
Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Lehrstuhl für Anatomie – Vegetative Anatomie
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

**Post mortem Untersuchungen funktioneller
Neurone des Augenbewegungssystems auf
perineuronale Netze bei Fällen mit progressiver
supranukleärer Parese (PSP)**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Maria Fröschl
aus
Laa an der Thaya
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Jahn
Prof. Dr. Oliver Ehrt

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: Prof. (apl). Dr. rer. nat.
Anja Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2018

1	EINLEITUNG	14
1.1	EXTRAZELLULÄRMATRIX (ECM)	14
1.2	PERINEURONALE NETZE (PN) ALS SPEZIALISIERTE ECM	15
1.2.1	<i>Einzelkomponenten der PN</i>	15
1.2.2	<i>Bildung der PN</i>	20
1.2.3	<i>Mögliche Funktionen der PN</i>	20
1.2.4	<i>Vorkommen der PN in Sakkadenneuronen</i>	20
1.3	PN UND NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN	24
1.3.1	<i>Progressive supranukleäre Parese (PSP)</i>	24
1.3.2	<i>Morbus Alzheimer</i>	27
1.4	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DES PROJEKTS	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	KONTROLLEN	30
2.2	KLINISCHE FÄLLE MIT PROGRESSIVER SUPRANUKLEÄRER PARESE	31
2.3	PRÄPARATIONEN	35
2.4	PARAFFINSCHNITTE	35
2.5	NISSL-FÄRBUNG UND GALLYAS-FÄRBUNG	35
2.6	GRUNDSCHRITTE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG	35
2.6.1	<i>Entparaffinierung und Rehydrierung</i>	35
2.6.2	<i>Antigen-Demaskierung</i>	36
2.7	EINZEL- UND DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	36
2.7.1	<i>Antikörper</i>	36
2.7.2	<i>Einzelschritte der doppelimmunhistochemischen Färbung</i>	39
2.8	AUSWERTUNG	40
2.8.1	<i>Lichtmikroskopische Analyse</i>	40
2.8.2	<i>Photographische Dokumentation</i>	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	UNTERSUCHTE KERNAREALE	46

3.1.1	<i>Rostraler interstitieller Nucleus des Fasciculus longitudinalis medialis (RIMLF)</i>	46
3.1.2	<i>Nucleus oculomotorius (nIII) und Nucleus Edinger-Westphal (EWcp)</i>	50
3.1.3	<i>Oliva superior (SO)</i>	55
3.2	FÄRBEMUSTER DER TAU-PROTEINE.....	60
3.2.1	<i>Tau-Pathologie und deren Färbemuster bei den Kontrollen</i>	61
3.2.2	<i>Tau-Pathologie und deren Färbemuster bei PSP-Fällen</i>	62
3.3	PN UND DEREN FÄRBEMUSTER BEI PSP	66
3.3.1	<i>Einzelfärbungen auf Tau-Proteine und Netze</i>	67
3.3.2	<i>Doppelimmunhistochemische Färbungen im SO</i>	71
3.3.3	<i>Doppelimmunhistochemische Färbungen im RIMLF</i>	74
3.3.4	<i>Doppelimmunhistochemische Färbungen im nIII</i>	76
3.3.5	<i>Doppelimmunhistochemische Färbungen im EWcp</i>	82
3.4	AUSBlick QUALITATIVE UNTERSUCHUNG SYNAPTISCHER EINGÄNGE.....	84
3.4.1	<i>Synapseneingänge auf Motoneurone im nIII in Kontrollgehirnen</i> .	85
3.4.2	<i>Synapseneingänge auf Motoneurone im nIII bei PSP-Fällen</i>	86
4	DISKUSSION	88
4.1	TECHNISCH-METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN.....	90
4.1.1	<i>Maskierung der Antigene</i>	90
4.1.2	<i>Vergleich der verwendeten Antikörper zur Darstellung der PN</i>	91
4.2	TAU-ERSCHEINUNGSFORMEN.....	93
4.3	DEGENERATIVER PROZESS DER PN	94
4.3.1	<i>Charakteristika von Neuronen mit PN untersuchter Kernareale</i> ...	95
4.4	WEITERE FUNKTIONEN PERINEURONALER NETZE.....	97
4.5	PRAKTISCH-KLINISCHE RELEVANZ	98
4.5.1	<i>Enzymatische Netzauflösung</i>	98
4.5.2	<i>PN und Ischämie</i>	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	102

6 ANHANG	104
6.1 FÄRBE-PROTOKOLLE	104
7 LITERATUR	124
8 DANKSAGUNG	136
9 LEBENSLAUF	138
10 EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	140

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einzelkomponenten der PN	17
Abbildung 2: Sagittalschnitt durch den Hirnstamm eines Primaten zur Demonstration relevanter Kernareale zur Generation von Sakkaden	22
Abbildung 3: Prämotorische Neuronenverbindungen zur Generation von Horizontalsakkaden	23
Abbildung 4: Sagittalschnitt durch den Hirnstamm mit korrespondierenden Transversalebene durch für Augenbewegungen relevante Kernareale	45
Abbildung 5: Kontrollschnitte RIMLF in Nissl- und Gallyas-Färbung	48
Abbildung 6: Kontrollschnitte RIMLF mit Netzfärbungen	49
Abbildung 7: Kontrollschnitte nIII in Nissl-Färbung	51
Abbildung 8: Kontrollschnitte nIII mit Netzfärbung	54
Abbildung 9: Kontrollschnitte SO in Nissl- und Gallyas-Färbung	58
Abbildung 10: Kontrollschnitte SO mit Netzfärbungen	59
Abbildung 11: Tau-Pathologie-Erscheinungsformen	61
Abbildung 12: Kontrollschnitte RIMLF, nIII und EWcp mit kombinierter Nissl- und Tau-Protein-Färbung	62
Abbildung 13: Transversalschnitte nIII, EWcp und RIMLF aller Fälle mit Tau-Protein-Färbung	65
Abbildung 14: Transversalschnitte nIII mit Gegenüberstellung der Netzfärbung und der Tau-Protein-Färbung	68
Abbildung 15: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung und der Tau-Protein-Färbung in der Übersicht	69
Abbildung 16: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung auf ACAN und der Tau-Protein-Färbung	70
Abbildung 17: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung auf HAPLN und der Tau-Proteinfärbung	71
Abbildung 18: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe der SO fortgeschrittener PSP-Fälle mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	73
Abbildung 19: Transversalschnitte RIMLF des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	74

Abbildung 20: Transversalschnitt RIMLF des intermediären PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung.....	75
Abbildung 21: Transversalschnitte RIMLF des späten PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	76
Abbildung 22: Transversalschnitte nIII des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	78
Abbildung 23: Transversalschnitte nIII des intermediären PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung.....	80
Abbildung 24: Transversalschnitte nIII des späten PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	82
Abbildung 25: Transversalschnitte EWcp des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung	84
Abbildung 26: Kontrollschnitte nIII mit Färbung der Synapsenendigungen	85
Abbildung 27: Transversalschnitte nIII des frühen PSP-Falls mit kombinierter Synapsen- und Tau-Protein-Färbung	86

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Diagnosekriterien PSP	25
Tabelle 2: Übersicht Fälle	34
Tabelle 3: Verdünnungsreihe der verwendeten Antikörper	39

III. Abkürzungsverzeichnis

3V	=	Dritter Ventrikel
AC	=	Axonal coats
ACAN	=	Aggrecan
AD	=	Morbus Alzheimer
anti-ACAN	=	Maus-Anti-Aggrecan-Antikörper
anti-CSPG	=	Maus-anti-CSPG-Antikörper
anti-HAPLN1	=	Ziege-anti-HAPLN1-Antikörper
anti-Syn	=	Kaninchen-anti-Synaptophysin-Antikörper
AT8	=	Maus-anti-Tau-Antikörper
CSPG	=	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
DAB	=	Diaminobenzidin
DAB-Ni	=	Nickel-Diaminobenzidin
EAP	=	Extravidin-Peroxidase
EBN	=	exzitatorische Burstneurone
ECM	=	Extrazellulärmatrix
EGF	=	epidermaler Wachstumsfaktor
EWcp	=	Nucleus Edinger-Westphal, zentral projizierend
GABA	=	Gamma-Amino-Buttersäure
GAG	=	Glykosaminoglykan
HA	=	Hyaluron
HAPLN	=	Hyaluron-und Proteoglykan-Linkprotein

INC	=	Nucleus interstitialis von Cajal
LNTB	=	Nucleus ventralis des Corpus trapezoidem
LSO	=	laterale Oliva superior
MAPT	=	mikrotubuli-assoziiertes Tau-Protein
MLF	=	Fasciculus longitudinalis medialis
MNTB	=	Nucleus medialis des Corpus trapezoideum
MSO	=	mediale Oliva superior
NFT	=	neurofibrilläre Tangles
nIII	=	Nucleus oculomotorius
nIV	=	Nucleus trochlearis
NP	=	Nucleus perlia
NT	=	Neuropil-Fäden
nVI	=	Nucleus abducens
nVII	=	Nucleus facialis
OPN	=	Omnipause-Neurone
PAV	=	Parvalbumin
PHF	=	gepaarte helicale Filamente
PN	=	perineuronale Netze
pNFT	=	neurofibrilläre Pretangles
PPO	=	Nucleus periolivaris posterior
PPRF	=	paramediane pontine Formatio reticularis
PSP	=	progressive supranukleäre Parese

RIMLF	=	rostraler interstitieller Nucleus des medialen longitudinalen Faszikels
RIP	=	Nucleus raphe interpositus
RN	=	Nucleus ruber
SC	=	Colliculus superior
SO	=	Oliva superior
SOC	=	superiorer oliviärer Komplex
SPON	=	Nucleus paraolivaris superior
Syn	=	Synaptophysin
TAU	=	Kaninchen-anti-Tau-Antikörper
TBS	=	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ("tris buffered saline")
VN	=	Nucleus vestibularis
VOR	=	vestibulo-okulärer Reflex

1 EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird im Rahmen einer post mortem Studie an Gehirnschnitten von Patienten mit progressiver supranukleärer Parese (PSP) die Ausprägung der Extrazellulärmatrix (ECM) an funktionellen Neuronen des Augenbewegungssystems im Hirnstamm untersucht. Kombinierte immunhistochemische Färbungen auf spezifische ECM-Komponenten, die sogenannten perineuronalen Netze (PN), sowie auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein als Degenerationsmarker wurden eingesetzt, um neue Erkenntnisse über die Funktion der PN zu erhalten.

1.1 EXTRAZELLULÄRMATRIX (ECM)

Das Auftreten der ECM als amorphe Struktur im ZNS wurde erstmals 1970 beschrieben (Tani and Ametani, 1971). Die ECM füllt den interstitiellen Raum aus und bettet so Neurone und Gliazellen ein (Soleman et al., 2013). Beide Zelltypen verfügen über die ECM-formenden Enzyme Protease und Hyaluronidase (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Dityatev and Schachner, 2003; Christopherson et al., 2005; Dityatev and Fellin, 2008; Frischknecht and Seidenbecher, 2008) und produzieren vermutlich die einzelnen Komponenten der ECM (Soleman et al., 2013). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass sich die Funktion der ECM während der Entwicklung ändert, wie nachfolgend genauer erläutert wird. Im Entwicklungsprozess unterstützt sie die neuronale Zellentwicklung und -migration und das axonale Wachstum (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Faissner et al., 2010). Im adulten Gehirn gibt es Hinweise für eine Funktion beim Zellüberleben, Plastizität und Regeneration (Meredith et al., 1993; Grimpe and Silver, 2002; Dityatev et al., 2010a; Kwok et al., 2011). Die abschließende Zusammensetzung der ECM fällt mit dem Ende der kritischen Periode zusammen (Galtrey and Fawcett, 2007; Carulli et al., 2010). Da die ECM ein spezifisches Mikromilieu bereitstellt, kann die neuronale Zellentwicklung und -aktivität, sowie die Signalübertragung via Synapsen reguliert werden (Matsui et al., 1999; Yamaguchi, 2000; Soleman et al., 2013). Die adulte ECM verhindert Reorganisationsvorgänge wie zum Beispiel axonales Wachstum (Carulli et al., 2010). Zeitgleich organisiert sie sich in spezifische, verdichtete ECM-Strukturen entweder als sogenannte PN um Somata und proximale Dendriten von Neuronen oder als „Axonal coats“ (AC) um singuläre Synapsenendigungen (Burnside and Bradbury, 2014).

1.2 PERINEURONALE NETZE (PN) ALS SPEZIALISIERTE ECM

Die PN wurden erstmals im 18. Jahrhundert von Golgi (Vitellaro-Zuccarello et al., 1998) mit Hilfe der Golgi-Methode (Synonym: „black reaction“), einer Silberfärbung zur Darstellung von Nervengewebe entdeckt (Pannese, 1996). Erst über 100 Jahre später gerieten die PN mit der Verfügbarkeit verschiedener moderner Nachweismethoden, wie Lektin-Bindung oder Immunhistochemie, wieder in den Fokus der Forschung verschiedener Arbeitsgruppen (Celio and Blümcke, 1994; Celio et al., 1998; Dityatev et al., 2010a; Dityatev et al., 2010b; Kwok et al., 2011; Morawski et al., 2012a; Morawski et al., 2012b).

PN sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich aus spezialisierten, geladenen ECM-Komponenten zusammensetzen (Celio et al., 1998). Sie kommen bei allen bisher untersuchten Vertebraten, wie zum Beispiel Meerschweinchen, Beutelratte oder auch Frosch (Ohyama and Ojima, 1997; Bruckner et al., 1998; Iozzo, 1998; Toole, 2000; Bruckner et al., 2006; Szigeti et al., 2006) vor. Man findet sie in verschiedenen ZNS-Regionen assoziiert mit Subpopulationen von Interneuronen und Projektionsneuronen (Hockfield and McKay, 1983; Brückner et al., 1993; Celio et al., 1998; Murakami and Ohtsuka, 2003) (siehe Abschnitt Vorkommen der PN).

1.2.1 EINZELKOMPONENTEN DER PN

Chemisch bilden die PN heterogene Strukturen mit einem komplexen Molekülaufbau (Matthews et al., 2002; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008; Kind et al., 2013) (Abb. 1A). Sie setzen sich zusammen aus den ECM-Komponenten:

1. **Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane (CSPG)**, bestehend aus einem Core-Protein und kovalent gebundenen sulfatierten Glykosaminoglykan-(GAG-) Seitenketten (Zaremba et al., 1989; Asher et al., 1995; Bertolotto et al., 1996; Lander et al., 1998)
2. **Hyaluron (HA)** als Rückgrat von CSPG
3. **Link-Proteine** als Verbindungs-Element zwischen den GAG-Seitenketten von CSPG und HA (Neame and Barry, 1993; Spicer et al., 2003; Kwok et al., 2010) und
4. **Tenascin R** (Deepa et al., 2006; Carulli et al., 2007), wodurch sich ein quartärer Komplex bildet (Asher et al., 1995; Bruckner et al., 2000; Yamaguchi, 2000).

Die Hauptkomponente der ECM der PN ist das Lektikan Aggrecan (ACAN) (Köppe et al., 1997; Matthews et al., 2002; Rauch, 2007). Die Expression von ACAN, Link-Proteinen und Hyaluron-Synthase sind unabdingbar für die Entwicklung der PN im in vitro Modell (Kwok et al., 2010).

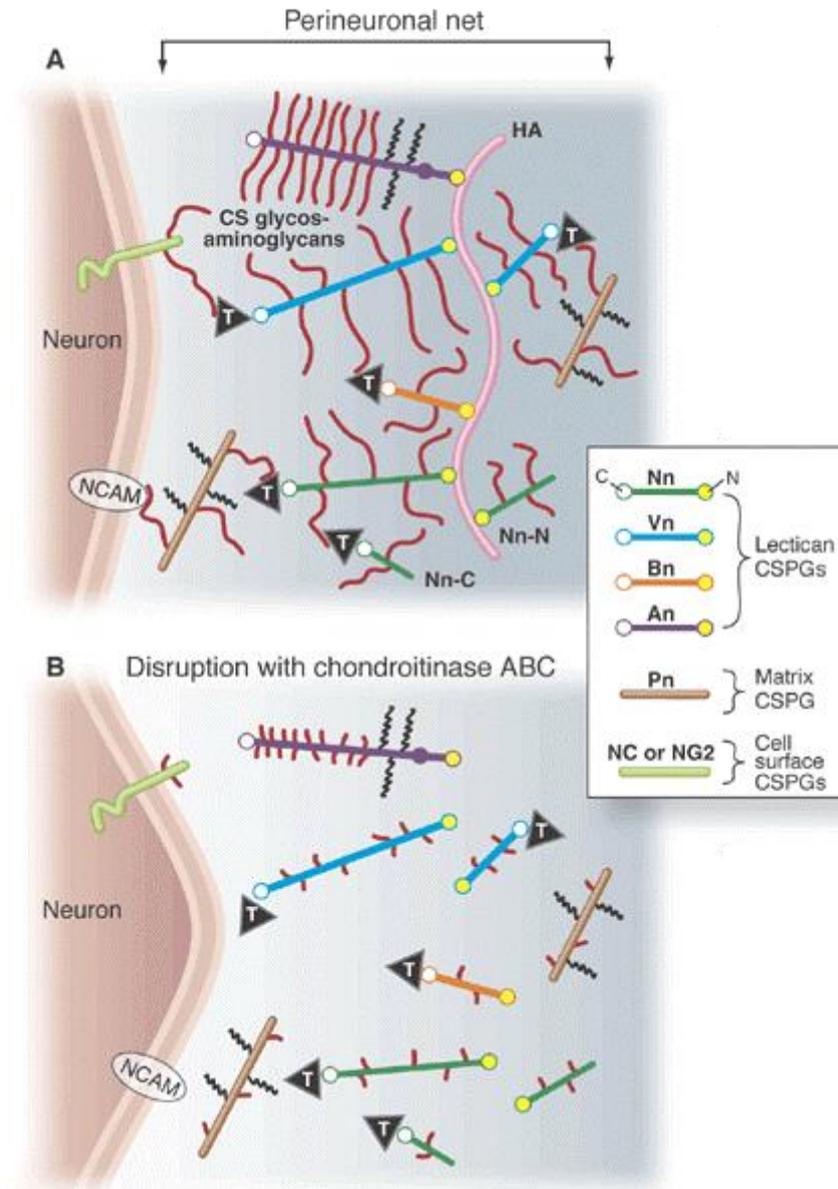


Abbildung 1: Einzelkomponenten der PN

Abb. 1A: Perineuronale Netze bestehen aus verschiedenen Subklassen von Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen (CSPG). Zur Untergruppe der Lektikanfamilie von CSPG zählen: Neurocan (Nn), Versican (Vn), Brevican (Bn) und Aggrecan (An), die allesamt nicht kovalent an Matrix-Hyaluron (HA, pink) via HA-bindende Domänen am aminoterminalen Ende (gelber Kreis) gebunden sind. Spezifische nicht kovalente Bindungen existieren zwischen dem carboxyterminalen Ende (weißer Kreis) einiger Lektikane (wie Neurocan und Versican) und dem Matrix-Glykoprotein Tenascin (T, Dreieck). Tenascin bindet via Chondroitin-Sulfat (CS) Glykosaminoglykan (GAG) (rote Linien) an Phosphacan (Pn) und andere Lektikane als auch an Zelloberflächen-CSPG wie Neuroglykan C (NC) und NG2. Phosphacan bindet an Zelloberflächen-Rezeptoren wie zum Beispiel an das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) via GAG-Ketten. Dargestellt sind zwei Splicing-Varianten von Versican als auch von intaktem Neurocan und seiner zwei proteolytischen Isoformen Neurocan-N (Nn-N) gebunden an HA und Neurocan-C (Nn-C) via Interaktion mit Tenascin und CS GAG innerhalb des perineuronalen Netzes gebunden.

Abb. 1B: Die Gabe von Chondroitinase ABC führt zu einem Abbau von CS GAG (rote Linien) als auch von Matrix-HA (pinke Linie), wodurch die PN zerstört werden (Fox and Caterson, 2002). Mit Erlaubnis von The American Association for the Advancement of Science, übernommen von: Freeing the Brain from the Perineuronal Net, Kevin Fox, Bruce Caterson, © 2002, Fox and Caterson

1.2.1.1 HYALURON (HA)

HA ist ein lineares Polymer aus N-Acetylglukosamin und Glucuronsäure-Disaccharid-Einheiten (Meyer et al., 1951), das über Beta 1-4-Verbindungen und Beta 1-3-Verbindungen verknüpft ist. Sein Vorkommen beschränkt sich nicht nur auf PN, es ist auch im Neuropil und den Ranvier'schen Schnürringen vorhanden (Bekku et al., 2009; Bekku et al., 2010). Als Besonderheit gilt, dass HA das einzige Glukosaminoglykan in der ECM ist, das nicht kovalent an das Core-Protein gebunden ist (Toole, 2000). HA bindet Proteoglykane und Glykoproteine (Spicer et al., 2003; Frischknecht and Seidenbecher, 2008) und interagiert mit anderen ECM-Molekülen (Hardingham and Muir, 1972; Hascall and Heinegard, 1974; Koppe et al., 1997) (siehe Abb. 1A). Zur immunhistochemischen Färbung wird biotinyliertes HA-Link-Protein, das eine hohe Affinität zu HA aufweist, verwendet. Hyaluron-Synthase synthetisiert als Enzym HA (Kwok et al., 2010) und wird in allen PN-tragenden Neuronen exprimiert (Carulli et al., 2007; Galtrey et al., 2008). Dementsprechend sind Hyaluronidasen imstande, die PN aufzulösen (Koppe et al., 1997).

1.2.1.2 UNTERGRUPPEN VON CSPG

Es existieren 4 Subgruppen von CSPG: die ECM-formenden Lektikane, Phosphacan, Zelloberflächen-assoziierte gliale Strukturen und Decorin (Davies et al., 2004; Iozzo and Schaefer, 2015). Lektikane binden HA und Lektine (Iozzo, 1998). Die biologische Aktivität von CSPG ist von deren GAG-Seitenketten im Hinblick auf Anzahl, Grad und Position der Sulfatierung abhängig (Hardingham and Fosang, 1992; Yamaguchi, 2000; Pizzorusso et al., 2002; Kwok et al., 2008). So sind sie beispielsweise in der Lage, die Bindungskapazität von Calcium zu beeinflussen (Hunter et al., 1988; Vigetti et al., 2008).

CSPG setzen sich aus einem Core-Protein und kovalent gebundenen GAG-Seitenketten zusammen. GAG bestehen aus sulfatierten Polysacchariden, welche aus sich wiederholenden Disacchariden gebildet werden. Sie sind via drei Zucker-Xylose-Einheiten, produziert von Xylsoyltransferase (Gotting et al., 2000), mit Serin-Resten des Core-Proteins verbunden. Die Sulfatierung erfolgt an Position 4 oder 6 von N-Acetylgalaktosamin oder bleibt ganz aus. Das Anlagerungsmuster der sulfatierten CS GAG-Ketten unterscheidet sich zwischen den Lektikanen. (Yamaguchi, 2000)

Man differenziert zwischen 4 verschiedenen Gruppen von Lektikanen: ACAN, Versican, Neurocan und Brevican (Matsui et al., 1998; Hagihara et al., 1999; Bandtlow and Zimmermann, 2000; Matsui and Oohira, 2004; Carulli et al., 2006; Galtrey et al., 2007; Galtrey and Fawcett, 2007) (siehe Abb. 1A). Die drei erstgenannten finden sich in der ECM, während Brevican sowohl in der ECM als auch verlinkt mit der Zellmembran vorkommen kann. Während ACAN in allen PN-Formationen auftritt, findet man andere Lektikane nur in Subpopulationen der PN-tragenden Neurone (Galtrey et al., 2008).

1.2.1.3 LINK-PROTEINE

Die Link-Proteine gehören zur Gruppe der HA- und Proteoglycan-bindenden Link-Proteine (HAPLN) (Spicer et al., 2003). Deren Funktion ist die Verankerung von HA mit CSPG (siehe Abb. 1A).

Alle 4 Untergruppen weisen eine ähnliche Grundstruktur auf: eine N-terminale Signalsequenz, eine Immunglobulin-Domäne und zwei konsekutive Link-Module oder Proteoglykan-Tandem-Repeats. Zu den 4 Untergruppen von HAPLN, die in verschiedenen Nomenklaturen geführt werden, zählen (Hascall and Heinegard, 1974; Neame et al., 1986; Marks et al., 1990):

Cartilage link protein 1 (entspricht HAPLN1) und Brain link protein 1 (entspricht HAPLN2), das die PN an den Ranvier'schen Schnürringen formt, und nur im adulten ZNS vorkommt.

HAPLN3 und Brain link protein 2 (entspricht HAPLN4), das ein gehirn-spezifisches Link-Protein ist (Bekku et al., 2003).

Nur HAPLN1 und HAPLN4 werden von PN-tragenden Neuronen exprimiert (Bekku et al., 2003; Rauch, 2004; Carulli et al., 2006; Galtrey et al., 2008). Außerdem sorgt HAPLN1 *in vitro* für die Bildung von PN (Kwok et al., 2010). HAPLN3 kommt nicht im Nervensystem vor, sondern an den glatten Muskelzellen und an der Plazenta (Tsifrina et al., 1999).

1.2.1.4 TENASCIN

Tenascin ist wichtiger Bestandteil der modularen Glykoproteine. Ein Trimer aus Tenascin bindet bis zu drei Lektikan-Moleküle (siehe Abb. 1A). Damit ist Tenascin

fähig, Di- und Trimere zu bilden und so für eine Quervernetzung von Lektikanen zu sorgen (Kwok et al., 2011). Das Resultat sind makromolekulare Aggregate in Form von PN (Lundell et al., 2004; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

1.2.2 BILDUNG DER PN

Die PN werden von Gliazellen und Neuronen produziert (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Yamaguchi, 2000). Zum Beispiel wird Brevican von Neuronen und Gliazellen gebildet (John et al., 2006), Versican und Tenascin-R nur von Gliazellen. ACAN wird von PN-tragenden Neuronen produziert (Lander et al., 1998). Auch Hyaluron-Synthase und Link-Proteine werden vornehmlich von Neuronen mit PN gebildet (Carulli et al., 2006; Carulli et al., 2007).

1.2.3 MÖGLICHE FUNKTIONEN DER PN

Die genaue Funktion der PN ist noch unklar, es werden jedoch verschiedene mögliche Aufgaben diskutiert. Neben einer Rolle bei der Regulierung der neuronalen Kommunikation an den Synapsen (Brückner et al., 1993), einer Funktion bei der Stabilisierung von synaptischen Kontakten während der Entwicklung (Berardi et al., 2003; Dityatev and Schachner, 2003; Rhodes and Fawcett, 2004) sowie der Regulation neuronaler Plastizität (Frischknecht et al., 2009; Carulli et al., 2010), wird den PN eine protektive Rolle zugesprochen. Durch ihren Einfluss auf das ionische Mikromilieu bewirken sie möglicherweise einen Schutz vor oxidativem Stress (Okamoto et al., 1994). Außerdem wird auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine protektive Rolle vermutet, beispielsweise bei Morbus Alzheimer (AD) (Morawski et al., 2010; Morawski et al., 2012b).

1.2.4 VORKOMMEN DER PN IN SAKKADENNEURONEN

Häufig finden sich PN um Neurone, die das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (PAV) exprimieren (Brückner et al., 1994; Härtig et al., 1995; Horn et al., 2003a; Horn et al., 2003b). Dieses Protein wurde vornehmlich in aktiven oder schnell feuernden Neuronen nachgewiesen, (Härtig et al., 1994; Kawaguchi, 1997; Tepper and Bolam, 2004), während langsamer feuernde, eher modulatorische Neurone keine PN tragen (Hobohm et al., 1998; Murakami and Ohtsuka, 2003).

Die genannten Eigenschaften einer hohen neuronalen Aktivität treffen auch auf funktionelle Neurone des Augenbewegungssystems zu, insbesondere für diejenigen,

die an der Generierung schneller Blicksprünge, den sogenannten Sakkaden, beteiligt sind und sich durch stark ausgeprägte PN auszeichnen. Dementsprechend konnte in vergleichenden Untersuchungen in Primaten die Expression von PN dazu genutzt werden, die homologen funktionellen Neurone des Sakkadensystems beim Menschen zu identifizieren (Horn et al., 2003a; Adamczyk et al., 2015). Eine Funktionsstörung dieser Sakkadeneurone steht im Vordergrund der neurodegenerativen Erkrankung progressive supranukleäre Parese (PSP). Im nächsten Abschnitt werden die Nervenbahnen beschrieben, welche an der Sakkadengenerierung beteiligt sind und Gegenstand der Untersuchung der vorliegenden Arbeit sind.

Die Generierung von Sakkaden erfolgt im Wesentlichen durch die Interaktion von zwei funktionellen Nervenzellgruppen: den Omnipause-Neuronen (OPN) und den prämotorischen Burst-Neuronen (EBN) (Horn et al., 1996) (Abb. 2 und 3).

Die EBN repräsentieren schnell feuernende Neurone in der *Formatio reticularis*, die Eingänge unter anderem vom *Colliculus superior* (SC) erhalten und zu den Motoneuronen der äußeren Augenmuskeln projizieren. Nur kurz vor einer Sakkade feuern diese Neurone mit einer hochfrequenten Entladungsburst, die in den nachgeschalteten Motoneuronen das Signal für die Sakkade bewirkt (Scudder et al., 2002; Sparks, 2002). Man unterscheidet zwei Kerngebiete in der *Formatio reticularis*, die jeweils für die Generierung vertikaler und horizontaler Sakkaden zuständig sind: Die EBN zur Generierung für Horizontalsakkaden liegen in der paramedianen pontinen *Formatio reticularis* (PPRF), während die Neurone für Vertikalsakkaden in der mesencephalen *Formatio reticularis* im rostralen interstitiellen Kern des *Fasciculus longitudinalis medialis* (RIMLF) zu finden sind (Horn, 2006) (Abb.2). Die angesteuerten Motoneurone liegen im *Ncl. Abducens* (nVI) (Horizontalsakkaden) und *Ncl. trochlearis* (nIV) und *Ncl. oculomotorius* (nIII) (Vertikalsakkaden), die dann die jeweiligen äußeren Augenmuskeln aktivieren (Hepp et al., 1989; Moschovakis, 1996). Die EBN werden während aller nicht-sakkadischen Augenbewegungen, einschließlich Fixation, durch die zweite Gruppe von Neuronen, die OPN, gehemmt (Scudder et al., 2002). Die OPNs nutzen Glyzin als Neurotransmitter (Horn et al., 1994) und liegen in einem zytoarchitektonisch abgegrenzten Kern, der als *Nucleus raphe interpositus* (RIP) zwischen dem *Nucleus raphe pontis* und *Nucleus raphe magnus* bezeichnet wird (Büttner-Ennever et al., 1988; Langer and Kaneko, 1990; Horn et al., 1994). OPNs feuern, wenn

keine Sakkade abläuft, und müssen ihrerseits gehemmt werden, damit eine Aktivierung der Burst-Neurone erfolgen kann, woraus eine Sakkade resultiert (Scudder and Kaneko, 2002). Die Augenbewegungen in alle Blickrichtungen erfolgen dann via Stimulierung der Motoneurone über die Burst-Neurone, wodurch die jeweiligen äußeren Augenmuskeln für horizontale und vertikale Blickbewegungen aktiviert werden (Leigh and Zee, 2006). (vgl. Abb.3)

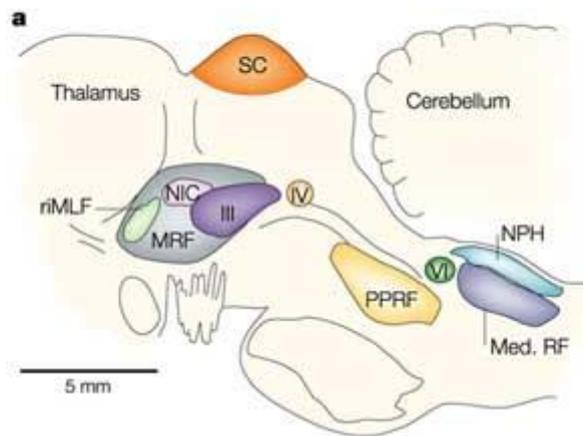


Abbildung 2: Saggitalschnitt durch den Hirnstamm eines Primaten zur Demonstration relevanter Kernareale zur Generation von Sakkaden

Exzitatorische Burst-Neurone aus dem rostralen interstitiellen Kern des medialen longitudinalen Faszikels (RIMLF) aktivieren Motoneurone im Ncl. Oculomotorius (III) und Ncl. trochlearis (IV) zur Generation von vertikalen Sakkaden. Exzitatorische Burst-Neurone in der paramedianen pontinen formatio reticularis (PPRF) aktivieren Motoneurone im Ncl. abducens (VI) und bewirken horizontale Sakkaden.

Med. RF medulläre retikuläre Formation, MRF mesencephale retikuläre Formation, NIC interstitieller Kern Cajal, NPH Nucleus präpositus hypoglossi, SC: Colliculus superior (Sparks, 2002). Mit Erlaubnis von Nature Publishing Group, übernommen von: The brainstem control of saccadic eye movements, David L. Sparks, © 2002, Sparks.

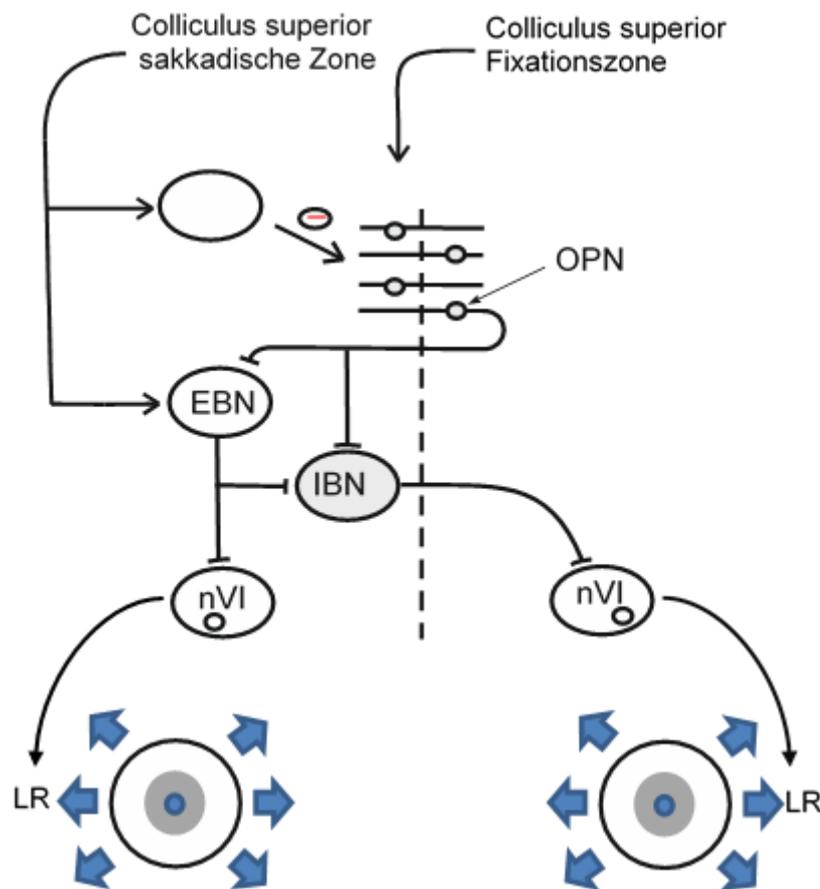


Abbildung 3: Prämotorische Neuronenverbindungen zur Generation von Horizontalsakkaden

Abb.3: Schematische Darstellung der prämotorischen Neuronenverbindungen, die sakkadischen Augenbewegungen generieren. Kurz vor und während der Sakkade werden die Omnipause-Neurone (OPN) durch ein Interneuron gehemmt, wodurch die Hemmung auf die exzitatorischen Burst-Neurone (EBN) aufgehoben wird. Die sakkadische Zone im Colliculus superior aktiviert EBNS, die die Motoneurone des Musculus rectus lateralis (LR) im Nucleus abducens (nVI) ansteuern. Gleichzeitig sorgen die inhibitorischen Burst-Neurone (IBN) für die Hemmung der Augenmuskel-Motoneurone des kontralateralen LR.

Die hochaktiven Burst-Neurone, Omnipause-Neurone und Motoneurone sind mit stark ausgeprägten PN assoziiert, wodurch vor allem die zyto-architektonisch schwierig definierten prämotorischen Areale RIMLF und PPRF gut abgegrenzt werden können (Horn et al., 2003b). Außerdem sind alle Twitch-Motoneurone innerhalb der Augenmuskelkerne mit PN assoziiert (Eberhorn et al., 2005). Bei Twitch-Motoneuronen handelt es sich um eine Neuronengruppe, die schnell kontrahierende Muskelfasern (schnelle Kontraktion = twitch) innervieren (Zeeh and Horn, 2012). Im Gegensatz dazu tragen peptiderge urocortin-positive Neurone im zentral projizierenden nicht-präganglionären EWcp keine PN (Horn et al., 2008).

1.3 PN UND NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN

Eine Rolle der PN bei neurodegenerativen Erkrankungen ist anhand verschiedener Studien vermutet worden. Es existieren Befunde, die auf eine mögliche protektive Funktion der PN bei Tau-Pathologien hinweisen (Viapiano and Matthews, 2006). Vor dem Hintergrund der mit PN assoziierten funktionellen Neurone des Sakkadensystems erscheint die neurodegenerative Erkrankung PSP, die mit Augenbewegungsstörungen einhergeht, als geeignet, um gezielte Untersuchungen der PN in bestimmten Hirnstammarealen durchzuführen (Chen et al., 2010).

1.3.1 PROGRESSIVE SUPRANUKLEÄRE PARESE (PSP)

PSP wurde erstmals von Steele und Kollegen (Steele et al., 1964) definiert und von Morbus Parkinson abgegrenzt. PSP gehört zu der zweithäufigsten Erkrankung des Parkinsonformenkreises nach dem klassischen Morbus Parkinson (Schrag et al., 1999). Man zählt PSP zu den atypischen Parkinsonerkrankungen, zu denen auch die Multisystematrophie, die Lewy-Body-Demenz (Unterform Pick's disease) und die Cortikobasale Degeneration gerechnet werden. PSP als neurodegenerative Multisystemerkrankung tritt spät auf und äußert sich durch folgende Klinik: Parkinsonismus, posturale Instabilität, supranukleäre Blickparese oder auch Frontallappensymptome. Vorrangig sind Frontal- und Parietallappen betroffen, im Gegensatz zum Okzipital- und Temporallappen (Williams and Lees, 2009). Neuropathologisch kommt es zur neuronalen Degeneration und Gliose in spezifischen Basalganglien und Hirnstammkernen. Außerdem lassen sich Störungen in dopaminergen, cholinergen und GABAergen Neurotransmittersystemen nachweisen. Zusätzlich akkumulieren abnormale filamentär aggregierte Tau-Proteine in Neuronen und Glia, weswegen man PSP auch zu den Tauopathien rechnet (Hoglinger et al., 2011).

Zur Diagnostik einer PSP-Erkrankung existieren die sogenannten „Litvan-Kriterien“ (Tab.1), welche die Wahrscheinlichkeit einer PSP-Erkrankung nach klinischen Charakteristika angeben (Litvan et al., 1996).

Tabelle 1: Klinische Diagnosekriterien PSP

Kriterium 1

Symptom	Bedingungen zur Erfüllung des Kriteriums
Progressive, nicht familiäre Beschwerden, die im mittleren oder hohen Alter beginnen	Beide Symptome müssen erfüllt sein
Vertikale supranukleäre Parese mit abwärts gerichteten Blickstörungen	
Pseudobulbärparalyse (Dysarthrie und Dysphagie)	Mindestens zwei Symptome müssen erfüllt sein
Bradykinesie und Rigidität	
Frontallappenstörungen (Bradyphrenie, Perseveration,....)	
Posturale Instabilität mit Fallneigung nach hinten	
Axiale Dystonie und Rigidität	

Kriterium 2

Symptom	Bedingungen zur Erfüllung des Kriteriums
Beginn nach 40 Jahren	Alle Symptome müssen erfüllt sein
Fortschreitender Krankheitsverlauf	
Bradykinesie	
Supranukleäre Blickparese *	
Dysarthrie oder Dysphonie	Mindestens drei Symptome müssen erfüllt sein
Axiale Rigidität > Extremitäten-Rigidität	
Hals in einer Extensionshaltung	
Minimaler oder kein Tremor	
Regelmäßige Stürze oder Blickstörungen früh im Krankheitsverlauf	
Geringes oder kein Ansprechen auf Levo-Dopa	Keine Symptome dürfen erfüllt sein
Frühe oder ausgeprägte Kleinhirnzeichen	
Unerklärte Polyneuropathie	
Nicht-iatrogene Dysautonomie (mit Ausnahme von einer isolierten posturalen Hypotension)	

*Entweder willkürlicher oder unwillkürlicher abwärts gerichteter Blick < 25% der Norm oder beides -willkürlicher oder unwillkürlicher nach oben gerichteter Blick < 25% der Norm und langsame, hypometrische willkürliche abwärts gerichtete Sakkaden.

Kriterium 3

Symptom	Bedingungen zur Erfüllung des Kriteriums
Fortschreitender Krankheitsverlauf	Alle Symptome müssen erfüllt sein
Kein Hinweis auf eine fokale Läsion nach neurologischer Untersuchung	
Krankheitsdauer unter 10 Jahren	
Schwere posturale Instabilität und Stürze ohne spezifische Ätiologie	
Parkinsonismus (Bradykinesie und axiale Rigidität)	
Surpanukleäre vertikale Ophthalmoplegie	
Pseudobulbärparalyse oder Dysarthrie	
Frontallappensymptome	
Keine signifikante Verbesserung mit Levo-Dopa oder CT	

Kriterium 4

Mindestens 7 Symptome von Kriterium 3 müssen erfüllt sein

1.3.1.1 KLINIK UND NEUROPATHOLOGIE

Definitiv kann die Diagnose PSP erst durch feingewebliche post mortem Untersuchungen gestellt werden. Allerdings gibt es eine Reihe von richtungsweisenden Symptomkomplexen und neuroradiologischen Befunden, die zu Lebzeiten eine Diagnose ermöglichen, welche im Folgenden aufgelistet sind.

Kardinalsymptome der PSP-Erkrankung sind typischerweise Stürze, posturale Instabilität, ein auffälliges breitbasiges Gangbild mit langsamem und schwankendem Gang, axiale Rigidität durch symmetrischen Extremitäten-Befall und eine vertikale Blickparese gefolgt von einer horizontalen Blickparese.

Zu Beginn der Erkrankung leiden die Patienten oft an Augenbewegungsstörungen und einer Verlangsamung der Initiation von Willkürsakkaden (Garbutt et al., 2008). Vorerst kommt es zu erhöhten Latenzzeiten in der Entstehung vertikaler Sakkaden (Garbutt et al., 2008) und dadurch zu Blickparesen aufgrund von früher Degeneration des RIMLF und später der PPRF (Steele et al., 1964). Warum vertikale vor horizontalen Blickparesen entstehen, bleibt zu klären. Auch der Vestibulo-Okuläre Reflex (VOR)

und der Opto-Kinetische Reflex können betroffen sein und laufen langsamer ab, insbesondere in vertikaler Richtung (Garbutt et al., 2004). Die Vergenz ist meist früh in der Pathogenese von PSP eingeschränkt.

PSP-Patienten leiden oft auch unter Dysarthrie und Dysphagie. Bei PSP ist eine atypische Präsentation mit zusätzlich asymmetrischen Parkinsonismus-Symptomen und/oder einem Fehlen von Okulomotorikstörungen möglich. (Arena et al., 2015)

Zu den physiologischen Pathologien zählen die Verminderung oder der komplette Verlust des Schreckreflexes, vermindertes Augenblinzeln (Fine et al., 1998) und Schlafstörungen. Veränderungen in Kognition und Verhalten, bedingt durch eine gestörte Funktion des Frontallappens, treten früh auf (Grafman et al., 1990). Im Verlauf entsteht eine subkortikofrontale Demenz mit Denkverlangsamung und verminderten Exekutivfunktionen (Pillon et al., 1991). Außerdem präsentieren sich die Patienten oftmals apathisch (Litvan et al., 1998).

Betreffend die Basalganglien kommt es zur frühen Affektion des Globus pallidus internus und der Substantia nigra, Pars reticulata. Diese Tatsache könnte eine mögliche Erklärung für die Resistenz gegenüber L-Dopa sein (Hardman et al., 1997a; Hardman and Halliday, 1999). Zusätzlich zu den beiden genannten Strukturen kann auch der Nucleus subthalamicus betroffen sein, was bei den Patienten zu klassischen Parkinsonsyndromen führt (Hardman et al., 1997b).

1.3.2 MORBUS ALZHEIMER

Die Tauopathie M. Alzheimer (AD) ist charakterisiert durch amyloide Plaques in der ECM und neurofibrilläre Tangles (NFT) in der Intrazellulärmatrix (Crews and Masliah, 2010; Ittner and Gotz, 2011). Subkortikale Areale sind unterschiedlich stark von AD betroffen, allerdings werden bei AD keine Augenbewegungsstörungen beschrieben (Kennard and Leigh, 2011). Passend zu einer möglichen protektiven Rolle von PN wurde die Beobachtung gemacht, dass PN-reiche Hirnareale bei Alzheimer-Fällen im Allgemeinen weniger von Degeneration betroffen sind (Bruckner et al., 1999). Die Tatsache, dass PN im Hirnstamm besonders stark mit Neuronen des Sakkadensystems assoziiert sind, veranlasste eine Arbeitsgruppe in Leipzig dazu, eine mögliche protektive Rolle von PN in post mortem Fällen mit AD zu überprüfen: Nachdem Patienten mit AD keine Augenbewegungsstörungen aufweisen, wurde

vermutet, dass die PN die entsprechenden Neurone vor Degeneration schützen würden. Dazu konnten die Autoren in post mortem Gewebe von AD-Fällen zeigen, dass der nIII und der RIMLF stark ausgeprägte PN enthielten und nahezu keine Neurone mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein, während direkt angrenzende Hirnstammareale sehr wohl degenerierte Neurone aufwiesen (Morawski et al., 2010). Allerdings blieb unklar, inwieweit keine Degeneration aufgrund der Anwesenheit der PN selbst oder aufgrund der unabhängigen Verbreitungswege stattfand.

1.4 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DES PROJEKTS

In Anlehnung an die post mortem Untersuchungen von Alzheimer-Fällen (Morawski et al., 2010) sollen in der vorliegenden Arbeit post mortem Gehirne von Fällen mit PSP mit unterschiedlich ausgeprägten Sakkadenstörungen unter folgenden Fragestellungen untersucht:

- Welche Färbemuster zeigen sich im RIMLF und nIII von menschlichen Kontrollgehirnen beim immunocytochemischen Nachweis verschiedener Komponenten der perineuronalen Netze?
- Inwieweit zeigen sich veränderte Färbemuster der perineuronalen Netze im RIMLF und nIII in post mortem PSP-Fällen mit unterschiedlich ausgeprägten Augenbewegungsstörungen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 KONTROLLEN

Als Kontrolle dienten Schnitte dreier Gehirne von Menschen, die zu Lebzeiten keine neurologischen Defizite aufwiesen und insbesondere keine okulomotorischen Defizite zeigten. Die Gehirne stammten aus der Brain-Bank der Ludwig-Maximilians-Universität und wurden unter Beachtung der ethischen Kriterien, die in der Deklaration von Helsinki 1964 zur medizinischen Forschung am Menschen festgelegt wurden, gewonnen. Ein positives Votum der Ethikkommission der LMU liegt vor.

Kontrolle 1: 71 Jahre, männlich

Todesursache: Multiorganversagen

Neuropathologie: altersentsprechende Taupathologie

Kontrolle 2: 75,9 Jahre, weiblich

Todesursache: septischer Schock mit Herz-Kreislauf-Versagen

Neuropathologie: geringgradige Alzheimer assoziierte Veränderungen Braak Stadium I, CERAD 0, Thal-Phase 0

Kontrolle 3: 62 Jahre, männlich

Todesursache: hepatisch metastasiertes Pankreaskarzinom

Neuropathologie: Alzheimer assoziierte Veränderungen Braak Stadium I, CERAD 0, Thal-Phase 0, NIH-Score: A0 B1 C0

Braak und Kollegen entwickelte eine klinisch-neuropathologische Einteilung für nicht neurologisch Erkrankte, die sich aus bereits etablierten kognitiven Tests und einer quantitativen Analyse von NFT und Neuropilfäden (NT) zusammensetzt (Mufson et al., 2016). Die neuropathologische Einteilung basiert auf der genauen Lokalisation der NFTs und NTs im Gehirn bezogen auf die 6 Schichten des Isocortexes. Man unterscheidet 6 Stadien: Stadium I und II: transentorhinale Veränderungen, Stadium III und IV: Veränderungen im limbischen System, Stadien V und VI: größere Ausdehnung auf den Neokortex (Braak and Braak, 1991). Es zeigte sich, dass im

alternden Gehirn gesunder Menschen NFT und NT nachweisbar sind und dass diese Tau-Pathologien ohne klinisches Korrelat sogar bis Braak Stadium V vorkommen können (Mufson et al., 2016). Um ausschließen zu können, dass eine hochgradige Tauopathie vorliegt, wurden vorab die Schnitte von Kontrollgehirnen auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein angefärbt. Die Immunfärbung mit den zwei verwendeten Antikörpern auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein (TAU oder AT8) zeigte vereinzelte NFTs und NTs bis Braak Stadium I bei zu Lebzeiten symptomlosen Patienten.

Paraffinschnitte aller Kontrollfälle und PSP-Fälle wurden immunhistochemisch auf die unterschiedlichen Komponenten der perineuronalen Netze CSPG, HAPLN1 und ACAN gefärbt. Dabei wurden folgende Regionen gezielt untersucht: RIMLF, nIII, EWcp und als Kontrolle die Oliva superior (SO), die Teil der Hörbahn ist, aber sich ebenfalls durch die Anwesenheit prominenter PN auszeichnet (Schmidt et al., 2010). Zur Dokumentation wurde der Kontrollfall mit den repräsentativsten Färbeergebnissen herangezogen.

2.2 KLINISCHE FÄLLE MIT PROGRESSIVER SUPRANUKLEÄRER PARESE

Es wurden insgesamt 6 verschiedene Gehirne von PSP-Patienten mit klinischer Symptomatik, wie nachfolgend beschrieben, bearbeitet. Die Gehirne wurden von der Brain-Bank der Ludwig-Maximilians-Universität im Rahmen einer gemeinsamen Studie mit Dr. Roeber vom Institut für Neuropathologie zur Verfügung gestellt. Die bearbeiteten Fälle waren zuvor alle durch die Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie anhand der Litvan-Kriterien als PSP-Fälle diagnostiziert worden. Entsprechend der Augenbewegungsstörungen wurden die bearbeiteten PSP-Fälle in drei Schweregrade eingeteilt: In Gruppe 1 zeigten die PSP-Patienten zuletzt eine komplette vertikale Blickparese. In Gruppe 2 wurden neben einer kompletten vertikalen Blickparese verlangsamte horizontale Sakkaden beschrieben. In Gruppe 3 traten eine komplette vertikale und horizontale Blickparese auf. Diese Symptomatik korreliert auch mit den Beobachtungen von PSP-Patienten in Studien. Frühe Stadien zeichnen sich durch vertikale Blickparese aus (Litvan et al., 2000). In späten Stadien liegt eine Kombination aus vertikalen und horizontalen Blickparesen vor (Litvan et al., 2000). Zusätzlich bestehen oft Symptome, wie posturale Instabilität, Stürze,

Pseudobulbärparalyse und Parkinsonismus, die allerdings in jedem klinischen Stadium vorkommen können (Arena et al., 2015). Eine genaue Auflistung der unterschiedlichen Symptomatik der verwendeten Fälle findet sich in Tabelle 2.

Patient 1:

Okulomotorik

7 1/2 Jahre ante mortem: inkomplette vertikale Blickparese beidseits (nach oben deutlicher), horizontaler Endstellnystagmus beidseits.

5 1/2 Jahre ante mortem: Gesichtsfeld fingerperimetrisch vertikal eingeschränkt, inkomplette vertikale Blickparese (nach oben > unten), Endstellnystagmus.

3 Jahre ante mortem: ausgeprägte vertikale Blickparese.

Gangstörungen

7 1/2 Jahre ante mortem: seit Jahren Schwindelsymptomatik und Stürze, Schwindel und Gangunsicherheit werden auf ausgeprägte SAE zurückgeführt.

5 1/2 Jahre ante mortem: Stürze, Gang mit Gehstütze möglich.

Krankheitsdauer: 8 Jahre

Patient 2:

Okulomotorik

4 Jahre ante mortem: vollständige vertikale Blickparese, horizontale Blicksakkaden deutlich verlangsamt mit mäßig verringerter Amplitude, intermittierendes Abweichen des rechten Bulbus nach rechts, keine Doppelbilder.

Gangstörungen

4 Jahre ante mortem: subjektiv: Gleichgewichtsstörung, Gehstrecke deutlich verkürzt (1,5 km), Aufstehen nur mit Aufstützen, Starthemmung; objektiv: Stand breitbasig, schwankend, Stellreflexe deutlich vermindert mit Sturzgefahr nach hinten. Gangbild breitbasig, deutlich ataktisch, nicht kleinschrittig, Wendebewegungen langsam und schwankend, langsame und zögernde Korrekturschritte, kein Extremitätenrigor.

Patient 3:

Okulomotorik

7 Monate ante mortem: vollständig bewegungsunfähige Bulbi, im Rollstuhl sitzender Patient, nach Aufstehen Astasie, Abasie, ausgeprägte Retropulsionsneigung nach rechts hinten, massive mimische Verarmung, keine sprachlichen Äußerungen.

Gangstörungen

7 Monate ante mortem: an den Rollstuhl gebunden bei Astasie, Abasie und Retropulsionsneigung nach rechts hinten.

Krankheitsdauer: mindestens 1 Jahr

Patient 4:

Okulomotorik

3 Jahre ante mortem: ausgeprägte vertikale Blickparese nach unten, mäßig nach oben, deutlich gestörte horizontale Blickbewegung, verschlechterter vertikaler optokinetischer Nystagmus, erhaltenes vertikales Puppenkopffänomen (intakter vertikaler VOR).

1 Jahr ante mortem: im Wesentlichen unverändert.

Gangstörungen

3 Jahre ante mortem: Stand vornübergebeugt, mäßig verminderte Standreflexe (Zugtest: Kippen nach hinten), Gangbild mit verkürzter Schrittlänge, leicht verminderte Mitbewegung der Arme, mäßige Propulsion, Romberg mit mäßig ungerichteter Ataxie.

1 Jahr ante mortem: Gangbild breitbasig, Aufrichten aus dem Sitzen erschwert.

Krankheitsdauer: 4,5 Jahre.

Patient 5:

Okulomotorik

4 Jahre ante mortem: vertikale Blickparese, Ptose rechts.

3,5 Jahre ante mortem: komplette vertikale und horizontale Blickparese bds., inkomplett, sakkadierte Blickfolge horizontal, kein Spontan- oder Blickrichtungsnystagmus, Ptose re. > li.

Gangstörung

4 Jahre ante mortem: Romberg und Unterberger nicht durchführbar, Fallneigung im Romberg.

3,5 Jahre ante mortem: Stand und Gang unsicher, Romberg, Unterberger, Seiltänzer unsicher, Retropulsionstendenz, ataktische Gangstörung mit Fallneigung nach hinten.

Krankheitsdauer: ca. 7 Jahre.

Patient 6:

Okulomotorik

7 Monate ante mortem: vollständig bewegungsunfähige Bulbi; im Rollstuhl sitzender Patient, nach Aufstehen Astasie, Abasie, ausgeprägte Retropulsionsneigung nach rechts hinten, massive mimische Verarmung, keine sprachlichen Äußerungen.

Krankheitsdauer: mindestens 1 Jahr.

Tabelle 2: Übersicht Fälle

<u>Fall</u>	<u>Alter</u>	<u>Geschl.</u>	<u>Vert. Parese</u>	<u>Horiz. Parese</u>	<u>VOR</u>	<u>Gangstörung</u>
Patient 6	70	männl.	+++	+++	∅	∅
Patient 5	66	männl.	+++	+++	∅	ja
Patient 4	77	männl.	+++	++	intakt	ja
Patient 3	70	männl.	+++	+++	∅	rollstuhlpflichtig
Patient 2	69	männl.	+++	+	∅	ja
Patient 1	76	weibl.	+++	-	∅	ja

- = nicht betroffen

∅ = keine Angaben

+ = verlangsamte Sakkaden

++ = inkomplette Parese

+++ = komplette Parese

VOR = vestibulo-okulärer Reflex

2.3 PRÄPARATIONEN

Nach der Obduktion wurden zur weiteren Verwendung der Gehirne die Meningenreste von der Gehirnoberfläche ab präpariert. Der Teil vom Diencephalon bis zum Hirnstamm wurde freigelegt und in einer Paraformaldehydlösung in 0,1M Phosphat-Puffer (pH 7,4) oder 10% Formalin-Lösung für mindestens 14 Tage und höchstens 7 Jahre gelagert. Der frühe PSP-Fall war für eine Dauer von 7 Jahren, der mittlere PSP-Fall für eine Dauer von 4 Jahren und die späten PSP-Fälle mindestens für eine Dauer von 14 Tagen in Formalin eingelegt. Nach der Fixierung wurde das Gewebe zur Weiterverarbeitung in 1cm dicke Blöcke geschnitten, entwässert und in Paraffin eingebettet.

2.4 PARAFFINSCHNITTE

In regelmäßigen Serien wurden von den Paraffinblöcken 10 und 5µm dünne Schnitte mit einem Schlittenmikrotom der Firma R. Jung AG Heidelberg geschnitten. Dabei wurden die Schnitte in einem Wasserbad (Temperatur < 50°C) gestreckt und auf elektrisch geladene Superfrost-Objekträger aufgezogen. Benachbarte Schnittserien von 10µm dicken Schnitten wurden zur Darstellung der Zytoarchitektur verwendet. Die 5µm dicken Schnitte wurden für die immunhistochemischen Färbungen genutzt.

2.5 NISSL-FÄRBUNG UND GALLYAS-FÄRBUNG

Die Zytoarchitektur und Lage der Neurone in den untersuchten Zellgruppen wurde mittels einer Färbereihe von Nachbarschnitten mit Nissl und Gallyas dargestellt. Dadurch war eine bessere Lokalisation der zur Analyse herangezogenen Kernareale möglich. Die Nissl-Färbung erfolgte mit 0,5% Kresylviolett (Protokolle siehe Anhang). Die Gallyas-Färbung ist eine Versilberungsmethode, mit deren Hilfe sich Axone darstellen lassen ((Gallyas et al., 1980), Protokoll siehe Anhang).

2.6 GRUNDSCHRITTE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG

2.6.1 ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte. Dabei wurden die Schnitte für 30 Minuten in gebrauchtem Xylol, und für 2 x 15 Minuten in frischem Xylol eingestellt, wodurch das Paraffin gelöst wurde. Die Rehydrierung erfolgte dann in einer von 100% bis 70% absteigenden Alkoholreihe für jeweils zehn Minuten und einer abschließenden Spülung in destilliertem Wasser.

2.6.2 ANTIGEN-DEMASKIERUNG

Als etabliertes Verfahren zur Demaskierung von Antigenen gilt die Vorbehandlung in der Mikrowelle mittels feuchter Hitze (Cattoretti et al., 1993; Munakata and Hendricks, 1993). Die Schnitte wurden in 0,01M Natrium-Citrat-Puffer (pH 6) in der Mikrowelle auf höchster Stufe (Stufe 8 bei 1000 W) in Teilschritten von 5 x 3 Minuten unter Nachfüllen der Pufferlösung inkubiert und danach bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten belassen. Der Kochvorgang wurde in regelmäßigen Abständen unterbrochen, um zu verhindern, dass die oberen Schnittränder durch zu rasche Verdunstung austrocknen. Es folgte eine kurze Spülung in destilliertem Wasser und eine dreimalige Spülung in 0,1M TBS-Puffer (pH 7,4) für jeweils 5 Minuten.

2.7 EINZEL- UND DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

2.7.1 ANTIKÖRPER

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit zwei, gegen unterschiedliche Antigene gerichteten Primärantikörpern durchgeführt. Die Visualisierung der Immunreaktion wurde mittels Streptavidin-Biotin-Technik realisiert. Dafür kommen biotinylierte sekundäre Antikörper, Diaminobenzidin (DAB) und Nickel-Diaminobenzidin (DAB-Ni) zur Anwendung (Scully et al.). Zur Visualisierung des ersten Primärantikörpers wurde die DAB-Ni-Reaktion verwendet, zur Visualisierung des zweiten Primärantikörpers nur das reine DAB. Die Primärantikörper dürfen nicht aus derselben Spezies sein, da sonst Kreuzreaktionen auftreten. Diese Reihenfolge bedingt, dass sich das Färbeprodukt nach DAB-Ni-Reaktion schwarz und nach DAB ohne Nickelzusatz braun darstellt. Zusätzlich wurden zum Vergleich noch benachbarte Schnitte auf nur einen Marker gefärbt. Je nachdem ob degenerierte Neurone oder PN visualisiert werden sollten, wurde die DAB-Reaktion alleine oder in Kombination mit Nickel durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Primärantikörper beschrieben, deren detaillierte Informationen in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

2.7.1.1 ANTIKÖRPER GEGEN KOMPONENTEN DER PERINEURONALEN NETZE

Zur Darstellung der PN wurden drei Antikörper eingesetzt, die gegen unterschiedliche Komponenten der kondensierten ECM gerichtet sind, nämlich anti-CSPG, anti-HAPLN1 und anti-ACAN. Um die Synapseneingänge zu untersuchen, wurde ein Antikörper gegen Synaptophysin (anti-Syn) herangezogen.

2.7.1.1.1 ANTI-CSPG

Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Cat-301 (Firma: Chemicon, USA, Verdünnung 1:500) eingesetzt (Bertolotto et al., 1991). Cat-301 ist ein Klon, des sich auf Oberflächen von Neuronen befindlichen großmolekularen CSPG (Margolis and Margolis, 1997). Cat-301 ist dem Aggrecan strukturell sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass Cat-301 nicht glykosiliert ist.

2.7.1.1.2 ANTI-HAPLN1

Ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen das sogenannte HA-und Proteoglykan-Link-Protein (Firma: R-D Systems, Deutschland, Verdünnung 1:400) und generiert in der Ziege, wurde verwendet. Als Link-Protein stabilisiert HAPLN1 die Verbindung zwischen den extrazellulär gelegenen Proteoglykanen und HA (Carulli et al., 2007). Dieser Antikörper besitzt die Fähigkeit, humanes HAPLN1 zu erkennen und zeigt eine Kreuzreaktion mit HAPLN4 in 5% der Fälle.

2.7.1.1.3 ANTI-ACAN

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifisch gegen humanes Aggrecan gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper (Firma: Acris Antibodies, Deutschland, Verdünnung 1:50) verwendet (Brückner et al., 2008). ACAN gehört zur ACAN/Versican-Proteoglykan-Familie und ist eine Hauptkomponente der ECM (Lendvai et al., 2013). Das ACAN-Proteoglykan besteht hauptsächlich aus CS, besitzt aber auch Keratan-Sulfat-Ketten und N/O-verlinkte Oligosaccharide.

2.7.1.1.4 ANTI-SYNAPTOPHYSIN

Synaptophysin (Syn) ist ein integrales Glykoprotein, das in der Membran präsynaptischer Vesikeln von Nervenzellen zu finden ist. Deshalb diente der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Synaptophysin (Firma: Chemicon, USA, Verdünnung 1:2000) als Marker für Synapsenendigungen (Wiedenmann and Franke, 1985).

2.7.1.2 ANTIKÖRPER GEGEN HYPERPHOSPHORYLIERTE TAU-PROTEINE

Die immunhistochemische Färbung auf die perineuronalen Netze oder auf Synapsenendigungen wurde mit der Färbung von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen kombiniert. Zur Bestimmung des Schweregrades der Degeneration von Neuronen wurden zwei Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein

verwendet, der monoklonale Maus-anti-Tau-Antikörper (AT8), dessen Färbeeigenschaften sehr gut etabliert sind und einen polyklonalen Kaninchen-anti-Tau-Antikörper (TAU), der auch in den Arbeiten von Morawski und Kollegen eingesetzt wurde (Goedert et al., 1995; Morawski et al., 2010).

2.7.1.2.1 TAU

TAU (Firma: Invitrogen, USA, Verdünnung 1:1000) wurde als Antikörper gegen ein synthetisch hergestelltes Phosphopeptid entwickelt. Dieser Antikörper bindet an Epitope nahe der C-terminalen Region von humanem Tau und reagiert mit allen Isoformen des humanen Taus, abnormal phosphoryliertem Tau und humanen NFT. Es leitet sich von humanen Tau-Proteinen, die Threonin 205 enthalten, ab (Alonso et al., 2001).

2.7.1.2.2 AT8

Bei AT8 (Firma: Thermo Scientific, USA, Verdünnung 1:4000) handelt es sich um ein Antigen, das aus purifizierten, gepaarten helikalen Filamenten (PHF) besteht. Der zugehörige monoklonale Antikörper richtet sich gegen PHF als wesentliche Bestandteile von NFTs. Die phosphorylierten Aminosäuren, an die AT8 bindet, sind Serin 202 und Threonin 205 (Goedert, 1996).

Tabelle 3: Verdünnungsreihe der verwendeten Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Wirt</u>	<u>Antigen</u>	<u>Nummer</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
anti-CSPG	A	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan	MAB5284, Clone Cat-301	Chemicon, Billerica USA	1:500
anti-HAPLN1	B	Hyaluron-und Proteoglykan-Link-Protein	AF2608	R-D-Systems, Wiesbaden Deutschland	1:400
anti-ACAN	A	Aggrecan, Core-Protein	SM1353	Acris Antibodies, Herford Deutschland	1:50
anti-Syn	C	Synaptophysin	AB9272	Chemicon, Billerica USA	1:2000
TAU	C	Humanes Tau	44738G	Invitrogen, Chicago USA	1:1000
AT8	A	Humanes Tau	MN1020	Thermo Scientific, Rockford USA	1:4000

A = Maus
 B = Ziege
 C = Kaninchen

2.7.2 EINZELSCHRITTE DER DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG

Bei Einsatz eines Enzyms (z.B. Peroxidase) mit unterschiedlichen chromogenen Substraten erfolgen die immunhistochemischen Reaktionen nacheinander. So lassen sich unterschiedlich gefärbte Reaktionsprodukte, die eine simultane Darstellung mehrerer Antigene ermöglichen, erzielen.

Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte in 1%igem H₂O₂ in 0,1 M TBS-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Pufferwaschungen erfolgte die Präinkubation mit Serum aus der Herkunftsspezies des Zweitantikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Im Anschluss wurde der Primärantikörper auf die Objektträger getropft und diese wurden dann über 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Pufferwaschung mit 0,1M TBS (pH 7,4) wurde der biotinylierte Sekundärantikörper in 0,1 M TBS in 2%igem Rinderserumalbumin für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgebracht. Anschließend erfolgte die dreimalige Pufferwaschung mit 0,1 M

TBS (pH 7,4) für jeweils 10 Minuten, bevor die Schnitte für 1 Stunde in Extravidin-Peroxidase (EAP) in 0,1 M TBS in 2%igem Rinderserumalbumin inkubiert werden. Nach erneuten Pufferwaschungen erfolgte der Nachweis der Antigenbindungsstelle bei mindestens zehnminütiger Inkubation mit 0,025%igem DAB in 0,015%igem H₂O₂ in 0,05 M TBS-Puffer (pH 8) mit Nickelzusatz. Durch diesen Vorgang heben sich die PN schwarz hervor. Für den Nachweis des zweiten Antigens, hier immer das hyperphosphorylierte Tau-Protein, wurden die Schnitte gewaschen und abermals einer Peroxidaseblockierung für 30 Minuten unterzogen. Für die Präinkubation, die 1 Stunde bei Raumtemperatur läuft, wurde 5%iges Serum in 0,3%igem Triton in 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,4) aufgetragen. Danach wurden die Schnitte in einer Lösung mit einem der beiden genannten Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tauprotein in 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,4) in je nach Antikörper unterschiedlichem Serum für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Pufferwaschung wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper in 0,1 M TBS in 2%igem Rinderserumalbumin für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte getropft. Die anschließenden Schritte mit Inkubation in EAP und die DAB-Reaktion erfolgten wie oben beschrieben. Ein brauner Niederschlag markiert die immunpositiven Strukturen. Abschließend wurden die Schnitte gründlich in der Pufferlösung gewaschen und kurz in Aqua destillata gespült. Die genauen Protokolle für die immunocytochemischen Färbungen finden sich im Anhang.

DEHYDRIERUNG UND EINDECKELUNG

Im Anschluss an die Immunfärbung wurden die Schnitte zum Trocknen ausgelegt. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe von 70% bis 100% und Einbringung in Xylol für 20 Minuten wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium (DPX Mountant for Histology; Fluka 44581) eingedeckelt. Um Neurone darzustellen, wurden die Schnitte zusätzlich mit Hämalaun (nach Mayer) gegengefärbt (siehe Protokolle).

2.8 AUSWERTUNG

2.8.1 LICHTMIKROSKOPISCHE ANALYSE

Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte am Lichtmikroskop. Die Neurone und deren Netze wurden in den untersuchten Kernarealen anhand doppelimmunhistochemischer Färbungen, also Netzmarker kombiniert mit abnormen Tau-Proteinen, identifiziert. Wesentlich für das Auffinden der relevanten Neurone

waren sowohl Landmarken, wie zum Beispiel Ventrikel oder Blutgefäße als auch der Vergleich mit Nissl- oder Gallyas-gefärbten Schnitten zur präzisen Lokalisation.

In den zu untersuchenden Hirnarealen wurden AT8 oder TAU-positive Neurone identifiziert und bei hoher Vergrößerung auf die Ausbildung von PN analysiert. Um die Qualität der Färbung einschätzen zu können, wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Antikörper-Eigenschaften und des Prozesses der Gewebefixierung der Grad der "Hintergrundfärbung" begutachtet. Nach mikroskopischer Darstellung des Kernareals in der Übersicht wurden in einem ersten Schritt einzelne netztragende Neurone bei hoher Vergrößerung für die unterschiedlichen Netzmarker analysiert. Das Auswertungskriterium hierfür war der Zustand der PN, nämlich ob sich komplett, inkomplett ausgebildete oder nahezu vollständig aufgelöste Netze nachweisen ließen. Als nächster Schritt folgte die Korrelation mit den hyperphosphorylierten Tau-Proteinen. Je nach Stärke der Anfärbung, also schwach und hellbraun oder prominent und dunkelbraun, wurde zwischen wenig bis stark betroffenen Neuronen unterschieden. Die Färbungen wurde ebenfalls beurteilt nach der Entwicklungsstufe von Tau-Proteinen und zwar ob neurofibrilläre Pretangles (pNFT), die eher fragmentiert gefärbt sind oder NFT, die eher homogen gefärbt sind, nachweisbar waren. Je stärker die Anfärbung und je homogener das Anfärbungsmuster, desto schwerer ist das Neuron betroffen (Augustinack et al., 2002). Um eine Vergleichbarkeit der Schnitte zu erreichen, bediente man sich Nachbarschnitten, bei denen dieselben Strukturen angefärbt wurden. Zur Bestätigung, dass einzelimmunhistochemische Färbungen dieselben Strukturen wie doppelimmunhistochemische Färbungen zeigen, wurden getrennt Fotos von Nachbarschnitten am Beispiel von AT8 und anti-ACAN und auch AT8 und anti-HAPLN1 in der Übersicht und im Detail gezeigt. Quantitative Analysen der Neurone mit Taupathologie werden im Rahmen einer anderen Studie untersucht (Feige et al., 2013).

Um erste Erkenntnisse zu sammeln, inwieweit noch funktionelle Synapsen an degenerierten Neuronen nachweisbar sind, wurden Schnitte, die auf hyperphosphorylierte Tau-Proteine und Synaptophysin angefärbt waren, qualitativ analysiert und photographisch dokumentiert.

2.8.2 PHOTOGRAPHISCHE DOKUMENTATION

Die gefärbten histologischen Schnitte wurden mit einem Slide-Scanner (Mirax Midi, Zeiss) bei 20-facher Vergrößerung eingescannt. Die digitalisierten Bilder konnten dann am Computer-Bildschirm mit der Software Panoramic Viewer (Versionsnummer 1.15.2) betrachtet, gezoomt und ausgewertet werden. Übersichtsaufnahmen von Kontrollschnitten des nIII, EWcp, RIMLF und Oliva superior (SO) wurden den digitalisierten Schnittbildern entnommen. Übersichtsaufnahmen der PSP-Fälle und Detailaufnahmen sowohl von Kontrollen als auch PSP-Fällen wurden am Lichtmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) mit einer aufmontierten Digital-Kamera (Pixera Pro 600ES; Klughammer) mit Hilfe der Software Viewfinder (Klughammer) angefertigt und auf einem Computer gespeichert. Anschließend wurden sowohl die Übersichtsaufnahmen als auch die Detailaufnahmen mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) in Schärfe, Kontrast, Helligkeit und Farbsättigung so angepasst, dass die Fotografien dem mikroskopischen Bild entsprachen. Das Zusammenfügen und die Beschriftung der Abbildungen erfolgten mit dem Zeichenprogramm Inkscape (Version 0.91, Firma Inkscape Community).

3 ERGEBNISSE

Die Identifizierung der untersuchten Kerne erfolgte an Paraffinschnitten, die mit Kresylviolett zur Darstellung der Zytoarchitektur über die Anfärbung des rauen endoplasmatischen Retikulums (Nissl-Schollen) markiert wurden. Ergänzend dazu wurden Paraffinschnitte mit der Versilberungsmethode (nach Gallyas) zur Darstellung der Fasertrakte gefärbt. Zu diesem Zweck wurden transversale Nachbarschnitte durch die in Abbildung 4 gezeigten Hirnstammebenen B, C und D des Mesencephalon und der Pons gefärbt und analysiert (Abb. 4).

Um zu klären, wie sich die PN bei Anwendung von Antikörpern gegen die verschiedenen Komponenten CSPG, ACAN und HAPLN1 darstellen lassen, wurden zunächst Kontrollfälle ohne neurologische Augenbewegungsstörungen analysiert. Zur genauen Lokalisation der interessierenden Kernareale wurde diese Schnitte mit den Nissl- und Gallyas-Nachbarschnitten verglichen. Die Netzfärbung erlaubte es bei allen drei verwendeten Markern, die zu untersuchenden Kernareale gut von der Umgebung abzugrenzen. Bei Vorversuchen hatte es sich gezeigt, dass zu lange Fixierzeiten in Formalin zu sehr schwachen Anfärbungen der PN, insbesondere bei Detektion von ACAN, führten. Es wurden daher von den drei untersuchten Kontrollgehirnen, die Schnitte mit den besten und konsistentesten Färbeergebnissen zur Analyse ausgewählt und in dieser Arbeit verwendet.

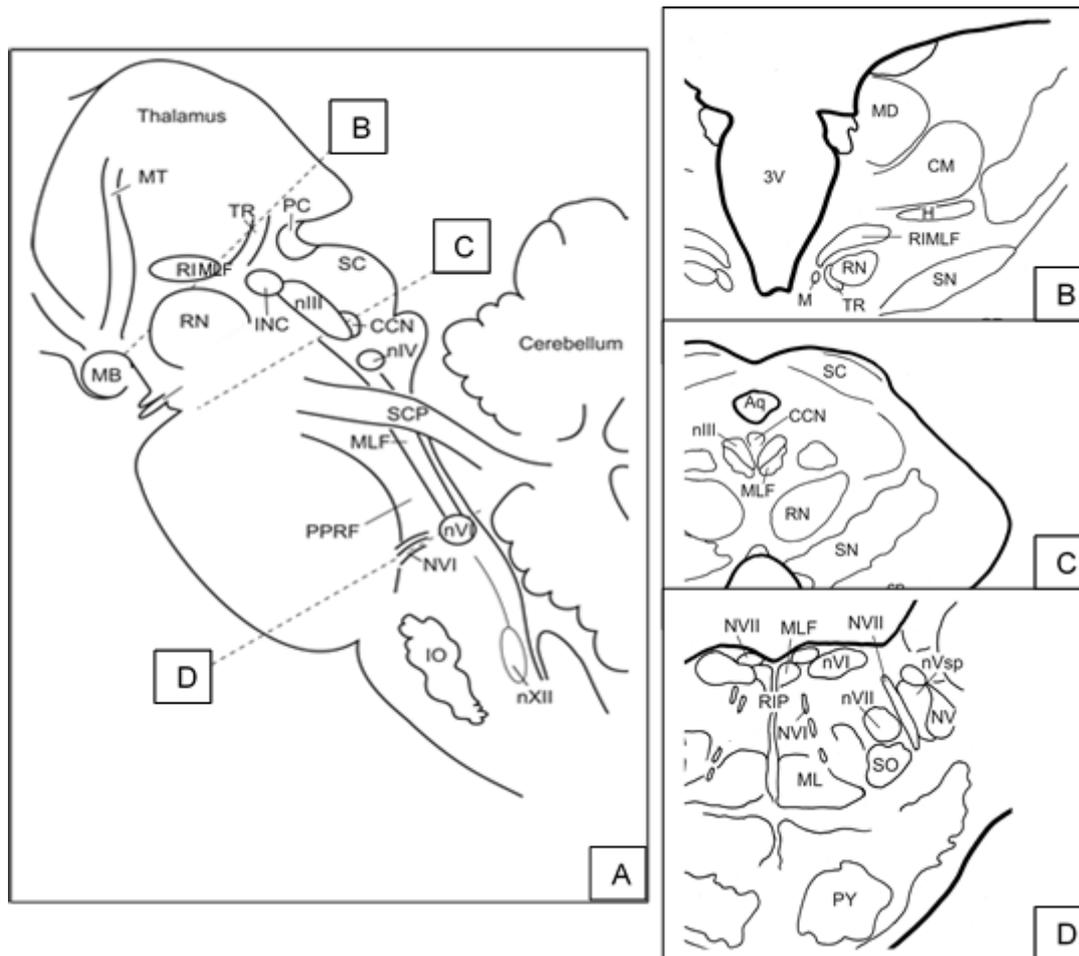


Abbildung 4: Sagittalschnitt durch den Hirnstamm mit korrespondierenden Transversalebene durch für Augenbewegungen relevante Kernareale

Abb. 4 A-D: A zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Sagittalschnitts durch einen humanen Hirnstamm mit Markierung verschiedener Strukturen, die für die Kontrolle der Augenbewegungen und Blickstabilisation wichtig sind. Die Linien repräsentieren die transversalen Schnittebenen der Schemazeichnungen in B, C und D. Relevante Kernareale: B: RIMLF = Rostraler interstitieller Nucleus des Fasciculus longitudinalis medialis, C: nIII = Nucleus oculomotorius, D: SO = Oliva superior.

nIV: Nucleus trochlearis; NV: Nervus trigeminus, nVI: Nucleus abducens; NVI: Nervus abducens; nXII: Nucleus hypoglossus; NVII: Nervus facialis (Facialis-Knie), nVII: Nucleus facialis, Aq: Aquädukt; CCN: Nucleus centralis caudalis; CM: Nucleus centromedianus thalamicus; TR: Fasciculus retroflexus; INC: Nucleus Cajal; IO: Oliva inferior; MLF: Fasciculus longitudinalis medialis; MB: Mammillarkörper; MT: Tractus mamillothalamicus; PC: Commissura posterior; PPRF: paramediane pontine Formatio reticularis; RN: Nucleus ruber; RIP: Nucleus raphe interpositus; SC: Colliculus superior; M: M-Gruppe; MD: Nucleus thalamicus medialis dorsalis, 3V: dritter Ventrikel, SN: Substantia nigra, CP: cerebral Pedunculus, ML: Lemniscus medialis, nVsp: Nucleus spinalis trigeminalis, PY: Pyramiden-Bahn

3.1 UNTERSUCHTE KERNAREALE

3.1.1 *ROSTRALER INTERSTITIELLER NUCLEUS DES FASCICULUS LONGITUDINALIS MEDIALIS (RIMLF)*

3.1.1.1 *LAGE UND ZYTOARCHITEKTUR*

Der RIMLF lässt sich mit der Nisslfärbung nur sehr schwer innerhalb des rostralen Mesencephalon von umgebenden Strukturen abgrenzen (Abb. 5A, B). Er bildet einen flügel förmigen Kern dorsomedial zum Nucleus ruber (RN) und rostral zum Nucleus interstitialis Cajal (INC) (Abb. 5A). Auf transversalen Schnitten wird der RIMLF meist dorsal von der Arteria thalamo-subthalamica begleitet (vgl. Abb. 5B, D; Stern). Die hauptsächlich mittelgroßen Neurone sind locker gepackt (Abb. 5C) und eingebettet in die durchziehenden Fasern des Fasciculus longitudinalis medialis, der sich in der Gallyas-Färbung gut zeigt (Abb. 5D, E).

3.1.1.2 *IMMUNPEROXIDASE-FÄRBUNGEN AUF VERSCHIEDENE KOMPONENTEN PERINEURONALER NETZE*

In den Kontrollhirnen konnte der RIMLF mit Immunperoxidasefärbungen auf verschiedene Bestandteile perineuronaler Netze selektiv innerhalb der rostralen mesencephalen Formatio reticularis angefärbt werden (Abb. 6A, C, E). Er erschien als schmales Band schwarz gefärbter Netze dorsomedial zum RN. In der Detailvergrößerung fällt auf, dass vor allem die mittelgroßen Neurone von prominenten perineuronalen Netzen umhüllt sind (Abb. 6B, D, F). Dabei handelt es sich vermutlich um prämotorische Burst-Neurone für vertikale Sakkaden (Horn et al., 2003a). Die PN weisen in ihrem Erscheinungsbild aufgrund der Anfärbung verschiedener ECM-Komponenten nur kleine Unterschiede auf. Der Antikörper gegen ACAN färbt nur Netzkomponenten, während die Antikörper gegen HAPLN1 und CSPG auch andere ECM-Komponenten, wie zum Beispiel Gliazellen miterfassen (Abb. 6F, Pfeil, 6D, Pfeil).

3.1.1.2.1 *ANTI-AGGRECAN (ANTI-ACAN)*

Die Immunfärbung auf anti-ACAN zeigt klar abgegrenzte PN entlang der Oberflächen von den mittelgroßen Neuronen und deren proximalen Dendriten im RIMLF (Abb. 6A). Dieser Marker ist auf die direkte Umgebung der Neuronenmembran beschränkt und umzeichnet diese selektiv (Abb. 6B). Mittels anti-ACAN lassen sich klar abgrenzbare PN nachweisen, da keine Strukturen im Neuropil angefärbt werden. Außerdem färbt

der anti-ACAN-Antikörper sogenannte Corpora amylacea als Glykoproteineinschlüsse im alternden Gehirn an, was bereits früher beschrieben wurde (Song et al., 2014) (Abb. 6G, Pfeil).

3.1.1.2.1.1 ANTI-CHONDROITINSULFAT-PROTEOGLYKAN (ANTI-CSPG)

Mit der Immunfärbung auf anti-CSPG wurden die PN im RIMLF über eine andere Komponente der ECM dargestellt (Abb. 6C). Ähnlich wie bei der Immunfärbung auf anti-ACAN zeigen sich in der Anfärbung auf anti-CSPG distinkte PN um die Zellsomata und proximalen Dendriten der mittelgroßen putativen Burst-Neurone im RIMLF (Abb. 6D). Zusätzlich treten im Neuropil perizelluläre Anfärbungen auf, die auch Gliazellen und Blutgefäße erfassen (Abb. 6D, Pfeil). Wie bei anti-ACAN werden bei Immunfärbung auf anti-CSPG Corpora amylacea angefärbt (Abb. 6H, Pfeil).

3.1.1.2.1.2 ANTI-HYALURON UND PROTEOGLYKAN LINK-PROTEIN (ANTI-HAPLN1)

Die Immunfärbung auf das anti-HAPLN1 zeigt eine sehr intensive Anfärbung der PN, die als prominente Strukturen entlang der Membranen der Neurone erscheinen (Abb. 6E). Im Unterschied zu den Anfärbungen auf anti-ACAN wird mit diesem Antikörper neben den direkten Netzen um die Neurone auch das Neuropil diffus mit angefärbt- im Vergleich zum anti-CSPG-Antikörper aber geringer (Abb. 6F). Wie bereits bei der Immunfärbung auf anti-CSPG beobachtet, färben sich bei anti-HAPLN1 ebenfalls Blutgefäße und Gliazellen (Abb. 6F, Pfeil). Morawski und Kollegen haben den Begriff „axonal coats“ (AC) für eine Erscheinungsform der ECM -dargestellt über HAPLN1- die perlenkettenartig um Dendriten lokalisiert sind, eingeführt (Morawski et al., 2012b). Solche AC wurden an den Dendriten der Neurone im RIMLF als knopfartige Strukturen um einzelne Terminalen mitgefärbt (vgl. Abb. 8G, Pfeile).

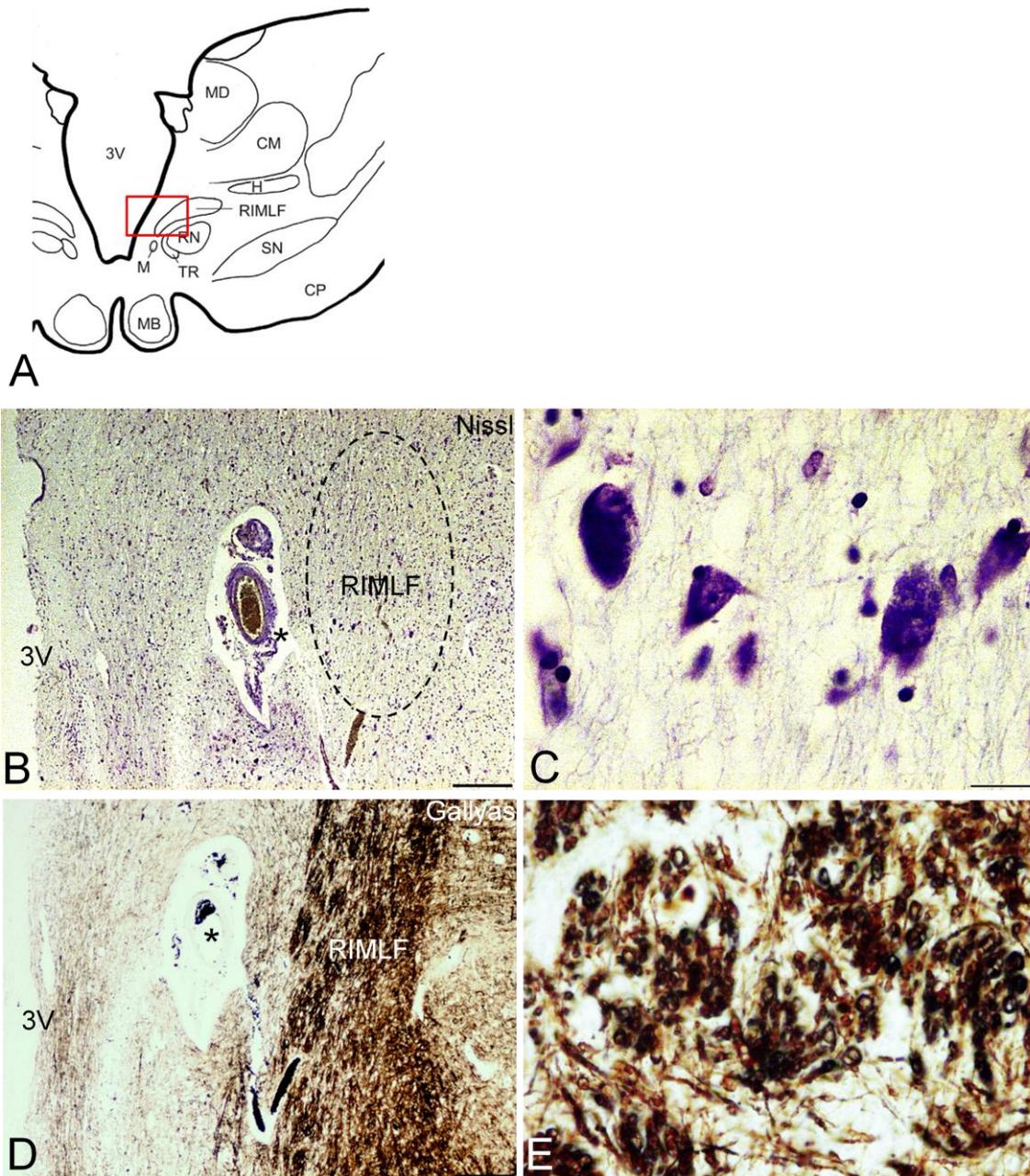


Abbildung 5: Kontrollschnitte RIMLF in Nissl- und Gallyas-Färbung

Abb. 5: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des Rostralen interstitiellen Nucleus des Fasciculus longitudinalis medialis (RIMLF) in Nissl-Färbung (B,C) und in Gallyas-Färbung (D,E) zur Orientierung. Maßstab (B, D) = 100 μ m, Maßstab (C,E) = 200 μ m

Die Schemazeichnung in A zeigt die Lage des RIMLF mit dem Ausschnitt (Rechteck), der in B und D gezeigt wird. In der Übersicht lässt sich der RIMLF in der Nissl-Färbung nicht gut abgrenzen (B), während in der Gallyas-Färbung die durchziehenden Fasern des MLF das Areal gut markieren (D). Die begleitende A. thalamo-subthalamica (B,D, Stern) dient als nützliche Landmarke. Die Detailaufnahmen in C und E zeigen die mittelgroßen putativen Burst-Neurone (C), die zwischen den durchziehenden Fasern des MLF eingebettet liegen.

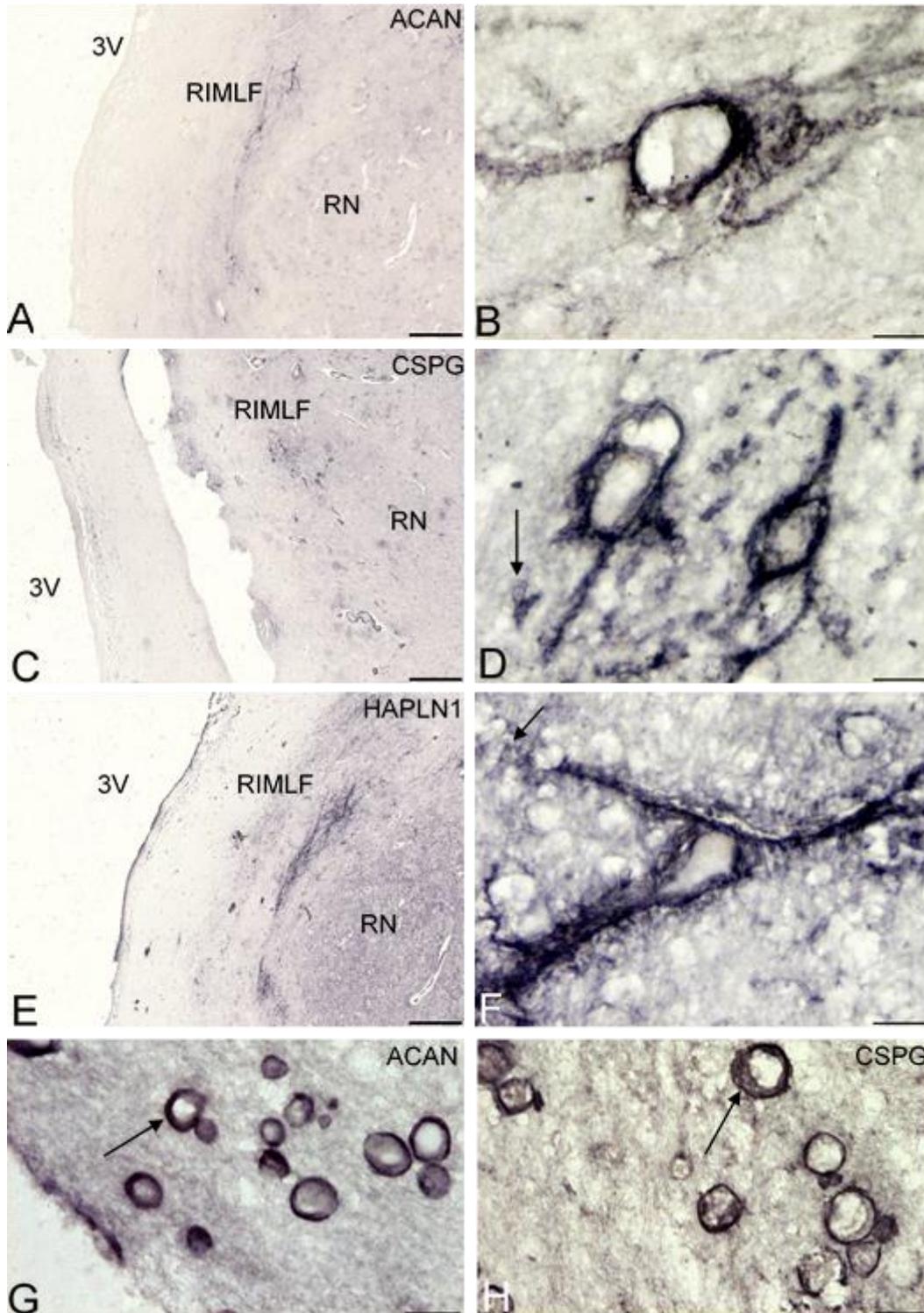


Abbildung 6: Kontrollschnitte RIMLF mit Netzfärbungen

Abb. 6: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des RIMLF in der Übersicht (A,C,E) zur Orientierung. Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN) (A, B), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (C,D) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (E,F). Maßstab (A,C,E) = 100 μ m, Maßstab (B,D,F,G,H) = 200 μ m. In den Übersichtsaufnahmen lässt sich der RIMLF in den verschiedenen PN-Färbungen gut abgrenzen (A,C,E). Die Detailaufnahmen zeigen typische Anfärbungsmuster der PN für die unterschiedlichen Komponenten an putativen Burst-Neuronen (B,D,F). Beachte die Mitanfärbung von Gliazellen (Pfeile), exemplarisch in D und F. Beachte die Mitanfärbung von Corpora amylacea (Pfeile), exemplarisch in G und H.

3.1.2 NUCLEUS OCULOMOTORIUS (NIII) UND NUCLEUS EDINGER-WESTPHAL (EWCP)

3.1.2.1 LAGE UND ZYTOARCHITEKTUR

Der nIII zeigte in der Nissl-Färbung eine klare Abgrenzung innerhalb des Tegmentums im Mittelhirn (Abb. 7B). Er befindet sich unterhalb und ventral des Aquaeductus mesencephalicus und ist von den Fasern des Fasciculus longitudinalis medialis (MLF) umgeben (Abb. 7A). Der nIII enthält multipolare mittelgroße Neurone, die durch deutlich sichtbare Nissl-Schollen charakterisiert sind (Abb. 7D). Innerhalb vom nIII lassen sich einzelne Subgruppen voneinander unterscheiden (Abb. 7B), welche die Motoneuronengruppen der individuellen Augenmuskeln repräsentieren (Zeeh and Horn, 2012; Che Ngwa et al., 2014).

Dorsomedial zum nIII hebt sich der zentral projizierende Teil des EWcp anhand seiner dicht gepackten ovalen oder fusiformen kleinen Neurone mit weniger Nisslschollen ab (Abb. 7C) (Zeeh and Horn, 2012). Der EWcp erstreckt sich nach rostral bis zum mesodiencephalen Übergang und umgreift dort den nIII dorsoventral (Büttner-Ennever and Horn, 2014; Che Ngwa et al., 2014).

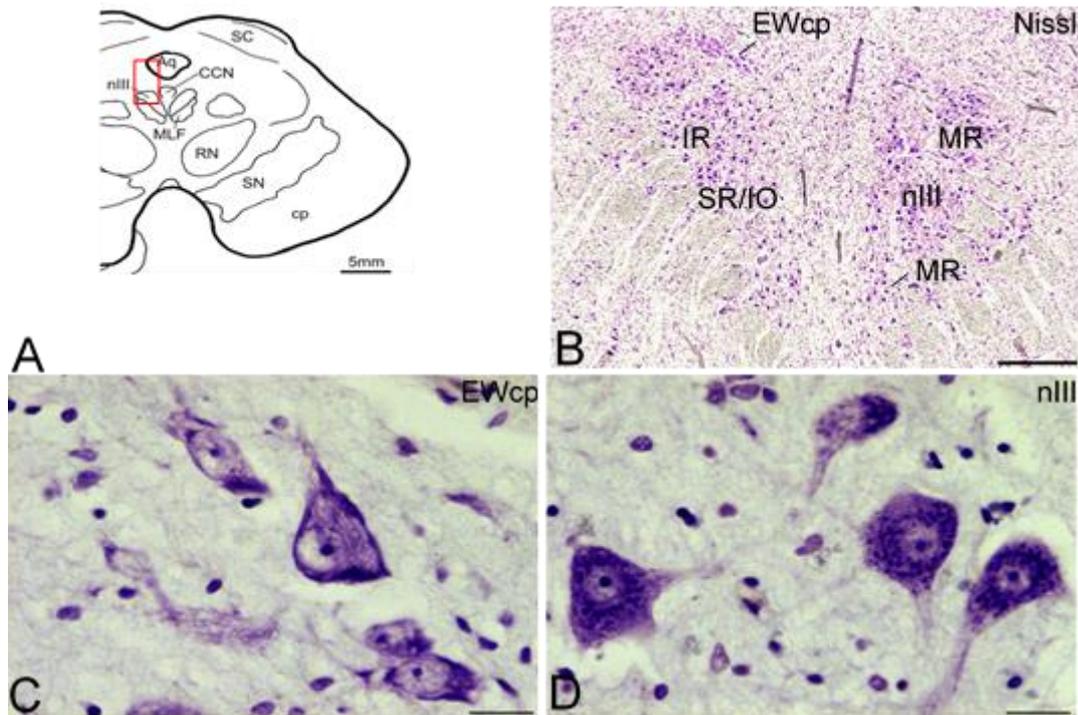


Abbildung 7: Kontrollschnitte nIII in Nissl-Färbung

Abb. 7: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des Nucleus oculomotorius (nIII) und des Nucleus Edinger-Westphal (EWcp) in Nissl-Färbung (B,C,D) zur Orientierung. Maßstab (B) = 100 μ m, Maßstab (C,D) = 200 μ m

Die Schemazeichnung in A zeigt die Lage des nIII und EWcp mit dem Ausschnitt (Rechteck), der in B gezeigt wird. In der Übersicht lassen sich der nIII mit seinen Subgruppen und der EWcp in der Nissl-Färbung gut abgrenzen (B). Die Detailaufnahme in C zeigt modulierende Neurone des EWcp und in D Motoneurone des nIII.

IR: Neurone des M. rectus inferior, SR: Neurone des M. rectus superior, IO: Neurone des M. obliquus inferior, MR: Neurone des M. rectus medialis

3.1.2.2 IMMUNPEROXIDASE-FÄRBUNGEN AUF VERSCHIEDENE KOMPONENTEN PERINEURONALER NETZE IM NIII VON KONTROLLHIRNEN

Die Immunperoxidasefärbung auf PN erlaubt eine einfache Abgrenzung des EWcp vom nIII und dessen Subgruppen mit allen verwendeten Netzmarkern. Allerdings lassen sich die Subgruppen des nIII, wie z.B. die ventral gelegene A-Gruppe der MR-Motoneurone und die dorsolaterale B-Gruppe, die in der Nissl-Färbung als kreisrund und abgesetzt erscheint, sich anhand der PN-Färbung nur schwer voneinander abgrenzen (vgl. Abb. 7B mit Abb. 8A, C, E). Ursache könnten die ebenfalls PN-tragenden Dendriten sein, die in benachbarte Motoneuronengruppen reichen (Evinger, 1988). Außerdem werden an der Mittellinie die Neurone des Nucleus Perlia (NP) durch ihre Umhüllung mit PN als abgesetzte Gruppe erkennbar (Abb.8A, C, E).

3.1.2.2.1 ANTI-AGGRECAN (ANTI-ACAN)

In der anti-ACAN-Immunfärbung erscheint der nIII in der Übersicht distinkt angefärbt, wodurch er sich klar von der angrenzenden mesencephalen Formatio reticularis abgrenzt. (Abb.8A). In der Vergrößerung zeigt sich, dass die anti-ACAN-Immunoreaktivität auf die Membranen der Somata und Dendriten der Neurone des nIII beschränkt ist. Eine sehr diskrete Mitanfärbung des Neuropils kann man aber dennoch beobachten (Abb.8B).

3.1.2.2.2 ANTI-CHONDROITIN-SULFAT PROTEOGLYCAN (ANTI-CSPG)

In der Übersicht zeigt die Immunfärbung auf anti-CSPG ebenfalls eine klare Abgrenzung des nIII innerhalb des mesencephalen Tegmentums. Besonders auffällig ist die distinkte Grenze der Anfärbung zur Mittellinie hin, die an der lateralen Seite eher diffus erscheint (Abb. 8C). Das beruht auf der Ausrichtung der PN-besetzten Dendriten der Motoneurone, die sich nach dorsal und lateral außerhalb der nIII-Grenzen ausstrecken (Evinger, 1988). Der Antikörper gegen CSPG richtet sich gegen mehrere ECM-Komponenten, was möglicherweise ein zusätzlicher Grund für die beobachtete diffusere kranzartige Färbung der Netze um die Motoneurone ist (Abb. 8C). Zusätzlich werden das Neuropil, Blutgefäße und Gliazellen mitmarkiert (Abb. 8D, Pfeil).

3.1.2.2.3 ANTI-HYALURON UND PROTEOGLYKAN LINK-PROTEIN (ANTI-HAPLN1)

Nach Färbung der Netze mit dem Antikörper anti-HAPLN1 grenzen sich diese als geschlossene Kontur um die Motoneurone des nIII ab (Abb. 8E). Im Detail erkennt man die um Somata und Dendriten angeordneten PN (Abb. 8F). Auch hier kommt es zu einer minimalen retikulär imponierenden Mitanfärbung des Neuropils, glialer Zellen und von Blutgefäßen (Abb. 8F, Pfeil). Als Besonderheit zeigen sich in der Darstellung anti-HAPLN1-basierter PN die kugelig erscheinenden AC, die vermutlich synaptische Kontakte umschließen (Abb. 8G, Pfeile).

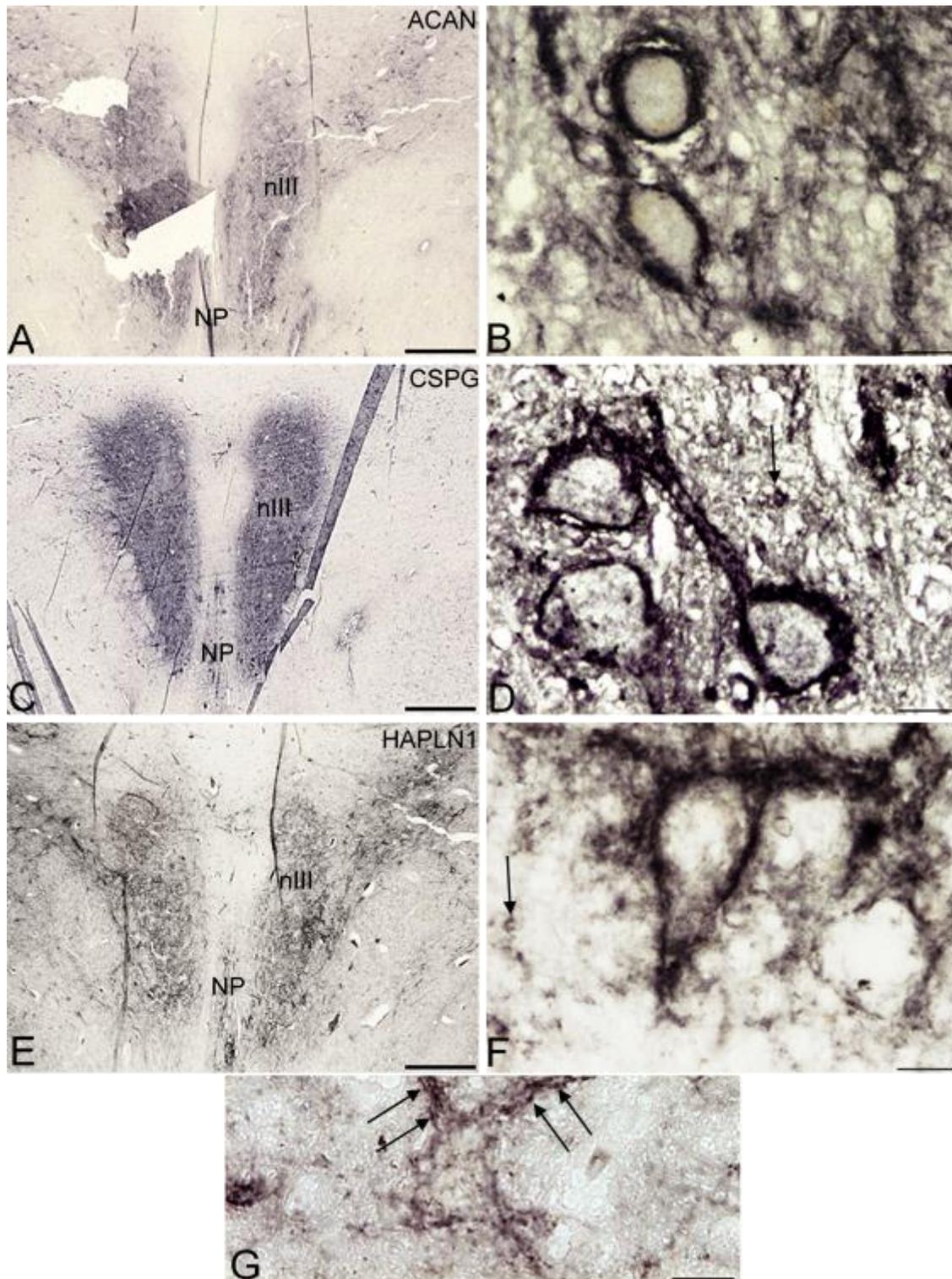


Abbildung 8: Kontrollschnitte nIII mit Netzfärbung

Abb. 8: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des nIII in der Übersicht (A,C,E) zur Orientierung. Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN) (A, B), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (C,D) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykanbindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (E,F). Maßstab (A,C,E) = 100 µm, Maßstab (B,D,F,G) = 200 µm. In den Übersichtsaufnahmen lässt sich der nIII in den verschiedenen PN-Färbungen gut abgrenzen (A,C,E). Die Detailaufnahmen zeigen typische Anfärbungsmuster der PN für die Motoneuronen des nIII (B,D,F). Beachte die Mitanfärbung von Gliazellen (Pfeile), exemplarisch in D und F und von Axonal coats (AC) (Pfeile) um singuläre Synapsenendigungen, exemplarisch in G.

3.1.3 OLIVA SUPERIOR (SO)

Das Kerngebiet der Oliva superior (SO) wurde aus folgenden Gründen als interne Kontrolle für die Immunfärbung der PN ausgesucht und analysiert: 1. Die SO zeichnet sich durch besonders stark ausgeprägte PN aus, die sich auch in überfixiertem Material – zumindest in abgeschwächter Form – zeigen (Schmidt et al., 2010). 2. Die SO ist als Kern der Hörbahn nicht in das neuronale Netzwerk für Augenbewegungen eingebunden. Außerdem gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass die SO bei PSP Taupathologien aufweist. Damit dient die SO als guter Referenzkern für vergleichende Analysen der Anfärbung auf PN und hyperphosphoryliertes Tauprotein.

3.1.3.1 LAGE UND ZYTOARCHITEKTUR

Die SO liegt als Nucleus oliva superior-Komplex im ventrolateralen Tegmentum des pontinen Hirnstamms, nahe des Corpus trapezoideum und des Nucleus facialis mit Nervus facialis (Kulesza, 2008; Che Ngwa et al., 2014). In der Nissl-Färbung ist die SO nicht gut, in der Gallyas-Färbung hingegen deutlich abgrenzbar (Abb. 9A, B, D). Es lassen sich in der Nissl- und besser in der Gallyas-Färbung innerhalb des superioren oliviären Komplexes (SOC) zwei Hauptkerngruppen voneinander unterscheiden, die mediale (MSO) und die kleinere laterale Olive (LSO) (Kulesza, 2008) (Abb. 9B, D, siehe auch Abb. 10A, C, E). In der Gallyas-Färbung werden die durch die LSO und MSO ziehenden Fasern der afferenten Bahnen des Corpus trapezoideum zur SO markiert (Abb. 9D, E). In der beim Menschen gut ausgeprägten MSO imponieren die fusiformen Zellkörper, die eine dichte zentrale Zellgruppe bilden und deren Dendriten von jedem Pol aus horizontal wegziehen und mit den Dendriten der LSO fingerförmig ineinander greifen (Kulesza, 2007) (vgl. Abb. 10B, D, F). In der LSO hingegen finden sich zahlreiche irregulär angeordnete Neurone, die entweder sternförmig, rund oder fusiform sind (Kulesza, 2007) (vgl. Abb. 9).

3.1.3.2 IMMUNPEROXIDASE-FÄRBUNGEN AUF VERSCHIEDENE KOMponenten PERINEURONALER NETZE

Bestimmte Kernareale der SO zeichnen sich durch prominente Netzfärbungen aus. Je nach verwendetem Marker werden entweder nur die direkte Umgebung eines Neurons, wie bei anti-ACAN, oder zusätzliche Strukturen im Neuropil, wie bei anti-HAPLN1 oder auch anti-CSPG gefärbt. Die untersuchten Kontrollschnitte zeigten ausgeprägte, zirkulär um Neurone angeordnete PN. Im SOC sind die Neurone des

MSO und LSO von intensiv gefärbten perineuronalen Netzen umhüllt, die mit den Somata und Dendriten assoziiert sind (Schmidt et al., 2010). Die PN befinden sich im SOC vor allem in mittig gelegenen Kernen und bei Vergleich von MSO und LSO eher im Gebiet der MSO (Schmidt et al., 2010). Außerdem sind die Neurone des Nucleus paraolivaris superior (SPON), des Nucleus periolivaris posterior (PPO) und des Nucleus ventralis des Corpus trapezoidem (LNTB) mit prominenten Netzen ausgestattet (Abb. 10 A, E) (Schmidt et al., 2010). Die prominente Netzfärbung der SO erlaubt es, diese zur Beurteilung der Färbegüte heranzuziehen. Mit allen drei verwendeten Antikörpern zur Darstellung der PN, anti-CSPG, anti-ACAN und anti-HAPLN1, zeigte sich eine intensive Anfärbung der SO. Im Folgenden werden die Unterschiede in der Anfärbung auf die verschiedenen PN-Komponenten beschrieben:

3.1.3.2.1 ANTI-AGGRECAN (ANTI-ACAN)

In der Übersicht erlaubt die Immunfärbung auf anti- ACAN eine klare Abgrenzung gegenüber Nachbarstrukturen im ventrolateralen Tegmentum, wobei MSO und LSO beide gefärbt und gut voneinander abgrenzbar waren (Abb. 10A). In den Detailaufnahmen von Neuronen der MSO zeigen sich alle Neurone assoziiert mit anti-ACAN-positiven PN einschließlich aller Dendriten, die vielfach angeschnitten im umgebenden Neuropil zu sehen sind (Abb. 10B, Pfeile). Auch perioliviär gelegene Neuronengruppen mit PN lassen sich voneinander unterscheiden (Abb. 10A).

3.1.3.2.2 ANTI-CHONDROITIN-SULFAT PROTEOGLYCAN (ANTI-CSPG)

Die Immunfärbung mit anti-CSPG-Antikörpern zeigte PN, die im Vergleich zu den anti-ACAN-basierten PN weniger intensiv gefärbt waren (Abb. 10E). Eine klare anti-CSPG-Färbung fand sich im MSO, aber nur schwach im LSO (Abb. 10C). Die Detailansicht zeigt, dass die anti-CSPG-basierten PN mit den Membranen der Somata und Dendriten assoziiert waren, die im MSO das charakteristische Bild der ineinander verschränkten Dendriten zeigt (Abb. 10D). Die Neurone perioliviärer Kerngruppen, die sich durch eine ausgeprägte Netzfärbung auszeichnen, ließen sich nicht abgrenzen. Außer den neuronalen PN-Färbungen selbst traten zusätzlich perizelluläre Anfärbungen der ECM im Neuropil auf (Abb. 10C) sowie Anfärbungen von Gliazellen und Blutgefäßen.

3.1.3.2.3 ANTI-HYALURON UND PROTEOGLYKAN LINK-PROTEIN (ANTI-HAPLN1)

Die PN-Anfärbung über anti-HAPLN1-Antikörper war am wenigsten spezifisch, da sich in den umliegenden Arealen des ventrolateralen pontinen Tegmentes zahlreiche immunpositive Zellprofile fanden (Abb. 10E). Auch innerhalb des SO wurde neben MSO und LSO der lateral gelegene perioliväre Komplex angefärbt. Der anti-HAPLN1-Antikörper zeigte jedoch die größte Robustheit gegenüber Überfixierung, und führte im SOC in allen Fällen immer zu positiven Anfärbungen. Ähnlich zu anti-CSPG ermöglicht die immunhistochemische Färbung mit anti-HAPLN1 eine Abgrenzung netztragender Neurone von ihrer Umgebung, allerdings nicht so selektiv wie anti-ACAN (Abb. 10E). In der Detailansicht zeigt sich hier ebenfalls eine enge Assoziation anti-HAPLN1-basierter PN mit den Somata und Dendriten der Neurone im SOC (Abb. 10F). Auch anti-HAPLN1 führt zu einer Färbung von perioliviären Kernkomplexen (Abb. 10E). Die zusätzliche Markierung von Blutgefäßen und glialer Zellen bewirkte einen diffusen Hintergrund in der Immunfärbung auf anti-HAPLN1.

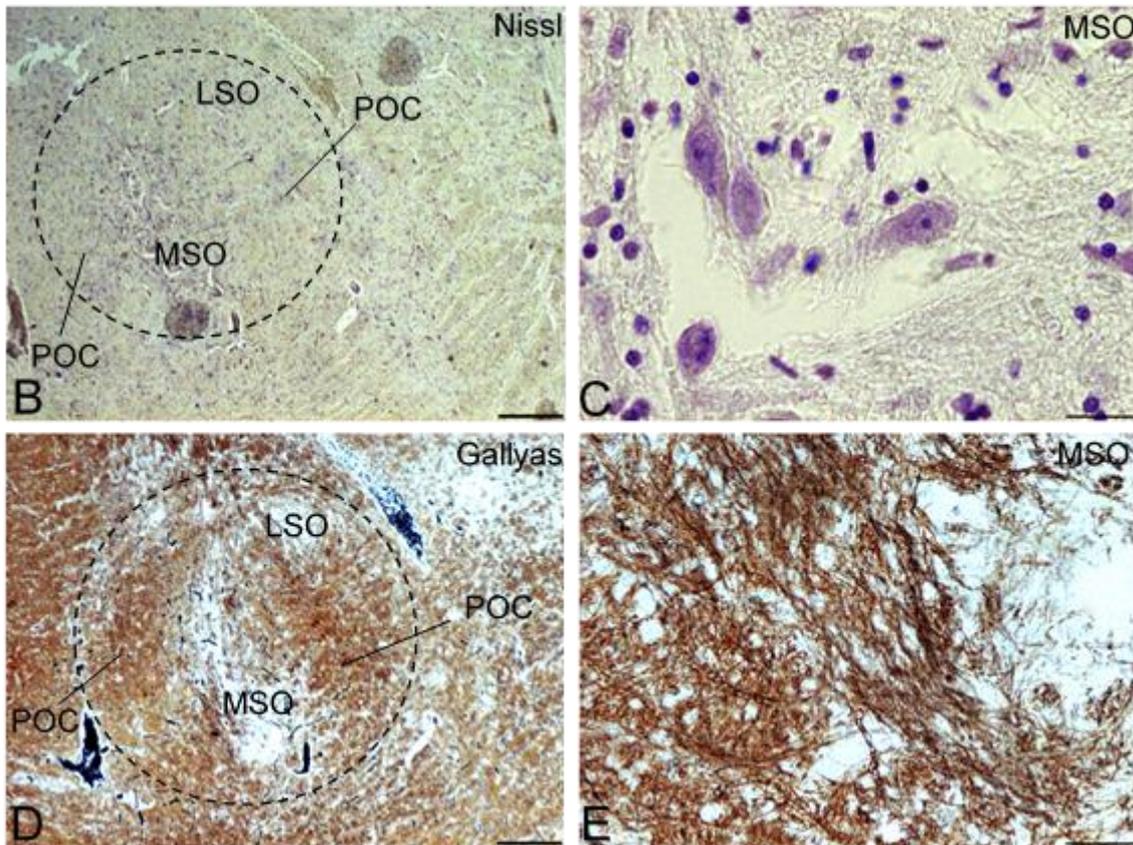
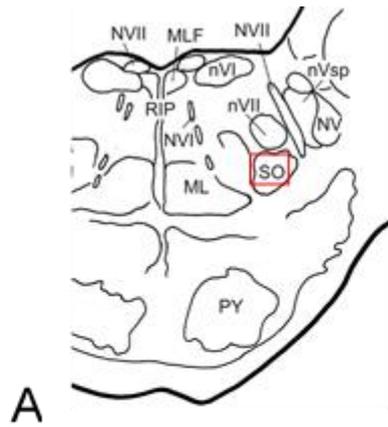


Abbildung 9: Kontrollschnitte SO in Nissl- und Gallyas-Färbung

Abb. 9: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe Oliva superior (SO) in Nissl-Färbung (B,C) und Gallyas-Färbung (D,E) zur Orientierung. Maßstab (B,D) = 100µm, Maßstab (C,E) = 200µm. Die Schemazeichnung in A zeigt die Lage des SO mit dem Ausschnitt (Rechteck), der in B und D gezeigt wird. In der Übersicht lässt sich die SO in der Nissl-Färbung nicht gut abgrenzen (B), während die durchziehenden Fasern des Corpus trapezoideum in der Gallyas-Färbung besser abgrenzbar sind (D). Die Detailaufnahme in C zeigt die parallel angeordneten Neurone der medialen Oliva superior (MSO), die Detailaufnahme in E zeigt durchziehende Fasern des Corpus trapezoideum. Die SO ist von Kernen des perioliviären Komplex (POC) umgeben - repräsentiert durch die gestrichelte Linie um die SO (vgl. B,D).

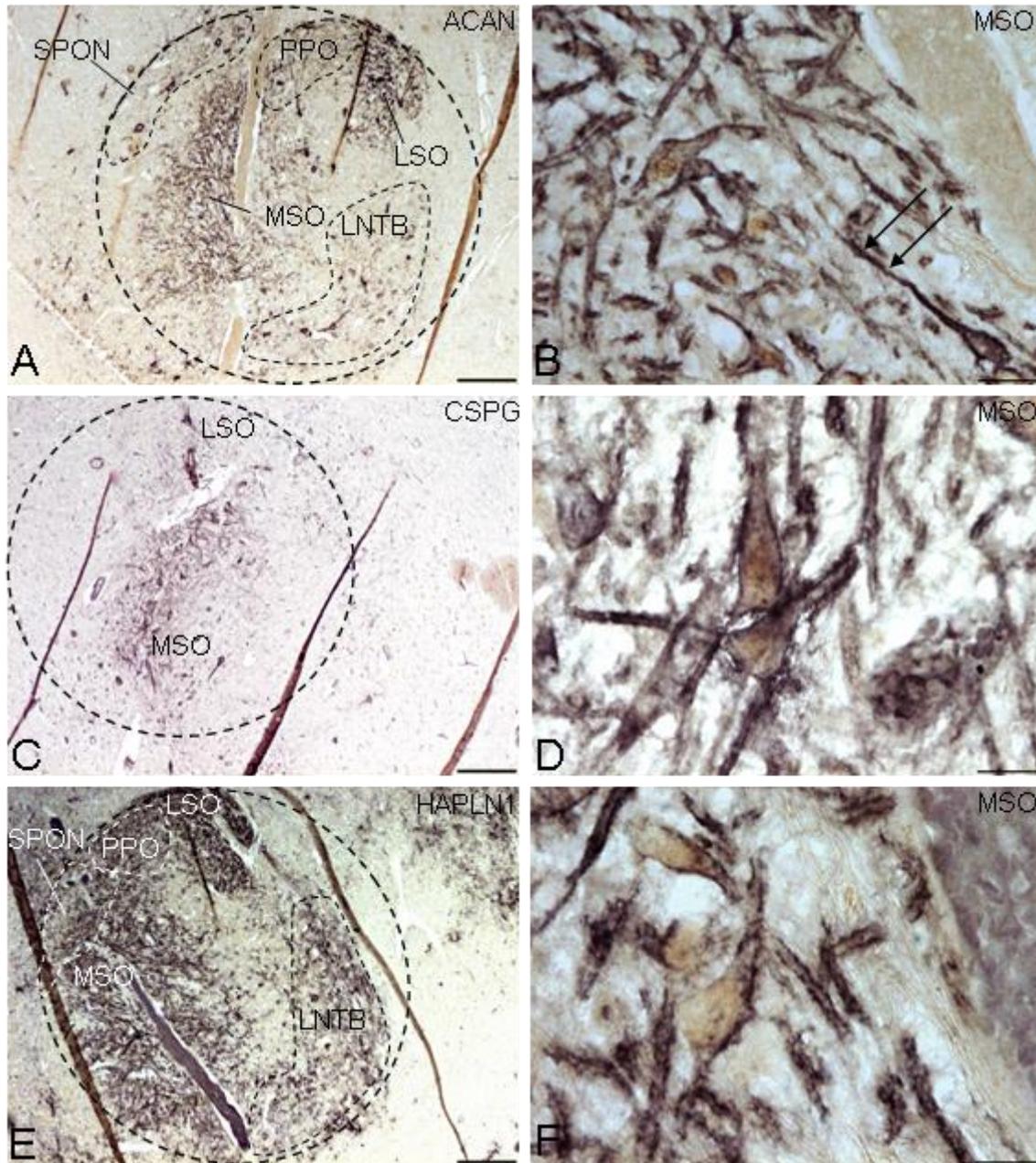


Abbildung 10: Kontrollschnitte SO mit Netzfärbungen

Abb. 10: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe der SO in der Übersicht (A,C,E) zur Orientierung. Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN) (A,B), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (C,D) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (E,F). Maßstab (A,C,E) = 100 µm, Maßstab (B,D,F) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen lässt sich die SO in den verschiedenen PN-Färbungen gut abgrenzen (A,C,E). Die Detailaufnahmen zeigen typische Anfärbungsmuster der PN für die unterschiedlichen Komponenten an parallel angeordneten Neuronen der MSO (B,D,F).

Beachte die Mitäufärbung von Dendriten, exemplarisch in B (Pfeile). Beachte in A und E die PN-positiven Neurone des Nucleus parolivaris superior (SPON), des Nucleus periolivaris posterior (PPO) und des Nucleus ventralis des Corpus trapezoideum (LNTB).

3.2 FÄRBEMUSTER DER TAU-PROTEINE

Die Tauopathie PSP wurde mit Hilfe von zwei Antikörpern, die gegen das hyperphosphorylierte Tau-Protein gerichtet sind und in verschiedenen Spezies generiert waren (AT8 in Maus, TAU im Kaninchen), detektiert (Morcinek et al., 2013). Bei vergleichenden Analysen der verwendeten Tau-Antikörper zeigten sich keine Unterschiede im Anfärbungsmuster, sodass jeweils der Antikörper mit dem aussagekräftigsten Färbeergebnis herangezogen wurde. Die Antikörper dienten dazu, tau-positive Ablagerungen in neuronalen und glialen Strukturen in den subkortikalen Arealen der analysierten Hirnstammschnitte nachzuweisen. Der Immunperoxidase-Nachweis der gebundenen Antikörper über DAB führte zu einer Braunfärbung der betroffenen Neurone und Gliazellen. Die Zellkörper von Neuronen zeigten intensiv gefärbte pNFT und NFT (Abb. 12A) oder NT (Abb. 12D, Pfeile) (Morcinek et al., 2013). In Gliazellen traten tau-positive Einschlüsse in Oligodendrozyten als sogenannte „coiled bodies“ (Abb. 12B, Pfeile), in Astrozyten als „tufted astrocytes“ auf (Abb. 12C, Pfeile) (Tawana and Ramsden, 2001; Yoshida, 2014). Charakteristisch für tau-positive Neurone ist, dass sie kompakte, dichte, filamentöse Aggregate kugelförmiger neurofibrillärer Tangles besitzen (Tawana and Ramsden, 2001).

NFTs bilden fein verwobene Filamente, die parallel angeordnet sind und das Zytoplasma von Neuronen komplett ausfüllen können (Abb. 12A). (Tawana and Ramsden, 2001)

Während NFTs diffus verstreut sind, weisen tufted astrocytes und coiled bodies eine lokale Verteilung auf. Die coiled bodies sind als tau-positive Proteine ringartig in den Oligodendrozyten nachweisbar (Abb. 12B). Tufted astrocytes erkennt man an ihrer sternartigen Anfärbung in Astrozyten (Abb. 12C). Tufted astrocytes sind außerdem pathognomonisch für PSP (Yoshida, 2014).

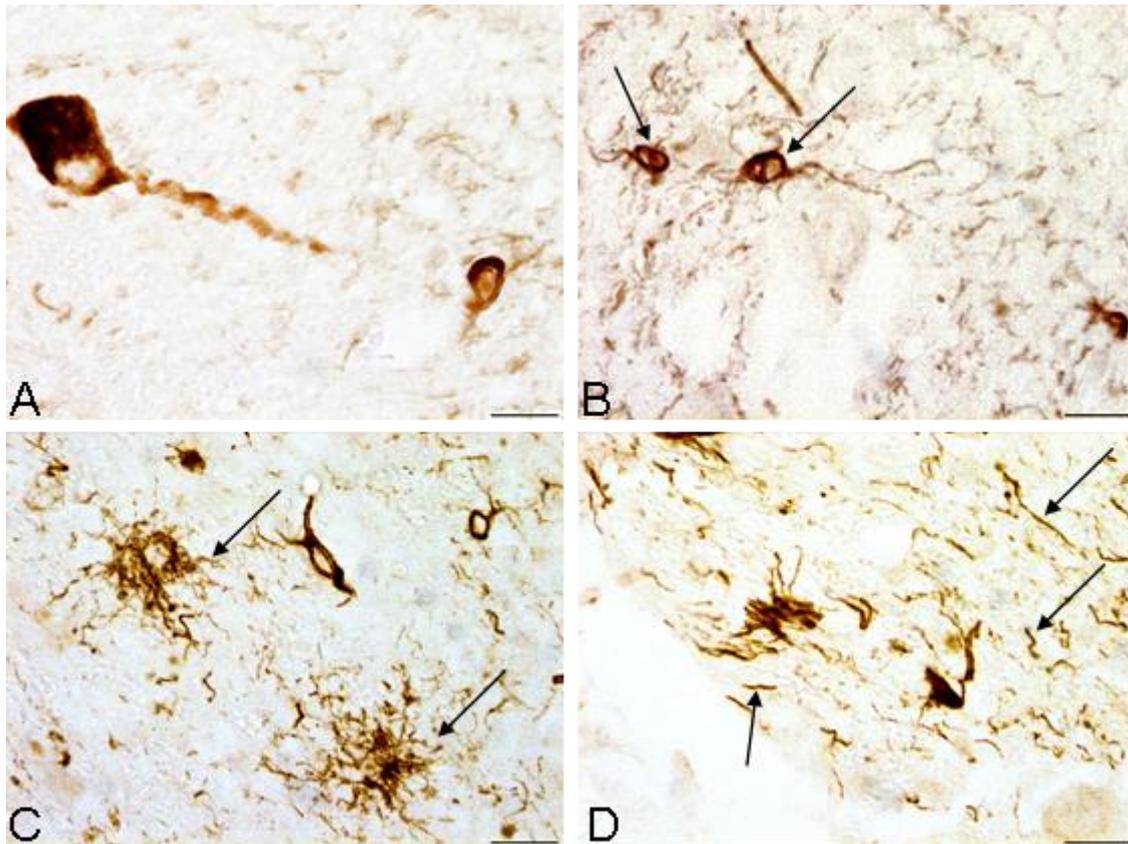


Abbildung 11: Tau-Pathologie-Erscheinungsformen

Abb. 11: Detaillenaufnahmen der verschiedenen Tau-Pathologie-Erscheinungsformen eines Gehirns mit PSP über eine Immunfärbung auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT8-Antikörper): neurofibrilläre Tangles (NFT), die das Zytoplasma von Neuronen komplett ausfüllen können (A), Neuropilfäden (NT) (D, Pfeile), Tau-Ablagerungen in glialen Zellen, die sie als „coiled bodies“ in Oligodendrozyten (B, Pfeile) oder als „tufted astrocytes“ (C, Pfeile) erscheinen lassen. Maßstab (A,B,C,D) = 200µm.

3.2.1 TAU-PATHOLOGIE UND DEREN FÄRBE-MUSTER BEI DEN KONTROLLEN

In Bezug auf den RIMLF zeigte die Immunfärbung auf hyperphosphorylierte Tau-Proteine, dass keine AT8- oder TAU-positiven Neurone auftraten (Abb.12 B, D). Die Pfeile in Abb. 12 B und D zeigen auf intakte, putative Burstneurone. Einige wenige NT konnten aber dargestellt werden. Im Kerngebiet des nIII waren nach Anfärbung mit AT8- oder TAU-Antikörpern keine positiv gefärbten Neurone sichtbar (Abb. 12 A, C). Vereinzelt ließen sich NT abgrenzen. Auch in der SO konnten nur vereinzelt NT in der AT8-Färbung nachgewiesen werden. Im EWcp hingegen zeigten sich mehrere pNFT und NFT, exemplarisch in Abb. 12 C.

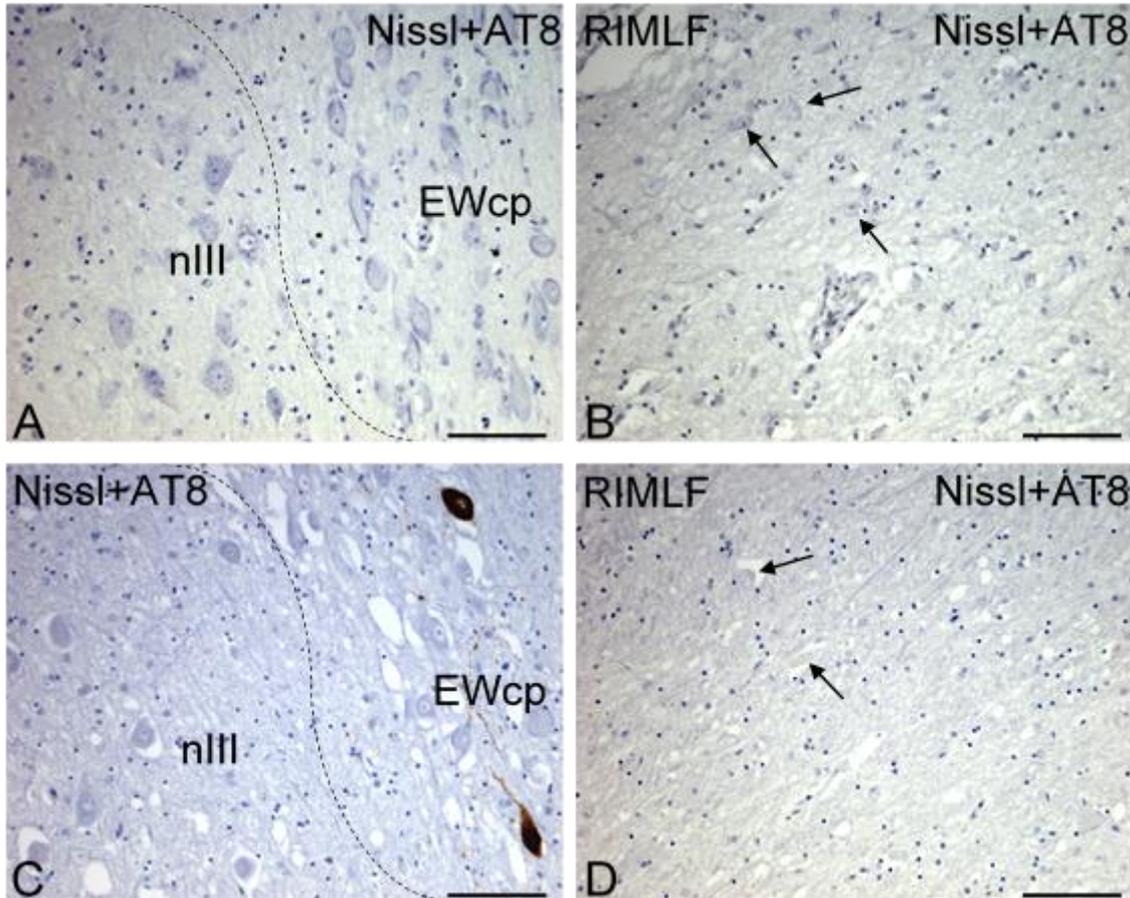


Abbildung 12: Kontrollschnitte RIMLF, nIII und EWcp mit kombinierter Nissl- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 12: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des RIMLF (B,D), des nIII und des EWcp (A,C) mit kombinierter Nissl- und Tau-Protein-Färbung zweier Kontrollen. Maßstab (A,B,C,D) = 100 µm.

Die Burst-Neurone (Pfeile) des RIMLF und die Motoneurone des nIII zeigen keine Tau-Pathologie, während bei den modulatischen Neuronen des EWcp Tau-positiv Neurone abgrenzbar sind (C).

3.2.2 TAU-PATHOLOGIE UND DEREN FÄRBEMUSTER BEI PSP-FÄLLEN

Alle hier untersuchten PSP-Fälle weisen eine mehr oder minder starke Tau-Pathologie im RIMLF und nIII auf. Eine systematische quantitative Untersuchung der Tau-Pathologie der funktionellen Sakkadeneurone im RIMLF, PPRF, Omnipause-Neurone und Motoneuronen bei PSP-Fällen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Sakkadenstörungen erfolgt im Rahmen einer gesonderten Studie, deren vorläufige Ergebnisse zeigt, dass die Anzahl Tau-positiver Neurone bei PSP-Fällen mit ausgeprägten Blickpareesen höher war als bei PSP-Fällen ohne Blickpareesen (Feige et al., 2013). Neben der Anzahl betroffener Neurone konnte man unterschiedliche Muster der immunzytochemischen Expression von hyperphosphoryliertem Tau-Protein detektieren: Neurone mit schwach oder mittelstark braun gefärbten Granula und

homogen dunkelbraun gefärbte Neurone. Bei geringgradig betroffenen Neuronen erscheint die Färbung der hyperphosphorylierten Tau-Proteine granulär, was auch als pNFT bezeichnet wird (vgl. folgende Abb., v.a. Abb.14-15). In Bezug auf stärker gefärbte Neurone zeigt sich ein weitaus homogeneres Bild. In diesen Fällen spricht man von NFT (vgl. folgende Abb., v.a. Abb.14-15). Die Dendriten kommen als fragmentierte Strukturen zur Darstellung oder sind von der Färbung komplett ausgespart. Oftmals lassen sich NFTs, also Anfärbungen im Zytoplasma von Neuronen, detektieren, der Kern aber bleibt ausgespart. Auch Gliazellen und NT können mitmarkiert sein.

3.2.2.1 ROSTRALER INTERSTITIELLER KERN DES FASCICULUS LONGITUDINALIS MEDIALIS (RIMLF)

Bei allen untersuchten PSP Fällen mit beschriebenen vertikalen Blickpareesen wurden mit beiden Tau-Antikörpern immunpositive Neurone im RIMLF nachgewiesen. Der frühe Fall weist vor allem NT, aber auch vereinzelt pNFT auf (Abb. 13B). Betreffend den intermediären Fall zeigen sich mittelbraun bis dunkelbraun markierte Neurone neben NT (Abb. 13D). Der späte Fall zeichnet sich durch vermehrte pNFT und NFT aus. Auch die Dendriten sind von der Tauopathie miterfasst (Abb. 13F).

3.2.2.2 NUCLEUS OCULOMOTORIUS (NIII) UND NUCLEUS EDINGER-WESTPHAL (EWCP)

3.2.2.2.1 NIII

Fälle mit inkompletter vertikaler Blickparese (Fall I) zeigten im nIII wenige Neurone mit einer AT8- oder TAU-Immunfärbung zum Nachweis hyperphosphorylierter Tau-Proteine, die sich eher im Randbereich abzeichneten. Dabei fanden sich vorwiegend pNFT und nur vereinzelt Neurone mit neurofibrillären Ablagerungen, die das gesamte Zytoplasma erfassen (Abb. 13A). Bei fortgeschrittenen PSP-Fällen mit einer kompletten vertikalen Blickparese (Fall II) finden sich etliche Motoneurone mit einem pNFT-Erscheinungsbild, aber auch zunehmend mehr gleichmäßig mittelbraun gefärbte AT8- oder TAU-positive Neurone (Abb. 13C). Zusätzlich wurden bei diesem Fall im Vergleich zum frühen Fall mehr AT8- oder TAU-positive Gliazellen und NT angefärbt (Abb. 13C). PSP-Fall III, der klinisch eine komplette Blickparese aufwies, zeigte in der Tau-Immunfärbung eine hohe Anzahl an Motoneuronen mit neurofibrillären Ablagerungen, die das komplette Zytoplasma ausfüllten - also NFT

(Abb. 13E). Stark vermehrt zeigten sich außerdem NT und immunpositive Gliazellen im Neuropil (Abb. 13E).

3.2.2.2 *EWCP*

Im Unterschied zum nIII waren im EWcp bereits in PSP-Fall I zahlreiche AT8- oder TAU-positive Neuronen als NFT neben NT auffällig. Bei den Fällen mit inkompletter und kompletter vertikaler Blickparese ließen sich außer den NT zahlreiche NFT nachweisen (Abb. 13A,C). Bei Analyse des Falls mit kompletter Blickparese zeigte sich eine große Anzahl homogen gefärbter, dunkelbrauner Neurone (Abb.13E).

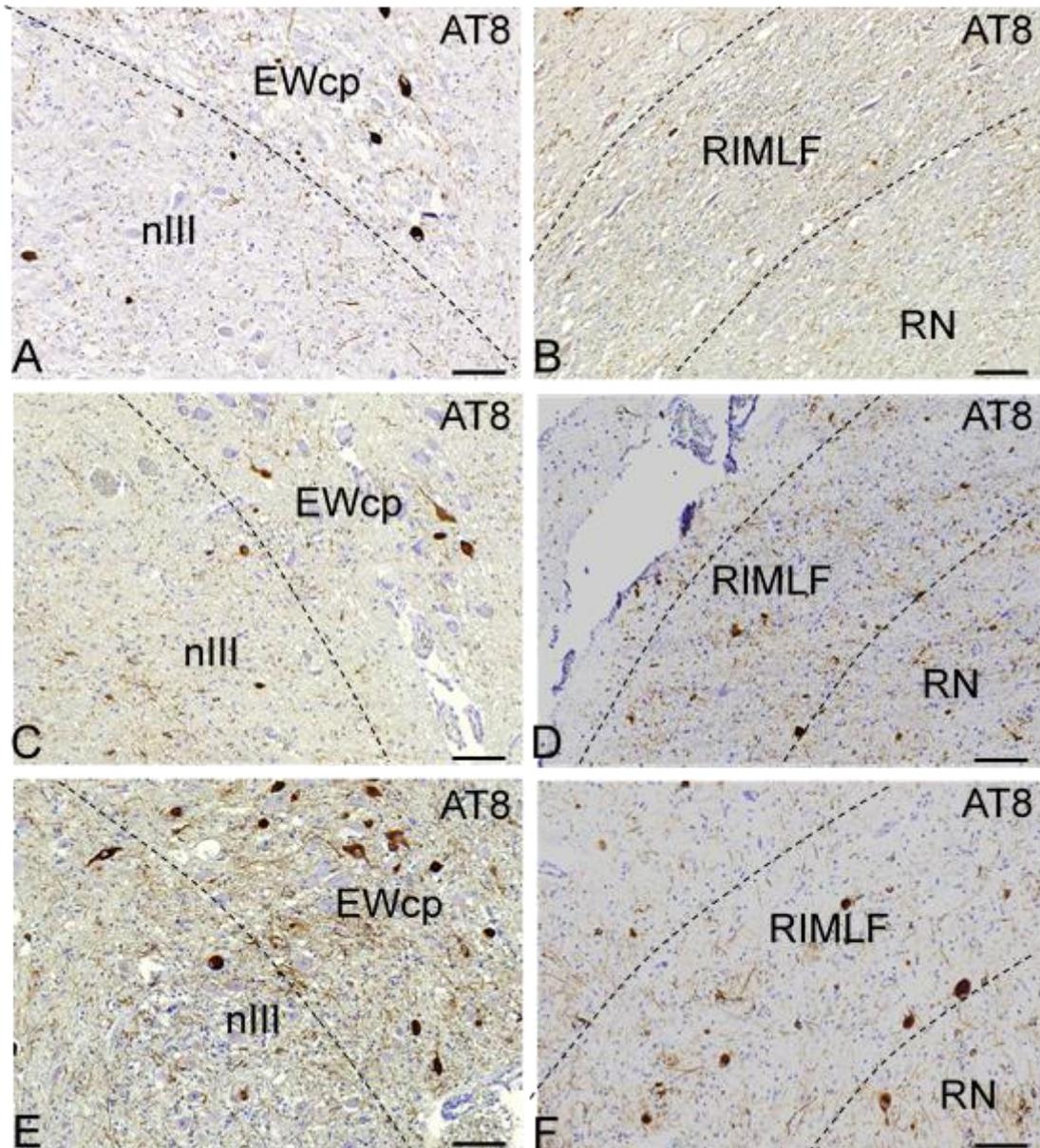


Abbildung 13: Transversalschnitte nIII, EWcp und RIMLF aller Fälle mit Tau-Protein-Färbung

Abb. 13: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des RIMLF (B,D,F), des nIII und des EWcp (A,C,E) des frühen (A,B), mittleren (C,D) und späten (E,F) PSP-Falls mit Tau-Protein-Färbung. Maßstab (A,B,C,D,E,F) = 100 µm.

Die Burst-Neurone des RIMLF und die Motoneurone des nIII zeigen bei Fällen mit inkompletter, kompletter vertikaler und kompletter Blickparese je nach klinischer Ausprägung unterschiedlich viele Tau-positive Neurone. Beim frühen Fall gibt es vor allem Neuropilfäden, aber auch Pretangles, während beim intermediären Fall neben Pretangles auch Tangles vorkommen und beim späten Fall vor allem Tangles dominieren. Bei den modulatorischen Neuronen des EWcp sind bereits im frühen Fall zahlreiche Tau-positive Neurone abgrenzbar(C).

3.3 PN UND DEREN FÄRBEMUSTER BEI PSP

Zur Analyse der perineuronalen Netze (PN) um Neurone des Augenbewegungssystems bei PSP wurden Gehirnschnitte von sechs Fällen herangezogen. Die immunhistochemische Darstellung der PN erfolgte entweder an dünnen benachbarten Schnitten zu denen mit der Tau-Pathologie, oder in einer kombinierten Färbung auf PN (anti-ACAN, anti-CSPG, anti-HAPLN1) und Tau (AT8, TAU). Untersucht wurden prämotorische Sakkadeneurone im RIMLF und Motoneurone im nIII. Entsprechende Immunfärbungen in der SO dienten als interne Kontrolle zur Überprüfung der Immunfärbung auf PN. Färbungen im EWcp dienten als Kontrolle einer altersbedingt auftretenden Tau-Pathologie, wie man sie auch bei Alzheimer-Patienten beobachtet (Morawski et al., 2012b). Wie bereits bei Färbung der Kontrollfälle, fiel die Anfärbung je nach Antikörper sehr unterschiedlich aus. Erschwerend kam hinzu, dass einzelne Gewebelöcke der PSP-Fälle nachträglich aus Formalin in Paraffin eingebettet werden mussten, die Immunfärbung auf PN aber besonders empfindlich auf eine Überfixierung reagiert. Dieser Effekt war am stärksten für anti-ACAN-basierte PN ersichtlich, die in den PSP-Fällen schwächer markiert waren als in den Kontrollen. Deshalb wurden die PN-Immunfärbungen in der SO immer als interne Kontrolle beurteilt.

Allgemein ließ sich beobachten, dass mittels anti-ACAN in allen PSP-Fällen PN nachweisbar waren, allerdings mit unterschiedlicher Färbegüte. Diese zeigten sich sehr distinkt, direkt um die Neurone angelagert. Eine Mitanfärbung von Gliazellen oder Blutgefäßen, die bei den anderen verwendeten Markern auftrat, wurde hier nicht gesehen.

Anti-HAPLN1-basierte PN konnten bei nahezu allen PSP-Fällen unabhängig vom klinischen Schweregrad dargestellt werden. Wie bei den Kontrollen zeichneten sich anti-HAPLN1-basierte PN durch kranzartige Netzstrukturen aus, die nicht nur auf die Neurone begrenzt bleiben, sondern auch distaler gelegene dendritische Kompartimente mit einschließen. Außerdem wies das Neuropil eine diffuse Immunfärbung auf.

Am empfindlichsten zeigte sie die Darstellung anti-CSPG-basierte PN, die schon bei geringer PSP-Pathologie nur noch im Einzelfall klassische Netzstrukturen zeigte. In der Mehrzahl der Fälle imponierten die PN als stark fragmentierte Strukturen entlang

der Membranen der Neurone. Allerdings wiesen zahlreiche Neurone, die normalerweise PN tragen, eine zelluläre Anfärbung mit dem anti-CSPG-Antikörper auf. Auch im Neuropil fanden sich anti-CSPG-positive diffuse Anfärbungen, die im Kontrollgewebe so nicht auftraten. Ob diese Beobachtung auf die Pathologie selbst oder auf die Überfixierung des Gewebes oder aber auf eine Kombination aus beidem zurückzuführen ist, bleibt noch zu klären.

Von den sechs bearbeiteten und analysierten PSP-Fällen wurde für jedes klinische Stadium ein repräsentativer PSP-Fall zur Zusammenstellung der Fotoplatten verwendet. Die Fälle waren unterschiedlich langen Fixierungszeiten ausgesetzt, was bei Interpretation der Färbeergebnisse berücksichtigt werden muss. Allgemein lässt sich beobachten, dass bei frühen Fällen der PSP-Erkrankung eine größere Anzahl intakter Netzstrukturen erhalten ist als bei späten Fällen.

3.3.1 EINZELFÄRBUNGEN AUF TAU-PROTEINE UND NETZE

Um eine Fehlinterpretation der Färbeergebnisse zu vermeiden, die möglicherweise eine schwache PN-Färbung aufgrund des Doppelimmunfärbe-Protokolls aufwies, wurden alternativ Einzelfärbungen an benachbarten 5µm Schnitten durchgeführt. Dazu zeigt Abb. 14 zwei benachbarte Detailausschnitte aus dem nIII eines PSP-Falls mit komplett bewegungsunfähigen Bulbi, angefärbt mit AT8 oder anti-ACAN-Antikörpern. Bei genauer Ausrichtung der Schnitte unter Zuhilfenahme von Landmarken konnten individuelle Tau-positive (Abb. 14, roter Stern) und Tau-negative Neurone (Abb. 14, schwarzer Stern) in beiden Schnitten gut identifiziert werden. Die Netze sind durch die DAB-Ni-Reaktion schwarz (Abb. 14 A, C), die Tau-positiven Neurone durch DAB braun (Abb. 14, B, D). Die Erscheinungsform der PN-Färbung entspricht dem Färbemuster in der Doppelimmunhistochemie (zum Vergleich Abb. 16-21). Dieses Beispiel zeigt in der Netzfärbung vorwiegend partielle Netze mit fragmentiertem Charakter. Die AT8-Markierung zeigt hyperphosphorylierte Tau-Proteine, tendenziell mittel- bis dunkelbraun und homogen kontrastiert (Abb. 14).

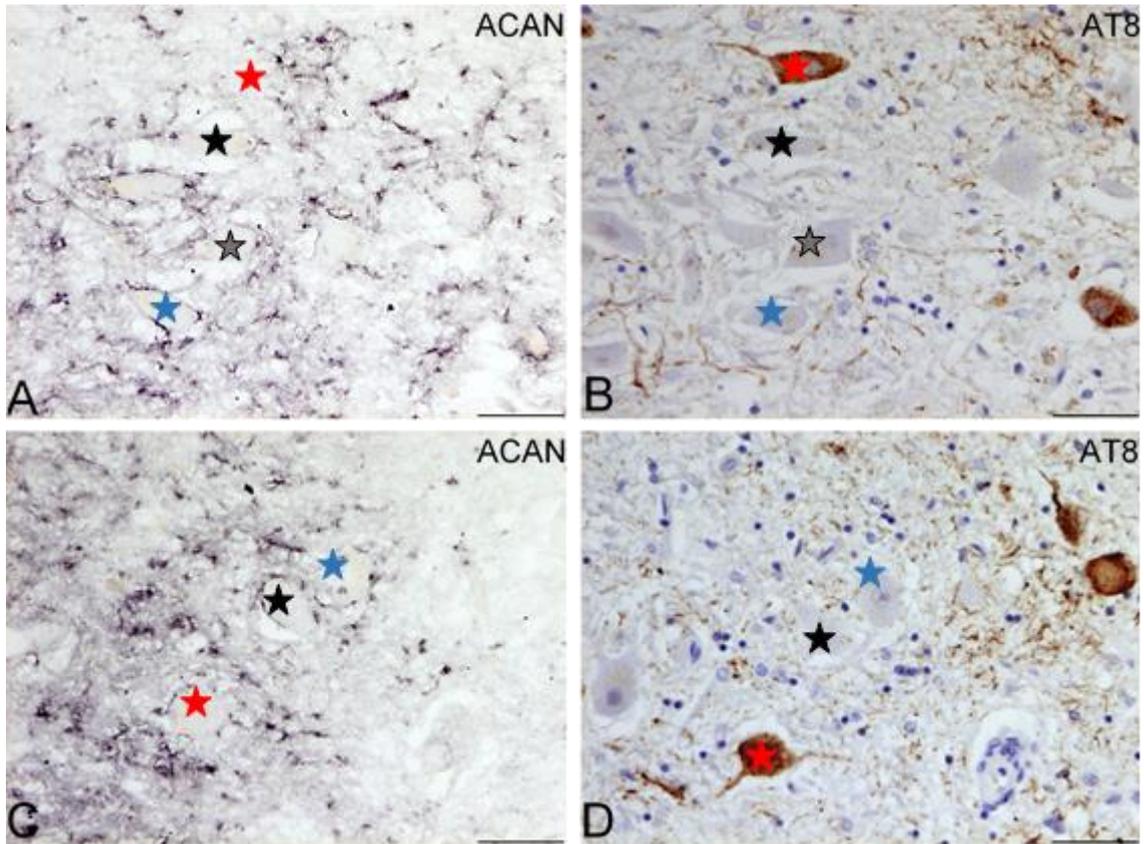


Abbildung 14: Transversalschnitte nIII mit Gegenüberstellung der Netzfärbung und der Tau-Protein-Färbung

Abb. 14: Detailansichten von transversalen Nachbarschnitten durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit kompletter Blickparese jeweils gefärbt auf anti-ACAN (A,C) und AT8, letztere noch mit Hämalaun gegengefärbt (B,D). Maßstab (A, B, C, D) = 50 μ m. Zur Orientierung sind die gleichen angeschnittenen Neurone auf benachbarten Schnitten durch Sterne gekennzeichnet. Beachte, dass kaum anti-ACAN-basierte PN an AT8-positiven Neuronen mit Tangles (A,B und C,D, rote Sterne) nachweisbar sind.

Abb. 15 und 16 zeigen isoliert Färbungen der SO auf anti-ACAN oder AT8 und anti-HAPLN1 oder AT8 eines PSP-Falls mit kompletter Blickparese. In Abb. 15A und Abb. 16A und B lassen sich zahlreiche intakte PN im Gebiet der MSO und der LSO nachweisen, während die Färbungen auf AT8 (Abb. 15B, Abb. 16C, D) neben NT keine Tau-positiven Neurone aufweisen. Nur in den Randbereichen der SO finden sich vereinzelt Tau-positive Neurone (Abb. 16D, Pfeile). Abb. 15 zeigt außerdem eindrücklich, dass neben der SO auch der Nervus abducens (nVI) und der Nervus facialis (nVII) PN besitzen, wodurch eine Abgrenzung gegenüber der Umgebung möglich ist.

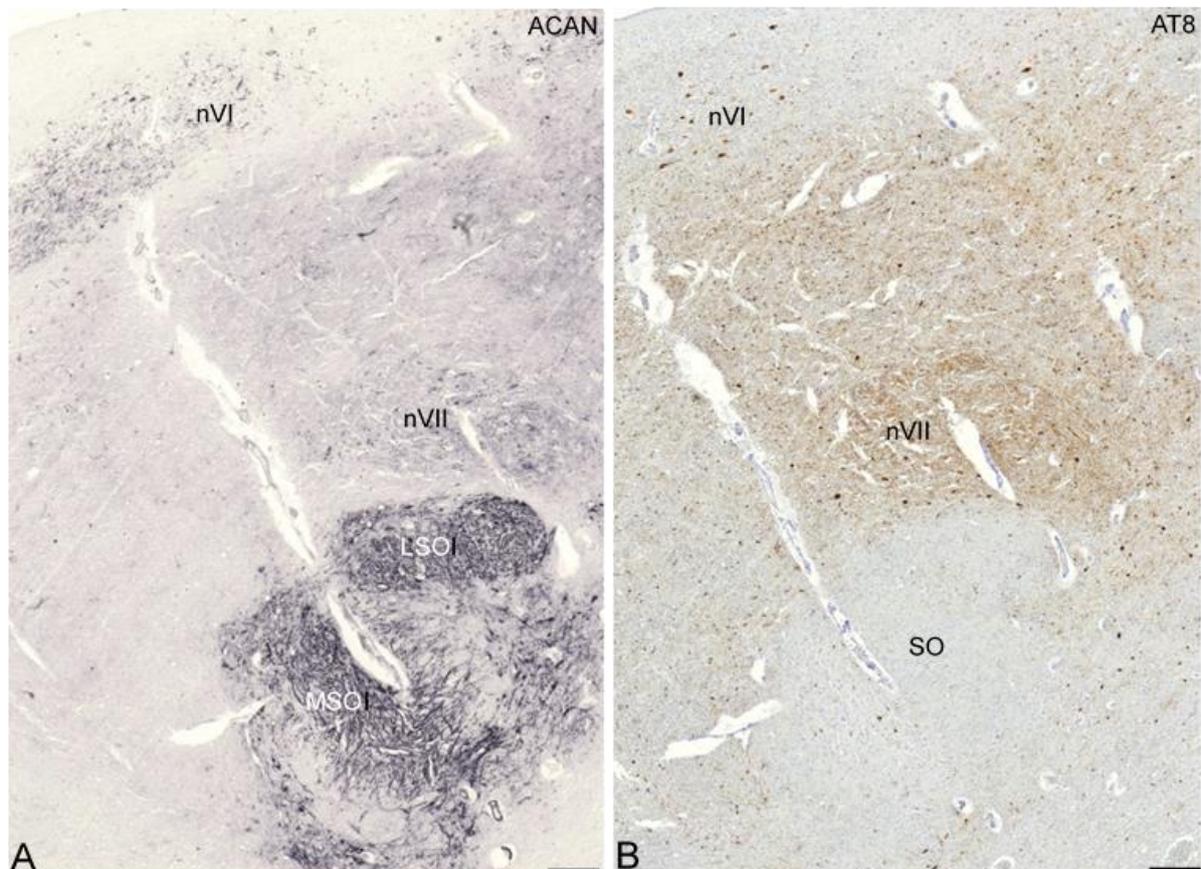


Abbildung 15: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung und der Tau-Protein-Färbung in der Übersicht

Abb. 15: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Gehirns mit PSP-Tauopathie auf Höhe der SO in der Übersicht mit Einzelfärbung auf PN (A) oder Tau-Proteine (B). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Agrecan (anti-ACAN). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf AT8. Maßstab (A, B) = 100 µm. Die Übersichtsaufnahme in A zeigt die MSO und LSO als Unterkerne der SO mit zahlreichen intakten PN. Beachte die Mitanfärbung der PN des Nucleus abducens (nVI) und des Nucleus facialis (nVII). Die Übersichtsaufnahme in B zeigt deutlich, dass im Kerngebiet der SO keine AT8-positiven Neurone nachweisbar sind, während in den umliegenden Kernen des nVI und des nVII zahlreiche Pretangles und Tangles nachweisbar sind.

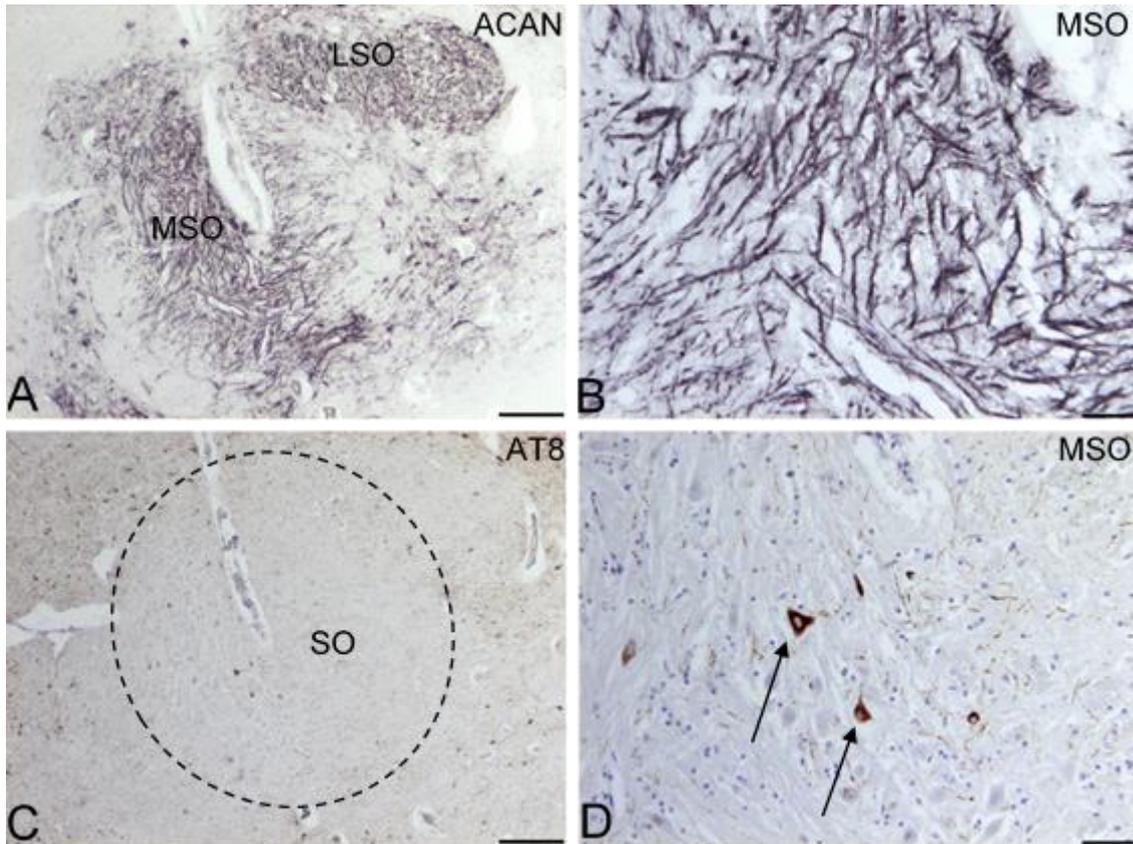


Abbildung 16: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung auf ACAN und der Tau-Protein-Färbung

Abb. 16: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Gehirns mit PSP-Tauopathie auf Höhe der SO in der Übersicht mit Einzelfärbung auf perineuronale Netze (PN) (A) oder Tau-Proteine (C). Die PN sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf AT8. Maßstab (A, C) = 100 µm, Maßstab (B, D) = 50 µm. Die Detailaufnahmen in B zeigen zahlreiche intakte PN und in D Neuropilfäden sowie vereinzelt Tau-positive Neurone im Randgebiet der MSO (Pfeile, D).

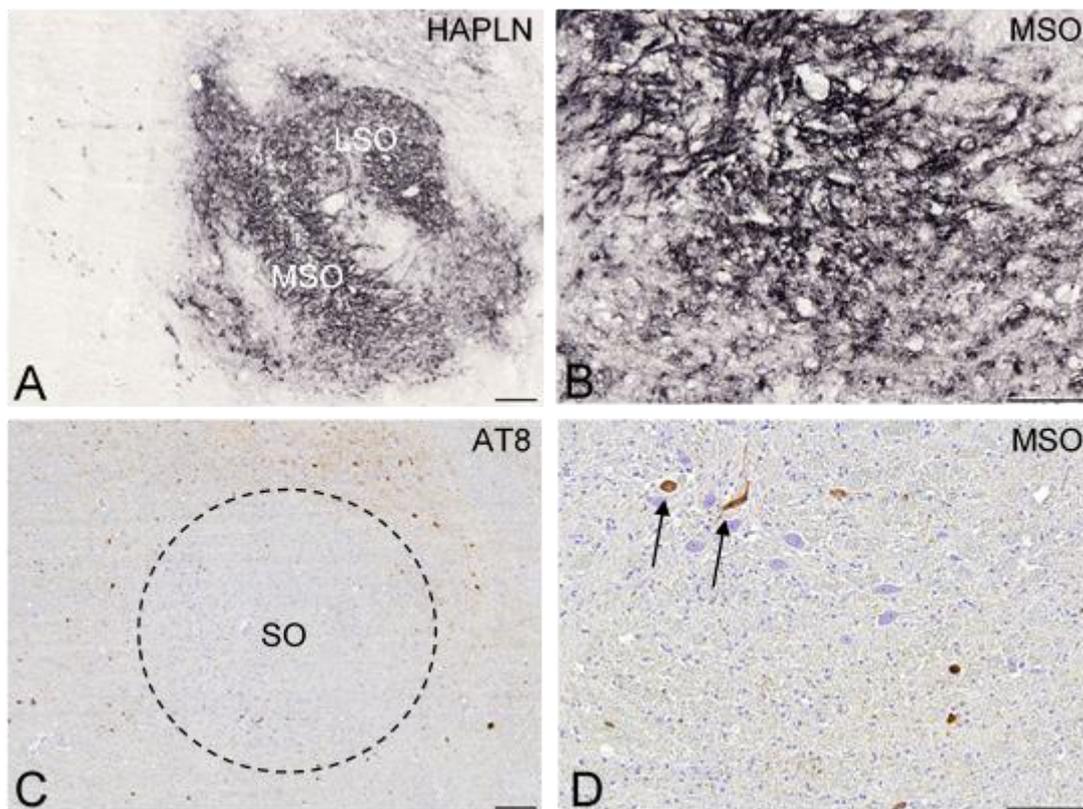


Abbildung 17: Transversalschnitte SO mit Gegenüberstellung der Netzfärbung auf HAPLN und der Tau-Proteinfärbung

Abb. 17: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Gehirns mit PSP-Tauopathie auf Höhe der SO in der Übersicht mit Einzelfärbung auf perineuronale Netze (PN) (A) oder Tau-Proteine (C). Die PN sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf AT8. Maßstab (A, C) = 100 µm, Maßstab (B, D) = 50 µm. Die Detailaufnahmen in B zeigen zahlreiche intakte PN und in D Neuropilfäden sowie vereinzelt Tau-positive Neurone im Randgebiet der MSO (D, Pfeile)

Die Schnitte in Abb. 17 wurden ebenfalls einzelimmunhistochemisch gefärbt -entweder auf anti-HAPLN1 oder auf AT8- und bieten ein zu Abb. 15-16 ähnliches Bild. In Abb. 17A erkennt man, dass LSO und MSO stark PN-positiv sind. Die Detailaufnahme (Abb. 17B) verdeutlicht, dass die Neurone von zirkulären, kompletten PN umgeben sind. Abb. 17C hingegen erscheint leer, ohne AT8-positive Neurone. In der Detailaufnahme (Abb.17D) zeigt sich jedoch, dass neben intakten Neuronen in den Randgebieten der MSO wenige NFT (Abb.17D, Pfeile) nachweisbar sind.

3.3.2 DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN IM SO

Wie schon erwähnt, diente die SO als interne Kontrolle zur Überprüfung, ob die Färbungen funktioniert haben, da sie nicht von PSP betroffen ist. Exemplarisch werden auf der folgenden Fotoplatte Schnitte von fortgeschrittenen PSP-Fällen, die

mindestens eine komplette, vertikale Blickparese aufwiesen, gezeigt. In Abb. 18A lassen sich unterschiedliche Kerngebiete mit vielen PN erkennen. Neben LSO und MSO sind vor allem die perioliviären Kerne (SPON, PPO, LNTB) mit intakten PN sichtbar, hyperphosphorylierte Tau-Proteine sind in der Übersicht nicht abzugrenzen. In Abb. 18B dominieren ineinander verschränkte Neurone, die samt ihren Dendriten komplett von PN umgeben sind. Vereinzelt finden sich Tau-Ablagerungen in Form von pNFT in den Neuronen. Bei Färbung der Schnitte mit anti-CSPG (Abb.18C) zeigt sich, dass die SO zwar abgegrenzt werden kann, es aber nicht möglich ist, LSO und MSO voneinander zu unterscheiden. Bei Analyse der Detailaufnahme (Abb. 18D) fällt eine starke zelluläre Anfärbung der Neurone auf, aber keine typischen PN. Dieses Färbemuster wurde mehrmals und für unterschiedliche PSP-Fälle beobachtet, sodass auf weiterführende Interpretationen von anti-CSPG-Färbungen verzichtet wurde. Abb. 18E des gleichen Schnittes, nur auf Höhe des Nucleus vestibularis (VN) aufgenommen, zeigt PN-positive Neurone ohne zelluläre Anfärbung, weswegen davon auszugehen ist, dass die Färbung funktioniert hat. In Abb. 18F lassen sich LSO, MSO und der perioliviäre Komplex durch ihre Netze nachweisen. Die Detailaufnahmen (Abb.18G, H) zeigen parallel angeordnete Neurone mit typischen PN, wobei keine Neurone mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein zu detektieren sind.

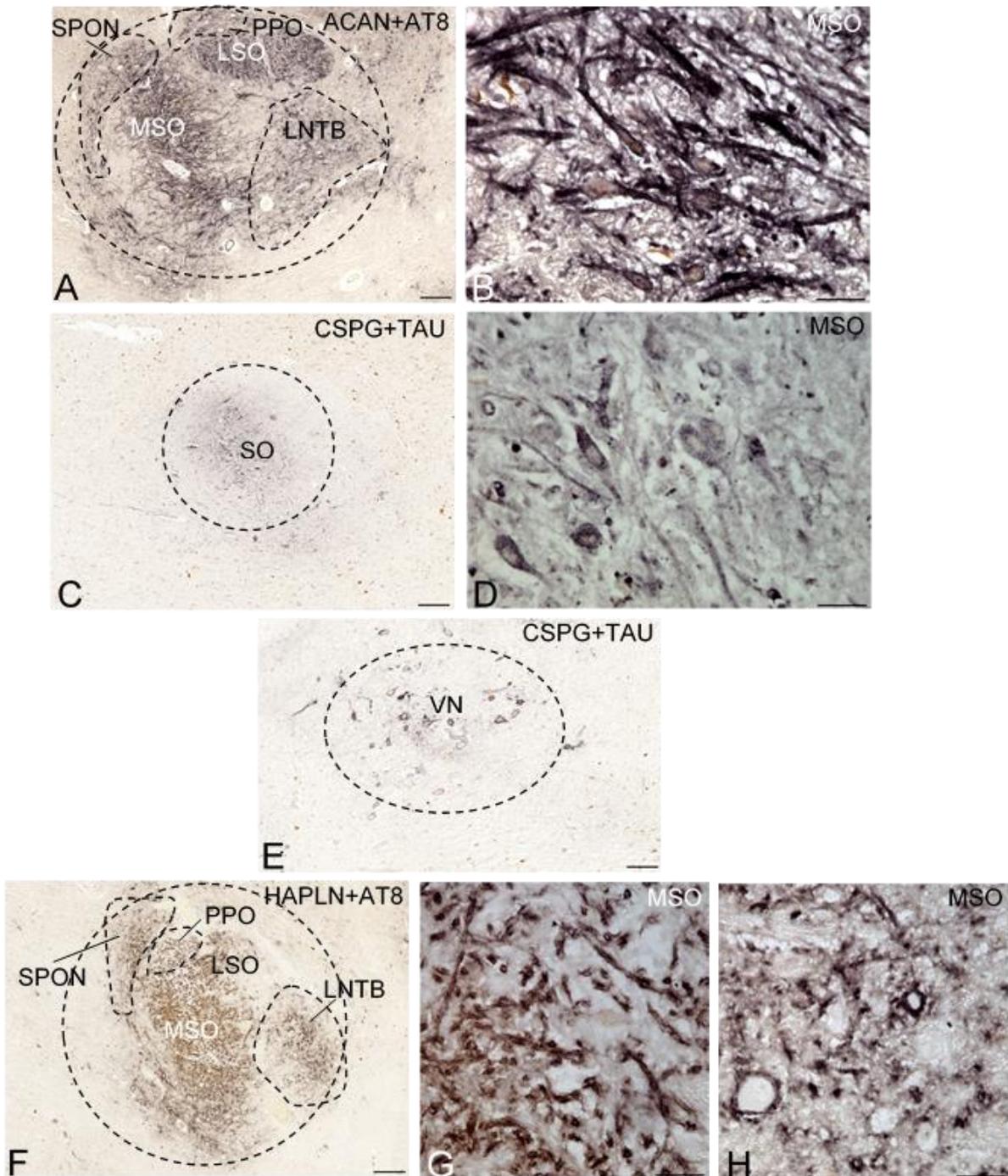


Abbildung 18: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe der SO fortgeschrittener PSP-Fälle mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 18: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit mindestens kompletter vertikaler Blickparese in der Übersicht (A, C, E, F). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN) (A, B), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (C, D, E) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (F, G, H). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU oder AT8. Maßstab (A, C, E, F) = 100µm, Maßstab (B, D, G, H) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen von A und F lassen sich die MSO und die LSO gut durch die PN-Färbung von der Umgebung abgrenzen, während C keine typischen PN zeigt. Die Detailaufnahme in B zeigt vereinzelt Pretangles mit intakten PN, hauptsächlich aber intakte Neurone mit intakten PN sowie in Abb. G und H auch. Abb. D zeigt keine AT8-positiven Neurone und keine typischen Netzstrukturen, nur zelluläre Anfärbungen. Abb. E zeigt Neurone des Nucleus vestibularis (VN) mit komplett vorhandenen PN ohne Tauopathie. Beachte in A und F die PN-positiven Neurone der periolivären Kerne (SPON, PPO und LNTB).

3.3.3 DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN IM RIMLF

RIMLF früher Fall (PSP-Fall 1): Bei diesem Fall ist der RIMLF aufgrund der ungewohnten Schnittrichtung nur in Zusammenschau mit einem benachbarten Nissl-Schnitt (nicht gezeigt) identifizierbar und abgrenzbar. Auf einem Schnitt sind die Burst-Neurone des RIMLF in eher geringer Anzahl vorhanden, sodass nur vereinzelt PN nachweisbar sind (Abb. 19A). In Abb. 19B (Pfeil) ist das Erscheinungsbild der PN homogen um ein intaktes Neuron strukturiert. Man findet putative Burst-Neurone mit schwacher Expression von Tau-Protein (Abb. 19D), sowie solche mit starker Expression von Tau-Protein (Abb. 19 C). Diese sind sowohl in Abb. 19C (Pfeil) mit Teilnetzen als auch in Abb. 19D (Pfeil) mit PN am unteren Pol des Neurons versehen.

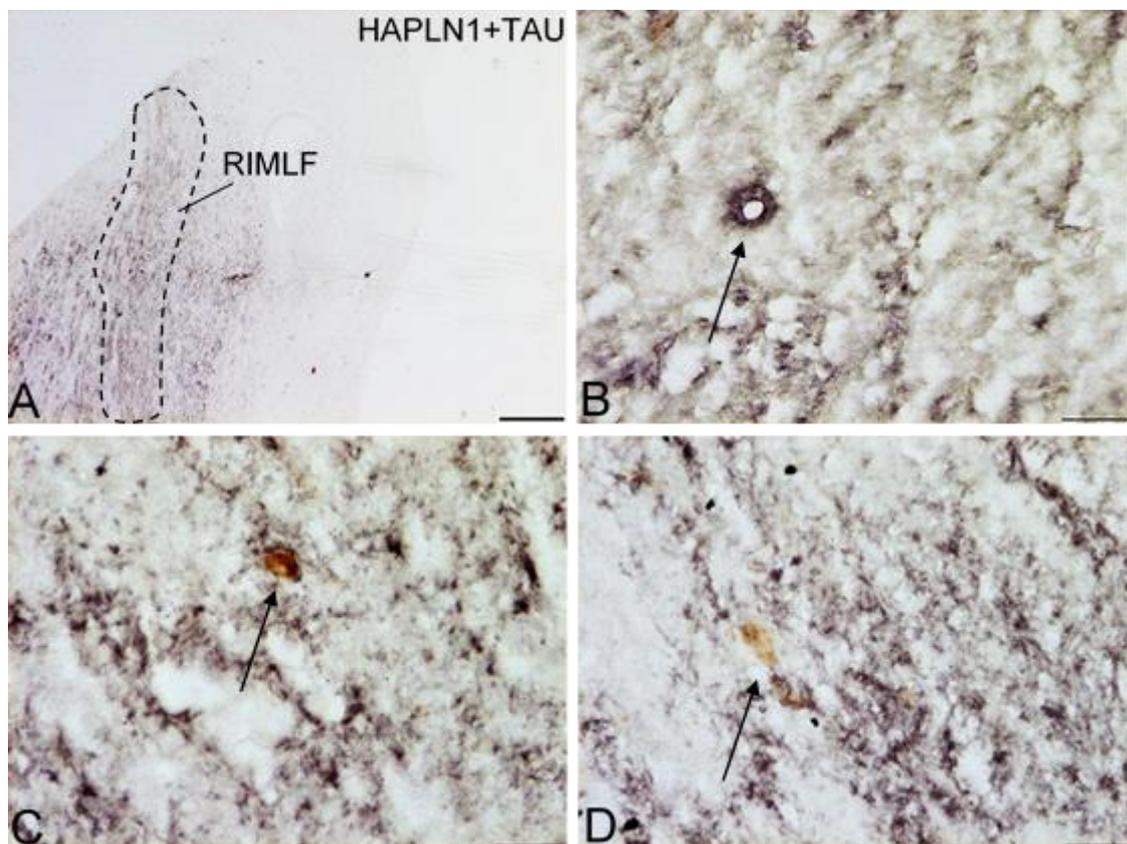


Abbildung 19: Transversalschnitte RIMLF des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 19: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des RIMLF eines PSP-Falls mit inkompletter vertikaler Blickparese in der Übersicht (A). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU. Maßstab (A) = 100µm, Maßstab (B, C, D) = 200µm. In der Übersichtsaufnahme sind die wenigen Burst-Neurone des RIMLF durch die PN-Färbung abgegrenzt (A). Die Detailaufnahmen in B zeigen ein intaktes Neuron mit intaktem Netz (Pfeil), während in C Tangles (Pfeil) und in D Pretangles (Pfeil) mit teilweise vorhandenen PN gezeigt werden.

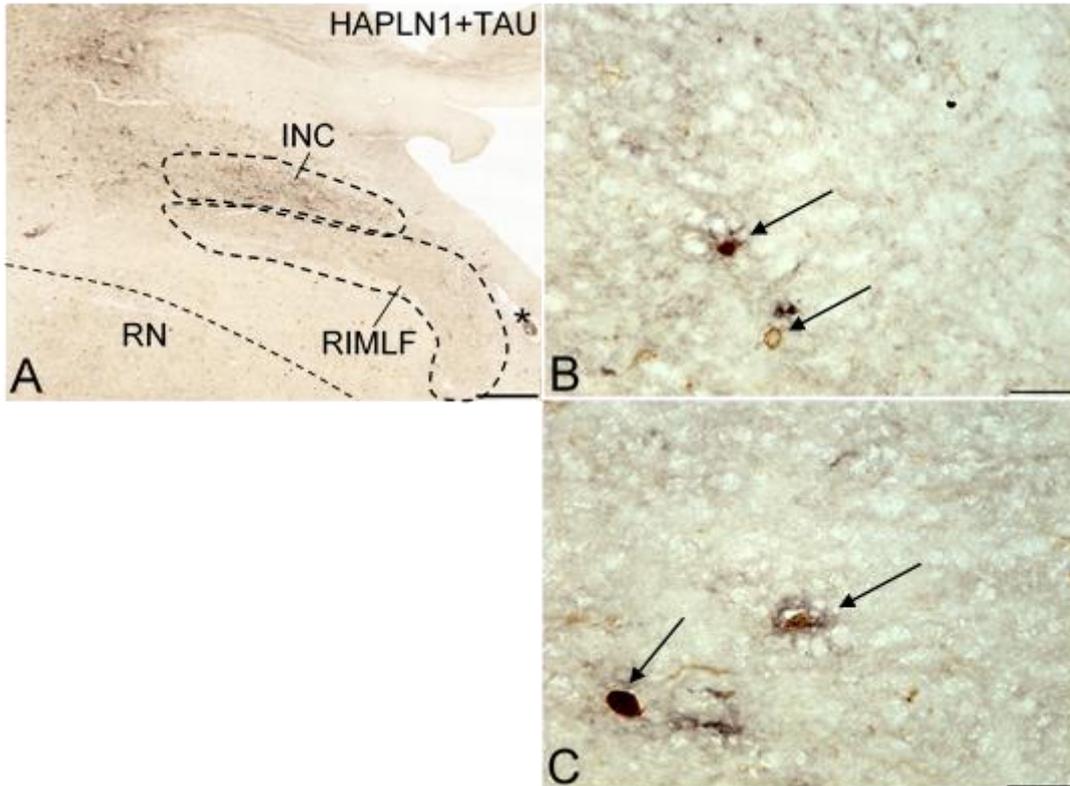


Abbildung 20: Transversalschnitt RIMLF des intermediären PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 20: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des RIMLF eines PSP-Falls mit kompletter, vertikaler Blickparese in der Übersicht (A). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU. Maßstab (A) = 100µm, Maßstab (B, C) = 200µm. In der Übersichtsaufnahme sind die wenigen Burst-Neurone des RIMLF durch die PN-Färbung abgegrenzt (A). Die begleitende A. thalamo-subthalamica (A, Stern) dient als nützliche Landmarke. Die Detailaufnahmen in B zeigen Tangles, ein Burstneuron (Pfeil) und coiled bodies (Pfeil), während in C Tangles und Pretangles mit fragmentierten PN (Pfeile) gezeigt werden.

RIMLF intermediärer Fall (PSP-Fall 2): Zur Auffindung der PN-positiven Burst-Neurone des RIMLF in der Übersicht dienten der Nucleus interstitialis Cajal (INC) und der RN als Begrenzung des RIMLF (Abb. 20A). In der Übersicht (Abb. 20A) zeigt sich, dass einige wenige Neurone mit PN ausgestattet sind. Die Pfeile in der Detailaufnahme (Abb. 20B) markieren ein Neuron mit stark hyperphosphoryliertem Tau-Protein und coiled bodies als ringförmige Struktur. Abb. 20C zeigt NFT und ein pathologisches Neuron mit fragmentiertem Netz neben NT.

RIMLF später Fall (PSP-Fall 3): Bei diesem Fall zeigten sich zahlreiche Tau-positive Neurone und Gliazellen, meist in Form von coiled bodies (Abb. 21A Pfeile). In Abb. 21 B lassen sich homogen kontrastierete NFT nachweisen. Es wurden nahezu keine Neurone mit intakten PN, die sicher sakkadische Burstneurone repräsentieren,

identifiziert. Der immunhistochemische Nachweis der ECM-Komponenten zeigte sich hauptsächlich als stark fragmentierte PN, fast ausschließlich im Neuropil.

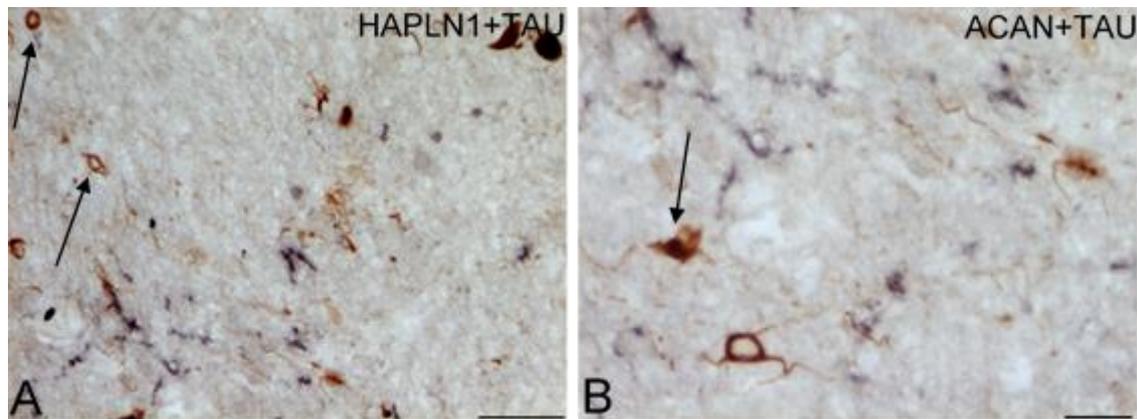


Abbildung 21: Transversalschnitte RIMLF des späten PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 21: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des RIMLF eines PSP-Falls mit kompletter vertikaler und horizontaler Blickparese im Detail (A, B). Die perineuronalen Netze sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-HAPLN1 oder anti-ACAN. Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU. Maßstab (A) = 50µm, Maßstab (B) = 200 µm. Die Detailaufnahmen in A zeigen Neuropilfäden, Tangles und coiled bodies (Pfeile), in B fällt vor allem das tau-positive Burst-Neuron (Pfeil) neben einem coiled body auf, PN zeigen sich stark fragmentiert und nicht in unmittelbarer Nähe der tau-Neurone.

3.3.4 DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN IM NIII

In allen untersuchten PSP-Fällen konnten die PN des nIII mit Antikörpern gegen CSPG, ACAN oder HAPLN1 dargestellt werden. Die PN erschienen mittels der DAB-Ni-Reaktion schwarz, die hyperphosphorylierten Tau-Proteine durch die DAB-Reaktion braun.

Früher PSP-Fall: Im nIII des PSP-Falls 1, der eine inkomplette vertikale Blickparese aufwies, zeigten sich anti-ACAN-basierte PN, deren Anfärbung allerdings viel schwächer als bei Kontrollen ausfielen (Abb. 22A). Die Detailanalyse zeigte, dass Tau-negative Motoneurone im nIII meist fragmentierte anti-ACAN-basierte PN entlang der Umrisse am Zellkörper aufwiesen (Abb. 22B, Pfeile). Die selten auftretenden Tau-positiven Neurone mit NFT zeigten keinerlei PN (Abb. 22C).

Wie bereits erwähnt, wies die anti-CSPG-Färbung bereits bei diesem frühen Fall eine diffuse zelluläre Anfärbung auf, aber keine anti-CSPG-basierte PN (Abb. 22D, E, Pfeil). Dieses Färbemuster ließ sich bereits in der SO beobachten (vgl. Abb.22C). Deshalb konnte mit dieser Färbung keine Aussage zur Ausprägung der PN gemacht werden.

Wie vorab beschrieben, zeigte die anti-HAPLN1-Immunfärbung eine relativ intensive Anfärbung im nIII, die bereits in der Übersichtsaufnahme (Abb. 22F) zu sehen ist. Die Detailanalyse zeigte, dass anti-HAPLN1-basierte PN (Abb. 22G, Pfeile) oft nur noch an Dendriten auftraten (Abb. 22G, Pfeil). Neurone mit pNFT wiesen meist nur anti-HAPLN1-positive Fragmente auf (Abb. 22H, Pfeil).

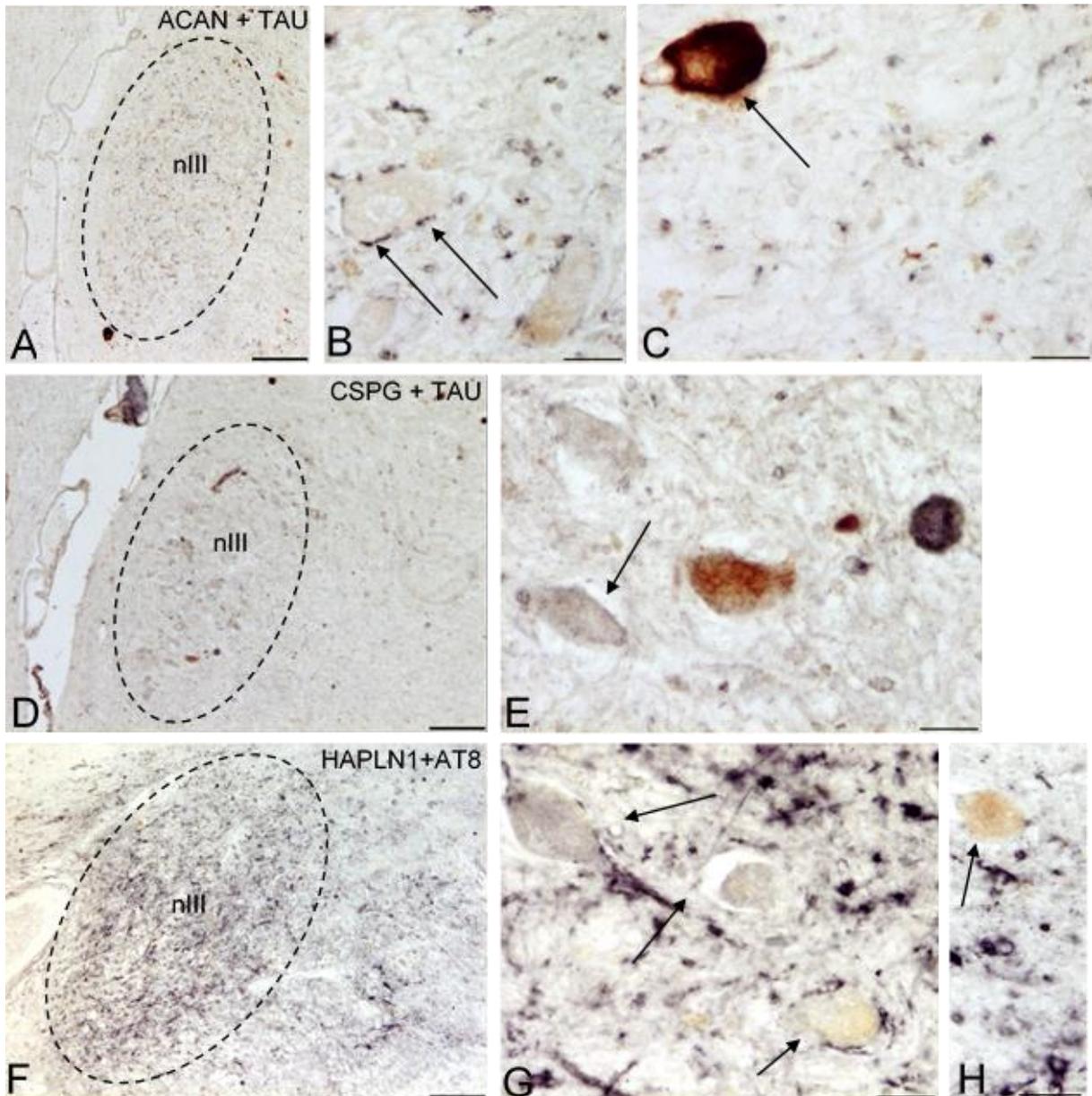


Abbildung 22: Transversalschnitte nIII des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 22: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit incompletter, vertikaler Blickparese in der Übersicht (A, D, F). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Agrecan (ACAN) (A, B, C), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (D, E) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (F, G, H). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU oder AT8. Maßstab (A, D, F) = 100µm, Maßstab (B, C, E, G, H) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen von A und F lässt sich der nIII gut durch die PN-Färbung abgrenzen, während D keine PN zeigt. Die Detailaufnahmen in B zeigen ein intaktes Neuron mit Teilnetzen (Pfeile), in C Tangles ohne PN (Pfeil). Abbildung G zeigt ein fragmentiertes Netz um ein Neuron mit Pretangles und ein auf den Dendriten beschränkte Netzfärbung (Pfeile). Die Detailaufnahme H zeigt eine diffuse zelluläre Anfärbung und Tangles ohne PN (Pfeil).

Fall mit vertikaler Blickparese (PSP-Fall 2): Bei PSP-Fällen mit kompletter vertikaler Blickparese zeigten die anti-ACAN-basierten PN im nIII ein ähnliches Erscheinungsbild wie im zuvor beschriebenen frühen Fall (Abb. 23A). Die Detailanalyse zeigte, dass Tau-negative Neurone eher noch PN trugen (Abb. 23C, Pfeil), die allerdings stark

fragmentiert waren, während bei Neuronen mit Tau-positiven NFT anti-ACAN-basierte PN komplett fehlen konnten (Abb. 23B, Stern). Es ließen sich NFT mit teilweise vorhandenen PN nachweisen (Abb. 23C, Pfeil).

Das Anfärbeverhalten von anti-CSPG-basierten PN glich dem des frühen Falls mit kaum sichtbaren Netzen, sondern zellulären Anfärbungen, die keine weitere Analyse von PN ermöglichte (Abb. 23D, E, F).

Die anti-HAPLN1-Färbung zeichnet sich durch ihr dichtes Anfärbemuster aus (Abb. 23G). Tau-negative Neurone zeigten in der Regel noch stark ausgeprägte intakte anti-HAPLN1-basierte PN (Abb. 23I, Pfeil). Daneben konnten aber auch zahlreiche Neurone mit pNFT gefunden werden, die intakte PN aufwiesen (Abb. 23I, Pfeil). Außerdem ließen sich NFT mit Fragmenten von PN um Neurone nachweisen (Abb. 23H, Pfeil).

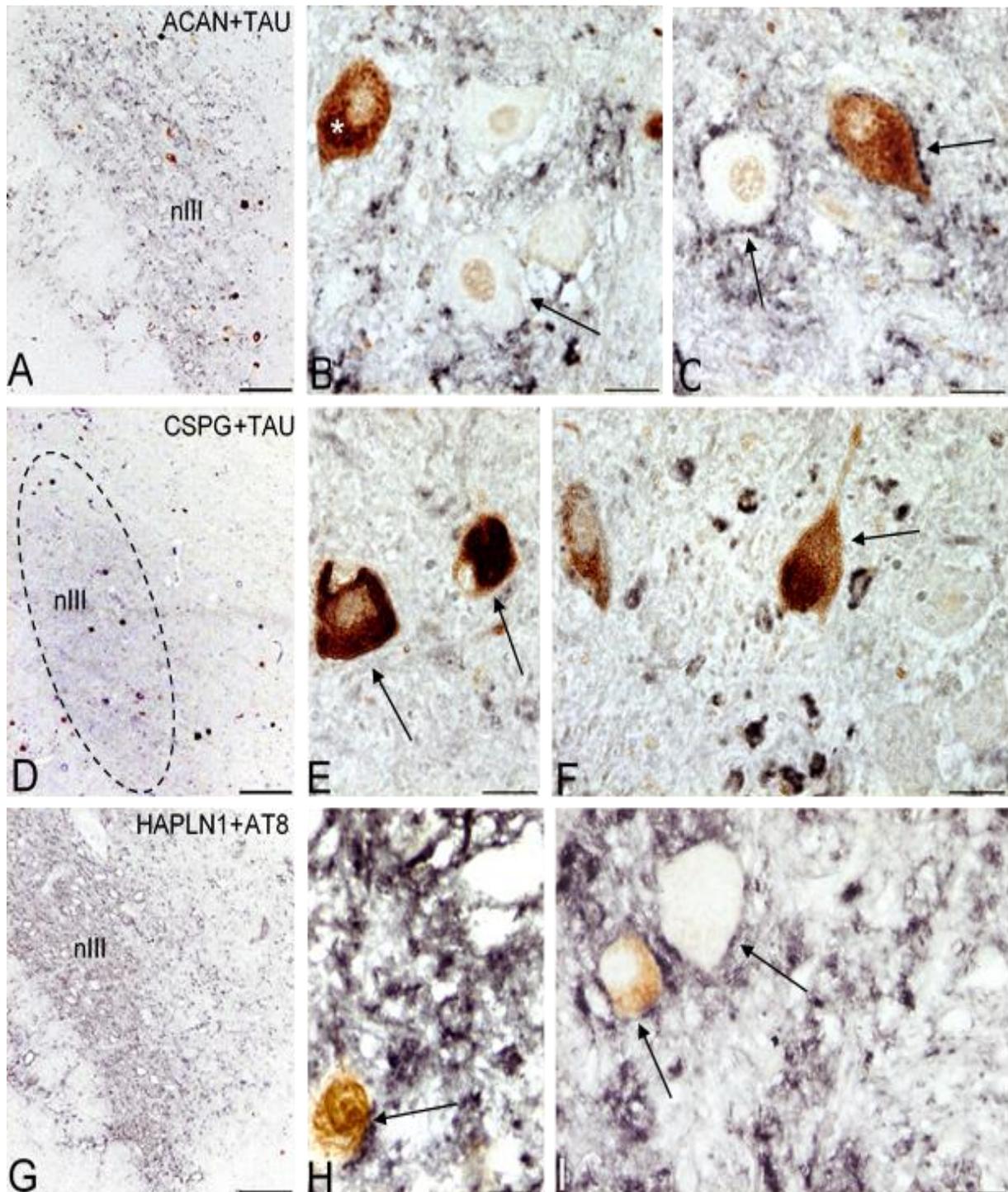


Abbildung 23: Transversalschnitte nIII des intermediären PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 23: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit kompletter vertikaler Blickparese in der Übersicht (A, D, G). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Aggregan (anti-ACAN) (A, B, C), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (D, E, F) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (G, H, I): Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU oder AT8. Maßstab (A, D, G) = 100µm, Maßstab (B, C, E, F, H, I) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen von A und G lässt sich der nIII gut durch die PN-Färbung abgrenzen, während D keine PN zeigt. Die Detailaufnahmen in B zeigen Tangles ohne PN (Stern) neben einem intaktem Neuron mit fragmentierten PN (Pfeil), in C ein intaktes Neuron mit PN (Pfeil) neben Tangles mit partiellen PN (Pfeil). Die Detailaufnahmen in E und F lassen keine PN erkennen, es gibt nur Tangles ohne PN (Pfeile), in H ein Neuron mit Tangles und Teilnetz (Pfeil) und in I neben Pretangles mit PN (Pfeil) ein intaktes Neuron mit PN (Pfeil).

PSP-Fall mit kompletter Blickparese (PSP-Fall 3): anti-ACAN präsentiert sich in der Übersicht sehr distinkt in der Anfärbung, die auf das Gebiet des nIII beschränkt bleibt (Abb. 24A). Es kommen sowohl stark markierte Neurone mit NFT ohne Netz (Abb. 24B, Pfeil) als auch schwach markierte hyperphosphorylierte Tau-Proteine, die aber von unvollständigen Netzstrukturen umgeben sind, vor (Abb. 24B, Pfeil).

Wie bereits beim frühen Fall beobachtet, lassen sich die Netzstrukturen bei Anfärbung mit anti-CSPG nur erahnen (Abb. 24C). Rechts im Bild Abb. 24D (Pfeil) könnte es sich um ein minimal betroffenes sich auflösendes Neuron handeln. Des Weiteren sieht man ein stark gefärbtes Neuron mit NFT, das kein Netz besitzt (Abb. 24D, Stern).

Das Übersichtsbild Abb. 24E des Markers anti-HAPLN1 zeigt nur fragmentierte, aber deutlich vorhandene Netzstrukturen des nIII, die sich vom umliegenden Gewebe abheben. Die PN stellen sich sehr diffus dar. Sowohl in Abb. 24F als auch in Abb. 24G sind pNFT sichtbar, deren Netzstrukturen teilweise markiert sind.

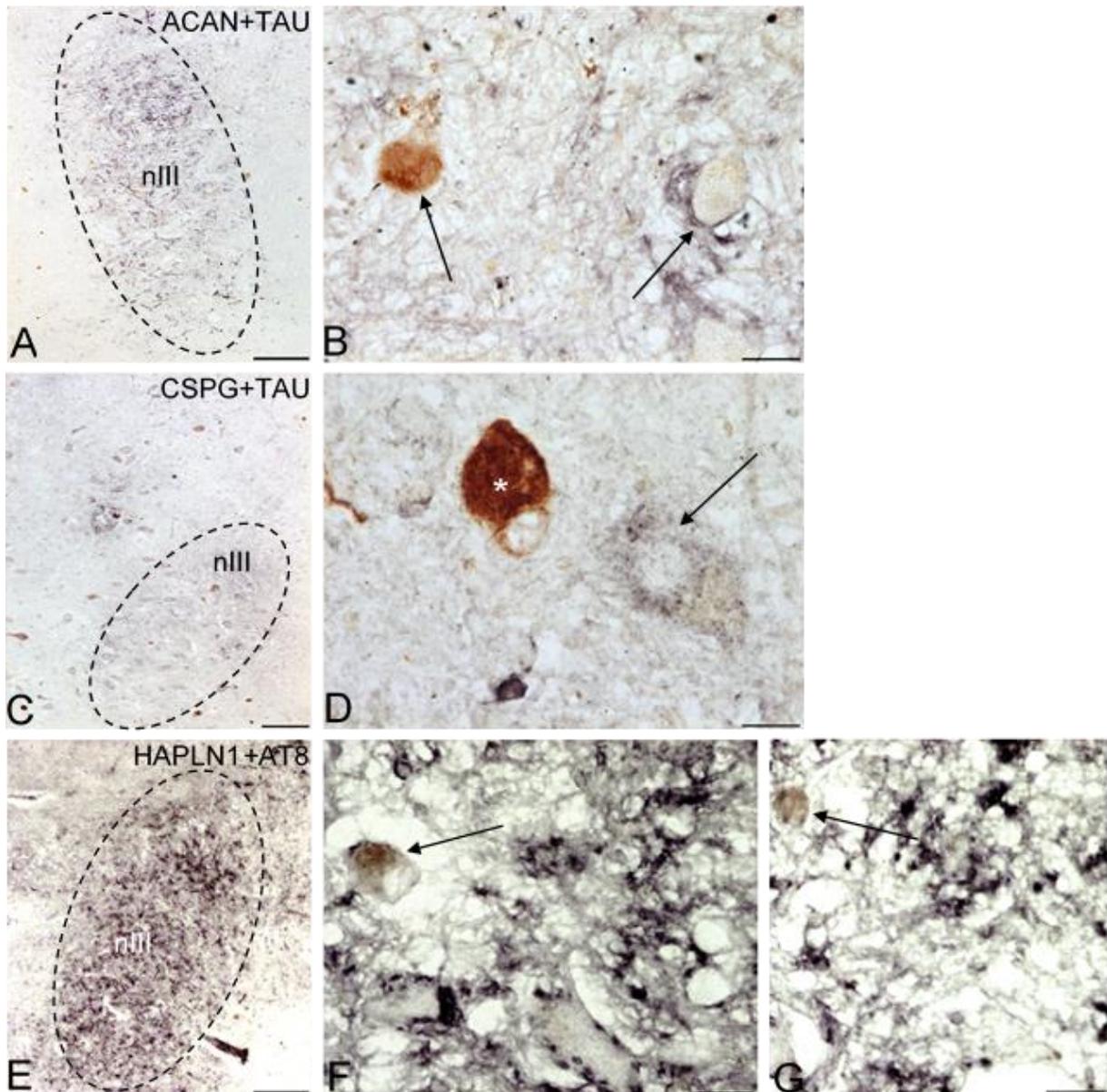


Abbildung 24: Transversalschnitte nIII des späten PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 24: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit kompletter vertikaler und horizontaler Blickparese in der Übersicht (A, C, E). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Agrecan (anti-ACAN) (A, B), anti-Chondroitinsulfat-Proteoglykan (anti-CSPG) (C, D) oder anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1) (E, F, G): Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf TAU oder AT8. Maßstab (A, C, E) = 100µm, Maßstab (B, D, F, G) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen von A und E lässt sich der nIII gut durch die PN-Färbung abgrenzen, während C keine PN zeigt. Die Detailaufnahmen in B zeigen ein intaktes Neuron mit PN neben Pretangles ohne Netz (Pfeile), in D Tangles ohne PN (Stern) und in F und G Pretangles mit stark fragmentierten PN (Pfeile).

3.3.5 DOPPELIMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN IM EWCP

Der nicht-präganglionäre EWcp grenzt sich als paarige Kerngruppe dorsal und rostral zum nIII ab. Entsprechend früherer Befunde von unserer und anderen Arbeitsgruppen weist der EWcp keine PN auf (Horn et al., 2008; Morawski et al., 2010). Bei den PSP-Fällen -einschließlich des frühen Stadiums- weist der EWcp bereits früh Tau-positive

Neurone auf. In den analysierten Hirnschnitten zeigen sich sowohl hellbraune als auch dunkelbraune Neurone ohne PN. Allgemein wird beobachtet, dass der EWcp nicht nur bei PSP, sondern auch bei anderen degenerativen Erkrankungen früh befallen wird (Mavroudis et al., 2014).

Zur Veranschaulichung wurde exemplarisch der frühe Fall (PSP-Fall 1) herangezogen. Neben NT wurden pNFT und NFT beobachtet (Abb. 25B, Pfeile). Dass die Netze nicht exprimiert werden, ist vom jeweiligen Marker unabhängig.

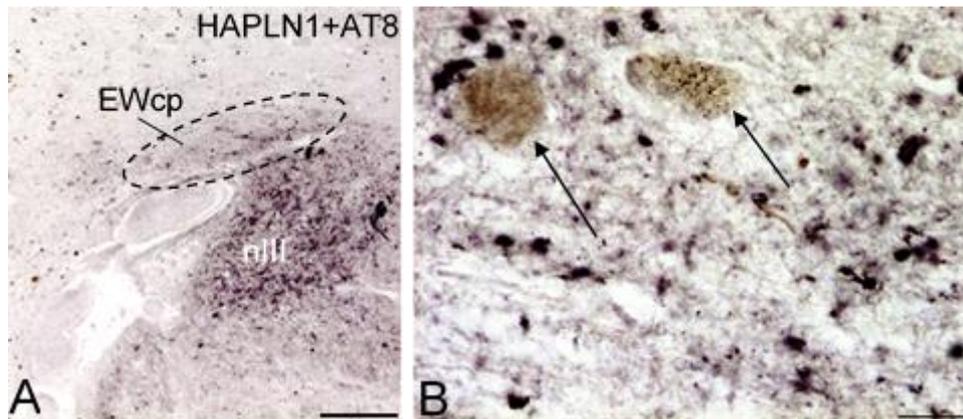


Abbildung 25: Transversalschnitte EWcp des frühen PSP-Falls mit kombinierter Netz- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 25: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des EWcp eines PSP-Falls mit inkompletter vertikaler Blickparese in der Übersicht (A). Die perineuronalen Netze (PN) sind immunhistochemisch angefärbt auf anti-Hyaluron- und Proteoglykan-bindendes Linkprotein (anti-HAPLN1). Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf AT8. Maßstab (A) = 100µm, Maßstab (B) = 200µm. In den Übersichtsaufnahmen lassen sich mehrere Tangles und Pretangles, aber keine PN nachweisen. Die Detailaufnahmen in B zeigen Pretangles und Tangles ohne PN (Pfeile).

3.4 AUSBLICK QUALITATIVE UNTERSUCHUNG SYNAPTISCHER EINGÄNGE

Da die PN mit den synaptischen Eingängen, für die sie Raum lassen, assoziiert sind, wurden in einer ersten orientierenden Studie Immunfärbungen auf die Synapsen im nIII bei den PSP-Fällen durchgeführt.

3.4.1 SYNAPSENEINGÄNGE AUF MOTONEURONE IM NIII IN KONTROLLGEHIRNEN

In Kontrollfällen ohne PSP-Pathologie zeigten sich Synaptophysin-positive schwarze punktartige Strukturen um mit Hämalan gefärbte Neurone. Diese repräsentieren synaptische Kontakte entlang der Motoneuronaußenmembranen. Alle Neurone im nIII weisen dicht gepackte Synapseneingänge auf (Abb. 26B, Pfeile).

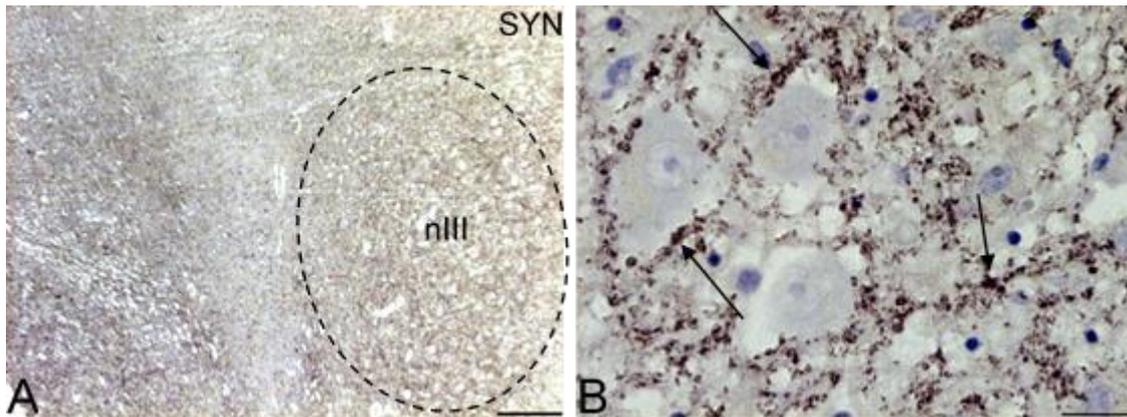


Abbildung 26: Kontrollschnitte nIII mit Färbung der Synapsenendigungen

Abb. 26: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm eines Kontrollgehirns auf Höhe des nIII in der Übersicht (A). Die Synapsen sind immunhistochemisch angefärbt auf Synaptophysin (Syn), gegengefärbt mit Hämalan. Maßstab (A) = 100 μ m, Maßstab (B) = 200 μ m. In der Übersichtsaufnahme lässt sich der nIII gut durch die Synaptophysin-Färbung abgrenzen. Die Detailaufnahme zeigt das typische knopfartige Anfärbemuster der Synapsenendigungen um Neurone (B, Pfeile).

3.4.2 SYNAPSENEINGÄNGE AUF MOTONEURONE IM NIII BEI PSP-FÄLLEN

Früher Fall (PSP-Fall 1): In der Doppelimmunfärbung auf anti-Syn und AT8 zeigte sich im nIII der PSP-Fälle ein etwas anderes Bild, das hier zusammenfassend beschrieben wird. Der frühe PSP-Fall mit geringen Augenbewegungsstörungen unterscheidet sich in der anti-Syn-Färbung auf den ersten Blick nur wenig von den Kontrollfällen. Der nIII wird anhand der großen Dichte Syn-positiver synaptischer Boutons hervorgehoben (Abb. 27A). In der Detailansicht kann man allerdings erkennen, dass die Syn-positiven Boutons nicht dicht gepackt an den Außenmembranen der Motoneurone sitzen. Dies betrifft vor allem Tau-positive Neurone, aber ist ebenfalls auffällig bei Tau-negativen Neuronen (Abb. 27B, C Pfeile).

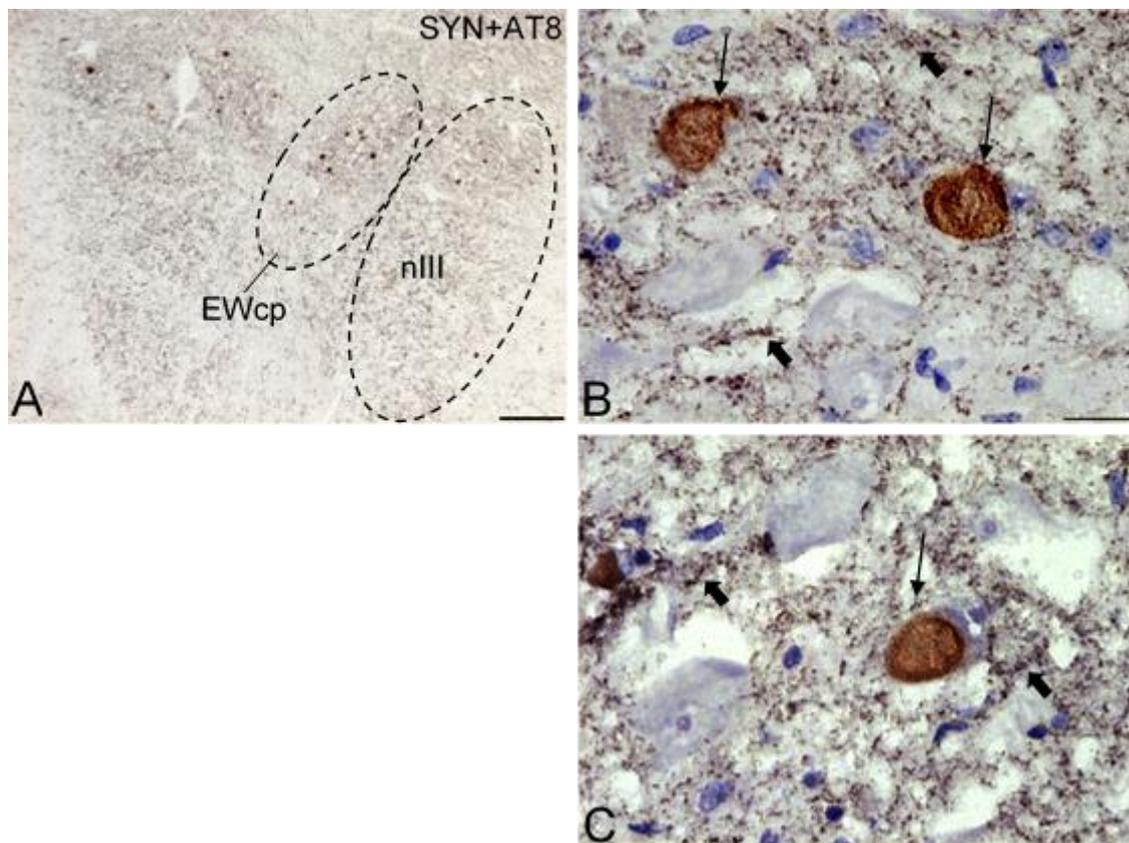


Abbildung 27: Transversalschnitte nIII des frühen PSP-Falls mit kombinierter Synapsen- und Tau-Protein-Färbung

Abb. 27: Transversale Nachbarschnitte durch den Hirnstamm auf Höhe des nIII eines PSP-Falls mit inkompletter vertikaler Blickparese in der Übersicht (A). Die Synapsen sind immunhistochemisch angefärbt auf Synaptophysin (Syn), gegengefärbt mit Hämalaun. Die Tau-Proteine sind immunhistochemisch angefärbt auf AT8. Maßstab (A) = 100µm, Maßstab (B, C) = 200 µm. In der Übersichtsaufnahme lässt sich der nIII gut durch die Synaptophysin-Färbung abgrenzen. Die Detailaufnahmen B und C zeigen Tangles und zahlreiche Synaptophysin-positive Boutons außerhalb der neuronalen Membran (Pfeile).

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden funktionelle Neurone des Sakkadensystems, prämotorische Burst-Neurone im RIMLF und Motoneurone im nIII bei PSP-Fällen mit unterschiedlich ausgeprägten Sakkadenstörungen auf ihre PN untersucht. Ausgangspunkt der Arbeit waren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Morawski, die zeigten, dass die Verteilung von PN im primären sensorischen, in sekundären sowie assoziativen Cortex in post mortem Untersuchungen von Alzheimer-Fällen gegenüber Kontrollen nicht verändert war (Morawski et al., 2010; Morawski et al., 2012b). Nachdem die Autoren dort keine netztragenden Neurone mit NFT fanden, formulierten sie eine Hypothese, dass PN eine protektive Rolle für Neurone einnehmen könnten, die sie vor einer Tau-Pathologie verschont (Morawski et al., 2012b; Blosa et al., 2013). Ein weiteres Indiz dafür, dass die Hypothese von Morawski und Kollegen unterstützt ist, dass modulatorische Neuronengruppen in Locus coeruleus, in den Raphekernen (Hobohm et al., 1998) und im EWcp, die bekanntlich keine PN tragen (Horn et al., 2008), frühzeitig eine Taupathologie in Bezug auf die Alzheimer-Erkrankung zeigen, während Neuronengruppen mit prominenten PN, wie der RIMLF und nIII keine Taupathologie aufwiesen (Morawski et al., 2010). Das könnte als weiterer Hinweis dienen, dass PN eine protektive Rolle innehaben. In der vorliegenden Arbeit wurden nun post mortem Untersuchungen an klinischen Fällen von PSP unternommen, die eine Neurodegeneration gerade in den Hirnstammarealen zur Sakkadengeneration aufweisen. Die Analyse von PSP-Fällen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Augenbewegungsstörungen zeigte, dass trotz zahlreicher Netze sehr wohl eine ausgeprägte Taupathologie im RIMLF und nIII beobachtet werden kann (Feige et al., 2013).

Die Analyse doppelimmunhistochemischer Färbungen auf Netze und hyperphosphoryliertes Tau-Protein präsentierte grundsätzlich schwächer ausgeprägte und fragmentiertere PN in den untersuchten Kernarealen RIMLF und nIII von PSP-Fällen je stärker die Augenbewegungsstörungen ausgeprägt ist. Wie die Ergebnisse zeigen, gibt es genügend Beispiele dafür, dass PN auch um Tau-positive Neurone vorkommen. Diese Beobachtung lässt mutmaßen, dass die PN Neurone nicht vor einer Degeneration schützen. Obwohl sich der nIII und der RIMLF durch PN auszeichnen, konnten pNFT und NFT mit unterschiedlich intakten PN nachgewiesen werden.

Mehrere Aspekte, die nachfolgend beschrieben werden, müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

1. Ein wesentlicher Punkt ist, dass sich die Ausbreitungswege von AD und PSP unterscheiden. Während bei AD der RIMLF und der nIII nicht von der Tauopathie erfasst werden, sind bei PSP gerade diese Kerngebiete betroffen (Kim et al., 2009; Morawski et al., 2010). Laut der Seeding-Theorie von Braak breitet sich die Tauopathie entlang der Nervenbahnen in anterograder Richtung, also hier von prämotorischen zu motorischen Zentren aus (Braak and Del Tredici, 2016). Es wird die Hypothese vertreten, dass das abnormale Tau-Protein prionen-artig von Neuron zu Neuron übergreift. Dies soll von der betroffenen Tau-Isoform, von der Gehirnregion und der Art der Zelle, in der das Tau initial vorkommt, abhängig sein (Hasegawa, 2016; Lewis and Dickson, 2016).

2. Morawski und Kollegen konnte zeigen, dass bei Patienten mit AD keinerlei Degeneration im RIMLF und im nIII stattfindet und dort völlig intakte PN nachweisbar waren (Morawski et al., 2010).

Zur protektiven Wirkung der perineuronalen Netze existieren viele wissenschaftliche Arbeiten. Es wird postuliert, dass die PN aufgrund ihrer Struktur eine Schutzfunktion ausüben, aber auch ihr Vermögen Ionen zum Erhalt eines stabilen Mikromilieus abzapuffern, spielt eine Rolle (Soleman et al., 2013; Suttkus et al., 2014). Vor allem ACAN ist verantwortlich für die hohe negative Ladung der PN, worauf die protektiven Eigenschaften der Netze hauptsächlich zurückzuführen sind (Suttkus et al., 2014). Meine Beobachtung ergab, dass einerseits intakte Netzstrukturen sowohl um Neurone mit schwacher wie auch starker Immunreaktivität bei hyperphosphorylierten Tau-Proteinen auftraten, aber andererseits auch nur PN-Fragmente um mäßig oder stark degenerierte Neurone gefunden wurden. Demzufolge bieten die PN keine absolute protektive Funktion da im vertikalen Blickzentrum und im Kerngebiet des nIII sehr wohl hyperphosphorylierte Tau-Proteine nachweisbar waren. Gerade diese beiden Hirnareale nIII und RIMLF zeichnen sich durch eine hohe Expression der PN aus (Horn et al., 2003b; Horn et al., 2008). Die Beobachtung, dass degenerierte Neurone häufig keine oder nur teilweise perineuronale Netze aufweisen, legt nahe, dass die ECM verändert ist. Inwieweit aber eine Veränderung der ECM Voraussetzung für Tau-basierte Degeneration ist, bleibt noch unklar.

4.1 TECHNISCH-METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN

Es müssen auch technisch-methodische Überlegungen in die Ergebnis-Beurteilung miteinbezogen werden, die im Folgenden genauer erläutert werden. Zum einen müssen das Hirngewebe betreffend vor allem die Fixierungszeiten berücksichtigt und zum anderen die Charakteristika der verwendeten Antikörper diskutiert werden.

4.1.1 MASKIERUNG DER ANTIGENE

Die postmortale initiale Gewebeaufarbeitung, die Fixation und die Dauer der Aufbewahrung der Gewebeblöcke müssen als mögliche Faktoren für eine technisch-methodisch bedingte schlechte Nachweisbarkeit der PN in Betracht gezogen werden. Schwierigkeiten könnten sich möglicherweise dadurch ergeben, dass die Gehirne durch lange Lagerungszeiten in Formalin überfixiert wurden. Die lange Einwirkzeit von Formalin auf dieses Archivmaterial könnte dazu beitragen, dass die durch immunhistochemische Verfahren nachzuweisenden Antigene maskiert wurden. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten dieses Phänomen (Shiurba et al., 1998; Liu et al., 2010; Stumptner et al., 2016). Ein kritischer Punkt bei der Interpretation der Ergebnisse war die Beurteilung, inwieweit schwache PN-Anfärbungen auf methodische Parameter -wie Überfixierung- oder auf echte prämortale degenerative Prozesse der PSP-Erkrankung zurückzuführen waren. In der Tat wurde beobachtet, dass die PN bei frisch eingebettetem Gewebe, also nach frühestens 14 Tagen, besser angefärbt wurden, als bei den Archivfällen, bei denen das Gewebe mehrere Jahre in Formalin lagerte. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Antigene durch Formalin zerstört werden und sich somit dem immunhistochemischen Nachweis entziehen. Um diesen methodischen Effekt auch nach den vorgenommenen Demaskierungsmethoden besser einschätzen zu können, wurde bei jedem Fall die SO als interne Kontrolle gewählt. Die SO ist als Komponente der Hörbahn unabhängig von den neuronalen Netzwerken für das Augenbewegungssystem und zeigt stark ausgeprägte PN (Sonntag et al., 2015). Dies zeigt sich auch klinisch, da PSP-Patienten kein beeinträchtigtes Hörvermögen aufgrund ihrer Erkrankung aufweisen (Hughes et al., 2014). Hingegen lässt sich aber nicht ausschließen, dass die PN durch die PSP-Pathologie selbst noch zusätzlich geschädigt werden. Es könnte sich aber auch um eine Kombination beider Prozesse handeln. Somit bleibt offen, in welchem Ausmaß die Netze durch postmortale Gewebefixierung verändert werden und was dem

degenerativen Krankheitsprozess von PSP zuzuschreiben ist (siehe auch degenerativer Prozess der PN).

4.1.2 VERGLEICH DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER ZUR DARSTELLUNG DER PN

Als Marker für die Netzstrukturen wurden anti-ACAN, anti-HAPLN1 und anti-CSPG verwendet. Dadurch konnte die Verteilung und der Phänotyp der PN und der AC in bestimmten Kernarealen und um einzelne Synapsen dargestellt werden (Jäger et al., 2013). In die PSP-Analyse wurden hauptsächlich anti-ACAN und anti-HAPLN1 miteinbezogen, da anti-CSPG schon in den Gehirnschnitten des PSP-Falls mit inkompletter Blickparese kein deutlich abgrenzbares Anfärbemuster präsentierte. Dies wurde schon von Jäger et. al beschrieben (Jäger et al., 2013). Die zellulären Markierungen mit anti-CSPG Antikörpern bei den PSP-Fällen lassen vermuten, dass die CSPG-Komponenten von einer membranständigen Lokalisation in eine zelluläre übergegangen sind (Eggers et al., 2015). Ähnliche Beobachtungen der Anfärbungen mit Antikörpern auf die drei PN-Komponenten waren bei der post mortem Untersuchung eines Falles mit kompletter Blickparese nach einer Herzgefäßoperation beobachtet worden (Eggers et al., 2015). Die Annahme liegt nahe, dass die Zielkomponenten von anti-CSPG sehr empfindlich sind. Weil anti-CSPG, anti-HAPLN1 und anti-ACAN unterschiedliche Proteine der ECM markieren, wäre es möglich, dass die dargestellten Zielstrukturen sich in ihrer Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen unterscheiden. Diese Möglichkeit wurde schon früher in Betracht gezogen und diskutiert (Lendvai et al., 2013). Vor allem N-Acetylgalaktosamin enthaltende Seitenketten von CSPG gelten als besonders anfällig für schädigende Einflüsse (Morawski et al., 2012b).

Vor allem bei den Kontrollschnitten des nIII und des RIMLF ließ sich ein bestimmtes, charakteristisches Färbemuster für anti-ACAN und anti-HAPLN1 beobachten. Auch andere Arbeitsgruppen konnten dieses für den jeweiligen Antikörper spezifische Färbeverhalten beschreiben und reproduzieren. Jäger und Kollegen zeigte, dass anti-ACAN direkt an der Membran neuronaler Somata und Dendriten bindet, während anti-HAPLN1 auch weiter distal gelegene dendritische Kompartimente anfärbt und somit ein diffuseres Bild zeigt (Jäger et al., 2013). Anti-CSPG präsentierte sich als

Antikörper, der gitterartig bestimmte Neuronenpopulationen umgibt und auch das Neuropil reichlich mitanfärbt (Lendvai et al., 2013).

Bezogen auf die Netzfärbungen bei PSP-Fällen untersuchter Kernareale ließ sich nachweisen, dass sowohl im nIII als auch im RIMLF mittels anti-HAPLN1 ausgeprägte PN mit zusätzlicher Anfärbung des Neuropils auftraten, während anti-ACAN schwächere Anfärbungen zeigte. Außerdem wurde mittels anti-ACAN nur die direkte neuronale Membran gefärbt. Im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen ließen sich somit ähnlich Färbeergebnisse erzielen (Jäger et al., 2013; Lendvai et al., 2013).

Als letztes Kernareal wurde die Oliva superior miteinbezogen, die durch zahlreiche netztragende Neurone charakterisiert ist (Sonntag et al., 2015). Erstaunlicherweise bleibt die SO weitgehend von der Taupathologie verschont, was sich in dem späten PSP-Fall sehr eindrücklich in Abb. 15 zeigt, was für eine protektive Wirkung der PN sprechen würde. Auf der anderen Seite ist die SO nicht in die prämotorischen Bahnen zur Steuerung von Sakkaden eingebunden (siehe 4.3.1). Im vorliegenden Fall gelangt man zu dem Ergebnis, dass auch hier anti-HAPLN1 prominente Netze und anti-ACAN feine Netze mit schwächerer Anfärbung zeigen. Die Reproduzierbarkeit des Färbeergebnisses für alle drei verwendeten Netzmarker in Kontrollschnitten und Nachbarschnitten unterschiedlicher Schweregrade der Taupathologie lässt den Schluss zu, dass die Netzfärbungen funktioniert haben.

Das unterschiedliche Färbeergebnis mit anti-ACAN, anti-HAPLN1 und anti-CSPG lässt auf unterschiedliche Funktionen an der Zelloberfläche und an den Terminalen der eingehüllten Neurone schließen. Die PN ermöglichen lokale Modifikationen der Oberflächenmoleküle und regulieren somit die Funktion synaptischer Rezeptoren und die Funktion von Ionenkanälen (Brückner et al., 1993; Brückner et al., 1996; Davies et al., 1999; Härtig et al., 1999). ACAN gilt als Hauptbestandteil der ECM. Als Funktion wird vermutet, dass vor allem ACAN synaptische Kontakte stabilisiert (Hockfield et al., 1990) und möglicherweise eine Diffusionsbarriere für positiv geladene Moleküle bildet (Steindler et al., 1989; Wu et al., 2005; Morawski et al., 2012b; Blosa et al., 2013). HAPLN1 hingegen ist dafür verantwortlich, dass CSPG und HA zu perineuronalen Netzen verlinkt werden und dadurch die synaptische Plastizität gehemmt wird (Carulli et al., 2007; Carulli et al., 2010).

4.2 TAU-ERSCHEINUNGSFORMEN

Bei der Ergebnisinterpretation ist es wichtig zu bedenken, dass Tau-Ablagerungen, die durch Phosphorylierungsprozesse entstehen, auch in Gehirnen gesunder, älterer Personen nachweisbar sind (Iqbal et al., 2005; Gotz et al., 2010). Unter physiologischen Bedingungen ist das Tau-Protein ein lösliches Eiweißmolekül, welches keine Sekundärstruktur besitzt. Als mikrotubuli-assoziiertes Tau-Protein (MAPT) ist es ein wesentlicher Bestandteil von reifen Neuronen, dessen biologische Aktivität vom Grad der Phosphorylierung abhängt (Iqbal et al., 2005). Das Gen MAPT auf Chromosom 17q21 führt zu einer posttranslationalen Modifikation des Proteins und Entstehung von sechs verschiedenen Tau-Isoformen im adulten Gehirn. Diese unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von einem oder zwei Inserts am aminoterminalen Ende und haben drei bis vier Mikrotubuli-bindende Wiederholungssequenzen am carboxyterminalen Ende. Tau kommt, wie auch in den Ergebnissen beobachtet, sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten vor. (Gotz et al., 2010)

Recherchen zeigten, dass hyperphosphoryliertes Tau im Rahmen von Tauopathien in verschiedenen Erscheinungsformen und Zuständen vorkommt. Neben dem physiologischen, funktionellen Tau-Protein existiert auch ein hyperphosphoryliertes, toxisches Tau-Protein, das letztendlich zu einer anterograden Neurodegeneration führt (Iqbal et al., 2005). Entweder liegt Tau als lösliches Tau vor oder in Aggregaten als NFTs, NTs, coiled bodies oder tufted astrocytes (Tawana and Ramsden, 2001; Morcinek et al., 2013; Yoshida, 2014). Neurofibrilläre Läsion findet man in Zellkörpern und apikalen Dendriten als NFTs und in distalen Dendriten als NTs (Gotz et al., 2010). Innerhalb der NFTs tendiert Tau dazu, PHF, die unterschiedlich hyperphosphoryliert sind, zu formieren (Iqbal et al., 2005). Der Grad der Hyperphosphorylierung korreliert aber nicht mit der Ausbildung von NFTs. NFTs können eine granuläre Anfärbung zeigen, was auf Pretangle-Neurone, also Vorstufen, hinweist oder sie werden bei homogener Strukturierung als NFT bezeichnet (Braak et al., 1994). Dieses Phänomen konnte wiederholt bei den PSP-Fällen unterschiedlicher klinischer Schweregrade reproduziert werden. Es konnten genügend Beispiele für einerseits eher granuläre pNFTs und andererseits eher homogene NFTs gefunden werden. Im Verlauf der Tauopathie PSP kommt es außerdem zu einer Umverteilung des Tau-Proteins von axonalen zu eher somatodendritischen Kompartimenten der Neurone.

Die zur Anfärbung hyperphosphorylierter Tau-Proteine verwendeten Antikörper AT8 und TAU zeigten vergleichbare Färbeergebnisse. Beide Antikörper binden an bestimmte Aminosäuren hyperphosphorylierter Tau-Proteine, einzig die Position ist unterschiedlich. Bei TAU handelt es sich um Epitope von Serin 422 (Augustinack et al., 2002), bei AT8 um Epitope von Serin 202/Threonin 205 (Goedert et al., 1995). AT8 markiert NFT im Nativstadium der Phosphorylierung, also frühe zytoskelettale Änderungen und ist nicht in der Lage, unphosphoryliertes Tau zu erkennen (Goedert, 1996).

4.3 DEGENERATIVER PROZESS DER PN

Es ist unklar, ob der Verlust perineuronaler Netze auf den Untergang von PN-Komponenten selbst zurückzuführen ist oder ob dies eine Konsequenz von Zelldysfunktion oder Degeneration der Neurone ist (Cabungcal et al., 2013). Es könnte also möglich sein, dass sich nach Bildung hyperphosphorylierter Tau-Proteine in weiterer Folge die Netze auflösen. Es wäre aber auch denkbar, dass die Netzkomponenten zerstört werden und dadurch sekundär neuronale und gliale pathologische Tau-Einschlüsse entstehen.

Bei Analyse der pathologischen Gehirnschnitte konnte man neben Neuronen mit hyperphosphorylierten Tau-Proteinen ohne Netze auch solche mit gut ausgeprägten Netzen detektieren. Daneben ließen sich auch Neurone, die hyperphosphoryliertes Tau-Protein exprimierten mit partiellen PN abgrenzen. Wenn die PN also tatsächlich eine Schutzfunktion auf die Neurone ausüben würden, zum Beispiel durch Aufrechterhaltung des Ionenmilieus aufgrund ihrer hohen Feuerungsrate, so scheinen sie aber grundsätzlich keinen Schutz vor Degeneration zu bieten. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Morawski und Kollegen bei AD-Fällen. Daraus lässt sich die Hypothese generieren, dass die PN-tragenden Neurone, die via Ausbreitung der PSP-Pathologie betroffen sind, nicht vor Degeneration geschützt sind. Die Annahme legt nahe, dass sowohl bei PSP als auch im Rahmen von anderen degenerativen Erkrankungen mit ähnlichem Pathomechanismus eine Schädigung der PN-tragenden Neurone stattfindet.

4.3.1 CHARAKTERISTIKA VON NEURONEN MIT PN UNTERSUCHTER KERNAREALE

Allgemein sind PN mit unterschiedlichen Neuronentypen assoziiert (Brückner et al., 1993; Celio et al., 1998). Eine Gruppe umfasst stark aktive Neurone mit hohen oder andauernden Feuerraten, die meist auch das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (PAV) enthalten (Härtig et al., 1994). Zu dieser Gruppe gehören funktionelle Neurone des Sakkadensystems. Sowohl im nIII als auch im RIMLF wurden zahlreiche, für diese beiden Kernareale charakteristische PN gefunden. Bezüglich des nIII existieren zwei differente Neuronentypen, die sich aufgrund der An- oder Abwesenheit von PN unterscheiden (Horn et al., 2008). Dabei wurde gezeigt, dass die Twitch-Motoneurone PN exprimieren, während die Non-Twitch-Motoneurone keine Netze besitzen und sich als ein durchgehendes Band von kleinen cholinergen Neuronen am medialen Rand des nIII abzeichnen (Zeeh and Horn, 2012). Einzelnnervierte Twitchfasern gehören zu den Skelettmuskelfasern und führen zu schnellen Muskelkontraktionen, multipel innervierte Non-twitch-Muskelfasern bewirken eine langsam tonische Kontraktion (Jacoby et al., 1989). Die Motoneurone der einzeln innervierten Muskelfasern repräsentieren schnell feuernde Neurone, die bei Augenbewegungen, einschließlich der schnellen Sakkaden, mit hochfrequenten Aktivitätsbursts feuern und mit der Expression von PAV und PN einhergehen (Horn et al., 2003a).

Auch die exzitatorischen prämotorischen Burst-Neurone im RIMLF repräsentieren schnell-feuernde Nervenzellen, die durch gut ausgebildete PN gekennzeichnet sind (Büttner-Ennever et al., 1982; Horn and Büttner-Ennever, 1998; Horn et al., 2003a). Außerdem enthalten die Burst-Neurone alle das Calcium-bindende Protein PAV (Horn and Büttner-Ennever, 1998). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hobohm und Kollegen, die zeigten, dass modulierende serotonerge Neurone in den Raphe-Kernen keine Netze tragen (Hobohm et al., 1998), zeigten die Neurone im EWcp entsprechend früherer Arbeiten ebenfalls keine Netze (Horn et al., 2008). Hier traten regelmäßig zahlreiche Tau-positive Neurone auf, woraus sich eine erhöhte Vulnerabilität der Neurone im EWcp ableiten ließe (Horn et al., 2008). Die zentral projizierenden Neurone des EWcp repräsentieren peptidergen, urocortinhaltige Neuronen, die sich von den cholinergen, parasymphatischen Neuronen des präganglionären Nucleus Edinger-Westphal, die Pupillenreaktion und Akkommodation kontrollieren, unterscheiden (Horn et al., 2008; Kozicz et al., 2011). Untersuchungen

von Rüb und Kollegen zeigten, dass modulatorische Zellgruppen, wie die Raphe-Kerne bei AD bevorzugt degenerieren, wozu auch der EWcp gehört (Rüb et al., 2001). Die urocortinhaltigen Neurone des EWcp stehen in engem Zusammenhang mit der Modulation und Regulation von Stress (Weninger et al., 2000; Kozicz et al., 2001). Inwieweit sich das bei der Alzheimer-Erkrankung symptomatisch zeigen lässt, bleibt noch zu untersuchen.

Zur Überprüfung der Färbegüte wurden SO-Nachbarschnitte zu den untersuchten Kernarealen verwendeter Fälle gefärbt. Auffällig ist, dass die Oliva superior komplett von PSP ausgespart ist und daher in den Nachbarschnitten kaum Degeneration zeigt (Hughes et al., 2014; Sonntag et al., 2015). Dies könnte darin begründet sein, dass die SO nicht in das Neuronennetzwerk eingebunden ist, das bei PSP degeneriert und auch keine direkten Verbindungen zu Neuronengruppen des Augenbewegungssystems aufweist. Möglicherweise liegt es aber auch daran, dass die obere Olive durch ihre charakteristischen physiologischen Eigenschaften, die untenstehend beschrieben werden, geschützt ist. Besonders die fusiformen, zentral gelegenen Zellkörper besitzen prominente Netze und repräsentieren vermutlich „principle cells“. Bei den „principle cells“ handelt es sich um netzreiche Zellen des Nucleus medialis des Corpus trapezoideum (MNTB), die zelluläre Besonderheiten aufweisen (Atoji et al., 1989; Bertolotto et al., 1996; Lurie et al., 1997; Friauf, 2000; Härtig et al., 2001; Bekku et al., 2003; Hilbig et al., 2007). Jede einzelne „principle cell“ im auditorischen zentralen Nervensystem ist von einer großen Präsynapse, in ihrer Gesamtheit Calyx von Held genannt, umgeben (von Gersdorff and Borst, 2002; Hoffpauir et al., 2006). Als eines der schnellsten synaptischen Transmissionssysteme dient die Calyx von Held der raschen Signalübertragung im „Held-MNTB-principle cell-Komplex“ (von Gersdorff and Borst, 2002; Hoffpauir et al., 2006; Schneggenburger and Forsythe, 2006). Dass die netztragenden Neurone des MNTB zusammen mit Calcium-bindenden Proteinen und der Kalium-Kanal-Untereinheit Kv3.1b vorkommen, ist ein Hinweis darauf, dass es sich um hochaktive Neurone handelt (Härtig et al., 2001). Neben den „principle cells“ zeichnen sich auch Neurone des SPON und Zellgruppen in posteriorer Lage durch zahlreiche PN aus (Kulesza, 2008). Auch der LNTB, der PPO und der Nucleus lateralis des Corpus trapezoideum besitzen, wenn auch in geringerem Ausmaß PN (Schmidt et al., 2010). Bei Analyse der Schnitte konnte man beobachten, dass sich im SPON, im LNTB und im PPO Netze nachweisen ließen. Die LSO und die MSO sind durch

einzelne Netze gekennzeichnet, oftmals mit starker Anfärbung des Neuropils. Dies wurde auch bei Kulesza und Kollegen beobachtet (Kulesza, 2007).

4.4 WEITERE FUNKTIONEN PERINEURONALER NETZE

PN sind spezialisierte geladene ECM-Komponenten, die sich um bestimmte Neurone des ZNS anlagern (Celio et al., 1998). Die genaue Funktion der PN ist noch unklar, jedoch werden mehrere Aufgaben diskutiert.

Die PN sind durch Änderung des Ionenmilieus in der Lage, ein genau definiertes extrazelluläres Milieu aufrecht zu erhalten und somit die Neurone vor oxidativen Stressreaktionen zu schützen (Brückner et al., 1996; Hobohm et al., 1998; Härtig et al., 1999). Ihr polyanionischer Charakter führt zu einer Pufferung von Ionen durch Bindung von Kationen und so zu einer Kontrolle der ionischen Diffusion (Brückner et al., 1993). Daraus lässt sich ableiten, dass PN als Filter für Rezeptorsignale fungieren und die synaptische Kommunikation überwachen (Brückner et al., 1993).

Celio und Blümcke forschten an der Beobachtung, dass PN neurotrophe Moleküle, wie z. B. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren anlocken. Nach Schädigung von PN werden vermehrt neurotrophe oder andere protektive Mediatoren gebildet. (Celio and Blümcke, 1994)

Als weitere wesentliche Funktion gilt die Ausbildung (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Dino et al., 2006) und Stabilisierung (Pizzorusso et al., 2002; Berardi et al., 2003; Dityatev and Schachner, 2003; Rhodes and Fawcett, 2004) von Synapsen während der Entwicklung. Mechanismen, die sowohl für die gerade genannten Aufgaben als auch für die Regulation der lokalen Ionen-Homöostase eine Rolle spielen, sind die Verhinderung eines Transmitterüberschusses (Vargova and Sykova, 2008; Dityatev et al., 2010b) und die laterale Rezeptordiffusion (Frischknecht et al., 2009). Die perineuronalen Netze regulieren auch die neuronale Plastizität (Frischknecht et al., 2009; Carulli et al., 2010). Sind die Netze komplett ausgebildet, wird die Plastizität inhibiert (Bradbury et al., 2002; Pizzorusso et al., 2002; Massey et al., 2006; Pizzorusso et al., 2006; Galtrey et al., 2008; Garcia-Alias et al., 2009). In der Folge lässt sich die Reorganisation neuronaler PN einleiten, wenn die Netzstrukturen enzymatisch aufgelöst werden (Abb.1) (Wang and Fawcett, 2012).

4.5 PRAKTISCH-KLINISCHE RELEVANZ

4.5.1 ENZYMATISCHE NETZAUFLÖSUNG

Mit der klinischen Relevanz perineuronaler Netze befassten sich viele Forschungsgruppen in Bezug auf Neuropathologie, Regeneration und Erstellung von multiplen Therapiemodellen (Viapiano and Matthews, 2006; Busch and Silver, 2007; Crespo et al., 2007; Galtrey and Fawcett, 2007; Kwok et al., 2011; Bartus et al., 2012; Garcia-Alias and Fawcett, 2012). Netztragende Neurone weisen eine niedrige synaptische Plastizität auf und verhindern, aufgrund ihrer Netze, axonale Regeneration. Am Ende der kritischen Periode in der PN-Entwicklung ist die Menge an inhibitorischem CSPG sehr hoch. Mithilfe einer intrakortikalen Injektion eines Enzyms Chondroitinase ABC ist es möglich, die Netze aufzulösen und die synaptische Plastizität zu reaktivieren. (Brückner et al., 1998; Sorg et al., 2016) Chondroitinase ABC ist ein Enzym, das selektiv Chondroitin sulfatierte GAG-Ketten abbaut (vgl. Abb 1B). Wenn also der Untergang von Neuronen in den Krankheitsprozess involviert ist, könnte man durch Enzymgabe die Regeneration fördern, so zum Beispiel bei Patienten mit Querschnittlähmung. (Fitch and Silver, 2008; Fawcett and Curt, 2009; Bartus et al., 2012) Therapien, die darauf abzielen, die Plastizität durch den Abbau von CS GAG zu reaktivieren, könnten in Zukunft ein Baustein für die erfolgreiche Behandlung von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, so auch AD sein (Soleman et al., 2013). Gleichermäßen wäre es denkbar, netzerneuernde Therapien zur Wiederherstellung der Funktion bei Sakkadenstörungen bei PSP-Patienten zu entwickeln. Dennoch lässt sich noch nicht abschätzen, welche Nebenwirkung durch die Freisetzung von CSPG-Seitenketten entstehen. Zur Anwendung in der Klinik bedarf es folglich umfassender Forschungsarbeit.

4.5.2 PN UND ISCHÄMIE

Die Komposition der reifen ECM in Form von PN ist als stabil anzusehen, solange bis Läsionen, beispielsweise zerebrale Gefäßokklusionen, auftreten. Die Arbeitsgruppe von Hobohm und Kollegen (Hobohm et al., 2005) untersuchte am Tiermodell die postischämischen Auswirkungen auf die Einzelbestandteile der PN. Jede Verletzung des Gehirns, so auch jeder Apoplex, führt zu einer glialen Narbenentstehung, die als Barriere zum Schutz des umgebenden Gewebes dient (Anderson et al., 2003; Rhodes and Fawcett, 2004). Dadurch werden aber auch die Bedingungen für Reorganisations-

und Regenerationsprozesse von geschädigten Neuronen und deren Netze verändert (Dityatev and Schachner, 2003; Silver and Miller, 2004). In glialen Narben sind Tenascin und manche CSPGs, also Versican, Brevican und Neurocan hochreguliert (Asher et al., 2001; Rhodes and Fawcett, 2004; Silver and Miller, 2004). Nach Ischämie lässt sich zuerst beobachten, dass GAG-Komponenten, möglicherweise durch von geschädigten Neuronen und Gliazellen freigesetzten lysosomalen Glykosidasen, zerstört werden und gleichzeitig Neurone zugrunde gehen (Chue et al., 1993; Bidmon et al., 1997). Außerdem kommt es zu einer Verringerung von Astroglia, einem Verlust der PAV-Immunreaktivität und der Kaliumkanal-Untereinheit Kv3.1b (Hobohm et al., 2005). In weiterer Folge wird das Core-Protein von CSPG abgebaut, während zeitgleich Blutzellen aus der Peripherie ins Zentrum einwandern (Tanaka et al., 2003). Dann lösen sich die PN soweit auf, dass sie nach wenigen Tagen nur mehr durch eine schwache anti-CSPG-Färbung auffallen. Dies wird dadurch erklärt, dass Neurone, die in die betroffenen Areale projizieren, in Mitleidenschaft gezogen werden (Hobohm et al., 2005). Für den Untergang von Projektionsneuronen soll aktiviertes Mikroglia verantwortlich sein, welche die Nervenzellen phagozytiert (Hobohm et al., 2005). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zerstörung einzelner ECM-Komponenten durch aktiviertes Mikroglia den neuronalen Tod vorantreibt (Belichenko et al., 1997; Belichenko et al., 1999). Die Annahme, dass zu Beginn Einzelbestandteile der ECM geschädigt werden und danach erst der neuronale Zelltod eintritt, geht auf Studien humaner Gehirne nach HIV-Infektion oder Creuzfeldt-Jakob-Erkrankung zurück (Belichenko et al., 1999). Außerdem sind Enzyme aus der Familie der Metalloproteinasen und deren Gewebeinhibitoren nach Ischämie vermehrt nachweisbar (Planas et al., 2001; Maier et al., 2004; Sole et al., 2004) und führen zu einer Aufspaltung von ECM-Bestandteilen (Stamenkovic, 2003; Crocker et al., 2004; Rauch, 2004). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass möglicherweise auch bei neurodegenerativen Krankheiten erst die Netzstrukturen und sekundär die Neurone zugrunde gehen. Es wäre denkbar, dass durch die oben beschriebenen postischämischen Veränderungen neben den beschriebenen schädigenden Einflüssen Heilungsprozesse mittels Reaktivierung der synaptischen Plastizität eingeleitet werden können. (Witte and Stoll, 1997; Calabresi et al., 2003). Eine pharmakologische Therapie sollte also darauf abzielen, inhibitorische CSPG-

Seitenketten aufzulösen, um axonales Wachstum zu ermöglichen (Burnside and Bradbury, 2014).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Forschungsarbeit befasst sich mit der Untersuchung der kondensierten Extrazellulärmatrix (ECM) in Form perineuronaler Netze (PN) an funktionellen Neuronen des Sakkadensystems im Hirnstamm von post mortem Fällen mit progressiver supranukleärer Parese (PSP). PSP ist eine primäre Tauopathie und die zweithäufigste Form eines neurodegenerativen Parkinson-Syndroms. Eines der ersten Symptome ist das Auftreten von verlangsamten vertikalen Sakkaden bis hin zu vertikalen Blickparesen und im fortgeschrittenen Stadium zusätzlich horizontale Blickparesen. Die Diagnose erfolgt post mortem anhand der Identifizierung von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen in Form von neurofibrillären Pretangles (pNFT), Tangles (NFT), Neuropilfäden (NT) sowie „tufted astrocytes“ und „coiled bodies“ von Glia und Neuronen in bestimmten Hirnregionen. PN finden sich hauptsächlich an schnell feuernenden Neuronen, wie den prämotorischen Burst-Neuronen im Nucleus rostralis interstitialis des Fasciculus longitudinalis medialis (RIMLF) und den Motoneuronen der äußeren Augenmuskeln im Nucleus oculomotorius (nIII) und können als histochemische Marker dieser Neurone eingesetzt werden. Neben anderen Funktionen wird den PN eine Schutzfunktion zugesprochen, die assoziierte Neurone bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer (AD), verschonen könnte. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, indem eine neurodegenerative Erkrankung gewählt wurde, bei der die Tau-Pathologie gerade in PN-reichen Augenbewegungszentren des Hirnstamms erwartet wird.

Es wurden bei 6 PSP-Fällen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Sakkadenstörungen prämotorische Burst-Neurone im RIMLF und Motoneurone im nIII auf ihre Tau-Pathologie und assoziierte PN untersucht. Dazu wurden Paraffinschnitte aus dem RIMLF, nIII und zentral projizierenden Edinger-Westphalkern (EWcp) von den PSP-Fällen und Kontrollfällen auf PN und hyperphosphoryliertes Tauprotein mit Doppelimmunperoxidase-Methoden angefärbt. Zusätzlich diente die PN-reiche Oliva superior (SO) als Kern der Hörbahn als interne Färbekontrolle. Die Visualisierung der PN erfolgte mit Antikörpern gegen verschiedene Komponenten der PN, e.g. HA- und Proteoglykan-Linkprotein (HAPLN1), Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG) und Aggrecan (ACAN), die Markierung hyperphosphorylierter Tau-Proteine mit den Antikörpern AT8 und TAU.

Die lichtmikroskopische Analyse der Kontrollfälle ergab, dass die Neurone im RIMLF, im nIII und SO mit prominenten PN assoziiert waren, die mit allen drei Antikörpern gegen unterschiedliche Komponenten der PN nachgewiesen werden konnten. Während bei den frühen PSP-Fällen mit einer vertikalen Blickparese, wo bereits eine gering ausgeprägte Tau-Pathologie im RIMLF und nIII auftrat, die PN in beiden Kernen gut anfärbbar waren, so erschienen sie bei den späten Fällen mit ausgeprägten vertikalen und horizontalen Blickparesen und vermehrter Tau-Pathologie nur noch fragmentiert oder waren nicht mehr nachweisbar. Dabei zeigte insbesondere der Antikörper gegen CSPG nur noch zelluläre Anfärbungen im nIII und RIMLF. Um Fehlinterpretationen aufgrund einer möglichen Überfixierung des Gewebes auszuschließen, wurde auch die SO bei allen PSP-Fällen analysiert. Die PN der SO konnten bei PSP-Fällen nachgewiesen werden. Die Doppelimmunfärbungen auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein und PN im RIMLF und nIII in den PSP-Fällen zeigten folgenden Befund: grundsätzlich waren die PN um Tau-negative Neurone gut nachweisbar. Neben zahlreichen Tau-positiven Neuronen, die fragmentierte oder keine PN aufwiesen, fanden sich jedoch auch Tau-positive Neurone mit relativ intakten PN. Der EWcp, der keine PN enthält, wies bei allen Fällen Tau-positive Neurone auf. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bei neurodegenerativen Erkrankungen auch netztragende Nervenzellen nicht ausgespart werden und zugrunde gehen. Ob die Neurone aufgrund des Untergangs der PN von der Tauopathie erfasst werden oder aber ob die Neurone selbst degenerieren und die PN sich erst danach auflösen, bleibt offen.

6 ANHANG

6.1 FÄRBE-PROTOKOLLE

Protokoll 1: Nissl-Färbung

Protokoll 2: Gallyas-Färbung

Protokoll 3: Hämalaun-Färbung

Protokoll 4: Maus-anti-Aggregan-DAB-Ni + Kaninchen-anti-Tau (pT205)-DAB

Protokoll 5: Maus-anti-CSPG-DAB-Ni + Kaninchen-anti-Tau (pT205)-DAB

Protokoll 5: Ziege-anti-HAPLN1-DAB-Ni + Maus-anti-Human PHF-Tau-DAB

Protokoll 6: Ziege-anti-HAPLN1-DAB-Ni + Kaninchen-anti-Tau (pT205)-DAB

Protokoll 7: Kaninchen-anti-Synaptophysin-DAB-Ni + Maus-anti-Human PHF-Tau-DAB

Nisslfärbung für Paraffinschnitte

Lösung:

0,5 g Kresylviolett in 100 ml Aqua destillata pH 7,4

Entfetten:

- | | |
|--------------|-----------------|
| 1. 2x 30 min | Xylol |
| 2. 10 min | 100% Alkohol |
| 3. 10 min | 96% Alkohol |
| 4. 10 min | 90% Alkohol |
| 5. 10 min | 70% Alkohol |
| 6. 10 min | Aqua destillata |

Färbung:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. 5 min | 0,5% Kresylviolettacetat in Aqua destillata 7,4 |
| 2. kurz waschen | Aqua destillata |
| 3. 5 min | 70% Alkohol |
| 4. 5 min | 90% Alkohol |
| 5. bis hell genug | 96% Alkohol ¹ |
| 6. 5 min | 100% Alkohol |
| 7. 2x je 15 min | Xylol |
| 8. Eindeckeln | |

¹ Wenn noch keine Differenzierung möglich, dann 96% Alkohol mit 2 Tropfen Essigsäure

Gallyas-Färbung

Vorbereitung:

1. 25 min 70% Alkohol, dann wenden und nochmals 25 min
2. Über Nacht 96% Alkohol

Lösungen:

- Imprägnierungslösung: 500 ml Aquadest + 475 mg Ammoniumnitrat + 500 mg Silbernitrat (unter Rühren in dieser Reihenfolge ansetzen) + NaOH bis pH 7,6

- Entwickler:
 - Lsg A: 300 ml Aquadest + 15 g Natriumcarbonat (wasserfrei)

 - Lsg B: 300 ml Aqua destillata + 600 mg Ammoniumnitrat + 600 mg Silbernitrat + 3 g Wolframkieselsäure

 - Lsg C: 90 ml B + 0,3 ml Formalin

- Natriumthiosulfat: 200 ml Aquadest + 4 g Natriumthiosulfat

- Essigsäure: 995 ml Aquadest + 5 ml Essigsäure

- zum Säubern: 0,5 g Kaliumhexacyanoferrat II + 240 ml Aquadest

Vorbehandlung und Färbung:

1. 60 min Pyridin/Essigsäureanhydrid im Verhältnis 2:1
2. 3x je 5 min Aqua destillata
3. 1 Stunde Imprägnierung bei 24 Grad im Dunklen (im Wasserbad auf Schüttler)
4. Kurz Aqua destillata
5. 10 min 0,5% Essigsäure
6. 2x je 5 min Aqua destillata
7. Kurz Entwickler (100 ml A + 70 ml B + 30 ml C = 200 ml)

-
- | | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 8. Kurz | Stoppen in 0,5% Essigsäure |
| 9. 2x je 5 min | Aqua destillata |
| 10. 2 min | Säubern in Kaliumhexacyanoferrat |
| 11. 2x je 5 min | Aqua destillata |
| 12. 1 min 2% | Natriumthiosulfat (Fixer) |
| 13. 20 min | unter fließendes Leitungswasser |
| 14. Entwässern und Eindeckeln | |

Hämalaun-Färbung nach Mayer

Lösung:

Hämalaun: 1000 ml Aqua destillata + 1 g Hämatoxylin + 0,2 g Natriumjodat (NaJO₃)+ 50 g Kalialaun + 50 g Chloralhydrat + 1 g krist. Zitronensäure

filtrieren und in dunkler Glasflasche lagern (haltbar für lange Zeit)

Färbung:

1. 5 min Aqua destillata
2. 2 min Hämalaun
3. 15 min fließendes Leitungswasser
4. Kurz Aqua destillata
5. 5 min 70% Alkohol
6. 5min 90% Alkohol
7. 1-5 min 96% Alkohol
8. 1-5 min 100% Alkohol
9. 2x je 15 min Xylol
10. Eindeckeln

Antikörper 1	<i>mouse-anti-Aggrecan (ACAN)-monoclonal-Antibody, Acris Antibodies = SM1353 (Lagertemperatur:-20°C)</i>
Antikörper 2	<i>rabbit-anti-Tau (pT205)-phosphospecific-polyclonal-Antibody, unconjugated, Invitrogen = 44738G (Lagertemperatur:-20°C)</i>

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 30 min gebrauchtes Xylol
2. 2x je 15 min frisches Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 10 min 90% Alkohol
6. 10 min 70% Alkohol
7. kurz Aqua destillata
8. 5x je 3 min in Mikrowelle in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0² (Lösung in Spezial-Plastik-Küvetten, Mikrowelle auf Stufe 8 und dazwischen mit 0,01M Citrate Puffer nachfüllen)
9. 15 min bei RT in Citratpuffer abkühlen lassen
10. Kurz Aqua destillata
11. 3x je 5 min 0,1M TBS pH 7,4

1.Tag:

1. 30min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M TBS)
2. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
3. 1h bei RT Präinkubation (5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4)
4. 48 h bei 4 Grad Antikörper 1 = **mouse-anti-ACAN, Verdünnung 1:50** in 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

2.Tag:

1. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
2. 1h bei RT biotinylierter 1.Antikörper = **horse-anti-Mouse, Verdünnung 1:200** in 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS (TBS-RSA)
3. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4

² Herstellung Sodium Citrat Puffer 0,01M pH 6,0 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O):

2,94g in 900 ml Aqua dest. auf pH 6,0 einstellen und mit A. dest bis 1000 ml einfüllen

-
- | | |
|----------------|--|
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Ni-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB in
0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ³ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6+ 40 mg filtriertes Ammonium-Nickel

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

- | | |
|--------------------|--|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 30min | Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS) |
| 9. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 10. 1h bei RT | Präinkubation (5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in
0,1M TBS pH 7,4) |
| 11. 48h bei 4 Grad | Antikörper 2 = rabbit-anti-TAU, Verdünnung 1:1000 in
5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4 |

3.Tag:

- | | |
|----------------|---|
| 1. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 2. 1h bei RT | biotinylierter 2. Antikörper = goat-anti-Rabbit,
Verdünnung 1:200 in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 10min | DAB-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB
+ 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ⁴ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

³ Herstellung 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

⁴ Anmerkung: 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

-
- | | |
|--------------------|-----------------|
| 6. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 7. 5min | Aqua destillata |
| 8. Trocknen lassen | |
| 9. 5 min | 70% Alkohol |
| 10.5min | 90% Alkohol |
| 11.5 min | 96% Alkohol |
| 12.5 min | 100% Alkohol |
| 13.20min | Xylol |
| 14. Eindeckeln | |

Antikörper 1	<i>mouse-anti-CSPG-Antibody, Chemicon, MAB5284</i> (Lagertemperatur:-20°C)
Antikörper 2	<i>rabbit-anti-Tau (pT205)-phosphospecific-polyclonal-Antibody, unconjugated, Invitrogen = 44738G</i> (Lagertemperatur:-20°C)

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 30 min gebrauchtes Xylol
2. 2x je 15 min frisches Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 10 min 90% Alkohol
6. 10 min 70% Alkohol
7. kurz Aqua destillata
8. 5x je 3 min in Mikrowelle in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0⁵ (Lösung in Spezial-Plastik-Küvetten, Mikrowelle auf Stufe 8 und dazwischen mit 0,01M Citrate Puffer nachfüllen)
9. 15 min bei RT in Citratpuffer abkühlen lassen
10. Kurz Aqua destillata
11. 3x je 5 min 0,1M TBS pH 7,4

1.Tag:

1. 30min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M TBS)
2. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
3. 1h bei RT Präinkubation (5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4)
4. 48 h bei 4 Grad Antikörper 1 = **mouse-anti-CSPG, Verdünnung 1:500** in 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

2.Tag:

1. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
2. 1h bei RT biotinylierter 1.Antikörper = **horse-anti-Mouse, Verdünnung 1:200** in 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS (TBS-RSA)
3. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4

⁵ Herstellung Sodium Citrat Puffer 0,01M pH 6,0 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O):

2,94g in 900 ml Aqua dest. auf pH 6,0 einstellen und mit A. dest bis 1000 ml einfüllen

-
- | | |
|----------------|--|
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Ni-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB in
0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ⁶ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6+ 40 mg filtriertes Ammonium-Nickel

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

- | | |
|--------------------|--|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 30min | Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS) |
| 9. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 10. 1h bei RT | Präinkubation (5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in
0,1M TBS pH 7,4) |
| 11. 48h bei 4 Grad | Antikörper 2 = rabbit-anti-TAU, Verdünnung 1:1000 in
5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4 |

3.Tag:

- | | |
|----------------|---|
| 1. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 2. 1h bei RT | biotinylierter 2. Antikörper = goat-anti-Rabbit,
Verdünnung 1:200 in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 10min | DAB-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB
+ 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ⁷ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

⁶ Herstellung 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

⁷ Anmerkung: 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

-
- | | |
|--------------------|-----------------|
| 6. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 7. 5min | Aqua destillata |
| 8. Trocknen lassen | |
| 9. 5 min | 70% Alkohol |
| 10.5min | 90% Alkohol |
| 11.5 min | 96% Alkohol |
| 12.5 min | 100% Alkohol |
| 13.20min | Xylol |
| 14. Eindeckeln | |

Antikörper 1	<i>goat-anti-human-HAPLN1-Antibody,</i> (Lagertemperatur:-20°C)	<i>R&DSystems</i>
Antikörper 2	<i>mouse-anti-human-PHF-Tau-monoclonal Antibody (AT8); Thermo Scientific-MN1020</i> (Lagertemperatur:-20°C)	

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 30 min gebrauchtes Xylol
2. 2x je 15 min frisches Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 10 min 90% Alkohol
6. 10 min 70% Alkohol
7. kurz Aqua destillata
8. 5x je 3 min in Mikrowelle in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0⁸ (Lösung in Spezial-Plastik-Küvetten, Mikrowelle auf Stufe 8 und dazwischen mit 0,01M Citrate Puffer nachfüllen)
9. 15 min bei RT in Citratpuffer abkühlen lassen
10. Kurz Aqua destillata
11. 3x je 5 min 0,1M TBS pH 7,4

1.Tag:

1. 30min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M TBS)
2. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
3. 1h bei RT Präinkubation (5% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4)
4. 48 h bei 4 Grad Antikörper 1 = **goat-anti-HAPLN1, Verdünnung 1:400** in 5% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

2.Tag:

1. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
2. 1h bei RT biotinylierter 1.Antikörper = **rabbit-anti-Goat, Verdünnung 1:200** in 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS (TBS-RSA)
3. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4

⁸ Herstellung Sodium Citrat Puffer 0,01M pH 6,0 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O):

2,94g in 900 ml Aqua dest. auf pH 6,0 einstellen und mit A. dest bis 1000 ml einfüllen

-
- | | |
|----------------|--|
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Ni-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB in
0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ⁹ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6+ 40 mg filtriertes Ammonium-Nickel

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

- | | |
|--------------------|---|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 30min | Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS) |
| 9. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 10. 1h bei RT | Präinkubation (5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in
0,1M TBS pH 7,4) |
| 11. 48h bei 4 Grad | Antikörper 2 = mouse-anti-AT8, Verdünnung 1:4000 in
5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS
pH 7,4 |

3.Tag:

- | | |
|----------------|---|
| 1. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 2. 1h bei RT | biotinylierter 2. Antikörper = horse-anti-Mouse, Verdünnung 1:200 in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 10min | DAB-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB
+ 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ¹⁰ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

⁹ Herstellung 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

¹⁰ Anmerkung: 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H_2O_2

- | | |
|--------------------|-----------------|
| 6. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 7. 5min | Aqua destillata |
| 8. Trocknen lassen | |
| 9. 5 min | 70% Alkohol |
| 10. 5min | 90% Alkohol |
| 11. 5 min | 96% Alkohol |
| 12. 5 min | 100% Alkohol |
| 13. 20min | Xylol |
| 14. Eindeckeln | |

Antikörper 1	<i>goat-anti-human-HAPLN1-Antibody,</i> (Lagertemperatur:-20°C)	<i>R&DSystems</i>
Antikörper 2	<i>rabbit-anti-Tau (pT205)-phosphospecific-polyclonal-Antibody,</i> <i>unconjugated, Invitrogen = 44738G</i>	(Lagertemperatur:-20°C)

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 30 min gebrauchtes Xylol
2. 2x je 15 min frisches Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 10 min 90% Alkohol
6. 10 min 70% Alkohol
7. kurz Aqua destillata
8. 5x je 3 min in Mikrowelle in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0 ¹¹ (Lösung in Spezial-Plastik-Küvetten, Mikrowelle auf Stufe 8 und dazwischen mit 0,01M Citrate Puffer nachfüllen)
9. 15 min bei RT in Citratpuffer abkühlen lassen
10. Kurz Aqua destillata
11. 3x je 5 min 0,1M TBS pH 7,4

1.Tag:

1. 30min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M TBS)
2. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
3. 1h bei RT Präinkubation (5% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4)
4. 48 h bei 4 Grad Antikörper 1 = **goat-anti-HAPLN1, Verdünnung 1:400** in 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

2.Tag:

1. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
2. 1h bei RT biotinylierter 1.Antikörper = **horse-anti-Mouse, Verdünnung 1:200** in 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS (TBS-RSA)
3. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4

¹¹ Herstellung Sodium Citrat Puffer 0,01M pH 6,0 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O):

2,94g in 900 ml Aqua dest. auf pH 6,0 einstellen und mit A. dest bis 1000 ml einfüllen

-
- | | |
|----------------|---|
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Ni-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB in
0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ¹² |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6+ 40 mg filtriertes Ammonium-Nickel

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

- | | |
|--------------------|--|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 30min | Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS) |
| 9. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 10. 1h bei RT | Präinkubation (5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in
0,1M TBS pH 7,4) |
| 11. 48h bei 4 Grad | Antikörper 2 = <u>rabbit-anti-TAU, Verdünnung 1:1000</u> in
5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS
pH 7,4 |

3.Tag:

- | | |
|----------------|---|
| 1. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 2. 1h bei RT | biotinylierter 2. Antikörper = <u>goat-anti-Rabbit,</u>
<u>Verdünnung 1:200</u> in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS
(TBS-RSA) |
| 5. 10min | DAB-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB
+ 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ¹³ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

¹² Herstellung 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

¹³ Anmerkung: 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H_2O_2

- | | |
|--------------------|-----------------|
| 6. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 7. 5min | Aqua destillata |
| 8. Trocknen lassen | |
| 9. 5 min | 70% Alkohol |
| 10. 5min | 90% Alkohol |
| 11. 5 min | 96% Alkohol |
| 12. 5 min | 100% Alkohol |
| 13. 20min | Xylol |
| 14. Eindeckeln | |

Antikörper 1	<i>rabbit-anti-Synaptophysin-Antibody, Chemicon, AB9272</i> (Lagertemperatur:-20°C)
Antikörper 2	<i>mouse-anti-human-PHF-Tau-monoclonal Antibody (AT8); Thermo Scientific-MN1020</i> (Lagertemperatur:-20°C)

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 30 min gebrauchtes Xylol
2. 2x je 15 min frisches Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 10 min 90% Alkohol
6. 10 min 70% Alkohol
7. kurz Aqua destillata
8. 5x je 3 min in Mikrowelle in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0¹⁴ (Lösung in Spezial-Plastik-Küvetten, Mikrowelle auf Stufe 8 und dazwischen mit 0,01M Citrate Puffer nachfüllen)
9. 15 min bei RT in Citratpuffer abkühlen lassen
10. Kurz Aqua destillata
11. 3x je 5 min 0,1M TBS pH 7,4

1.Tag:

1. 30min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M TBS)
2. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
3. 1h bei RT Präinkubation (5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4)
4. 48 h bei 4 Grad Antikörper 1 = **rabbit-anti-Syn, Verdünnung 1:2000** in 5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

2.Tag:

1. 3x je 10min 0,1M TBS pH 7,4
2. 1h bei RT biotinylierter 1.Antikörper = **goat-anti-Rabbit, Verdünnung 1:200** in 2% Rinderserumalbumin + 0,1M TBS (TBS-RSA)

¹⁴ Herstellung Sodium Citrat Puffer 0,01M pH 6,0 (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O):

2,94g in 900 ml Aqua dest. auf pH 6,0 einstellen und mit A. dest bis 1000 ml einfüllen

-
- | | |
|----------------|---|
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | EAP, Verdünnung 1:1000 (30min vorher ansetzen),
Herstellung: 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Ni-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB in
0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ¹⁵ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6+ 40 mg filtriertes Ammonium-Nickel

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H₂O₂

- | | |
|--------------------|--|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 30min | Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS) |
| 9. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 10. 1h bei RT | Präinkubation (5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in
0,1M TBS pH 7,4) |
| 11. 48h bei 4 Grad | Antikörper 2 = <u>mouse-anti-AT8, Verdünnung 1:4000</u> in
5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS
pH 7,4 |

3.Tag:

- | | |
|-----------------|---|
| 1. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 2. 1h bei RT | biotinylierter 2. Antikörper = <u>donkey-anti-Mouse, Verdünnung 1:200</u> in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 3. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 4. 1h bei RT | Inkubation mit Maus-PAP in 2% Rinderserumalbumin
+ 0,1M TBS (TBS-RSA) |
| 5. 3x je 10 min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 6. 10min | DAB-Reaktion, Herstellung: 0,025% DAB
+ 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS pH 8 ¹⁶ |

Lösung A = 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Lösung B = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung

Lösung C = Lösung A + Lösung B

¹⁵ Herstellung 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

¹⁶ Anmerkung: 0,025% DAB = 0,5ml von 1% DAB-Stocklösung in 19,5ml 0,05M TBS pH 7,6

Endlösung = Lösung C + 10 µl 30% H_2O_2

- | | |
|--------------------|-----------------|
| 7. 3x je 10min | 0,1M TBS pH 7,4 |
| 8. 5min | Aqua destillata |
| 9. Trocknen lassen | |
| 10.5 min | 70% Alkohol |
| 11.5min | 90% Alkohol |
| 12.5 min | 96% Alkohol |
| 13.5 min | 100% Alkohol |
| 14.20min | Xylol |
| 15. Eindeckeln | |

7 LITERATUR

- Adamczyk C, Strupp M, Jahn K, Horn AK. 2015. Calretinin as a Marker for Premotor Neurons Involved in Upright Gaze in Human Brainstem. *Front Neuroanat* 9:153.
- Alonso AD, Zaidi T, Novak M, Barra HS, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem* 276(41):37967-37973.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. 2003. Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 28(2):293-305.
- Arena JE, Weigand SD, Whitwell JL, Hassan A, Eggers SD, Hoglinger GU, Litvan I, Josephs KA. 2015. Progressive supranuclear palsy: progression and survival. *J Neurol*.
- Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. 2001. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res* 132:611-619.
- Asher RA, Scheibe RJ, Keiser HD, Bignami A. 1995. On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system. *Glia* 13(4):294-308.
- Atoji Y, Hori Y, Sugimura M, Suzuki Y. 1989. Extracellular matrix of the superior olivary nuclei in the dog. *J Neurocytol* 18(5):599-610.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103(1):26-35.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR. 2000. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80(4):1267-1290.
- Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ. 2012. Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol* 235(1):5-17.
- Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T. 2009. Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 108(5):1266-1276.
- Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fassler R, Ohtsuka A, Kang JS, Sanders J, Murakami T, Ninomiya Y, Oohashi T. 2003. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci* 24(1):148-159.
- Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fassler R, Ninomiya Y, Sykova E, Oohashi T. 2010. Bral1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci* 30(8):3113-3123.
- Belichenko PV, Miklossy J, Belser B, Budka H, Celio MR. 1999. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 6:269-279.
- Belichenko PV, Miklossy J, Celio MR. 1997. HIV-1 induced destruction of neocortical extracellular matrix components in AIDS victims. *Neurobiol Dis* 4(3-4):301-310.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L. 2003. Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26(7):369-378.
- Bertolotto A, Manzardo E, Guglielmone R. 1996. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfate proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res* 283:283-295.
- Bertolotto A, Rocca G, Canavese G, Migheli A, Schiffer D. 1991. Chondroitin sulfate proteoglycan surrounds a subset of human and rat CNS neurons. *J Neurosci Res* 29:2225-2234.
- Bidmon H-J, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P, Zilles K. 1997. Structural alternations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 82(2):397-520.

-
- Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, Rübsamen R, Arendt T, Morawski M. 2013. Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body – Implications for physiological functions. *Neuroscience* 228(0):215-234.
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. 1994. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87(6):554-567.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-259.
- Braak H, Del Tredici K. 2016. Potential Pathways of Abnormal Tau and alpha-Synuclein Dissemination in Sporadic Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(11).
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416(6881):636-640.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard D, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8:3183-3200.
- Brückner G, Bringmann A, Härtig W, Köppe G, Delpech B, Brauer K. 1998. Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Exp Brain Res* 121:300-310.
- Bruckner G, Grosche J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M. 2000. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428(4):616-629.
- Brückner G, Härtig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K. 1996. Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol* 25:333-346.
- Bruckner G, Hartig W, Seeger J, Rubsamen R, Reimer K, Brauer K. 1998. Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. *Anat Embryol* 197(4):249-262.
- Bruckner G, Hausen D, Hartig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. 1999. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92(3):791-805.
- Brückner G, Morawski M, Arendt T. 2008. Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151(2):489-504.
- Brückner G, Seeger G, Brauer K, Härtig W, Kacza J, Bigl V. 1994. Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the mongolian gerbil and rat. *Brain Res* 658:67-86.
- Bruckner G, Szeoke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J. 2006. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* 138(2):365-375.
- Burnside ER, Bradbury EJ. 2014. Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40(1):26-59.
- Busch SA, Silver J. 2007. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 17(1):120-127.
- Büttner-Ennever JA, Büttner U, Cohen B, Baumgartner G. 1982. Vertical gaze paralysis and the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus. *Brain* 105:125-149.
- Büttner-Ennever JA, Cohen B, Pause M, Fries W. 1988. Raphe nucleus of the pons containing omnipause neurons of the oculomotor system in the monkey, and its homologue in man. *J Comp Neurol* 267:307-321.
- Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2014. Olszewski and Baxter's Cytoarchitecture of the Human Brainstem: Karger.
- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, Do KQ. 2013. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(22):9130-9135.
-

-
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Cupini L, Bernardi G. 2003. Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol* 2(10):622-629.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW. 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133(Pt 8):2331-2347.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW. 2006. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 494(4):559-577.
- Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. 2007. Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 501(1):83-94.
- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al. 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171(2):83-98.
- Celio MR, Blümcke I. 1994. Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Rev* 19:1128-1145.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. 1998. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21(12):510-515.
- Che Ngwa E, Zeeh C, Messoudi A, Buttner-Ennever JA, Horn AK. 2014. Delineation of motoneuron subgroups supplying individual eye muscles in the human oculomotor nucleus. *Front Neuroanat* 8:2.
- Chen AL, Riley DE, King SA, Joshi AC, Serra A, Liao K, Cohen ML, Otero-Millan J, Martinez-Conde S, Strupp M, Leigh RJ. 2010. The disturbance of gaze in progressive supranuclear palsy: implications for pathogenesis. *Front Neurol* 1:147.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullaney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120(3):421-433.
- Chue CH, Yukioka N, Yamada E, Hazama F. 1993. The possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of hypertensive cerebral lesions in spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathol* 85(4):383-389.
- Crespo D, Asher RA, Lin R, Rhodes KE, Fawcett JW. 2007. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol* 206(2):159-171.
- Crews L, Masliah E. 2010. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19(R1):R12-20.
- Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. 2004. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 75(1):1-11.
- Davies JE, Tang X, Denning JW, Archibald SJ, Davies SJ. 2004. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *Eur J Neurosci* 19(5):1226-1242.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. 1999. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19(14):5810-5822.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW. 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem* 281(26):17789-17800.
- Dino MR, Harroch S, Hockfield S, Matthews RT. 2006. Monoclonal antibody Cat-315 detects a glycoform of receptor protein tyrosine phosphatase beta/phosphacan early in CNS development that localizes to extrasynaptic sites prior to synapse formation. *Neuroscience* 142(4):1055-1069.
- Dityatev A, Fellin T. 2008. Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol* 4(3):235-247.
-

-
- Dityatev A, Schachner M. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4(6):456-468.
- Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. 2010a. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11(11):735-746.
- Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. 2010b. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* 33(11):503-512.
- Eberhorn AC, Ardelenu P, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2005. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol* 491:352-366.
- Eggers SD, Horn AK, Roeber S, Hartig W, Nair G, Reich DS, Leigh RJ. 2015. Saccadic Palsy following Cardiac Surgery: Possible Role of Perineuronal Nets. *PLoS One* 10(7):e0132075.
- Evinger C. 1988. Extraocular motor nuclei: location, morphology and afferents. In: Büttner-Ennever JA, ed. *Rev Oculomot Res*. Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier. p 81-117.
- Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C. 2010. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* 63(1-2):26-38.
- Fawcett JW, Curt A. 2009. Damage control in the nervous system: rehabilitation in a plastic environment. *Nat Med* 15(7):735-736.
- Feige J, Zeeh C, Roeber S, Arzberger T, Kretschmar H, Horn A, 2013. Tau pathology in motoneurons of extraocular muscles in progressive supranuclear palsy. Poster
- Fine EJ, Hallett M, Litvan I, Tresser N, Katz D. 1998. Dysfunction of Ib (autogenic) spinal inhibition in patients with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 13(4):668-672.
- Fitch MT, Silver J. 2008. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209(2):294-301.
- Fox K, Caterson B. 2002. Freeing the Brain from the Perineuronal Net. *Science* 298(5596):1187-1189.
- Friauf E. 2000. Development of chondroitin sulfate proteoglycans in the central auditory system of rats correlates with acquisition of mature properties. *Audiol Neurootol* 5(5):251-262.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12(7):897-904.
- Frischknecht R, Seidenbecher CI. 2008. The crosstalk of hyaluronan-based extracellular matrix and synapses. *Neuron Glia Biol* 4(3):249-257.
- Gallyas F, Zaborszky L, Wolff JR. 1980. Experimental studies of mechanisms involved in methods demonstrating axonal and terminal degeneration. *Stain Technol* 55(5):281-290.
- Galtrey CM, Asher RA, Nothias F, Fawcett JW. 2007. Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair. *Brain* 130(Pt 4):926-939.
- Galtrey CM, Fawcett JW. 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54(1):1-18.
- Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. 2008. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 27(6):1373-1390.
- Garbutt S, Matlin A, Ilmuth J, Schenk AK, Johnson JK, Rosen H, Dean D, Kramer J, Neuhaus J, Miller BL, Lisberger SG, Boxer AL. 2008. Oculomotor function in frontotemporal lobar degeneration, related disorders and Alzheimer's disease. *Brain* 131:1268-1281.
- Garbutt S, Riley DE, Kumar AN, Han Y, Harwood MR, Leigh RJ. 2004. Abnormalities of optokinetic nystagmus in progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 75:1386-1394.
- Garcia-Alias G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW. 2009. Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12(9):1145-1151.
-

-
- Garcia-Alias G, Fawcett JW. 2012. Training and anti-CSPG combination therapy for spinal cord injury. *Exp Neurol* 235(1):26-32.
- Goedert M. 1996. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777:121-131.
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. 1995. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189(3):167-169.
- Gotting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K. 2000. Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol* 304(4):517-528.
- Gotz J, Gladbach A, Pennanen L, van Eersel J, Schild A, David D, Ittner LM. 2010. Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1802(10):860-871.
- Grafman J, Litvan I, Gomez C, Chase TN. 1990. Frontal lobe function in progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 47(5):553-558.
- Grimpe B, Silver J. 2002. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 137:333-349.
- Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B, Yamaguchi Y. 1999. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 410(2):256-264.
- Hardingham TE, Fosang AJ. 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6(3):861-870.
- Hardingham TE, Muir H. 1972. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 279(2):401-405.
- Hardman CD, Halliday GM. 1999. The internal globus pallidus is affected in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease. *Exp Neurol* 158:135-142.
- Hardman CD, Halliday GM, McRitchie DA, Cartwright HR, Morris JGL. 1997a. Progressive supranuclear palsy affects both the substantia nigra pars compacta and reticulata. *Exp Neurol* 144:183-192.
- Hardman CD, Halliday GM, McRitchie DA, Morris JGL. 1997b. The subthalamic nucleus in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(2):132-142.
- Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. 1994. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res* 635:307-311.
- Härtig W, Brückner G, Brauer K, Schmidt C, Bigl V. 1995. Allocation of perineuronal nets and parvalbumin-, calbindin-D 28k- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. *Brain Res* 698:265-269.
- Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, Reichenbach A, Brückner G. 1999. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 842:15-29.
- Härtig W, Singer A, Grosche J, Brauer K, Ottersen OP, Brückner G. 2001. Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Res* 899:123-133.
- Hascall VC, Heinegard D. 1974. Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *J Biol Chem* 249(13):4232-4241.
- Hasegawa M. 2016. Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Alzheimer's disease and Tauopathies-Prion-Like Seeded Aggregation and Phosphorylation. *Biomolecules* 6(2).
- Hepp K, Henn V, Vilis T, Cohen B. 1989. Brainstem regions related to saccade generation. In: Wurtz RH, Goldberg ME, eds. Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier. p 105-212.
- Hilbig H, Nowack S, Boeckler K, Bidmon HJ, Zilles K. 2007. Characterization of neuronal subsets surrounded by perineuronal nets in the rhesus auditory brainstem. *J Anat* 210(5):507-517.
-

-
- Hobohm C, Gunther A, Grosche J, Rossner S, Schneider D, Bruckner G. 2005. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res* 80(4):539-548.
- Hobohm C, Härtig W, Brauer K, Brückner G. 1998. Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *J Chem Neuroanat* 15:135-142.
- Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H. 1990. Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:505-514.
- Hockfield S, McKay RD. 1983. A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(18):5758-5761.
- Hoffpauir BK, Grimes JL, Mathers PH, Spiro GA. 2006. Synaptogenesis of the calyx of Held: rapid onset of function and one-to-one morphological innervation. *J Neurosci* 26(20):5511-5523.
- Hoglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PM, Wang LS, Klei L, Rademakers R, de Silva R, Litvan I, Riley DE, van Swieten JC, Heutink P, Wszolek ZK, Uitti RJ, Vandrovcova J, Hurtig HI, Gross RG, Maetzler W, Goldwurm S, Tolosa E, Borroni B, Pastor P, Cantwell LB, Han MR, Dillman A, van der Brug MP, Gibbs JR, Cookson MR, Hernandez DG, Singleton AB, Farrer MJ, Yu CE, Golbe LI, Revesz T, Hardy J, Lees AJ, Devlin B, Hakonarson H, Muller U, Schellenberg GD. 2011. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet* 43(7):699-705.
- Horn AK. 2006. The reticular formation. *Prog Brain Res* 151:127-155.
- Horn AK, Eberhorn A, Härtig W, Ardelenanu P, Messoudi A, Büttner-Ennever JA. 2008. Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 507(3):1317-1335.
- Horn AKE, Brückner G, Härtig W, Messoudi A. 2003a. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* 455:341-352.
- Horn AKE, Büttner-Ennever JA. 1998. Premotor neurons for vertical eye-movements in the rostral mesencephalon of monkey and man: the histological identification by parvalbumin immunostaining. *J Comp Neurol* 392:413-427.
- Horn AKE, Büttner-Ennever JA, Büttner U. 1996. Saccadic premotor neurons in the brainstem: functional neuroanatomy and clinical implications. *J Neuroophthalmol* 16:229-240.
- Horn AKE, Büttner-Ennever JA, Wahle P, Reichenberger I. 1994. Neurotransmitter profile of saccadic omnipause neurons in nucleus raphe interpositus. *J Neurosci* 14:2032-2046.
- Horn AKE, Helmchen C, Wahle P. 2003b. GABAergic neurons in the rostral mesencephalon of the Macaque monkey that control vertical eye movements. *Ann N Y Acad Sci* 1004:19-28.
- Hughes LE, Rowe JB, Ghosh BC, Carlyon RP, Plack CJ, Gockel HE. 2014. The binaural masking level difference: cortical correlates persist despite severe brain stem atrophy in progressive supranuclear palsy. *J Neurophysiol* 112(12):3086-3094.
- Hunter GK, Wong KS, Kim JJ. 1988. Binding of calcium to glycosaminoglycans: an equilibrium dialysis study. *Arch Biochem Biophys* 260(1):161-167.
- Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-652.
- Iozzo RV, Schaefer L. 2015. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42:11-55.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3):198-210.
- Ittner LM, Gotz J. 2011. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12(2):65-72.
-

-
- Jacoby J, Chiarandini DJ, Stefani E. 1989. Electrical properties and innervation of fibers in the orbital layer of rat extraocular muscles. *J Neurophysiol* 61:116-125.
- Jäger C, Lendvai D, Seeger G, Brückner G, Matthews RT, Arendt T, Alpár A, Morawski M. 2013. Perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in the human spinal cord. *Neuroscience* 238(0):168-184.
- John N, Krugel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI. 2006. Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci* 31(4):774-784.
- Kawaguchi Y. 1997. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res* 27(1):1-8.
- Kennard C, Leigh RJ. 2011. *Neuro-ophthalmology*: Elsevier Science.
- Kim C, Lee HW, Park MY. 2009. Exodeviated ophthalmoplegia in a patient with progressive supranuclear palsy. *J Korean Med Sci* 24(5):982-984.
- Kind PC, Sengpiel F, Beaver CJ, Crocker-Buque A, Kelly GM, Matthews RT, Mitchell DE. 2013. The development and activity-dependent expression of aggrecan in the cat visual cortex. *Cereb Cortex* 23(2):349-360.
- Köppe G, Brückner G, Brauer K, Härtig W, Bigl V. 1997. Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res* 288:33-41.
- Koppe G, Bruckner G, Hartig W, Delpech B, Bigl V. 1997. Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J* 29(1):11-20.
- Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PDR, Palkovits M, Horn AKE, Toledo CAB, Ryabinin AE. 2011. The Edinger-Westphal nucleus: A historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol* 519(8):1413-1434.
- Kozicz T, Min A, Arimura A. 2001. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following acute pain stress in rats. *Stress* 4:85-90.
- Kulesza RJ, Jr. 2007. Cytoarchitecture of the human superior olivary complex: medial and lateral superior olive. *Hear Res* 225(1-2):80-90.
- Kulesza RJ, Jr. 2008. Cytoarchitecture of the human superior olivary complex: nuclei of the trapezoid body and posterior tier. *Hear Res* 241(1-2):52-63.
- Kwok JC, Afshari F, Garcia-Alias G, Fawcett JW. 2008. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci* 26(2-3):131-145.
- Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW. 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem* 114(5):1447-1459.
- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW. 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 71(11):1073-1089.
- Lander C, Zhang H, Hockfield S. 1998. Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18(1):174-183.
- Langer TP, Kaneko CR. 1990. Brainstem afferents to the oculomotor omnipause neurons in monkey. *J Comp Neurol* 295:413-427.
- Leigh RJ, Zee DS. 2006. *The Neurology of Eye Movements*. Leigh RJ, Zee DS, eds. New York: Oxford University Press. 3-762 p.
- Lendvai D, Morawski M, Negyessy L, Gati G, Jager C, Baksa G, Glasz T, Attems J, Tanila H, Arendt T, Harkany T, Alpar A. 2013. Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 125(2):215-229.
- Lewis J, Dickson DW. 2016. Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* 131(1):27-48.
- Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, Goetz CG, Golbe LI, Grafman J, Growdon JH, Hallett M, Jankovic J, Quinn NP, Tolosa E, Zee DS. 1996. Clinical research criteria for the

-
- diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 47(1):1-9.
- Litvan I, Dickson DW, Büttner-Ennever JA, Delcourte A, Hutton M, Dubois B, Golbe LI, Hallet M, Schellenberg GD, Standaert D, Brooks DJ, Price D. 2000. Research goals in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 15:446-458.
- Litvan I, Paulsen JS, Mega MS, Cummings JL. 1998. Neuropsychiatric assessment of patients with hyperkinetic and hypokinetic movement disorders. *Arch Neurol* 55(10):1313-1319.
- Liu JY, Martinian L, Thom M, Sisodiya SM. 2010. Immunolabeling recovery in archival, post-mortem, human brain tissue using modified antigen retrieval and the catalyzed signal amplification system. *J Neurosci Methods* 190(1):49-56.
- Lundell A, Olin AI, Morgelin M, al-Karadaghi S, Aspberg A, Logan DT. 2004. Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure* 12(8):1495-1506.
- Lurie DI, Pasic TR, Hockfield SJ, Rubel EW. 1997. Development of Cat-301 immunoreactivity in auditory brainstem nuclei of the gerbil. *J Comp Neurol* 380(3):319-334.
- Maier CM, Hsieh L, Yu F, Bracci P, Chan PH. 2004. Matrix metalloproteinase-9 and myeloperoxidase expression: quantitative analysis by antigen immunohistochemistry in a model of transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 35(5):1169-1174.
- Margolis RU, Margolis RK. 1997. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* 290(2):343-348.
- Marks MS, Chi-Rosso G, Toole BP. 1990. Hyaluronate-binding proteins of murine brain. *J Neurochem* 54(1):171-180.
- Massey JM, Hubscher CH, Wagoner MR, Decker JA, Amps J, Silver J, Onifer SM. 2006. Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 26(16):4406-4414.
- Matsui F, Nishizuka M, Oohira A. 1999. Proteoglycans in perineuronal nets. *Acta Histochem Cytochem* 32:141-147.
- Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, Oohira A. 1998. Occurrence of a N-terminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum. *Brain Res* 790(1-2):45-51.
- Matsui F, Oohira A. 2004. Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenit Anom* 44(4):181-188.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. 2002. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* 22(17):7536-7545.
- Mavroudis IA, Manani MG, Petrides F, Petsoglou C, Njau SN, Costa VG, Baloyannis SJ. 2014. Dendritic and spinal alterations of neurons from Edinger-Westphal nucleus in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 52(2):197-204.
- Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4(9):953-961.
- Meyer K, Linker A, Rapport MM. 1951. The production of monosaccharides from hyaluronic acid by beta-glucuronidase. *J Biol Chem* 192(1):275-281.
- Morawski M, Bruckner G, Arendt T, Matthews RT. 2012a. Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 44(5):690-693.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Arendt T. 2010. Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169(3):1347-1363.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T. 2012b. Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol* 22(4):547-561.
-

-
- Morcinek K, Kohler C, Gotz J, Schroder H. 2013. Pattern of tau hyperphosphorylation and neurotransmitter markers in the brainstem of senescent tau filament forming transgenic mice. *Brain Res* 1497:73-84.
- Moschovakis AK. 1996. The superior colliculus and eye movement control. *Curr Opin Neurobiol* 6(6):811-816.
- Mufson EJ, Malek-Ahmadi M, Perez SE, Chen K. 2016. Braak staging, plaque pathology, and APOE status in elderly persons without cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 37:147-153.
- Munakata S, Hendricks JB. 1993. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 41(8):1241-1246.
- Murakami T, Ohtsuka A. 2003. Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Arch Histol Cytol* 66(3):195-207.
- Neame PJ, Barry FP. 1993. The link proteins. *Experientia* 49(5):393-402.
- Neame PJ, Christner JE, Baker JR. 1986. The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J Biol Chem* 261(8):3519-3535.
- Neumann-Haefelin T, Witte OW. 2000. Perinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(1):45-52.
- Ohyama J, Ojima H. 1997. Labeling of pyramidal and nonpyramidal neurons with lectin *Vicia villosa* during postnatal development of the guinea pig. *J Comp Neurol* 389(3):453-468.
- Okamoto M, Mori S, Endo H. 1994. A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Res* 637:257-267.
- Pannese E. 1996. The black reaction. *Brain Res Bull* 41(6):343-349.
- Pillon B, Dubois B, Ploska A, Agid Y. 1991. Severity and specificity of cognitive impairment in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 41(5):634-643.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298(5596):1248-1251.
- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L. 2006. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(22):8517-8522.
- Planas AM, Sole S, Justicia C. 2001. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8(5):834-846.
- Rauch U. 2004. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 61(16):2031-2045.
- Rauch U. 2007. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 4):656-660.
- Rhodes KE, Fawcett JW. 2004. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204(1):33-48.
- Rüb U, Del Tredici K, Schultz C, Büttner-Ennever JA, Braak E. 2001. The premotor region essential for rapid vertical eye movements shows early involvement in Alzheimer's disease-related cytoskeletal pathology. *Vision Res* 41:2149-2156.
- Schmidt E, Wolski Jr TP, Kulesza Jr RJ. 2010. Distribution of perineuronal nets in the human superior olivary complex. *Hear Res* 265(1-2):15-24.
- Schneggenburger R, Forsythe ID. 2006. The calyx of Held. *Cell Tissue Res* 326(2):311-337.
- Schrag A, Ben-shlomo Y, Quinn NP. 1999. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 354:1771-1775.
- Scudder CA, Kaneko CS, Fuchs AF. 2002. The brainstem burst generator for saccadic eye movements: a modern synthesis. *Exp Brain Res* 142(4):439-462.
- Scully RE, Galdabini JJ, McNeely BU. 1980. Case records of the massachusetts general hospital. *N Engl J Med* 303:803-809.
- Shiurba RA, Spooner ET, Ishiguro K, Takahashi M, Yoshida R, Wheelock TR, Imahori K, Cataldo AM, Nixon RA. 1998. Immunocytochemistry of formalin-fixed human brain tissues: microwave irradiation of free-floating sections. *Brain Res Brain Res Protoc* 2(2):109-119.
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5(2):146-156.
-

-
- Sole S, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A, Planas AM. 2004. Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(4):338-349.
- Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW. 2013. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253(0):194-213.
- Song W, Zukor H, Liberman A, Kaduri S, Arvanitakis Z, Bennett DA, Schipper HM. 2014. Astroglial heme oxygenase-1 and the origin of corpora amylacea in aging and degenerating neural tissues. *Exp Neurol* 254:78-89.
- Sonntag M, Blosa M, Schmidt S, Rubsamen R, Morawski M. 2015. Perineuronal nets in the auditory system. *Hear Res* 329:21-32.
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JC, Miquel M. 2016. Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J Neurosci* 36(45):11459-11468.
- Sparks DL. 2002. The brainstem control of saccadic eye movements. *Nat Rev Neurosci* 3(12):952-964.
- Spicer AP, Joo A, Bowling RA, Jr. 2003. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol Chem* 278(23):21083-21091.
- Stamenkovic I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200(4):448-464.
- Steele J, Richardson JC, Olszewski J. 1964. Progressive supranuclear palsy. A heterogeneous system degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol* 10:333-359.
- Steindler DA, Cooper NG, Faissner A, Schachner M. 1989. Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol* 131(1):243-260.
- Stumptner C, Gogg-Kamerer M, Viertler C, Denk H, Zatloukal K. 2016. Immunofluorescence and Immunohistochemical Detection of Keratins. *Meth Enzymol* 568:139-162.
- Suttkus A, Rohn S, Weigel S, Glöckner P, Arendt T, Morawski M. 2014. Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis* 5(3):e1119-.
- Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bácskai T, Halasi G, Mészár Z, Módis L. 2006. Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. *J Comp Neurol* 496:819-831.
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T. 2003. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117(3):531-539.
- Tani E, Ametani T. 1971. Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J Ultrastruct Res* 34(1):1-14.
- Tawana K, Ramsden DB. 2001. Progressive supranuclear palsy. *MP, Mol Pathol* 54(6):427-434.
- Tepper JM, Bolam JP. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14(6):685-692.
- Toole BP. 2000. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest* 106(3):335-336.
- Tsifrina E, Ananyeva NM, Hastings G, Liau G. 1999. Identification and characterization of three cDNAs that encode putative novel hyaluronan-binding proteins, including an endothelial cell-specific hyaluronan receptor. *Am J Pathol* 155(5):1625-1633.
- Vargova L, Sykova E. 2008. Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission. *Physiol Res* 57 Suppl 3:S89-99.
- Viapiano MS, Matthews RT. 2006. From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med* 12(10):488-496.
- Vigetti D, Andrini O, Clerici M, Negrini D, Passi A, Moriondo A. 2008. Chondroitin sulfates act as extracellular gating modifiers on voltage-dependent ion channels. *Cell Physiol Biochem* 22(1-4):137-146.
-

-
- Vitellaro-Zuccarello L, De Biasi S, Spreafico R. 1998. One hundred years of Golgi's "perineuronal net": history of a denied structure. *Ital J Neurol Sci* 19(4):249-253.
- von Gersdorff H, Borst JG. 2002. Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat Rev Neurosci* 3(1):53-64.
- Wang D, Fawcett J. 2012. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349(1):147-160.
- Weninger SC, Peters LL, Maklad A. 2000. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology* 141:256-263.
- Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017-1028.
- Williams DR, Lees AJ. 2009. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges. *Lancet Neurol* 8:270-279.
- Witte OW, Stoll G. 1997. Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. *Adv Neurol* 73:207-227.
- Wu Y, Wu J, Lee DY, Yee A, Cao L, Zhang Y, Kiani C, Yang BB. 2005. Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol* 24(1):3-13.
- Yamaguchi Y. 2000. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:276-289.
- Yoshida M. 2014. Astrocytic inclusions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathology* 34(6):555-570.
- Zaremba S, Guimaraes A, Kalb RG, Hockfield S. 1989. Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron* 2(3):1207-1219.
- Zeeh C, Horn AK. 2012. [The subnuclei of the oculomotor nucleus in humans]. *Klin Monbl Augenheilkd* 229(11):1083-1089.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. 2008. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130(4):635-653.

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler bedanken, die mein Interesse für mikroskopische Studien auf dem Gebiet der Okulomotorik geweckt hat und mir mit ihrem umfassenden, neuroanatomischen Fachwissen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt dem Leiter des Labors, MPh. Ahmed Messoudi, der für mich ein wichtiger Ansprechpartner in technisch-methodischen Belangen war. Für die Unterstützung bei meinen Färbungen bedanke ich mich bei MTA Christine Unger und MTA Christine Glombik.

Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Mutter und bei Frau Mag. Gabriele Dietmann für das Korrekturlesen der Doktorarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund, der mir mit seinen IT-Fachkenntnissen eine große Stütze war.

9 LEBENSLAUF

Inhalt entfernt

10 EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass meine Dissertation mit dem Titel
„Post mortem Untersuchungen funktioneller Neurone des Augenbewegungssystems
auf perineuronale Netze bei Fällen mit progressiver supranukleärer Parese (PSP)“
von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist. Wörtlich oder inhaltlich
übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

München, 10.06.2017

Anna Maria Fröschl