 1988;86(2-3):231-7. Epub 1988/09/01.
113. Terao S, Li M, Hashizume Y, Mitsuma T, Sobue G. No transneuronal degeneration between human cortical motor neurons and spinal motor neurons. *Journal of neurology*. 1999;246(1):61-2. Epub 1999/02/13.
114. Bannerman PG, Hahn A, Ramirez S, Morley M, Bonnemann C, Yu S, et al. Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 8):1877-86. Epub 2005/05/20.
115. Gilmore CP, DeLuca GC, Bo L, Owens T, Lowe J, Esiri MM, et al. Spinal cord neuronal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2009;19(4):642-9. Epub 2009/01/28.
116. Schirmer L, Albert M, Buss A, Schulz-Schaeffer WJ, Antel JP, Bruck W, et al. Substantial early, but nonprogressive neuronal loss in multiple sclerosis (MS) spinal cord. *Annals of neurology*. 2009;66(5):698-704. Epub 2009/11/26.
117. Schirmer L, Antel JP, Bruck W, Stadelmann C. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2011;21(4):428-40. Epub 2010/12/01.
118. Shefner JM, Carter JL, Krarup C. Peripheral sensory abnormalities in patients with multiple sclerosis. *Muscle & nerve*. 1992;15(1):73-6. Epub 1992/01/01.
119. Seewann A, Kooi EJ, Roosendaal SD, Pouwels PJ, Wattjes MP, van der Valk P, et al. Postmortem verification of MS cortical lesion detection with 3D DIR. *Neurology*. 2012;78(5):302-8. Epub 2012/01/06.
120. Kuchling J, Sinnecker T, Bozin I, Dorr J, Madai VI, Sobesky J, et al. [Ultrahigh field MRI in context of neurological diseases]. *Der Nervenarzt*. 2014;85(4):445-58. Epub 2014/02/20. Ultrahochfeld-MRT im Kontext neurologischer Erkrankungen.
121. Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dorr J, Pfueller CF, Harms L, Niendorf T, et al. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-

---

field strength magnetic resonance imaging study. *Archives of neurology*. 2012;69(6):739-45. Epub 2012/02/22.

122. Sinnecker T, Kuchling J, Dusek P, Dorr J, Niendorf T, Paul F, et al. Ultrahigh field MRI in clinical neuroimmunology: a potential contribution to improved diagnostics and personalised disease management. *The EPMA journal*. 2015;6(1):16. Epub 2015/08/28.

123. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(5):552-6. Epub 2012/04/12.

## I. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kathrin Sarah Hütker, geb. Müller-Wielsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Neuronaler Schaden in der Multiplen Sklerose - eine stereologische und histomorphologische Untersuchung" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 31. August 2016

Kathrin Sarah Hütker

**Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Kathrin Sarah Hütker, geb. Müller-Wielsch, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Vogt J, Paul F, Aktas O, **Müller-Wielsch K**, Dorr J, Dorr S, Bharathi BS, Glumm R, Schmitz C, Steinbusch H, Raine CS, Tsokos M, Nitsch R, Zipp F. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology*. 2009;66(3):310-22.

Beitrag im Einzelnen: Akquise von Untersuchungsmaterial, histologische Aufarbeitung und Durchführung der stereologischen Messungen am humanen Gewebe, Zusammenstellung der Patientendaten der stereologischen Untersuchung. Gesamtanteil 20%.

Publikation 2: **Müller-Wielsch KS**, Cannella B, Raine CS. Multiple Sclerosis: Neurofilament pathology in spinal motor neurons. *Journal of the Neurological Sciences*, derzeit im Einreichungsprozess.

Beitrag im Einzelnen: Konzeption der gesamten Arbeit (gemeinsam mit CS Raine), histologische und immunhistochemische Aufarbeitung des Gewebes, mikroskopische Beurteilung und Dokumentation, Zusammenstellung und Auswertung der Daten, Verfassen des Artikels als Primärautorin. Gesamtanteil 80%.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **II. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



---

### III. Publikationsliste

1. **Müller-Wielsch KS**, Cannella B, Raine CS. *Multiple Sclerosis: Neurofilament pathology in spinal motor neurons*. Journal of the Neurological Sciences, derzeit in Revision.
2. **Müller-Wielsch K**, Huppke P, Gärtner J. *Entwicklungsverzögerung im Säuglingsalter durch alimentären Vitamin B12-Mangel*. Neuropädiatrie in Klinik und Praxis 10(3):89ff., 2011.
3. Vogt J, Paul F, Aktas O, **Müller-Wielsch K**, Dörr J, Dörr S, Bharati BS, Glumm R, Schmitz C, Steinbusch H, Raine CS, Tsokos M, Nitsch R, Zipp F. *Lower Motor Neuron Loss in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Annals of Neurology 66(3):310ff., 2009.
4. **Müller-Wielsch K**, Vogt J, Omari KM, Nitsch R, Raine CS, Zipp F. *Neuronal changes in the spinal cord in Multiple Sclerosis*. European Journal of Medical Research 12(Supplement IV):I-XXIV, 155f., 2007. (Postervortrag)

## IV. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Kollegen, Förderer und Freunde sowie Familienmitglieder nicht zustande gekommen. Ihnen allen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Insbesondere danke ich...

... meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Friedemann Paul für die kompetente und zuverlässige Betreuung meiner Promotion und die anregende Zusammenarbeit.

... aus der Charité Universitätsmedizin Berlin: Prof. Dr. med. Frauke Zipp und Prof. Dr. med. Dr. phil. Robert Nitsch für die Angliederung an ihre Arbeitsgruppen sowie das zur Verfügung stellen von Räumlichkeiten, Geräten und Zubehör und Dr. med. Johannes Vogt für die Einarbeitung in Stereologie und histologische Methoden sowie die Durchführung der statistischen Tests.

... aus dem Albert Einstein College of Medicine New York: Cedric S. Raine, Ph.D., D.Sc. für die intensive Begleitung meiner dortigen Arbeit als Mentor, Kakuri M. Omari, Ph.D. für die Einarbeitung in EAE und Immunhistochemie, Barbara Cannella, Ph.D. für ihre Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen und ihren wissenschaftlichen Rat, Mirjam Pakingan für die technische Hilfe bei der Gewebeverarbeitung.

... Dr. med. Eva Würfel und Prof. Dr. med. Christoph Schmitz für die Genehmigung der Verwendung von ihnen erstellter Abbildungen im Methodikteil.

... Daria Kuner für die Hilfe beim Layout und die mentale Unterstützung.

... Dr. med. Bettina Göricke und Dr. rer. nat. Wilhelm Heuer fürs Korrekturlesen.

... dem Evangelischen Studienwerk Villigst, dem Biomedical Sciences Exchange Program der International Academy of Life Sciences (IALS) sowie der Stiftung Dr. Edith Grünheit des Deutschen Ärztinnenbundes e.V., deren Stipendien mir zahlreiche Möglichkeiten und Freiräume eröffneten.

... Christoph Hilmes für die Begleitung auf einer langen Strecke des Weges.

... vielen Freunden, die mich immer wieder motiviert haben.

... meinen Eltern Eva und Rainer Müller-Wielsch für ihre unschätzbare Unterstützung und Förderung – nicht nur, aber auch bei der Promotion.

... und ganz besonders meinem Mann Sebastian für seine Liebe, Geduld und stetige Ermutigung.