

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. M. Synowitz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchung der  
Schadenskaskade in neuroepithelalem Gewebe in einem  
Rattenmyelomeningozelenmodell zu verschiedenen Zeitpunkten im  
embryonalen Verlauf

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Ann-Kathrin Simone Blumenröther  
aus Konstanz

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hiltrud Muhle

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2024

Zum Druck genehmigt, 21.08.2024

gez.: Prof. Dr. Franziska Theilig  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)



# I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	I
II Tabellenverzeichnis.....	IV
III Abbildungsverzeichnis.....	V
IV Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Terminologie und Klassifikation.....	1
1.2 Epidemiologie und Ätiologie.....	3
1.2.1 All-Trans-Retinsäure als Auslöser von Myelomeningozelen.....	6
1.3 Diagnostik.....	7
1.4 Das klinische Bild.....	9
1.5 Therapie.....	10
1.6 Anatomie und Embryologie des Rückenmarks.....	13
1.6.1 Ein allgemeiner Überblick.....	13
1.6.2 Von der Neurulation zur Geburt.....	16
1.6.3 Anatomie der Myelomeningozele.....	20
1.7 Pathogenese – die Schadenskaskade.....	21
1.7.1 Second Hit.....	21
1.7.2 Third Hit.....	23
1.8 Zytokine und Chemokine.....	24
1.8.1 Zytokine im zentralen Nervensystem – Mediatoren der posttraumatischen Inflammation .....	26
1.8.2 Zytokine und die Entwicklung des ZNS.....	27
1.8.3 IL-1 $\beta$ .....	27
1.8.4 TNF- $\alpha$ .....	28
1.8.5 CXCL12.....	29
1.8.6 CX3CL1.....	30
1.9 Zielsetzung.....	30
2 Material & Methoden.....	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Tiermaterial.....	32
2.1.2 Chemikalien.....	32
2.1.3. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme.....	34
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	36
2.1.5 Antikörper.....	36
2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	39
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Das Tiermodell.....	41

2.2.1.1 Muttertiere.....	41
2.2.1.2 Jungtiere.....	42
2.2.2 Molekularbiologische Analyse.....	44
2.2.2.1 RNA-Isolation mittels TRIzol®.....	45
2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie und Qualitätsbeurteilung.....	45
2.2.2.3 DNA-Verdau & Umschreibung in cDNA.....	46
2.2.2.4 Real-Time PCR.....	47
2.2.2.5 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte.....	49
2.2.3 Histologische Analyse.....	50
2.2.3.1 Entparaffinierung.....	51
2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	51
2.2.3.3 Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung.....	52
2.2.3.4 Qualitätskontrolle der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung.....	53
2.2.3.5 Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	54
2.2.3.6 Mikroskopie.....	55
2.2.4 Statistik.....	55
3 Ergebnisse.....	56
3.1 Vorarbeiten.....	56
3.1.1 Vorarbeiten zur molekularbiologischen Untersuchung der MMC-Tiere: Analyse des Fehlbildungsgewebes und des kranial davon gelegenen Rückenmarksgewebes separat oder gemeinsam?.....	56
3.1.2 Vorarbeiten zur immunhistochemischen Untersuchung: Kontrollfärbungen.....	58
3.2 Histologische Vorstudien: Anatomische Charakterisierung der Plakode.....	59
3.2.1 Histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte.....	59
3.2.1.1 E16.....	59
3.2.1.2 E18.....	60
3.2.1.3 E22.....	62
3.2.2 Analyse der DAB-Färbungen: Erarbeiten eines strukturellen Profils der Plakode.....	65
3.2.2.1 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E16.....	65
3.2.2.2 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E18.....	71
3.2.2.3 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E22.....	73
3.3 Charakterisierung der Schadenskaskade.....	78
3.3.1 IL-1 $\beta$ .....	78
3.3.1.1 PCR-Ergebnisse.....	78
3.3.1.2 IHC-Analyse.....	79
3.3.2 IL-1RI.....	80
3.3.2.1 PCR-Ergebnisse.....	80
3.3.2.2 IHC-Analyse.....	81
3.3.3 TNF- $\alpha$ .....	84
3.3.3.1 PCR-Ergebnisse.....	84
3.3.3.2 IHC-Analyse.....	85
3.3.4 TNF-R1.....	86
3.3.4.1 PCR-Ergebnisse.....	86

3.3.4.2 IHC-Analyse.....	87
3.3.5 CXCL12.....	90
3.3.5.1 PCR-Ergebnisse.....	90
3.3.6 CXCR4.....	91
3.3.6.1 PCR-Ergebnisse.....	91
3.3.7 CX3CL1.....	92
3.3.7.1 PCR-Ergebnisse.....	92
3.3.8 CX3CR1.....	93
3.3.8.1 PCR-Ergebnisse.....	93
4 Diskussion.....	96
4.1 Methodische Aspekte.....	96
4.1.1 Das Tiermodell.....	96
4.1.2 Vorarbeiten zur molekularbiologischen Untersuchung der MMC-Tiere: Analyse des Fehlbildungsgewebes und des kranial davon gelegenen Rückenmarksgewebes separat oder gemeinsam?.....	97
4.2. Histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte.....	97
4.3 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen: Das strukturelle Profil der Plakode.....	99
4.3.1 Neurone.....	99
4.3.2 Glia.....	100
4.4 Beurteilung der molekularbiologischen Analyse sowie der Immunfluoreszenzfärbungen: Expression der Zytokine in der Plakode.....	103
4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$ und IL-1RI.....	104
4.4.2 Die Rolle von TNF- $\alpha$ und TNF-R1.....	106
4.4.3 Die Rolle der Chemokine.....	108
5 Zusammenfassung.....	109
6 Anhang.....	111
6.1 Literaturverzeichnis.....	111
6.2 Danksagung.....	124

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	25
Tabelle 2.....	26
Tabelle 3.....	32
Tabelle 4.....	32
Tabelle 5.....	34
Tabelle 6.....	36
Tabelle 7.....	38
Tabelle 8.....	39
Tabelle 9.....	39
Tabelle 10.....	44
Tabelle 11.....	47
Tabelle 12.....	48
Tabelle 13.....	49
Tabelle 14.....	52
Tabelle 15.....	57
Tabelle 16.....	66
Tabelle 17.....	66
Tabelle 18.....	67
Tabelle 19.....	67
Tabelle 20.....	79
Tabelle 21.....	81
Tabelle 22.....	85
Tabelle 23.....	87
Tabelle 24.....	91
Tabelle 25.....	92
Tabelle 26.....	93
Tabelle 27.....	94

### III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Neuralrohrdefekte.....	1
Abbildung 2: Retinoic Acid-Signal-Mechanismus.....	6
Abbildung 3: Sonographische Diagnostik einer dysraphischen Fehlbildung.....	8
Abbildung 4: OP-Ablauf.....	11
Abbildung 5: Hinge-Point-Modell am Beispiel der Neuralplatte des Huhns.....	14
Abbildung 6: Zentrale Entwicklungsvorgänge im lumbosakralen Rückenmark.....	19
Abbildung 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines <i>lumbalen Rückenmarkabschnittes eines Kontrolltieres</i> (links) sowie einer Plakode (rechts) zum Zeitpunkt E16 in transversaler Ebene.....	21
Abbildung 8: Pathophysiologische Parallele von spinalem Trauma und spinaler Dysraphie.....	24
Abbildung 9: Schematische Darstellung der "Third-Hit-Hypothese" im pränatalen Verlauf.....	31
Abbildung 10: Fotografische Dokumentation von <i>Tieren mit Myelomeningozele zu den Zeitpunkten E16 (A, B), E18 (C, D), E22 (E, F)</i> . Pfeile deuten auf Fehlbildung, Stern deutet auf Rattenschwanz.....	43
Abbildung 11: Serumkontrollen.....	58
Abbildung 12: Positivkontrollen.....	58
Abbildung 13: HE-Färbungen von Plakoden und Kontrollrückenmark zu verschiedenen Zeitpunkten.....	64
Abbildung 14: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E16.....	70
Abbildung 15: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E18.....	73
Abbildung 16: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E22.....	77
Abbildung 17: DAB-Färbungen mit Fokus auf IL-1 $\beta$ und IL-1RI.....	82
Abbildung 18: Real-time RT-PCR-Ergebnisse für IL-1 $\beta$ (A) und IL-1RI (B) zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten.....	83
Abbildung 19: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMC-Plakoden mit Fokus auf IL-1 $\beta$ und IL-1RI.....	83
Abbildung 20: DAB-Färbungen mit Fokus auf TNF- $\alpha$ und TNF-R1.....	88
Abbildung 21: Real-time RT-PCR-Ergebnisse für TNF- $\alpha$ (A) und TNF-R1 (B) zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten.....	88
Abbildung 22: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMC-Plakoden mit Fokus auf TNF- $\alpha$ und TNF-R1.....	89
Abbildung 23: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der Chemokine in Kontrollrückenmark und Plakoden zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten.....	95

## IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	engl. Avidin-Biotin-complex-methode = Avidin-Biotin-Komplex-Methode
AFP	Alpha-Fetoprotein
Aqua bidest. / ddH <sub>2</sub> O	lat. Aqua bidestillatum = doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	lat. Aqua destillatum = destilliertes Wasser
ATRA	All-trans Retinoic Acid
Bp	Basenpaar
BSA	engl. bovine serumalbumine
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
C <sub>T</sub>	engl. cycle of threshold = Schwellenwertzyklus
CX3CL1	Chemokin (C-X3-C)-Ligand
CX3CR1	Chemokin (C-X3-C)-Rezeptor
CXCL12 / SDF-1	Chemokin (C-X-C) Ligand 12 / Stroma cell-derived factor 1
CXCR4	Chemokin (C-X-C) Rezeptor 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
E	Embryonaler Tag

EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FGF2	fibroblast growth factor 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAM56	Makrophagen Marker
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	engl. Horseradish Peroxidase
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin-1-beta
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor 1
IR	Immunoreaktivität
KG	Körpergewicht
LHP	Lateral Hinge Point
MHP	Medial Hinge Point
MMC	engl. myelomeningocele = Myelomeningozele
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure

MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
NeuN	engl. Neuronal nuclei
NF200kD	Neurofilament 200 kilodalton
NFQ	Nicht fluoreszierender Quencher
OD	Optische Dichte
OPC	Oligodendrocyte precursor cells
PBS	engl. phosphored buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
pH	lat. Potentia hydrogenii: negativer, dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RA	engl. retinoic acid = Retinsäure

RNase	Ribonuklease
Rpm	engl. revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SB	Spina Bifida
SCI	engl. spinal cord injury
Taq	lat. thermus aquaticus
TBS(T)	engl. Tris-buffered saline (Tween®) = Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCS	Tethered-Cord-Syndrom
TNF(-α)-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Rezeptor-1
TNF(-α)-R2	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Rezeptor-2
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan

### ***Präfixe der üblichen Einheiten***

c	Centi
g	Gramm
l	Liter
m	Milli
m	Meter
M	Mol
n	Nano
μ	Mikro
U	Unit

Chemische Elemente in Formel wurden mit den üblichen Symbolen dargestellt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Terminologie und Klassifikation

Die große Familie der Neuralrohrdefekte bezeichnet eine heterogene Gruppe von Fehlbildungen, die durch eine fehlerhafte Umformung der Neuralplatte zum Neuralrohr entstehen. Zur unvollständigen Neurulation gesellt sich das Fehlen einer oder mehrerer das neurale Gewebe bedeckender Strukturen,<sup>1</sup> woraus das Freiliegen des neuralen Gewebes an der Körperoberfläche resultiert.<sup>2</sup> Auch der Begriff der Dysraphie beschreibt eine durch eine gestörte Neurulation hervorgerufene Fehlbildung, die assoziiert ist mit skelettalen Fehlbildungen und dermalen Dysplasien.<sup>2</sup> Zu den Neuralrohrdefekten zählen Anenzephalie, Craniorachischisis, Enzephalomeningo-/ Enzephalozele, Myeloschisis, Myelomeningo-/ Myelozele und die Spina bifida occulta (s. Abbildung 1).<sup>3</sup> Nach dem Ort des fehlerhaften Neuralrohrschlusses werden Neuralrohrdefekte weiter unterteilt in kraniale und spinale Unterformen. In über 50% der Fälle finden sich Neuralrohrdefekte lumbosakral. Mit 34% ist

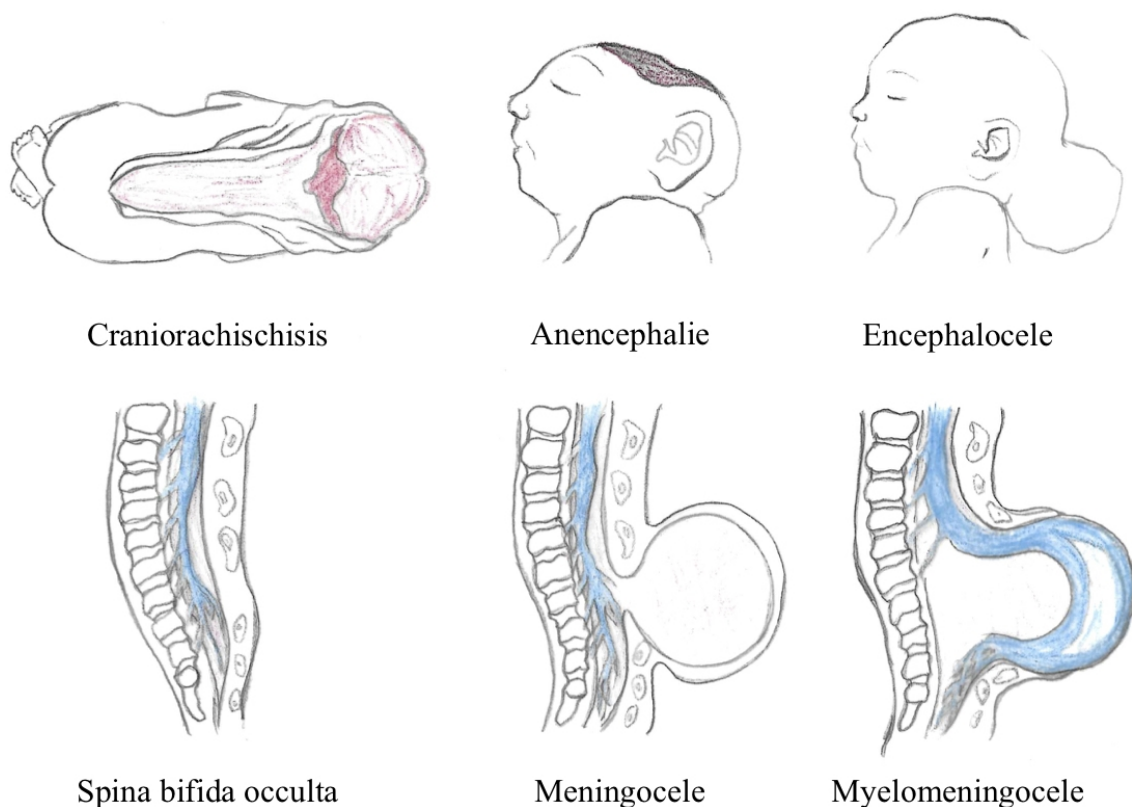


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Neuralrohrdefekte  
angelehnt an: Spina bifida - Interdisziplinäre Diagnostik, Therapie und Beratung, Moers et al., 2018, S. 5



die sakrokokzygeale Region am zweithäufigsten betroffen. Verschlussstörungen des zervikalen Segments finden sich zu 10% und solche im thorakalen Segment in 3% der Fälle.<sup>3</sup>

Die Anenzephalie stellt eine der schwersten Formen der kranialen Neuralrohrdefekte dar. Bei diesem meist letalen Krankheitsbild gibt ein klaffender Schädel den Blick frei auf ein fehlangelegtes, destruiertes Gehirn.<sup>2</sup> Seit dem 16. Jahrhundert sind viele Beispiele der Anenzephalie in Europa beschrieben. Sie verschwindet jedoch durch pränatale Ultraschalluntersuchungen und die Möglichkeit des Schwangerschaftsabbruchs mehr und mehr aus den meisten industrialisierten Ländern.<sup>2</sup> Geelen et al. wiesen bei Ratten drei Phasen des embryonalen Verlaufs der Anenzephalie nach: (1) eine gestörte Neurulation des rostralen Teils der Neuralplatte; (2) Protrusion des zunächst regelhaft entwickelten Gehirns; (3) Degeneration der exponierten Gehirnteile mit dem Resultat der Anenzephalie.<sup>4,5</sup> Daten von menschlichen Embryonen mit Anenzephalie deuten auf einen ähnlichen Entstehungsweg hin.<sup>6,7</sup> Auf die Degeneration des exponierten Gehirns folgt dessen Umbau in eine zerebrovaskuläre Masse, bestehend aus glialen und ependymalen Zellen und vaskulären Strukturen.<sup>6,7</sup> Wie auch die Myelomeningozele (MMC) (s. unten) kann die Anenzephalie in Tierversuchen durch Hypervitaminose A induziert werden.<sup>4,5,8</sup> Die Craniorachischisis ist die ausgeprägteste Form der Neurulationsstörung. Die defekte Neurulation zeigt sich hier rostral, resultierend in der eben beschriebenen Anenzephalie und setzt sich entlang der spinalen Achse fort. Ist isoliert die gesamte spinale Achse betroffen, wird dies als Rachischisis bezeichnet. Enzephalomenigo- und Enzephalozelen sind Protrusionen des Hirns mit oder ohne Beteiligung der Meningen durch eine abnormale Öffnung des Schädels. In westlichen Ländern finden sich 85% der Enzephalozelen okzipital, wohingegen sie in Südostasien eher frontal auftreten.<sup>2</sup>

Die Familie der spinalen Dysraphien beinhalten spinale Abnormalitäten mit unvollständiger Fusion der in der Mittellinie befindlichen, mesenchymalen, knöchernen und neuralen Strukturen. Ein zentraler Begriff ist jener der Spina bifida, der auf den Anatomen und Chirurgen Nicolaes Tulp zurückgeht. Tulp, dessen echter Name Claes Pieterszoon war, kennt man als Figur in Rembrandts „The Anatomy Lessons of Dr. Tulp“ (1632). In einem seiner Textbücher mit dem Namen „Observationes Medicae“ tauchen die ersten Illustrationen einer spinalen Dysraphie auf. Er beschreibt den Fall eines Kindes mit einer großen, lumbalen Myelomeningozele, in welcher „nervorum propagines tam varle per tumorem dispersas“ („sich die Verlängerung der Nerven in verschiedene Richtungen durch den Tumor zerstreuen“). In einer hierzu gehörigen Bildlegende ist zum ersten Mal der Terminus Spina bifida zu lesen, übersetzt als „gespaltener Dorn(-fortsatz)“.<sup>9</sup> Heute werden hierunter offene und geschlossene Formen subsumiert. Der Begriff Spina bifida aperta beschreibt Läsionen, in welchen sich neurales Gewebe in einem Hautdefekt befindlich

an der Körperoberfläche präsentiert. Dieses liegt entweder frei exponiert vor oder wird zystisch durch Membranen bedeckt, was man als Spina bifida cystica bezeichnet. Es treten drei Haupttypen der Spina bifida aperta auf, die jeweils durch Folgendes charakterisiert sind: (1) die Neuralplatte verbleibt offen klaffend (Myeloschisis oder Myelozele), (2) neurales und meningeales Gewebe protrahieren vom Wirbelkanal in Richtung Hautoberfläche (Myelomeningozele), (3) alleinig meningeales Gewebe protrahiert (Meningozele).<sup>2</sup> Hiervon abgrenzen lässt sich die Spina bifida occulta. Bei dieser geschlossenen Dysraphie liegen das neurale Gewebe und die Meningen nicht exponiert. Der Defekt zeigt sich vollständig epithelialisiert, die darüber befindliche Haut kann jedoch dysplastisch sein. Meist präsentiert sich die Spina bifida occulta in Form reiner Knochendefekte der Wirbelbögen, welche mit einer Prävalenz von 17-30% sehr häufig auftreten.<sup>9-11</sup>

## 1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Neuralrohrdefekte zählen mit 0,5-10 Fällen pro 1000 Geburten weltweit zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen.<sup>12</sup> Aufgrund der komplexen Ätiologie ist die Prävalenz äußerst variabel. So finden sich in den USA und vielen europäischen Ländern 0,5-0,8 Fälle pro 1000 Geburten, wohingegen die Prävalenz in einigen Regionen in China mehr als 20 mal höher liegt.<sup>13,14</sup> Geht man von einer durchschnittlichen Prävalenz von einem Neuralrohrdefekt-Fall pro 1000 Geburten aus bei einer globalen Population von 7 Milliarden Menschen und einer Geburtenrate von 20 pro 1000 Menschen, erhält man ein jährliches Auftreten von 140000 Neuralrohrdefekt-Fällen weltweit. In Regionen mit höheren Prävalenzen finden sich disproportional höhere Frequenzen von seltenen Subtypen wie der Craniorachischisis.<sup>15</sup> Auch die Ethnie stellt einen prävalenz-modulierenden Faktor dar. In den USA beispielsweise zeigte sich bei Einwohnern mit hispanoamerikanischer und spanischer Herkunft eine höhere und bei Afroamerikanern eine niedrigere Spina-bifida-Prävalenz im Vergleich zu nicht-hispanischen Weißen.<sup>16,17</sup> EUROCAT (*European network of population-based registries for the epidemiological surveillance of congenital anomalies*) sammelt Daten von Lebend- und Totgeburten sowie von Schwangerschaftsabbrüchen und generiert somit umfassende Daten zu Prävalenzen von Fehlbildungen in Europa. Für die Periode 2003-2007 ermittelte EUROCAT Prävalenzen von Spina bifida und Neuralrohrdefekten in Europa von 0,51 und 0,94 pro 1000 Lebendgeburten, Totgeburten und Schwangerschaftsabbrüchen.<sup>18</sup>

Sowohl genetische als auch nicht-genetische Faktoren sind mit der Pathogenese der Neuralrohrdefekte assoziiert. In Prävalenzstudien der 1960er wurde basierend auf dem Verhältnis von Betroffenen unter den Geschwistern von Indexfällen in South Wales, Glasgow und London eine

Vererbbarkeit von 60-70% ermittelt.<sup>19</sup> Weniger als 10% der Neuralrohrdefekte treten im Rahmen von Syndromen auf, wie einer Trisomie 13 oder 18, während die große Mehrheit ein nicht-syndromales, sporadisches Auftreten zeigt.<sup>20</sup> Unter letzteren wird eine multifaktorielle Kausalität vermutet, die sich aus genetischen und nicht genetischen Faktoren zusammensetzt. Das Wiederholungsrisiko für Geschwister eines Indexfalles beträgt 2-5%, was verglichen mit der Prävalenz der allgemeinen Bevölkerung (ca. 1 von 1000) eine 20-50fache Risikoerhöhung darstellt.<sup>20</sup> Verwandte zweiten und dritten Grades zeigen ein niedrigeres Wiederholungsrisiko als Verwandte ersten Grades, aber trotzdem ein höheres als Nicht-Verwandte. Für betroffene Frauen beträgt das empirische Wiederholungsrisiko 3%. Nach zwei Schwangerschaften mit Kindern mit einer Spina bifida steigt dieses auf 10% an.<sup>20</sup> Ein weiterer Hinweis auf genetische Ursachen von Neuralrohrdefekten ist die Persistenz von Prävalenz-Unterschieden zwischen ethnischen Gruppen auch nach Migration in andere geographische Lokalisationen.<sup>21</sup>

Bislang wurden bei Mäusen mehr als 200 Gene identifiziert, die für eine fehlerfreie Neurulation benötigt werden.<sup>20</sup> Diese Gene sind mit einer großen Spanne an molekularen Signalwegen verknüpft<sup>22-24</sup> und Mutationen dieser Gene können eine Vielzahl an Neuralrohrdefekt-Phänotypen generieren. Für die Exenzephalie, den embryonalen Vorläufer der Anenzephalie, wurden bislang die meisten verursachenden Genmutationen erkannt (über 150 Gene). Für Spina bifida aperta existieren mehr als 40 Mutantenstämme.<sup>20,23,25</sup> Gensequenzierungen von kodierenden Regionen vieler ebendieser Gene bei Menschen zeigten bei Patienten mit Neuralrohrdefekten seltene Missense-Mutationen, die bei Unbetroffenen fehlen. Insbesondere für Genvarianten des Planar-cell-polarity-Pathways konnten Assoziationen mit Neuralrohrdefekten nachgewiesen werden.<sup>20,26</sup> Eine zweite Gruppe von mit Neuralrohrdefekten assoziierten Genen sind jene, die für Enzyme des „Folsäure one-carbon Metabolismus“ (FOCM) kodieren. Eines dieser Enzyme ist die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), welche 5-Methyltetrahydrofolat generiert. Dieses ist essenziell für die Konversion von Homocystein zu Methionin. Die 677C>T-Variante des MTHFR-Gens zeigt eine Konversion von Valin zu Alanin in Codon 222, was die Enzymaktivität reduziert. Dieser Genotyp, egal ob bei der Schwangeren oder dem Fetus, stellt bei niedrigem Folsäurestatus einen Risikofaktor für Neuralrohrdefekte dar.<sup>20</sup>

Die nicht-genetischen Faktoren betreffend ist ein reduzierter Folsäurestatus unzweifelhaft der bekannteste, beeinflussende Faktor. Vor mehr als 50 Jahren zeigten Smithells et al., dass Ernährung und postpartale Blutspiegel von Frauen mit von Neuralrohrdefekten betroffenen Schwangerschaften arm waren an bestimmten Mikronährstoffen, hierunter Folsäure.<sup>27</sup> Die Gabe eines Folsäure-beinhaltenen Nahrungsergänzungsmittels reduzierte darauffolgend das Wiederholungsrisiko für

weitere Schwangerschaften.<sup>28</sup> Eine Reihe von Studien bestätigte einen Vorteil einer Folsäuresupplementierung, der sich sowohl zur Primärprävention, als auch zur Senkung des Wiederholungsrisikos zeigte.<sup>20,29</sup> Verschiedene Fall-Kontroll-Studien zeigten die Reduktion des Neuralrohrdefekt-Risikos um 35-75% bei perikonzeptioneller Einnahme eines Multivitaminpräparats mit Folsäure.<sup>30-34</sup> In einer großen prospektiven Kohortenstudie ging die Einnahme eines folsäurehaltigen Präparats in den ersten sechs Wochen der Schwangerschaft mit einer Risikoreduktion von 70 Prozent einher.<sup>30,35</sup> Spätestens 4 Wochen vor der Konzeption wird Frauen heute empfohlen, mit der Einnahme von 0,4mg Folsäure täglich zu beginnen. Hochrisikopatientinnen, die beispielsweise schon eine betroffene Schwangerschaft hatten, wird zur täglichen Einnahme von 4mg Folsäure geraten. Daneben wirken sich andere Nährstoffe und ernährungsbezogene Faktoren auf die Entstehung von Neuralrohrdefekten aus. Nennenswert ist die Assoziation von Spina bifida mit maternalem Übergewicht. In einer Vielzahl von Studien bildete sich eine Risikoerhöhung um den Faktor 1,5 – 3 ab.<sup>36</sup> Übergewicht und Spina bifida scheinen hierbei in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung verbunden zu sein, da schweres Übergewicht zu einer weiteren Risikoerhöhung führt.<sup>20</sup> Als zugrunde liegende Mechanismen werden ein gestörter Glucose-Metabolismus, oxidativer Stress und das metabolische Syndrom diskutiert.<sup>37</sup> Bei maternalem Diabetes mellitus, welcher für eine Reihe an Fehlbildungen inklusive Neuralrohrdefekte prädisponiert, scheint u.a. die Hyperglykämie eine unmittelbare Ursache des Neurulationsfehlers darzustellen. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist wenig verstanden. Eine Vermutung ist eine unterbrochene Expression des Pax3-Gens, dessen Loss-of-function-Mutation auch bei Mäusen Neuralrohrdefekte hervorruft.<sup>20,38</sup> Des Weiteren beeinflussen andere die Mutter und die Umwelt betreffende Faktoren das Risiko der Entstehung von Neuralrohrdefekten. Im Falle des Antikonvulsivums Valproat besteht bei Einnahme während des ersten Trimesters der Schwangerschaft eine 10fache Risikoerhöhung für Neuralrohrdefekte. Seine potente, inhibitorische Wirkung auf die Histon-Deacetylase stört die Balance aus Protein-Acetylierung und -Deacetylierung, was zum Neurulationsfehler führt.<sup>20,39,40</sup> Das Auslösen von Neuralrohrdefekten durch das von Pilzen produzierte Fumonisin zeigte sich bei einem „Ausbruch“ von Neuralrohrdefekten in Südtexas. Dieser war zurückzuführen auf eine Pilz-Kontamination von Tortilla-Mehl.<sup>20,39,41</sup> Versuche an Nagetier-Embryos identifizierten als Schlüssel-Target des Toxins den Sphingosin-Phosphat-Metabolismus, welcher potenziell die Folsäurenutzung vermittelt.<sup>20,42</sup> Obwohl eine Vielzahl von Umweltfaktoren mit Neuralrohrdefekten assoziiert sind, existieren nur wenige Hinweise zum zugrundeliegenden Pathomechanismus der jeweiligen Beeinflussung.

Wahrscheinlich ist, dass nicht-genetische Faktoren die Neurulation beeinflussen, wenn sie mit einem prädisponierenden Genotyp zusammenkommen.<sup>20</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Faktoren an der Modulation des Entstehungsrisikos von Neuralrohrdefekten beteiligt sind. Wie dieses Zusammenspiel von Risikofaktoren zu einem wachsenden, nationalen Gesundheitsproblem führen kann, zeigt sich im Irak. Nach Jahrzehnten, die durch Konflikte und Kriege geprägt waren, wurden dort steigende Fallzahlen betroffener Kinder beobachtet. 2012 lagen Schätzungen zur nationalen Prävalenz mit 24,2 Neuralrohrdefekten / 1000 Lebendgeburten weit über dem internationalen Durchschnitt. Teile des Landes sind besonders stark betroffen. In Fallujah, einer Stadt in der irakischen Provinz al-Anbar, wurde eine Prävalenz von 95 Fällen / 1000 Lebendgeburten festgestellt. Zurückgeführt wird dies auf die Exposition gegenüber Giften wie abgereichertem Uran, maternale Mangelernährung, maternalen Folsäure-Mangel, das Fehlen eines nationalen Programms zur Folsäureanreicherung und psychosozialen Stress.<sup>43,44</sup>

### 1.2.1 All-Trans-Retinsäure als Auslöser von Myelomeningozelen

Neben den bereits beschriebenen genetischen Mutationen können Neuralrohrdefekte im Tierversuch auch durch experimentelle Manipulation<sup>45,46</sup> oder Teratogene produziert werden. Zu letzteren gehört Retinsäure (retinoic acid = RA), ein grundlegender Regulator der frühen, embryonalen Entwicklung.<sup>47</sup> RA leitet sich von Retinol (Vitamin-A) ab und wird in verschiedenen isomeren Formen produziert. Von diesen stellt all-trans-RA (ATRA), welches für das Tiermodell der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, den primären, physiologischen Liganden während der Entwicklung dar.<sup>48</sup> Die Wirkung als Signalmolekül für Zellwachstum und -differenzierung vermittelt RA als Transkriptionsfaktor. Es bindet als Ligand den nukleären RA-Rezeptor (RAR) und

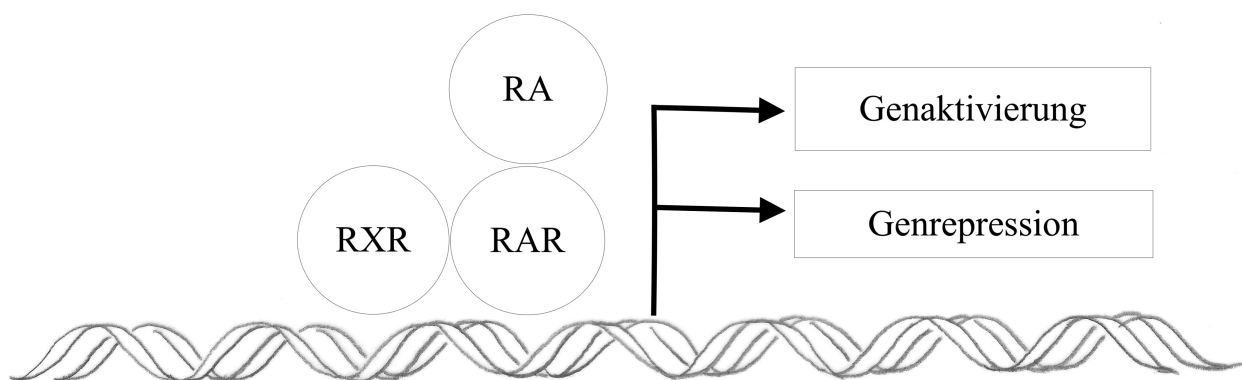


Abbildung 2: Retinoic Acid-Signal-Mechanismus

RA = Retinoic Acid; RAR = RA-Rezeptor; RXR = Retinoid-X-Rezeptor. Aus „Retinoic acid signaling pathways“, Ghyselinck & Duester, 2019 Development 146, S.1

wird dann gemeinsam mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) als RA response element (RARE) bezeichnet. Diese Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung des RAR und so zur Aktivierung oder Hemmung der Transkription von Genen.<sup>48</sup> Auf diese Weise ist RA essenziell für den Entwicklungsprozess von Chordatieren. Während der neuralen Entwicklung nimmt RA eine tragende Rolle in der frühen Neurogenese und der Neurulation ein.<sup>48</sup> Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss von RA führen zu Fehlbildungen in Form von Strukturierungsfehlern entlang der anteroposterioren Achse.<sup>47,49</sup> Loss-of-Function-Mutationen von Genen kodierend für Aldh1a, einem tragenden Enzym der RA-Synthese, Cyp26a1, einem Schlüsselenzym des RA-Metabolismus, und die RA-Rezeptorgene RARA und RARG rufen im Tierversuch nachweislich Neuralrohrdefekte hervor (Aldh1a = Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1; Cyp26a1 = Cytochrome P450 Family 26 Subfamily A Member 1; RARA = retinoic acid receptor alpha; RARG = Retinoic acid receptor gamma).<sup>22</sup>

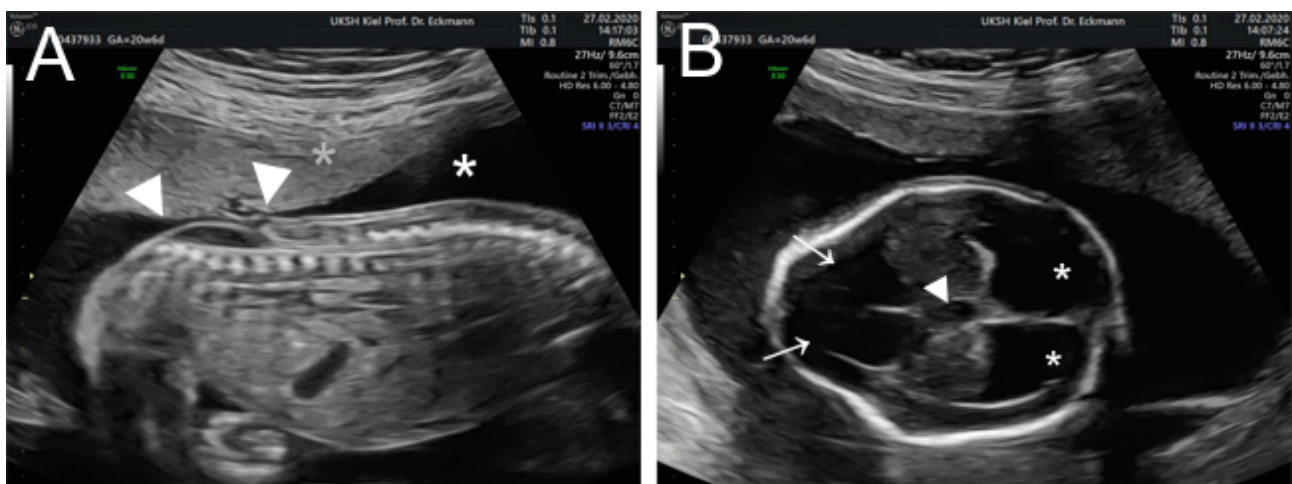
Auf welche Weise durch den Einfluss von RA Neuralrohrdefekte entstehen, ist nicht gänzlich verstanden. Denkbar sind Fehler in der Initiation der Neurulation oder der Fusion der Neuralfalten. RA könnte die Proliferation oder Differenzierung der neuroepithelialen oder dem Neuroepithel unterliegenden, mesenchymalen Zellen beeinflussen. Untersuchungen zu kranialen Neuralrohrdefekten zeigten, dass durch RA ausgelöster exzessiver Zelltod im gastrulierenden Mesoderm eine Rolle spielen könnte.<sup>50-52</sup>

### 1.3 Diagnostik

Die Detektion der Myelomeningozele während der Schwangerschaft beruht auf der Kombination verschiedener diagnostischer Komponenten. Die tragende Säule der Myelomeningozelen-Diagnostik ist die Sonographie. Sie dient zur Erkennung und im Weiteren zur Einschätzung des Ausmaßes der Fehlbildung. Letzteres ist essenziell für die Prognose und folglich für die pränatale Beratung. Sonographisch lässt sich die Myelomeningozele durch direkte oder indirekte Zeichen zeigen. Bei günstiger Lage des Feten im Uterus kann man neben dem Defekt zusätzlich die begleitenden, skelettalen Veränderungen erkennen. Diese sind fehlende Processus spinosi, eine C-/U-Form der Wirbel in axialer Ebene und ein Auseinanderweichen der lateralen Processus in koronarer Ebene.<sup>9</sup> Da eine komplette Darstellung der spinalen Achse häufig nicht möglich ist, behilft man sich durch die Begutachtung indirekter Auswirkungen der Fehlbildung. Aufgrund der Assoziation der Spina bifida aperta mit der Chiari-Malformation-II können sich intrakranial indirekte Zeichen zeigen.<sup>9,53,54</sup> Der transzerebelläre Schnitt kann ab der 16. SSW eine oblitierte

Cisterna magna und ein dysplastisches Cerebellum mit einer abnormen anterioren Flexur („Banana sign“) erkennen lassen.<sup>9,55,56</sup> Im transventrikulären Schnitt kann sich eine Ventrikulomegalie darstellen sowie in 50% eine frontale, knöcherne Verformung („Lemon sign“). Letztere verliert sich in den meisten Fällen zwischen der 22. und 24. SSW.<sup>9,57</sup> Aufgrund der gezielten Untersuchung dieser indirekten Zeichen konnte die Sensitivität der Sonographie in der Erkennung der Spina bifida aperta in westlichen Ländern auf 68-90% erhöht werden.<sup>9,53,54</sup>

Nach der Erkennung eines Defektes in der Sonografie findet die MRT (Magnetresonanztomographie) Verwendung für differentialdiagnostische Überlegungen, die Detektion assoziierter Fehlbildungen und die präoperative Planung. Bei offenen, spinalen Dysraphien beträgt das Risiko einer chromosomalen Anomalie 8-16%. Ein Karyogramm kann folglich indiziert sein, beispielsweise bei Vorliegen assoziierter Fehlbildungen. Eine weitere diagnostische Komponente ist die Untersuchung des Serums der Schwangeren und des Fruchtwassers. Die Bestimmung von Alpha-Fetoprotein (AFP) nimmt hierbei eine wichtige Rolle ein. Dieses ist erhöht im Falle von Fehlbildungen, die mit einer nicht intakten Hautoberfläche einhergehen, wie der Omphalozele oder spinalen Dysraphien.<sup>9</sup>



**Abbildung 3: Sonographische Diagnostik einer dysraphischen Fehlbildung**

A) zeigt die Darstellung einer lumbosakralen Myelomenigozele. Die Pfeilspitzen begrenzen die Plakode. Der weiße Stern markiert die Amnionflüssigkeit, der graue Stern die Plazenta. In B) zeigt sich das Lemon sign als frontale knöcherne Verformung. Die Pfeile markieren die Seitenventrikel, die Sterne deren Hinterhörner. Die Pfeilspitze deutet auf den dritten Ventrikel.

Mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Eckmann-Scholz, Pränatalmedizin, UKSH Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## 1.4 Das klinische Bild

Das klinische Bild setzt sich zusammen aus der neuronalen Schädigung, den auftretenden Komplikationen und den assoziierten Fehlbildungen. Letztere finden sich in Vielzahl, einerseits in Form von skelettalen Abnormalitäten wie Fuß-/Beinfehlstellungen, Hüft dysplasie und Skoliose, andererseits zeigen sich Fehlbildungen von Herz, Urogenitaltrakt und Gastrointestinaltrakt.<sup>9</sup>

Die Schädigung des spinalen Gewebes kann sich in Form und Schwere variabel präsentieren. Eine entscheidende Rolle spielt die Lage und Größe der Fehlbildung.<sup>9</sup> Die Schädigung motorischer Neurone äussert sich in Form von Paresen und Atrophien, jene sensibler Neurone als Sensibilitätsstörungen und Schmerzen. Der Defekt viszeraler Nerven zeigt sich in Blasen- und Mastdarm entleerungsstörungen und einer gestörten, sexuellen Funktion. Die neurogene Blase beeinflusst durch die mögliche Entstehung von Nierenversagen entscheidend die Prognose.<sup>9</sup>

Gravierende Auswirkungen auf die Prognose haben auch die das ZNS-betreffenden Komplikationen. Wichtig zu nennen sind hierbei die Liquorzirkulationsstörung, die zumeist in einer Versorgung mit einem Shuntsystem mündet, sowie die Chiari-Malformation-II, das Tethered-Cord-Syndrom und die Syringomyelie. Letztere lässt sich radiologisch als Aufweitung des Zentralkanals über mindestens zwei Wirbelsegmente erkennen. Hierbei kann es zur Minderversorgung des Rückenmarks mit Blut kommen mit möglicher bulbärer, motorischer und sensorischer Symptomatik.<sup>9</sup> Der Hydrozephalus tritt bei 85-90% der Myelomeningozelen-Patienten perinatal auf.<sup>9</sup> Vor der Einführung von Shunts zur Behandlung des Hydrozephalus in den 1960ern war dieser die häufigste Todesursache bei Patienten mit MMC.<sup>58</sup> In den 1990ern zeigten Dias et al., dass die Shunt dysfunktion zur Hydrozephalus-Behandlung den häufigsten Grund einer neurologischen Verschlechterung von MMC Patienten darstellt.<sup>9</sup> Als Ursache des Hydrozephalus finden sich eine veränderte venöse Hämodynamik, ependymale Alterationen und eine Liquorzirkulationsstörung.<sup>59</sup> Letztere wird unter anderem bedingt durch die veränderten anatomischen Verhältnisse in der hinteren Schädelgrube. Die Chiari-Malformation-II bezeichnet eine Verlagerung der Kleinhirntonsillen sowie Teilen des Hirnstamms in den Spinalkanal als Folge der Myelomeningozele. Auch kann es zur Herniation des Vermis cerebelli in Richtung des Tentoriums kommen, woraus eine relative Aquäduktstenose resultiert. Während der Embryogenese entsteht die Chiari-Malformation-II, wenn sich das rhombenzephal Bläschen nicht vollständig erweitert. Gleichzeitig bildet das umliegende Mesoderm keine ausreichend große Fossa cranii posterior. Kleinhirn und Hirnstamm wachsen nun in der kleinen Fossa cranii posterior mit daraus resultierender Herniation in das Foramen magnum. Dies wirkt sich ebenfalls auf die Entwicklung der supratentoriellen Teile des Gehirns sowie der ossären Strukturen aus.<sup>60,61</sup> Zum



Symptomkomplex der Chiari-Malformation-II zählen neurologische und orthopädische Probleme sowie Hirnstammfunktionsstörungen. Die Chiari-Malformation-II tritt bei nahezu 100% der MMC-Patienten auf, weswegen einige Autoren sie als Teil der Fehlbildung sehen.<sup>9</sup> Beim Tethered-Cord-Syndrom (TCS) kommt es durch zunehmende Spannung auf das Rückenmark zu Mikroinfarkten in ebendiesem.<sup>9</sup> Man unterscheidet eine primäre und sekundäre Form des Tethered-Cord-Syndroms. Physiologischerweise aszendiert der Conus medullaris während der Embryogenese im Wirbelkanal, da die umliegenden Gewebe in longitudinaler Richtung ein größeres Wachstum zeigen.<sup>3,9</sup> Da bei der MMC das Nervengewebe und die Meningen noch in Verbindung mit der Cutis stehen, kommt es zur Zugwirkung auf das Gewebe und es folgt eine Aszensionshemmung (primäres TCS). Auch die operative Versorgung der Myelomenigozele (s. 1.5 Therapie) führt sekundär in vielen Fällen zu Verklebungen zwischen Dura und Myelon (sekundäres TCS). Klinisch zeigt sich sowohl das primäre als auch das sekundäre Tethered-Cord-Syndrom durch Spastiken, Schmerzen oder Parästhesien.<sup>3</sup> Auch orthopädische Probleme wie Bein-/Fußdeformitäten, Wachstumsunterschiede der unteren Extremität oder eine progrediente Skoliose gehören zu den Symptomen.<sup>3</sup>

## 1.5 Therapie

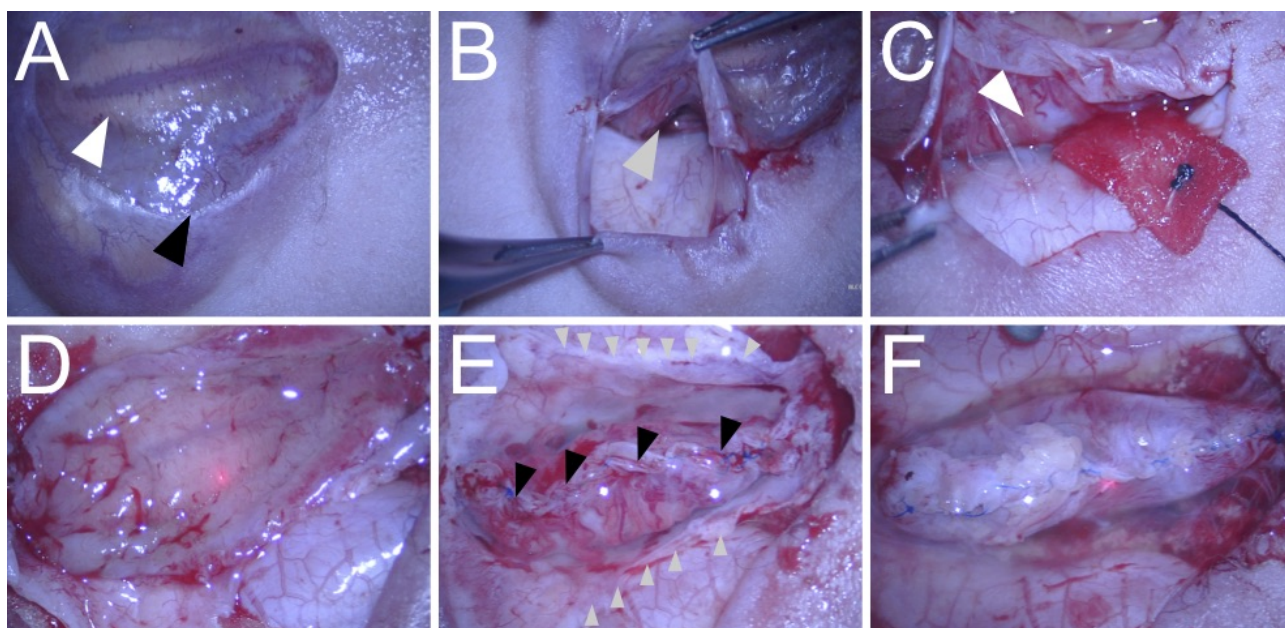
Um für einen Patienten mit einer MMC das bestmögliche, neurologische Outcome und die höchste Lebensqualität zu erreichen, sind folgende Therapiepfiler von entscheidender Bedeutung: Eine das sensible Nervengewebe schonende Entbindung, ein zeitiger Verschluss des Defektes und eine suffiziente Behandlung von auftretenden Komplikationen.

Die Geburt eines Kindes mit MMC ist durch die hohe Erkennungsrate und die pränatale Diagnostik und Beratung in den meisten Fällen geplant. Aufgrund der hohen, mechanischen Belastung im Geburtskanal ist die vaginale Entbindung mit einer Verschlechterung der neurologischen Symptomatik der Patienten assoziiert.<sup>62</sup> Aus diesem Grund wird die Entbindung meist per Kaiserschnitt durchgeführt.<sup>9</sup> Luthy et. al zeigten des Weiteren eine bessere motorische Funktion für den Kaiserschnitt vor Blasensprung gegenüber dem Kaiserschnitt nach Blasensprung. Erklären könnte man dies durch den Verlust von Amnionflüssigkeit, welcher zur mechanischen Traumatisierung der Plakode beiträgt.<sup>62</sup>

Die tragende Säule der Therapie eines Kindes mit MMC stellt der chirurgische Verschluss des Defektes dar. Bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts betrug die Mortalität von Patienten mit einer MMC nahezu 100%, 80-90% der Kinder starben innerhalb des ersten Lebensjahres.<sup>63</sup> Durch die Entwicklung von Verschlusstechniken zum Ende des 19. Jahrhunderts wurde das Überleben für

Kinder in gutem, gesundheitlichen Zustand ohne Komorbiditäten ermöglicht.<sup>9</sup> Der Eingriff dient der Schaffung eines natürlichen Milieus für die Neurone, dem Schutz der neuralen Strukturen und der Prävention von Liquorverlust.<sup>9,56</sup> Er führt ebenfalls zur Minimierung des Risikos für Infektionen, welche in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts noch eine Haupttodesursache von MMC-Patienten darstellten.<sup>9,56</sup>

Der Verschluss einer MMC beginnt mit der Abtragung der Zona epithelioserosa (s. Abb. 4B), wodurch sich das Myelon in den offenen Spinalkanal senkt.<sup>3,64</sup> Es folgt der Verschluss des fehlgebildeten, neuralen Gewebes im Sinne einer Neurulation. Hierzu werden die lateralen Ränder der Plakode in der Mittellinie vernäht, wodurch sie ein Neuralrohr formen (s. Abb. 4E).



*Abbildung 4: OP-Ablauf*

*A) zeigt die Plakode direkt vor der operativen Versorgung der Fehlbildung. Die weiße Pfeilspitze deutet auf das an der Oberfläche liegende Myelon. Die schwarze Pfeilspitze zeigt die Grenze der Zona epithelioserosa zur Haut. B) zeigt die Präparation der Zona epithelioserosa sowie der umgebenden Haut. Die weiße Pfeilspitze deutet auf die ventrale Seite des Myelons mit den abgehenden motorischen Nervenwurzeln. C) zeigt die ventrale und laterale Ansicht des präparierten Myelons. D) zeigt das herauspräparierte Myelon vor der Neurulation. E) zeigt das neurulierte Myelon, die Pia wurde mit Einzelknopfnähten adaptiert (schwarze Pfeilköpfe). Die weißen Pfeilköpfe deuten auf den bereits präparierten Durarand. F) zeigt die oberhalb der Plakode verschlossene Dura.*

Anschließend wird der Durasack rekonstruiert und das Plakodengewebe umkleidend verschlossen (s. Abb. 4F). Durch Elevation und Verschluss der thorakolumbalen Faszie wird eine myofasziale Abdeckung geschaffen. Im nachfolgenden Verschluss der Haut gilt es spannungsfreie Verhältnisse anzustreben. Hierfür können komplexe, plastische Deckungsverfahren, z.B. in Form von Rotationslappen, notwendig sein.<sup>9</sup>

Diskutiert wird über den Zeitpunkt der Intervention, wobei heute ein postnataler und ein pränataler Eingriff in Frage kommen. Bei einem postnatalen Vorgehen wurde früher ein Verschluss innerhalb der ersten 24 Lebensstunden angestrebt. Heute existieren Daten, die eine Reparatur innerhalb von 48 bis 72h oder sogar später nahelegen. In der zusätzlichen Zeit kann die adäquate Evaluation des Patienten respektive anderer medizinischer Probleme erfolgen sowie die Formation eines geeigneten Chirurgeteams angepasst an individuelle, verkomplizierende Faktoren des Patienten.<sup>9</sup> Nachdem das postnatale Vorgehen lange die einzige Überlebenschance für MMC-Patienten dargestellt hatte, taten sich mit der Entwicklung der fetalen Chirurgie in den 80ern neue Möglichkeiten auf. Michael Harrison führte 1981 die erste Vesikostomie bei posterioren Urethralklappen in utero durch und legte damit den Grundstein für die pränatale Chirurgie. Diese ist bis heute nur wenigen Indikationen vorbehalten, unter denen die MMC den größten Anteil stellt.<sup>3</sup> In der darauffolgenden Zeit postulierten Hutchins und Meuli die Two-Hit-Hypothese (s. 1.7.1 Second Hit), welche die Frage nach einer frühestmöglichen, intrauterinen Therapie nahelegt.<sup>3,46,65,66</sup> In ersten Operationen in den 90ern versuchten Tulipan und Bruner die Plakode endoskopisch mit einem Vollhautlappen zu bedecken.<sup>67</sup> Nach dem Scheitern dieser Methode gelang es Adzick 1998 erstmals, die MMC-Läsion in utero erfolgreich zu verschließen.<sup>3,68</sup> Das in der 23. Schwangerschaftswoche operierte und in der 30. Schwangerschaftswoche geborene Kind zeigte trotz einer thorakalen Läsion ein neuromuskuläres Lähmungsniveau auf Höhe L4-L5. Die rhombenzepale Herniation war postoperativ rückläufig und es lag keine Ventrikulomegalie vor. Leider kam es im weiteren Verlauf durch Tethering des Rückenmarks wiederum zum Verlust von motorischer Beinfunktion.<sup>68</sup> In den darauffolgenden Jahren bildeten sich verschiedene Vor- und Nachteile der pränatalen, chirurgischen Versorgung gegenüber einem postnatalen Eingriff ab, welche ab 2003 von Adzick et al. in der „Management of Myelomeningocele Study“ erstmals prospektiv, randomisiert untersucht wurden.<sup>3</sup> Primäre Endpunkt dieser Studie waren die fetale und neonatale Sterblichkeit oder das Erfordernis einer Shuntanlage im 1. Lebensjahr sowie die mentale und motorische Entwicklung der Kinder nach 30 Lebensmonaten. Es zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der pränatalen Chirurgie. Auch sekundäre Endpunkte wie rhombenzepale Herniation und Ambulation wiesen klar in diese Richtung. Auf der anderen Seite zeigten sich fetale und maternale Risiken einer Operation in utero. Zu nennen sind hierbei eine höhere Wahrscheinlichkeit für Frühgeburtlichkeit, Oligohydramnion, Plazentaablösung, einen vorzeitigen Blasensprung, sekundäre Infekte sowie Uterusdehiszenz. Auch war bei in utero operierten Kindern das Auftreten eines sekundären Tethered-Cord-Syndroms wahrscheinlicher. Nach der Randomisierung von 183 der 200 geplanten Patienten wurde die Studie aufgrund einer deutlichen

Überlegenheit der Ergebnisse in der Versuchsgruppe aus ethischen Gründen abgebrochen. Allgemein lässt sich sagen, dass die Entscheidung zwischen prä- und postnatalem Eingriff individuell getroffen werden muss. Dabei gilt es, die eben beschriebenen Vorteile und Nachteile des pränatalen Vorgehens gegeneinander abzuwiegen und weitere Ein- und Ausschlusskriterien für Mutter und Kind zu beachten. Entscheidet sich eine Mutter für das pränatale Vorgehen, findet der Eingriff zwischen der 19. und 26. Schwangerschaftswoche statt.<sup>3,69</sup>

Im Weiteren gilt ein besonderes Augenmerk der Therapie der Komplikationen des ZNS, welche sich maßgeblich auf die neurologische Funktion und die Prognose auswirken.<sup>9</sup> Hydrozephalusbedingte Shunt-OPs und -Revisionen sind der häufigste Grund für eine neurologische Verschlechterung von MMC-Patienten.<sup>59</sup> Auch sind sie mit einer 1%-Mortalität pro Jahr verbunden.<sup>70</sup> Bei einer ausgeprägten Chiari-Malformation-II kann eine operative kranio-zervikale Dekompression mit eventueller Anwendung einer Duraerweiterungsplastik nötig werden. Das Tethered-Cord-Syndrom stellt in vielen Fällen eine Indikation zur Operation dar, in welcher pathologische Fixationen des Rückenmarks und arachnoidale Adhäsionen gelöst werden.<sup>3</sup> Assoziierte Fehlbildungen sowie begleitende, orthopädische und urologische Probleme ziehen therapeutische Konsequenzen nach sich. Für ein bestmögliches, neurologisches Outcome und eine größtmögliche Patientenzufriedenheit ist somit eine fein abgestimmte, interdisziplinäre Zusammenarbeit anzustreben.

## **1.6 Anatomie und Embryologie des Rückenmarks**

### **1.6.1 Ein allgemeiner Überblick**

Spinale Dysraphien entstehen früh in der Embryogenese durch Störung der Gastrulation (2.-3. Woche), der primären Neurulation (3.-4. Woche) oder der sekundären Neurulation (5.-6. Woche).<sup>9</sup> Während der Gastrulation bildet sich zwischen Endoderm und Ektoderm eine dritte Zellschicht, das Mesoderm, aus welcher sich unter anderem die Chorda dorsalis entwickelt. Der Chorda-Mesoderm-Komplex induziert die Bildung der Neuralanlage aus ektodermalem Gewebe, nun auch als Neuralplatte bezeichnet. Dies ist der Beginn der primären Neurulation, in welcher sich aus der Neuralanlage das Neuralrohr formen wird. Im Rahmen der sekundären Neurulation entsteht das kaudale Rückenmark durch retrogressive Differenzierung. Hier bildet sich aus einer noch undifferenzierten Zellmasse über Apoptose, Regression, Degeneration und Differenzierung ein terminaler Ventrikel. Dieser Vorgang führt zum Schluss des Neuroporus posterior und zur Bildung des Filum terminale.<sup>3</sup>

Myelomeningozelen entstehen durch eine fehlerhafte primäre Neurulation. Bei Menschen beginnt diese an der Grenze zwischen späterem Rhombenzephalon und Halswirbelsäule auf Höhe des 5. Somiten am 22. Tag post fertilisationem. Von dort ausgehend setzt sie sich in rostraler und kaudaler Richtung fort, einem bidirektionalen Reißverschluss ähnelnd. Aus dem kranialen Teil des Neuralrohrs bilden sich im Weiteren als Anlage des Gehirns die Hirnbläschen, aus dem kaudalen

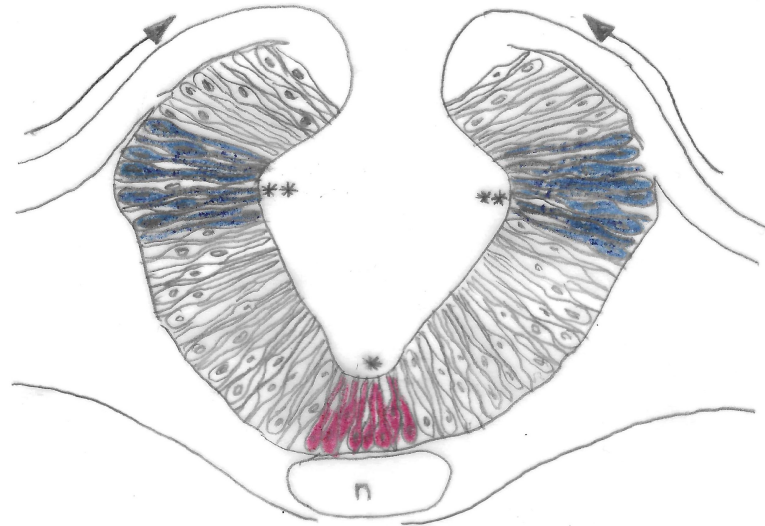


Abbildung 5: Hinge-Point-Modell am Beispiel der Neuralplatte des Huhns

\* = Furchung assoziiert mit MHP (MHP = Medial Hinge Point (rot)), \*\* = Furchung assoziiert mit DLHP (DLHP = Dorsolateral Hinge Points (blau)), aus „Towards a cellular and molecular understanding of neurulation“, Colas & Schoenwolf, 2001, *Developmental Dynamics*, S 126

Teil entsteht das Rückenmark. Am kranialen und kaudalen Ende des Neuralrohrs verbleiben zunächst der Neuroporus anterior und posterior. Noch steht das Neuralrohr über diese beiden Öffnungen in Verbindung mit der Amnionflüssigkeit, jedoch schließen sich beide im Verlauf. Den kranialen, anterioren Neuroporus betreffend findet dies am 24. Tag post fertilisationem statt, während der Verschluss des spinalen, posterioren Neuroporus am 26. Tag post fertilisationem erfolgt.

Die primäre Neurulation verläuft physiologischerweise in den folgenden vier Stadien: (1) Entstehung der Neuralplatte, (2) Bildung der Neuralrinne, (3) Krümmung der Neuralplatte, (4) Verschluss der Neuralrinne zum Neuralrohr. Die Entstehung der Neuralplatte aus ektodermalen Zellen ist der Beginn der Formierung des zentralen Nervensystems. Rostral des Primitivstreifens

wandeln sich mediale Ektoblasten unter dem induzierenden Einfluss des darunter befindlichen, axialen Mesoderms um in Neuroektoblasten. Vom Chorda-Mesoderm-Komplex sezernierte Substanzen setzen im Ektoderm die Differenzierung in ein mehrreihiges, prismatisches Epithel in Gang. Die so neu gebildete Neuralplatte zeigt sich in ihrem kranialen Teil, wo das Gehirn entstehen wird, breiter, wohingegen sie sich in ihrer kaudalen Region, dem späteren Rückenmark, verjüngt. Nun erfolgt ein Ausgestaltungsprozess, in dem sich die Neuralplatte apikobasal verdickt, mediolateral verschmälert und longitudinal verlängert. Die medialen Zellen verformen sich von prismatisch zu keilförmig, wodurch sich in der Mittellinie die V-förmige Neuralrinne bildet. Diese mediale Region bildet die Medial Hinge Point Region (MHP-Region). Lateral begrenzt wird die Neuralrinne durch die Neuralfalten. In diesen bilden sich beidseits Dorsolateral Hinge Point Regionen (DLHP-Regionen). Medial und Dorsolateral Hinge Point Regionen besitzen die Funktion von Ankerpunkten und beinhalten hierauf spezialisierte Zellen. Die MHP-Regionen sind an der prächordalen Platte und am Notochord fixiert, die DLHP-Regionen am benachbarten Ektoderm. Über das Zytoskelett können sie so Zugkraft auf den sie umgebenden Zellverband ausüben. Durch Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten, die intrazellulär zwischen apikalen Desmosomen aufgespannt sind, kommt es zur Krümmung. Die Neuralwülste wölben sich beidseits auf und bewegen sich aufeinander zu. Schließlich verschmelzen sie in der vierten Phase medial und bilden so das Neuralrohr.<sup>2,71-73</sup>

Daraufhin separiert mesodermales Gewebe das neurale vom nicht-neuralen Ektoderm, dem späteren Oberflächenektoderm. Aus der Verschmelzungszone der ehemaligen Neuralwülste entspringen die Neuralleistenzellen. Diese sind Stammzellen, welche sich durch ihre phänotypische Vielfalt und die Fähigkeit, große Strecken zu überwinden, auszeichnen. Im Weiteren bilden sie periphere Nervenzellen (Neurone und Gliazellen des sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervensystems), Melanozyten, Calcitonin-Zellen der Schilddrüse, Zellen des Nebennierenmarks und Bestandteile des Skelett- und Bindegewebes im Kopfbereich.<sup>2,3,72,73</sup>

Bei der Ratte beginnt der Schluss des Neuralrohrs im zervikalen Bereich und setzt sich von dort reißverschlussartig nach rostral und kaudal fort. In rostraler Richtung geschieht dies nur bis zum Rhombenzephalon. Rostral davon, im Bereich des Übergangs von Mesenzephalon zu Prosenzephalon, beginnt darauffolgend ein separater Verschlussvorgang, der sich nach rostral fortsetzt. Daraufhin verschließen sich sowohl die Öffnung zwischen diesen beiden Verschlusszonen als auch der anteriore Neuroporus im Bereich des Prosenzephalons.<sup>74</sup> Die spinale Neurulation verläuft von zervikal nach sakral fortschreitend. Hier kommt es bei der Ratte an Tag E11.5 zum Verschluss des kaudalen Neuroporus.<sup>75</sup>

Die neuroektodermalen Zellen, die die Wand des Neuralrohrs formen, bezeichnet man als Neuralepithelzellen. Nach Schluss des Neuralrohrs beginnen diese noch undifferenzierten Zellen mit einer raschen Zellvermehrung. In dieser auch als Matrixzone (s. Abb. 7) bezeichneten Region bilden sich primitive Nervenzellen, die Neuroblasten. Sie lagern sich außen dem Neuralepithel an. So formen sie die Mantelzone, welche im Verlauf zur grauen Substanz werden wird. Um die Mantelzone ordnen sich die Nervenfasern der Neurone in der Marginalzone an, später als weiße Substanz bezeichnet.<sup>73</sup> In der Mantelschicht finden sich drei Zonen, in welchen sich mit einem ventrodorsalen Gradienten Neurone entwickeln (Grundplatte, intermediäre Zone und Flügelplatte). Die ventral gelegene Grundplatte ist der Ursprung der Makroneurone, der zukünftigen Motoneurone des Vorderhorns. In der intermediären Zone bilden sich daraufhin Mesoneurone, d.h. die Relayneurone des intermediären Graus. Die Axone dieser Neurone projizieren in entfernte, spinale Segmente oder supraspinale Strukturen. Hier entwickeln sich unter anderem auch viszerosensible und viszeromotorische Kernareale des zukünftigen Seitenhorns. In der Flügelplatte entstehen zuletzt Mikroneurone, d.h. die Interneurone des Hinterhorns. Diese haben kurze Axone und enden lokal oder innerhalb weniger Rückenmarkssegmente.<sup>76</sup> Die Bereiche, die dorsal und ventral des Neuralrohrs auf Höhe der Mittellinie liegen, heißen Deckplatte und Bodenplatte. Hier finden sich keine Neuroblasten, viel eher sind sie Durchgangsstraßen für Nervenfasern, die von einer Seite des Rückenmarks zur anderen kreuzen.<sup>72,73</sup> Auch bilden sich hier Glioblasten, Vorläuferzellen der Glia.<sup>76</sup> Diese migrieren in die Mantelschicht und in die Marginalzone, wo sie sich zu Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten entwickeln. Zuletzt entstehen aus dem noch verbliebenen Neuroepithel die Ependymzellen als Auskleidung des Zentralkanal (s. Abb. 7).<sup>73</sup>

### **1.6.2 Von der Neurulation zur Geburt**

Da die gescheiterte Neurulation den Beginn der pathologischen Entwicklung darstellt, dient der folgende Abschnitt der chronologischen Darstellung von Entwicklungsprozessen des gesunden Rückenmarks ab diesem Zeitpunkt bis zur Geburt. Da in der vorliegenden Arbeit bei lumbosakraler Lokalisation der Myelomeningozelen im Tierprojekt das lumbosakrale Rückenmark der Kontrolltiere als Referenz gewählt wurde, ist eine Beschreibung eben dieser Rückenmarkshöhe essenziell. Grund hierfür ist der rostrokaudale Gradient in der Entwicklung des Rückenmarks. Altman & Bayer präsentieren in „The Development of the Rat Spinal Cord“ eine außerordentliche Darstellung der Entwicklungsprozesse im Rückenmark. Deren Darstellung erfolgt jedoch in großen Teilen an der Untersuchung des zervikalen Rückenmarks. Die folgende Zusammenfassung verwendet in den entsprechenden Abschnitten deren Zeitangaben für das zervikale Rückenmark und

fügt in Klammern eine geschätzte Zeitangabe für das lumbosakrale Rückenmark hinzu. Diese Schätzung entbehrt wissenschaftlicher Genauigkeit, dient aber als gedankliche Stütze für die folgenden Untersuchungen. Für diese Schätzung wird eine zerviko-lumbosakrale Entwicklungsdifferenz von zwei Tagen angenommen. Begründet wird dies mit der von Altman & Bayer untersuchten Entwicklung der Motoneurone. Diese weist in deren Studien von zervikal nach lumbosakral eine Verzögerung von zwei Tagen auf.<sup>76</sup>

Nach Schluss des Neuralrohrs beginnen die ventral gelegenen Neuralepithelzellen mit der Bildung der Neuroblasten, welche die zukünftigen Motoneurone des Vorderhorns repräsentieren. Diese Neuroblasten migrieren vom Neuralepithel zu ihrer endgültigen Position im zukünftigen Vorderhorn, wo sie zum Zeitpunkt E12 im zervikalen Rückenmark (lumbosakral: E14) das Wachstum der Axone in Richtung der Peripherie initiieren. Zu diesem Zeitpunkt formieren sich in der intermediären Zone kontralateral projizierende Relayneurone. Auch im Spinalganglion beginnt das Auswachsen der Fasern von früh-gebildeten Spinalganglionzellen. Dies geschieht bidirektional in Richtung der Peripherie und in Richtung der Flügelplatte. An der Flügelplatte angelangt bilden diese Fasern die spindelförmige „dorsal root entrance zone“, einen Vorläufer des Funiculus dorsalis.<sup>76</sup>

An Tag E13 bilden die Motoneurone des Vorderhorns im zervikalen Rückenmark (lumbosakral: E15) Dendriten, wozu sie zunächst eine bipolare Form annehmen und sich parallel zur Rückenmarksoberfläche ausrichten. Durch die ersten, aussprossenden Axone der zuvor entstandenen, kontralateral projizierenden Relayneurone im intermediären Grau kommt es zur Formation der ventralen Kommissur und des kontralateralen Funiculus ventralis. Im Neuralepithel entwickeln sich außerdem ipsilateral projizierende Relayneurone. Aus der „dorsal root entrance zone“ bildet sich durch das Wachstum intrasegmentaler Kollateralen der einwachsenden, sensiblen Fasern die „dorsal root bifurcation zone“. Während des folgenden Wachstums der Mantel- und Marginalzone findet eine stetige Größenabnahme des Zentralkanals statt.<sup>76</sup>

Die zuvor im Neuralepithel gebildeten ipsilateral projizierenden Relayneurone migrieren an Tag E14 im zervikalen Rückenmark (lumbosakral: E16) nach lateral (s. Abb. 6). Durch die Aussprossung von Fasern bilden sie den lateralen Funiculus. Sowohl letzterer als auch der ventrale Funiculus wachsen ab diesem Zeitpunkt konstant durch die zahlenmäßige Zunahme an den sie durchziehenden, afferenten und efferenten Fasern. Im Neuralepithel kommt es von E14 bis zum Ende des Tages E15 zur Bildung der Interneurone des zukünftigen Hinterhorns. Aus der „dorsal root bifurcation zone“ bildet sich durch das Wachstum intersegmentaler (propriospinaler) Kollateralen der einwachsenden, sensiblen Fasern die „dorsal funiculus propriospinal zone“.<sup>76</sup>

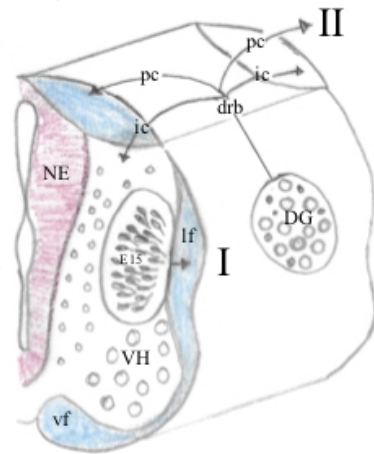


Am Ende des Tages E15 lässt sich in der Matrixzone des zervikalen Rückenmarks (lumbosakral: E17) letztmalig die Bildung von Neuronen nachweisen. Diese zuletzt gebildeten Neuroblasten wandern als zukünftige Interneurone in Richtung der Kopfreion des Hinterhorns, wo sie sich in der Substantia gelatinosa niederlassen. Eine zweite Gruppe dieser Neuroblasten verbleibt im dorsalen, zentralen Grau.<sup>76</sup>

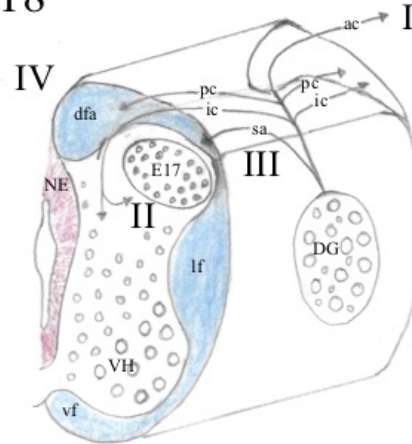
Aus der „dorsal funiculus propriospinal zone“ bildet sich an Tag E16 im zervikalen Rückenmark (lumbosakral: E18) durch das Wachstum suprasegmentaler Kollateralen der einwachsenden Fasern die „dorsal funiculus ascending zone“ (s. Abb. 6). Letztere verliert ab diesem Zeitpunkt ihre spindelartige Form. Der Grund hierfür ist die Rotation großkalibrieriger Hinterwurzel-Afferenzen von lateral nach medial. Von dort sprossen sie nach ventral in die Mantelzone aus, um dann einen nach dorsal gerichteten Bogen zum Hinterhorn zu schlagen und in diesem Synapsen zu bilden. Kleinkalibrige Afferenzen aus der Hinterwurzel erreichen zu diesem Zeitpunkt über Lissauer's Trakt das Hinterhorn. Ebenso siedeln sich die zuvor generierten Interneurone zu diesem Zeitpunkt im Hinterhorn an.<sup>76</sup>

Zum Zeitpunkt E17 nehmen im zervikalen Rückenmark (lumbosakral: E19) die letzten Interneurone im Hinterhorn ihren Platz ein. Letzteres wächst hierdurch und nimmt nun eine größere Fläche ein als das Vorderhorn. Ab diesem Zeitpunkt ähnelt die Anordnung der Neurone des Rückenmarks jener des adulten Zustands (s. Abb. 6).<sup>76,77</sup>

E16



E18



E22

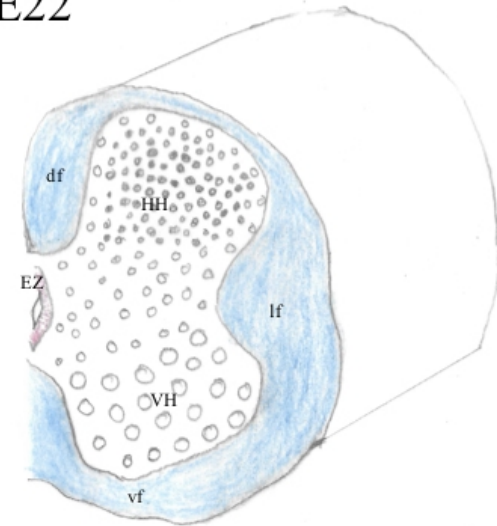


Abbildung 6: Zentrale Entwicklungsvorgänge im lumbosakralen Rückenmark

Die Darstellung ist angefertigt unter Berücksichtigung einer zerviko-lumbosakralen Entwicklungsdifferenz von zwei Tagen (nach Beobachtungen im zervikalen Rückenmark von Altman et Bayer, *The Development of the Rat Spinal Cord*). NE = Neuroepithel, EZ = Ependymzellen, VH = Vorderhorn, HH = Hinterhorn, vf = ventraler Funiculus, lf = lateraler Funiculus, DG = dorsal root ganglion, drb = dorsal root bifurcation zone, dfa = dorsal funiculus ascending zone, pc = propriospinale Kollateralen, ic = intrasegmentale Kollateralen, sa = small-caliber afferents, ac = ascendierende Kollateralen

Zu E16

I: Laterale Migration der ipsilateral projizierenden Relayneurone. Diese wurden an Tag E15 im Neuroepithel generiert.

II: Formation der „dorsal funiculus propriospinal zone“ durch auswachsende intersegmentale, propriospinale Kollateralen (pc).

Zu E18

I: Formation der „dorsal funiculus ascending zone“ (dfa) durch einsprossende, suprasegmentale Kollateralen (ac).

II: Ansiedlung der Interneurone im Hinterhorn, welche an Tag E17 im Neuroepithel generiert wurden.

III: Ankunft der kleinkalibrigen Afferenzen (sa) aus der Hinterwurzel.

IV: Rotation der großkalibrigen Afferenzen aus der Hinterwurzel (und somit der dfa) in Richtung der sagittalen Mittellinie.

Zu E22

Die Anordnung der Neurone ähnelt jener des adulten Rückenmarks.

### 1.6.3 Anatomie der Myelomeningozele

Das nicht neurulierte Rückenmark präsentiert sich wie ein aufgeklapptes Buch als zweigeteilte, meist symmetrische Läsion.<sup>78</sup> Das neurale Gewebe liegt auf einer zystischen, mit Liquor gefüllten Vorwölbung, dem Subarachnoidalraum. Dieser beinhaltet die aus dem fehlgebildeten Rückenmark nach ventral abgehenden Nervenwurzeln sowie die zu- und abführenden Gefäße.<sup>79</sup> Die Radix anterior verlässt die weiße Substanz der Plakode medially. Lateral findet sich die Radix posterior, welche beidseits zum Spinalganglienpaar führt und sich daraufhin mit der Radix anterior zum Spinalnerv vereinigt. Beide Radices werden begleitet von kleinen, arteriellen und venösen Gefäßen, welche die A. spinales anteriores und posteriores und V. spinales anteriores und posteriores speisen. Begrenzt wird der Subarachnoidalraum durch die ebenfalls aufgeklappt liegenden Meningen. Dorsal bildet die Pia mater die direkte Unterlage für das auf ihr befindliche, neurale Gewebe. Lateral geht diese in der Zona epithelioserosa über in Epidermis und oberflächliche Dermis, wobei dieses Transitions Gewebe ein hypertrophes Erscheinungsbild aufweist. Von dem lateralen Aspekt sprießen reichlich Blutgefäße in die Plakode ein. Diese daraus resultierende Hypervaskularisierung des neuralen Gewebes verleiht dem medialen Teil der Fehlbildung den Namen Zona medullovasculosa.<sup>9,78,79</sup> Ventral des Liquorraums findet sich die Arachnoidea Mater und das innere Blatt der Dura mater. Zwischen dem inneren Blatt der Dura mater und deren periostalen, äußeren Blatt spannt sich der Epiduralraum auf. Dieser beinhaltet Lymphgefäße sowie den Plexus venosus vertebralis.<sup>78</sup> Ventral des Epiduralraums imponieren Wirbelkörper sowie lateral die knöchernen Fortsätze des Wirbelbogens, welche aufgrund der nicht vollzogenen Neurulation keine gebogene Form einnehmen, sondern nach lateral abflachen.

Die Plakode selbst betrachtend lassen sich Matrix-, Mantel- und Marginalzone differenzieren (s. Abb. 7). Letztere liegt ventral und wird von medial nach lateral gebildet durch die Commissura alba anterior, den Funiculus ventralis, den Funiculus lateralis und den Funiculus dorsalis. In der Mantelzone findet sich medial die Bodenplatte, woran sich lateral die Basalplatte, das intermediäre Grau und die Flügelplatte anschließen. Die Matrixzone, also das Neuroepithel, schließt die Plakode zur Oberfläche hin ab. Dort findet sich als feine Linie die Membrana limitans interna. Aufgrund der nicht vollendeten Fusion der Plakodenhälften, lässt sich die Dachplatte nicht äquivalent zuordnen. Am ehesten finden sich äquivalente Zellen im hypertroph anmutenden, lateralen Teil der Plakode.<sup>2,9,77-80</sup>

Für eine histologische Betrachtung der embryonalen Entwicklung in der Plakode fehlt bislang eine wissenschaftliche Datenlage, weswegen sie an dieser Stelle ausbleiben muss. Die in der

vorliegenden Arbeit beobachteten, morphologischen und zellulären Veränderungen von E16 über E18 zu E22 finden sich in Abschnitt 3.2.1.

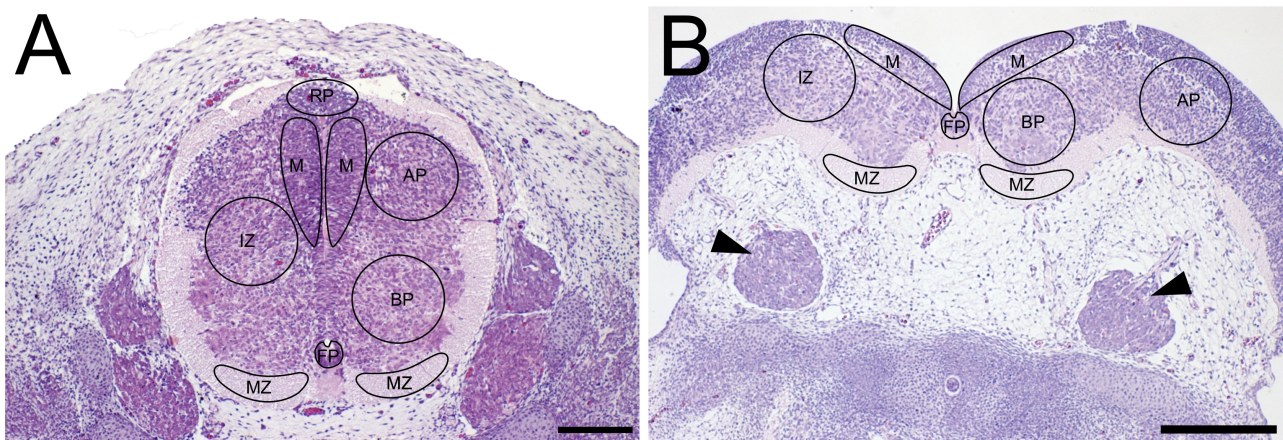


Abbildung 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines lumbalen Rückenmarkabschnittes eines Kontrolltieres (links) sowie einer Plakode (rechts) zum Zeitpunkt E16 in transversaler Ebene.

Matrixzone (M), Bodenplatte (engl. Floor plate = FP), Grundplatte (engl. Basal plate = BP), Intermediäre Zone (IZ), Flügelplatte (engl. Alar plate = AP); Deckplatte (engl. Roof plate = RP), Marginalzone (MZ), Spinalganglien (Pfeilspitzen), Maßstabsskala: 200µm

## 1.7 Pathogenese – die Schadenskaskade

Heutzutage geht man bei der MMC von einer mehrstufigen Schädigung des Plakodengewebes aus, welche im folgenden erläutert wird. Die erste Stufe der Schädigung, der „First Hit“, ist hiernach die nicht vollzogene Neurulation selbst. Daraufhin kommt es in utero zur sekundären Traumatisierung und Destruktion des Plakodengewebes, dem „Second Hit“. Im weiteren Verlauf findet sich ein sukzessiver Untergang von Nervengewebe, welcher nicht auf den Bereich der Läsion begrenzt bleibt. Dieses Läsionswachstum geht einher mit einer Verschlechterung der neurologischen Funktion. Die Krankheitsdynamik sowie histopathologische Beobachtungen erinnern an den Langzeitverlauf nach einem spinalen Trauma, in welchem Entzündungsprozesse von großer Bedeutung sind.<sup>81–85</sup> So liegt die Vermutung nahe, dass zelluläre Entzündungsmechanismen, als möglicher „Third Hit“, auch in der Pathophysiologie der MMC eine entscheidende Rolle spielen könnten, was erste Untersuchungen bestätigen.<sup>56,86,87</sup>

### 1.7.1 Second Hit

Lange war man davon ausgegangen, dass die neurologische Symptomatik der MMC-Patienten das direkte Resultat des eben beschriebenen Neurulationsfehlers sei. Erst als die fetale Chirurgie

Anfang der 80er Jahre durch den Kinderchirurgen Michael Harrison in den Vereinigten Staaten eingeführt wurde, entwickelte man ein Verständnis dafür, dass konnatale Fehlbildungen eine pränatale Vorgeschichte haben.<sup>78</sup> In Bezug auf die Spina bifida aperta wurde die natürliche Vorgeschichte in utero seit dieser Zeit intensiv studiert und experimentelle sowie klinische Beweise führten zur Postulierung der Second-Hit-Hypothese. Diese erklärt das neurologische Defizit der MMC-Patienten mit einer biphasischen Schädigung der nervalen Strukturen der Fehlbildung in utero. Der „First Hit“ ist hiernach die nicht vollzogene Neurulation, der „Second Hit“ eine sich in utero ereignende Destruktion des Neuralepithels. Schlüsselfiguren in der Erarbeitung dieses neuen, pathogenetischen Konzepts waren John Hopkins, der Pathologe Grover M. Hutchins und eine Reihe von weiteren Forschern um Heffez, Jordan, Blakemore und Meuli. Sie analysierten eine Vielzahl von MMC-Läsionen humaner Feten<sup>78,88-91</sup> und lieferten hierbei die erste akkurate, anatomische Beschreibung einer typischen Plakode. Auffällig war, dass trotz der nicht-neurulierten Form charakteristische, histologische Kennzeichen sowie sensomotorische Projektionen zur und von der Plakode vorhanden waren. Während sich in der frühen Schwangerschaft das Neuralepithel histologisch intakt zeigte, konnten gegen Ende der Schwangerschaft Zeichen von zunehmender Destruktion beobachtet werden.<sup>78,88,91</sup> Bei Stiefel et al. zeigte sich in einem Mausmodell eine zunächst physiologische Zytoarchitektur der Plakode in frühen Stadien der Schwangerschaft. Bis auf die nicht-neurulierte Form der Plakode fanden sich an Tag E13,5 keine Auffälligkeiten wie Trauma oder Degeneration. An Tag E15,5 zeigten sich erhaltene, neuronale Verbindungen durch die Plakode hindurch, geprüft durch Injektion eines Markierungsfarbstoffs rostral der Fehlbildung und darauffolgende Untersuchung der Färbung von Nerven der hinteren Gliedmaße. Die Untersuchung der sensomotorischen Funktion der Nerven an Tag E16,5 ergab bei 55% der Mäuse eine erhaltene Schmerzreaktion. Erst im weiteren Verlauf konnten Erosionen, Einblutungen und Degeneration des Gewebes beobachtet werden, verbunden mit dem Verlust der neuronalen Verbindung und einer Abnahme der neurologischen Funktion.<sup>45</sup> Auch Studien zur humanen Pathogenese lieferten Beweise, die auf eine sekundäre Schädigung in utero hindeuteten. So beobachtete man in Ultraschalluntersuchungen einen Verlust von zuvor vorhandener, neurologischer Funktion in Form von abnehmenden Extremitätenbewegungen.<sup>89</sup> Auf der Suche nach verantwortlichen Mechanismen konnten vorrangig mechanische und chemische Traumata identifiziert werden.<sup>62</sup> Erstere ereignen sich durch den beengten Platz im Uterus und Krafteinwirkungen im Geburtskanal, letztere werden durch eine über das physiologische Maß prolongierte Einwirkung der Amnionflüssigkeit auf das Plakodengewebe hervorgerufen.<sup>9,45,65,78</sup>

Diese bahnbrechende Erkenntnis des zweiphasigen Schädigungsverlaufs warf neue Fragen auf. Könnte eine pränatal eingebrachte, schützende Abdeckung der MMC-Läsion die Destruktion des Nervengewebes Betroffener reduzieren? Und wie könnte ein solcher Eingriff aussehen? (s. 1.5 Therapie)

### 1.7.2 Third Hit

Ein pathophysiologisches Verständnis der Traumatisierung von Nervengewebe ist für viele neurologische Krankheitsbilder von großer Relevanz. Um ein Beispiel zu nennen, ließe sich die Querschnittssymptomatik nach einer spinalen Verletzung herausgreifen. Auf Höhe der Läsion findet sich durch die äußere Einwirkung ein irreversibler Verlust neuraler Strukturen. Jedoch bleiben die Folgen nicht auf die Zone der direkten Schädigung beschränkt. Auch im angrenzenden Gewebe kommt es zum sukzessiven Untergang von zuvor intaktem Nervengewebe. Dieses andauernde Läsionswachstum beeinflusst den Langzeitverlauf nach einem spinalen Trauma wesentlich.<sup>84</sup> Ein wichtiges Element dieser Läsionskaskade sind Entzündungsprozesse, welche sowohl in der akuten, als auch in der subakuten und chronischen, posttraumatischen Phase von großer Bedeutung sind.<sup>81-83,85</sup> Perivaskuläre und intraparenchymatöse Infiltrate von Entzündungszellen entlang der gesamten spinalen Achse weisen im Spätverlauf nach einem initialen Trauma auf eine anhaltende Entzündungsreaktion hin. Zudem lässt sich eine reaktive Astrozytose mit morphologischen Zeichen einer erhöhten zellulären Aktivität finden.<sup>85,92</sup> Astrozytose beschreibt die Vermehrung von Astrozyten und entsteht unter anderem als Antwort des Nervensystems auf eine Schädigung.

Histologische Untersuchungen an neuralem Gewebe von MMC-Läsionen lassen pathologische Parallelen zum eben beschriebenen Pathomechanismus nach einem spinalen Trauma erkennen. George & Cummings beschrieben postnatal an humanem Gewebe spinale Atrophie und neuronalen Zellverlust mit apoptotischem Zelltod.<sup>80</sup> Neben nekrotischen Veränderungen ließen sich in der Plakode auch inflammatorische Komponenten der Gewebereaktion nachweisen.<sup>88,91,93</sup> Darüber hinaus zeigten sich fibrotische Veränderungen und Gliose in Form einer ausgeprägten Astrozytose.<sup>80,94</sup> Letztere beschränkte sich nicht auf die Plakode, sondern war auch in Rückenmarksabschnitten rostral der Fehlbildung nachweisbar. Die Astrozytose, als eine gliale Narbe, steht im Verdacht, für einen Teil des Tethering-Mechanismus von MMC-Patienten verantwortlich zu sein (s. 1.4 Das klinische Bild) und somit wesentlich deren Prognose zu beeinflussen.<sup>94</sup> Auch in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte Astrozytose in humanem Plakodengewebe regelhaft nachgewiesen werden.<sup>56,87</sup> Durch die Ausschüttung von Botenstoffen,

unter Ihnen Zytokine, können Astrozyten proinflammatorisch wirken. Eine Induktion ebendieser findet sich nach traumatischen Rückenmarksverletzungen ebenso wie im Plakodengewebe. Hier wurden die Zytokine (s. 1.8 Zytokine und Chemokine) Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sowie deren Rezeptoren auf erhöhtem Niveau nachgewiesen, was ebenfalls auf eine inflammatorische Komponente der Gewebereaktion hindeutet.<sup>86,87</sup> Für letzteres spricht auch eine verstärkte Anfärbung von Plakodengewebe durch den Makrophagen-Marker HAM56.<sup>80</sup> Wir vermuten daraus folgernd eine tertiäre Stufe der Schadenskaskade in Form einer Entzündungsreaktion (Third Hit), welche im Plakodengewebe aufgrund der sekundären Schädigung durch mechanische und chemische Einflüsse verursacht wird und im Weiteren zu einer anhaltenden Verschlechterung der neurologischen Funktion führt.

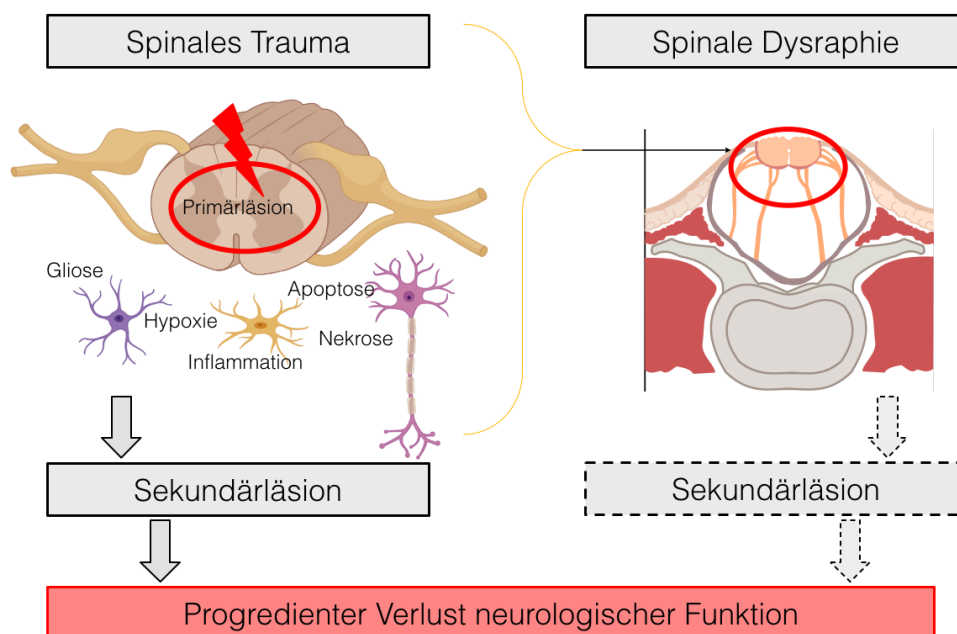


Abbildung 8: Pathophysiologische Parallele von spinalem Trauma und spinaler Dysraphie

## 1.8 Zytokine und Chemokine

Die nach traumatischer Schädigung von Rückenmark und Gehirn in Gang gesetzte Läsionskaskade führt sukzessive zum Untergang funktionsfähiger Zellen und folglich dem Verlust neurologischer Funktion.<sup>89,91</sup> Von großer Bedeutung in diesem destruktiven Prozess (s. oben) scheinen inflammatorische Mechanismen zu sein. Die verschiedenen, an der inflammatorischen

Gewebereaktion beteiligten Zellen kommunizieren hierbei über Botenstoffe, unter welchen Zytokine (Zyto=Zelle und kine=kleine Proteine) eine wesentliche Rolle spielen.<sup>85</sup> Zytokine wirken meist lokal über autokrine oder parakrine, z.T. aber auch über endokrine Mechanismen und haben eine Vielzahl von Funktionen. Zu ihnen zählen proinflammatorische, immunoregulatorische, chemotaktische und die Hämatopoese steuernde Effekte. Zudem sind sie wesentlich für die Reparatur von Gewebeschäden sowie als Wachstumsfaktoren für Zielzellen.

Zytokine werden von diversen Zelltypen gebildet und wirken pleiotrop, also auf viele verschiedene Zellen. Sie liegen nicht präformiert in der Zelle vor, sondern werden bei Bedarf de novo synthetisiert. Nach Bindung an spezifische Rezeptoren induzieren sie komplexe, intrazelluläre Signalkaskaden. Für einige Zytokine finden sich unterschiedliche Rezeptoren, die synergistische oder auch antagonistische Wirkungen vermitteln können. So löst die Bindung von TNF- $\alpha$  an TNF-R2 eine zytotoxische Reaktion aus, während die Bindung an TNF-R1 eine funktionelle Modulation der Zielzelle hervorruft. Da Zytokine über die Bildung von mRNA und Proteinsynthese funktionieren, wirken sie langsam über Stunden.<sup>95</sup>

Chemokine sind eine Familie von kleinen, aus 92-99 Aminosäuren bestehenden Proteinen. Sie wirken proinflammatorischen, indem sie an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden. Aufgrund ihrer chemischen Struktur werden sie in vier Familien unterteilt gemäß der Anzahl und Anordnung der ersten zwei Cysteine (C = Cystein, X = weitere Aminosäure) (s.Tabelle 1). Chemokine rekrutieren Entzündungszellen zum Entzündungsgeschehen. Die CC-Familie übt chemotaktische Wirkung auf monozytäre Zellen und T-Zellen aus, während die CXC-Familie Granulozyten und T-Zellen anlockt. Lymphotactin wirkt chemotaktisch auf Lymphozyten. Darüber hinaus können Chemokine eine strukturelle Änderung von Integrinen bewirken und so die Leukozytenmigration erleichtern.<sup>95</sup>

*Tabelle 1: Bezeichnung der vier Chemokinfamilien<sup>95</sup>*

Chemokinfamilien
Cystein-X-Cystein Chemokine (CXC-Familie)
C-C-Peptid(=Rantes-)Familie
C-Familie (Lymphactin)
CX3C-Chemokin (Fractalkin)

Die Zytokinrezeptoren werden in verschiedene Rezeptorfamilien unterteilt (s.Tabelle 2). Zu Ihnen gehören u.a. die Immunglobulin-Rezeptorfamilie, zu welchen z.B. IL-1RI, IL-1RII und M-CSF-R (M-CSF-R = Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor Rezeptor) zählen, und die TNF-



Rezeptorfamilie mit TNF-R1, TNF-R2, CD30, CD40 etc. (CD = engl. cluster of differentiation). Des Weiteren grundlegend für die vorliegende Arbeit ist die Chemokinrezeptorfamilie, welcher beispielsweise CCR1, CCR2, CXCR4, CX3CR1 angehören.<sup>95</sup>

*Tabelle 2: Auflistung der Zytokinrezeptoren<sup>95</sup>*

Bezeichnung der Zytokinrezeptoren	Beispiele von Liganden
Immunglobulin-Superfamilie	IL-1-RI, IL-1-RII, M-CSF-R
Rezeptoren mit Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin-(WSXSW)-Motiv	IL-2-R $\beta$ , IL-2-R $\gamma$ , IL-4-R, IL-5-R, IL-6-R, IL-7-R
Interferon-Rezeptorfamilie	INF- $\alpha/\beta$ -R, IFN- $\gamma$ -R
TNF-Rezeptorfamilie (death receptors)	TNF- $\alpha$ -RI, TNF- $\alpha$ -RII, CD95, CD27, CD30, CD40, CD137
Chemokin-Rezeptorfamilie	CCR1, CCR2, CXCR4, CX3CR1

### **1.8.1 Zytokine im zentralen Nervensystem – Mediatoren der posttraumatischen Inflammation**

Auch im ZNS erfüllen Zytokine vielfache Funktionen. Sie sind beteiligt an der Rekrutierung von Zellen des Immunsystems in Richtung des Entzündungsherdes. Auch spielen sie eine wichtige Rolle bei Stammzeldifferenzierung, De- und Remyelinisierung, Gliose und Apoptose. Sie sind ein bedeutender, regulatorischer Faktor der Entwicklungsprozesse des ZNS (s. 1.8.2 Zytokine und die Entwicklung des ZNS). In neurodegenerativen Prozessen nehmen sie als Mediator eine entscheidende Rolle ein. So wird beispielsweise nach traumatischen, kortikalen Läsionen die Bildung von IL1- $\beta$  in der Penumbra induziert.<sup>96</sup> In Untersuchungen der Schadenskaskade spinaler Läsionen finden sich die proinflammatorischen Zytokine IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der Frühphase im Läsionsrand.<sup>96</sup> Über das primäre Läsionsgebiet hinaus konnte eine Induktion von Chemokinen wie CCL2, CCL3, CXCL12 und deren Hauptrezeptoren nachgewiesen werden. Im Verlauf zeigten sich charakteristische, zeitliche und anatomische Expressionsmuster entlang der gesamten spinalen Achse. Auch findet sich nach traumatischer Schädigung des Rückenmarks über das spinale Niveau hinaus in verschiedenen Gehirnregionen eine Induktion von Zytokinen. Dies ist für kognitive und schmerzrelevante Prozesse von Bedeutung. So konnte man CCL2/CCR2 und CCL3/CCR1 nach spinalen, thorakalen Läsionen in hippocampalen Subregionen, in einigen Thalamuskernen und im Bereich des periaquäduktalen Graus auf signifikant erhöhtem Niveau nachweisen.<sup>56,82</sup> Des Weiteren fand sich eine klinische Korrelation mit relevanten Spätkomplikationen nach dem Trauma wie motorischem und schmerzassoziiertem Verhalten.<sup>56,81,83</sup>

In Analogie zur Schadenskaskade nach einer traumatischen, spinalen Läsion scheinen inflammatorische Zytokine und ihre Rezeptoren auch im Plakodengewebe in die zellulären Prozesse der sekundären Schädigung involviert zu sein. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  im humanem Plakodengewebe auf signifikant erhöhtem Niveau nachgewiesen werden.

### **1.8.2 Zytokine und die Entwicklung des ZNS**

Zytokine sind für die neurale Entwicklung und Funktion von entscheidender Bedeutung. Sie stellen einen Wachstumsstimulus Stammzellen dar und regulieren die Proliferation neuroepithelialer Zellen.<sup>97</sup> Im Neuroepithel findet zunächst die Bildung von Neuroblasten statt und nach deren Abschluss jene der Glioblasten.<sup>73</sup> Verschiedene Zytokine haben entscheidenden Einfluss auf diesen Wechsel von Neuro- zu Gliogenese. Chemokine haben durch ihre chemotaktische Wirkung Einfluss auf die Migration der neu generierten Neurone und Glia und modulieren die Richtung des Axonwachstums. Während der Entwicklung des ZNS werden Neurone und Glia im Übermaß produziert. Zytokine vermitteln daraufhin als neurotrophe Faktoren das Überleben dieser Zellen oder induzieren die Apoptose. Eine besondere Rolle nehmen hierbei Mikroglia ein. Als Gewebsmakrophagen des ZNS stellen sie ein Bindeglied zwischen Nerven- und Immunsystem dar. Durch die Sekretion von Zytokinen beeinflussen sie entscheidend die Entwicklung des Nervensystems.<sup>97</sup> Giulian et al. zeigten 1988, dass Mikroglia kurz vor der Geburt durch die Produktion von IL-1 die Astrogliogenese stimulieren.<sup>98</sup> Darüber hinaus sezernieren sie TNF- $\alpha$  als Regulator von Apoptose und Synaptogenese.<sup>97</sup>

Als Antwort auf eine maternale Infektion oder eine fetale Schädigung können Zytokine nachteilig die Entwicklung des Nervensystems beeinflussen. Es gibt epidemiologische Hinweise darauf, dass maternale Infektionen so das Risiko erhöhen für Schizophrenie, Autismus und zerebrale Lähmungen. Neuere Studien in Tiermodellen unterstützen diese Hypothese und lassen vermuten, dass eine Dysregulation bestimmter Zytokine Verhaltensdefizite der Nachkommen hervorrufen kann.<sup>97</sup>

### **1.8.3 IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  ist ein potentes, proinflammatorisches Zytokin und hat diverse Funktionen. Zunächst entdeckt wurde es als endogenes Pyrogen. Es induziert die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und B-Zellen und stimuliert so u.a. die Zytokin- und Antikörperproduktion.<sup>99</sup> In Synergie mit

IL-12 induziert es die Synthese von Interferon- $\gamma$  durch T1-Helfer-Zellen.<sup>100</sup> Über proinflammatorische Effekte hinaus spielt es eine Rolle in einer Vielzahl von zellulären Vorgängen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. So veranlasst es synergistisch mit TNF und IL-6 die Angiogenese durch die Induktion der VEGF-Produktion (VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor).<sup>101</sup> Im sich entwickelnden, zentralen Nervensystem wird es vermehrt exprimiert und ist dort verantwortlich für die neuronale Differenzierung. Es vermittelt neuronale Migration<sup>102</sup> und induziert u.a. das Wachstum von Neuriten<sup>103</sup>. Die Expression von IL-1 $\beta$  erreicht einen Höhepunkt während der Gliogenese und vermittelt die Differenzierung von Astrozyten in vitro. Außerdem induziert die Gabe eines IL-1 $\beta$  blockierenden Antikörpers die Proliferation von Progenitorzellen im dorsalen Rückenmark.<sup>97</sup>

Seine Wirkung entfaltet IL-1 $\beta$  über die Bindung an Interleukin-1-Rezeptor-1 (IL-1RI). Dieser transmembranäre Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Bindungsdomäne für Liganden und eine intrazelluläre Region, die sich Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) nennt. Die Bindung von IL-1 $\beta$  führt zur Rekrutierung einer zweiten Rezeptorkette, dem IL1 receptor accessory protein (IL1RAP). IL-1 $\beta$ , IL-1RI und IL1RAP bilden daraufhin einen Ligand-Rezeptorkomplex, der die weitere Signalkaskade initiiert.<sup>104</sup> Zytokine und ihre Rezeptoren finden zunehmend therapeutische Anwendung. So wird IL-1-RA, der Interleukin-1-Rezeptorantagonist, bei rheumatoider Arthritis, Gicht und periodischen Fiebersyndromen eingesetzt.<sup>95</sup>

#### **1.8.4 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  gilt als Hauptmediator in der Abwehr gramnegativer Bakterien und initiiert die intrazelluläre Abtötung von (Myko-)Bakterien. Die Freisetzung erfolgt hauptsächlich durch Monozyten/Makrophagen sowie durch T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen. Schon in geringen Mengen induziert es die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, aktiviert Neutrophile und stimuliert Monozyten/Makrophagen zur Produktion von Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF, Chemokine). In größeren Mengen tritt es in die Blutbahn über und wirkt so hormonähnlich. So induziert es als endogenes Pyrogen, wie IL-1, über Zellen des Hypothalamus Fieber. Es führt zur IL-1- und IL-6-Synthese in Monozyten und regt in Hepatozyten die Produktion von bestimmten Serumproteinen, z.B. Akute-Phase-Proteinen, an. Auch führt es zur Gerinnungshemmung und der Unterdrückung von Stammzellen im Knochenmark. Längerfristig ist es für die bei Tumorpatienten oder chronischen Infekten typische Kachexie mitverantwortlich.<sup>95</sup>

In der Entwicklung des ZNS exprimieren embryonale Mikroglia TNF- $\alpha$  als einen wichtigen Regulator der Synaptogenese und Apoptose. Letzterer Aspekt lässt sich darstellen in

Untersuchungen mit Rückenmarkszellkulturen. TNF- $\alpha$  ist hier assoziiert mit dem Zelltod von Motorneuronen. TNF- $\alpha$ -Knock-out-Mäuse zeigen darüber hinaus eine Reduktion des Zelltods von Motorneuronen, sympathischen und sensiblen Neuronen.<sup>97</sup>

TNF- $\alpha$  bindet an TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und löst somit eine intrazelluläre Signalkaskade aus. TNF-R1 führt so zur Induktion von Apoptose und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Bestimmte Proteinasen können TNF-Rezeptoren spalten, so dass die extrazelluläre Domäne bei Entzündungsprozessen gelöst im Serum nachweisbar ist. Für diese gelösten Domänen konnte, wie für monoklonale Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , bei rheumatoider Arthritis eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden. Etanercept stellt ein fusioniertes Protein dar aus der ligandenbindenden Domäne des TNF-R2 und dem Fc-Teil von IgG1. Es wird u.a. eingesetzt in der Therapie der rheumatoiden Arthritis, von Morbus Bechterew und der Psoriasis.<sup>95</sup>

### 1.8.5 CXCL12

Der C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) wird auch als Stroma cell-derived factor 1 (SDF-1) bezeichnet. CXCL12 fungiert als Ligand des Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), welcher sich als G-Protein-gekoppelter Rezeptor an der Zelloberfläche befindet. Das Ligand-Rezeptor-Paar hat große Bedeutung in der Überwachung des Immunsystems und der Rekrutierung inflammatorischer Zellen bei Infektionen und Verletzungen. Darüber hinaus spielt es eine entscheidende Rolle in der Embryogenese sowie in Tumorwachstum und Metastasierung. Mutationen im Gen für CXCL12 zeigen eine Assoziation mit einer Resistenz gegenüber Infektionen mit dem Human Immunodeficiency Virus (HIV) Typ 1. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Eintritt von HIV in die Zelle durch eine Interaktion von CXCR4 mit dem CD4-Rezeptor unterstützt wird.

Im ZNS sind CXCL12 und CXCR4 u.a. verantwortlich für neuronale und gliale Migration und Proliferation. Auch spielen sie eine Rolle im zielgerichteten Wachstum von Axonen. So richten Motorneurone, deren Axone durch das Vorderhorn in Richtung der Peripherie wachsen, dieses Wachstum an mesenchymalen, CXCL12 exprimierenden Zellen aus. In CXCR4 Knock-Out-Mäusen findet sich zum Zeitpunkt E14 eine reduzierte Zahl an Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen, welche sich vor allem in den dorsalen Anteilen des Rückenmarks zeigt.<sup>97</sup>

### 1.8.6 CX3CL1

In den späten 1990ern entdeckte man die damals noch unbekannte CX3C-Chemokine-Unterklasse. Das hierzu gehörende CX3CL1 (C-X3-C motif chemokine ligand 1), auch Fractalkin genannt, bindet an CX3CR1. Dieser Chemokinrezeptor hat eine hohe Selektivität und befindet sich auf der Zelloberfläche zytotoxischer Effektor-Lymphozyten wie beispielsweise natürlicher Killerzellen und zytotoxischer T-Zellen. Fractalkin ist einzigartig unter den Zytokinen, denn es existiert in transmembranärer und in löslicher Form. In der transmembranären Variante vermittelt es integrin-unabhängig die Chemotaxis, Adhäsion und Extravasation CX3CR1-positiver Zellen. Endothelzellen exprimieren es nach Aktivierung durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1. Auch Neuronen besitzen CX3CL1 auf ihrer Zelloberfläche und aktivieren so oder über die lösliche Form Mikroglia.<sup>97</sup> Lösliches Fractalkin entsteht durch Abspaltung der extrazellulären Domäne durch eine Metalloproteinase und hat chemotaktische Wirkung. Fractalkin ist beteiligt an vielen Erkrankungen und Komplikationen. Hierzu gehören rheumatoide Arthritis, HIV-Infektionen, Atherosklerose, etc.<sup>105</sup>

## 1.9 Zielsetzung

Nach heutigem Kenntnisstand sind bei der Entwicklung und Optimierung von Therapiekonzepten in der Versorgung von MMC-Patienten zwei grundlegende, pathophysiologische Aspekte zu berücksichtigen. Da ist zunächst der primäre, strukturelle Defekt im Sinne einer fehlerhaften Neurulation. Des Weiteren zu bedenken sind durch sekundäre Traumata angestoßene Läsionskaskaden, welche zu einer sukzessiven Schädigung von Nervengewebe und dem Verlust neurologischer Funktion führen. Ähnlichkeiten zur Pathophysiologie nach traumatischen Rückenmarksverletzungen (s. 1.5.1) sowie Untersuchungen an Plakodengewebe legen eine inflammatorische Komponente dieser Läsionskaskaden nahe. Auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe fanden sich in humanem Plakodengewebe Indizien für diese Vermutung. Neben histologischen Korrelaten der Gewebeschädigung fanden sich inflammatorische Botenstoffe, die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , auf signifikant erhöhtem Niveau.<sup>56,87</sup>

Bisher sind die zugrundeliegenden, zellulären Schädigungsmechanismen nicht geklärt. Insbesondere der Zeitpunkt der Induktion dieser Mechanismen sowie deren potenziell pränataler Verlauf sind bislang wenig verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist folglich, einen Einblick zu gewinnen in die pränatale Dynamik dieser Mechanismen. Dies erfolgte durch Untersuchungen zu

verschiedenen Zeitpunkten im späten, fetalen Verlauf. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit die Zeitpunkte E16, E18 und E22 ausgewählt.

Für die Realisation dessen gilt es

1. durch ein Tiermodell bereitgestelltes Plakodengewebe von Tieren mit MMC molekularbiologisch auf den mRNA-Gehalt proinflammatorischer Zytokine und derer Rezeptoren zu untersuchen.
2. Plakodengewebe durch Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und durch immunhistochemische Färbungen mit strukturellen Antikörpern zu charakterisieren.
3. mithilfe immunhistochemischer Färbungen die Expressionsmuster proinflammatorischer Zytokine im Plakodengewebe im pränatalen Verlauf zu analysieren.
4. mithilfe von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen zelluläre Expressionsprofile zu erstellen und diejenigen Zelltypen zu identifizieren, welche ggf. die untersuchten Zytokine exprimieren.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sollen einem tieferen Verständnis der pränatalen Pathophysiologie spinaler Neuralrohrdefekte dienen. Dies soll Erkenntnisse liefern hinsichtlich des langfristigen Krankheitsverlaufs und die Basis schaffen für die Entwicklung gezielter Therapieansätze.

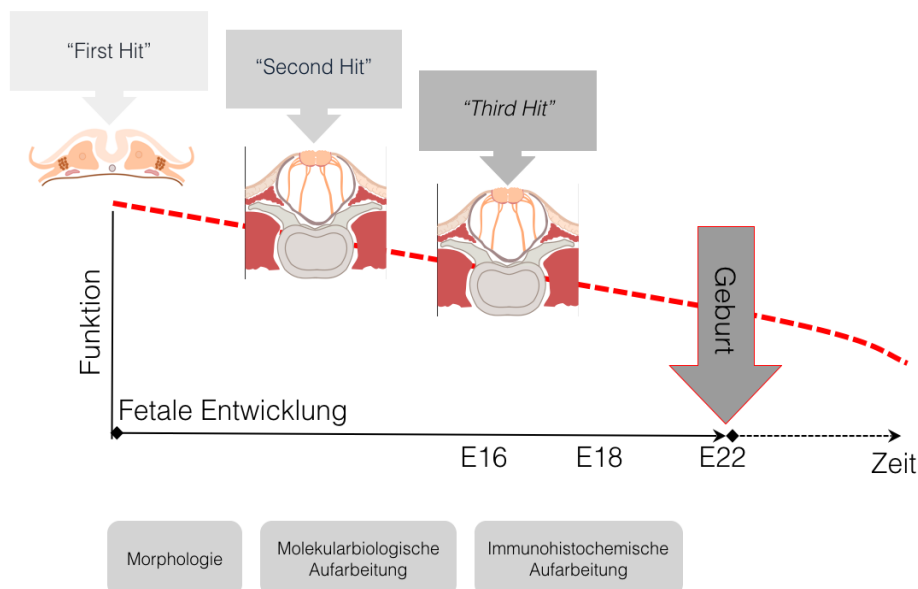


Abbildung 9: Schematische Darstellung der "Third-Hit-Hypothese" im pränatalen Verlauf

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiermaterial

Es erfolgte die Etablierung eines Rattenmyelomeningozelenmodells durch die Gabe von All-Trans-Retinsäure am Beispiel von Danzer et al.<sup>50</sup> Sämtliche Versuche erfolgten nach Genehmigung des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins (V242-22800/2016 (39-3/16)). In Tabelle 3 findet sich die Anzahl der hierbei für die unterschiedlichen, analytischen Verfahren genutzten Tiere.

*Tabelle 3: Anzahl der Versuchs- und Kontrolltiere der unterschiedlichen Zeitpunkte für molekularbiologische und histologische Untersuchungen: Anzahl verwendeter Tiere/Gesamtanzahl konservierter Tiere*

	E16 Molekular- biologie	E16 Histologie	E18 Molekular- biologie	E18 Histologie	E22 Molekular- biologie	E22 Histologie
MMC	9/9	9/9	8/8	5/6	8/8	5/9
Kontrolle	6/8	9/11	6/20	7/20	6/6	5/7

#### 2.1.2 Chemikalien

*Tabelle 4: Verwendete Chemikalien*

Reagenzien	Bezugsquelle
ABC-Komplex: Vectastain-Elite-ABC-Kit	<i>Vector, Burlingame, CA, USA</i>
Aceton	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	
All-trans Retinoic Acid (ATRA)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten</i>
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat reinst	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Ameisensäure	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
BSA (Bovine Serum Albumin)	<i>Paa Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Chloroform/Trichlormethan	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ CHCl <sub>3</sub>	
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Diaminobenzidin	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	

EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot H_2O$	
Einbettungsmedium Immomount	<i>Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland</i>
Einbettungsmedium Roti®-Mount	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Eosin	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Ethanol (vergällt)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ $C_2H_6O$	
Formaldehydlösung 4,5%	<i>BÜFA Chemikalien GmbH &amp; Co. KG. Hude, Deutschland</i>
Glycin	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ $C_2H_5NO_2$	
Hämatoxylin	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Kaliumchlorid	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ KCl	
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $KH_2PO_4$	
Kaliumjodat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Ketamin	<i>Ventoquinol GmbH, Ismaning, Deutschland</i>
Mayers Hämalan	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Methanol	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ $CH_3OH$	
Natriumchlorid	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ NaCl	
Olivenöl	<i>Penny-Markt GmbH Deutschland</i>
Paraffin	<i>Melite Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland</i>
Paraformaldehyd (4 %)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Random Hexamer Primer (100ng/µl)	<i>Amersham Biosciences, Teil von GE, Glattbrugg, Schweiz</i>
Roticlear	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Salzsäure (25%)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Sudanschwarz (1g/100ml, 1% in 70% Ethanol)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $C_{29}H_{24}N_6$	



TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
→ $C_4H_{11}NO_3$	
Triton X-100	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
TWEEN®20	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $C_{58}H_{144}O_{28}$	
Wasserstoffperoxid	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $H_2O_2$	
Xylazin	<i>Bayer AG, Leverkusen, Deutschland</i>
Xylol	<i>Th. Geyer GmbH &amp; Co. KG, Deutschland</i>
Normales Ziegenserum	<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>
Normales Pferdeserum	<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>
Normales Hasenserum	<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>
Zitronensäure	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $C_6H_8O_7 \times H_2O$	
Natriumcitrat	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
→ $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$	

### 2.1.3. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Aufgrund der durch den Hersteller geschützten Zusammensetzungen der Reagenziensysteme können diese im Folgenden nicht angegeben werden.

*Tabelle 5: Gebrauchsfertige Reagenzien*

Reagenz	Bezugsquelle
DNase (Konzentration: 1U/μl) DNase-Puffer (10x), DNase Stop	<i>Promega, Madison, WI, USA</i>
dNTP Mix 10mM, 1ml	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase, Reaktionspuffer (5x), (Konzentration: 200 U/μl)	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
TaqMan®-Universal PCR Master Mix	<i>Life Technologies, Scotland</i>
TRIzol®-Reagent	<i>Life Technologies, Carlsbad, USA</i>

**Target Assay Mix:**

Um in der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan-Methode spezifische (copy-)DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, wurden sogenannte Target Assays der Firma AB (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) verwendet. Sie enthalten spezifische Sonden und Primer. Deren Sequenzen, welche 15-30 Basen beinhalten, binden komplementär an die gewünschte Zielsequenz der zu vervielfachenden DNA. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Primer verwendet: IL-1 $\beta$  (Rn00580432\_m1), IL-1RI (Rn00565482\_m1), TNF (Rn00562055\_m1), TNF-R1 (Rn01492348\_m1), CXCL12 (Rn00573260\_m1); CXCR4 (Rn00573522\_s1), CX3CL1 (Rn00593186\_m1), CX3CR1 (Rn00591798\_m1) und GAPDH (Rn99999916\_s1).

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen sowie ihre jeweilige Zusammensetzung

Citratpuffer (pH 6,0)	9ml Stammlösung A 0,1M Zitronensäure (=21,01g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ in 1000ml Aqua dest.) 41ml Stammlösung B 0,1M Natriumcitrat (=29,41g $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ in 1000ml Aqua dest.) gelöst in 450ml Aqua dest.
PBS (pH 7,4) (Phosphore buffered saline)	pH 7,4: 137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM $Na_2HPO_4$ (Dinatriumhydrogenphosphat) $\times 7H_2O$ 1,4mM $KH_2PO_4$ (Kaliumdihydrogenphosphat) gelöst in Aqua dest.
TBS (Tris-buffered saline)	pH 7,5 für 5l: 500ml Stammlösung (6,1g TRIS ad 1000ml ddH <sub>2</sub> O (pH 7,6)) 38,25g NaCl ad 5000ml ddH <sub>2</sub> O
BSA (bovine serumalbumine) / 0,2% Glycin in TBS	200ml TBS 0,2g BSA 0,4g Glycin

## 2.1.5 Antikörper

Die Schnitte sämtlicher Tiere wurden zunächst mit strukturellen Primärantikörpern (NeuN, NF200, Nestin, Vimentin, Iba1, GFAP) gefärbt, deren Spezifität im Folgenden erläutert wird. Daran schlossen sich Färbungen an, welche die Darstellung der Expression der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie derer Rezeptoren (s.1.8 Zytokine und Chemokine) zum Ziel hatten.

NeuN, stehend für neuronal nuclei, ist ein DNA-bindendes Protein, welches neuronenspezifisch im Zellkern aufzufinden ist. Es wird exprimiert in den meisten neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems von Wirbeltieren. Die intrazelluläre Verteilung des Proteins beschränkt sich auf Nucleus und Perikarya von fetalen und adulten Neuronen. Nur in wenigen, speziellen Neurontypen findet sich keine Immunoreaktivität für NeuN. Zu diesen zählen u.a. Purkinje-Zellen, Neurone des Nucleus olivaris inferior, des Nucleus dentatus und sympathische Ganglionzellen.<sup>106,107</sup>

Immunhistochemisch nachweisbar wird NeuN in der Entwicklung ab dem Zeitpunkt des Rückzugs der Neurone aus dem Zellzyklus bzw. der Initiierung ihrer terminalen Differenzierung.<sup>106</sup> NeuN findet sich außerdem in embryonalen Tumorzellen.<sup>106</sup>

NF200 ist eines der Proteine, aus welchen Neurofilamente aufgebaut sind. Neurofilamente zählen zu den Intermediärfilamenten und sind ein grundlegender Teil des Zytoskeletts des axonalen Zytoplasmas.<sup>108</sup> Dort sind sie beteiligt an der mechanischen Integration von Organellen.<sup>109</sup> Sie sind 10nm im Durchmesser und werden gebildet durch die Verflechtung von Protofilamenten. Ihre Unterteilung erfolgt nach dem Molekulargewicht in drei Gruppen (light = NF-L, medium = NF-M, heavy = NF-H). Neurofilament 200 kD, welches für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, zählt zu den NF-H. Phäochromozytome<sup>110</sup> und Neuroblastome<sup>111</sup> zeigen eine positive Immunoreaktivität für Neurofilamente.<sup>56</sup>

Nestin ist ein großes Intermediärfilament, welches während der Entwicklung in vielen Zelltypen exprimiert wird. Es zeigt sich während der frühen Phasen der Entwicklung in mitotisch aktiven Zellen im zentralen und peripheren Nervensystem, in myogenen sowie in anderen Geweben.<sup>112</sup> Während der Neuro- und Gliogenese wird Nestin ersetzt durch Gewebe-spezifische Intermediärfilamente, wie Glial fibrillary acidic Protein (GFAP).<sup>113</sup> Die Nestinexpression wird in adultem Gewebe während pathologischer Situation reinduziert, wie beispielsweise die Bildung einer glialen Narbe nach traumatischen Läsionen des ZNS<sup>114</sup> oder der Regeneration von Muskelgewebe<sup>115</sup>.

Vimentin zählt wie Nestin zu den Intermediärfilamenten. Man findet es in diversen Zelltypen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten, Endothelzellen, etc.. Darüber hinaus wird es in anderen Zelltypen exprimiert, wie beispielsweise Epithelzellen, Astrozyten und Ependymzellen.<sup>116</sup> Auch spielt es eine Rolle in entdifferenzierten Karzinomen, wo es meist koexprimiert mit Zytokeratinen vorliegt. Des Weiteren wurde in Glioblastomen eine Koexpression von Vimentin und GFAP beschrieben.<sup>117–119</sup>

GFAP ist ein Protein, welches den Hauptbestandteil der zytoplasmatischen Intermediärfilamente von Gliazellen, insbesondere von Astrozyten, ausmacht. Es findet somit Anwendung als Marker für Astrozyten.<sup>120</sup> Außerdem wird es in der Hirntumordiagnostik als Biomarker zur Identifizierung glialer Tumore wie dem Glioblastom oder dem Astrozytom verwendet.<sup>121,122</sup>

Iba-1 fungiert als Marker für aktivierte Mikroglia. Das ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) ist ein für Mikroglia und Makrophagen spezifisches, Calcium bindendes Protein<sup>123</sup>. Es hat des Weiteren eine Actin-bündelnde Aktivität<sup>124</sup> und ist es an der Phagozytose sowie durch die Ausbildung von Lamellipodien an der Zellmigration beteiligt.

Tabelle 7: Für die Immunhistochemie verwendete, primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Immunogen/ Verdünnung	Bezugsquelle
NeuN	Neuronen (Neuronal Nuclei)	Mouse IgG, monoclonal, 1:500	Millipore/Chemicon, Schwalbach, Germany Cat.#MAB377
NF200	Neurofilament (Zytoskelett des axonalen Zytoplasma)	Mouse IgG, monoclonal, 1:200	Millipore/Chemicon, Schwalbach, Germany Cat.#MAB5266
Nestin	Neuroepithel und andere embryonale Gewebe (Intermediärfilament)	Mouse IgG, monoclonal, 1:200	Millipore/Chemicon, Schwalbach, Germany Cat.#MAB353
Vimentin	Mesenchymale Zellen (Intermediärfilament)	Mouse IgG, monoclonal, 1:300	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland Cat.#Sc-6260
Iba-1	Aktivierte Mikroglia	Goat IgG, polyclonal, 1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien, Cat.#Ab5076
GFAP	Astrozyten (Glial Fibrillary Acidic Protein)	Mouse IgG, monoclonal, 1:1000	Millipore/Chemicon, Schwalbach, Germany Cat.#MAB3402
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta	Rabbit IgG polyclonal, 1:1000	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland Cat.#Sc-7884
IL-1-RI	Interleukin-1-Rezeptor-I	Rabbit IgG, polyclonal, 1:500	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland Cat.#Sc-689
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	Goat IgG, polyclonal, 1:1000	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland Cat.#Sc-1351
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor- Rezeptor-1	Goat IgG, polyclonal, 1:1000	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland Cat.#Sc-1069

*Tabelle 8: Für die Immunhistochemie verwendete, sekundäre Antikörper*

Sekundärer Antikörper	Verdünnung/ Farbstoff	Bezugsquelle
Antiserum des Pferdes gegen biotinyliertes Maus-IgG	Verdünnung 1:200	Vector, Burlingame, CA, USA
Antiserum des Hasen gegen biotinyliertes Ziegen-IgG	Verdünnung 1:200	Vector, Burlingame, CA, USA
Antiserum der Ziege gegen biotinyliertes Hasen-IgG	Verdünnung 1:200	Vector, Burlingame, CA, USA
Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG	Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Antiserum des Affen gegen Ziegen-IgG	Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Antiserum des Affen gegen Maus-IgG	Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG	Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 9: Geräte und Verbrauchsmaterial inklusive ihrer Bezugsquellen*

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Autoklav (Lösungen)	Goessner, Hamburg
Autoklav (S2 Abfall)	Syntec, Hamburg
Canon EOS 6D	Canon Deutschland GmbH, Nürnberg
Digitalkamera, AxioCam MRm	Carl Zeiss GmbH, Jena
Einmalpipette (10 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Eismaschine AF-10	Scotsman, Glasgow, Schottland
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss GmbH, Jena
Fluoreszenzmikroskop Observer.Z + Apotome.2, Power Supply 232	Carl Zeiss GmbH, Jena
Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln
Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gefrierschrank	Kryotec, Hamburg

Kühlschrank	<i>Liebherr, Deutschland</i>
Kühlschrank	<i>National Lab GmbH, Mölln</i>
Kühlzentrifuge 5417R	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Magnetrührer MR 3001	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Mastercycler	<i>Heidolph, Schwachbach</i>
Messzylinder	<i>Duran/Schott-Glas, Mainz</i>
Mikroskop Axiovert 40 CFL	<i>Carl Zeiss GmbH, Jena</i>
Nanodrop 2000c Spectrophotometer®	<i>Thermo Scientific, Wilmington, USA</i>
Optische Folie	<i>Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
PCR-Detektionssystem, iQ5™ Multi Color real-time PCR Detection System + Laptop und iCycler Optical System Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
pH- Meter: WTW, pH 526	<i>WTW, Weilheim</i>
Pipetten	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt AG, Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	<i>Sarstedt AG, Nümbrecht</i>
Thermomixer compact	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Vortexer, REAX top	<i>Heidolph, Schwachbach</i>
96-Well-Platten	<i>Sarstedt AG, Nümbrecht</i>
Waage CP224S-OCE	<i>KERN &amp; Sohn GmbH, Balingen</i>
Waage EW600-2M	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Zentrifuge, 5417 RCanon EOS 6D	<i>Hereaus GmbH, Osterode</i>
Zentrifuge, Biofuge pico	<i>Sartorius, Göttingen</i>

---

## 2.2 Methoden

Nach Gewinnung des Tiermaterials durch das von Danzer et al.<sup>50</sup> entwickelte Rattenmodell erfolgte die Aufteilung eben diesen Materials für histologische und für molekularbiologische Untersuchungen.

In Vorstudien erfolgte zunächst eine anatomische Charakterisierung des Plakodengewebes durch die Analyse von HE-Färbungen sowie DAB-Färbungen mit Gewebemarkern.

Die anschließende Untersuchung der an der Schadenskaskade beteiligten Botenstoffe erfolgte auf molekularbiologische und immunhistochemische Art und Weise. Mittels PCR wurden die Gewebeproben auf deren Gehalt an mRNA verschiedener Zytokine und derer Rezeptoren (IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$ , TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX3CL1, CX3CR1 ) untersucht. Zur histologischen Aufarbeitung wurden für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$  und TNF-R1 immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Mit DAB-Färbungen mittels der ABC-Methode wurde ein erste Überblick über die Expressionsmuster und -verteilungen innerhalb des Kontrollgewebes und der Fehlbildung gewonnen. Mithilfe der daraufhin durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen konnten diese Expressionsmuster weiter aufgeschlüsselt und Koexpression der Zytokine mit strukturellen Markern dargestellt werden.

### 2.2.1 Das Tiermodell

Wie zuvor beschrieben (s. 1.2.1 All-Trans-Retinsäure als Auslöser von Myelomeningozelen) stellt Retinsäure einen grundlegenden Regulator der frühen, embryonalen Entwicklung dar. Als Transkriptionsfaktor vermittelt es Zellwachstum und -differenzierung bei Chordatieren und ist insbesondere für die Neurogenese und Neurulation von zentraler Bedeutung. Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss können teratogen sein und zu Fehlbildungen in Form von Strukturierungsfehlern entlang der anteroposterioren Achse führen.<sup>48</sup> Auf Grundlage dieser Pathophysiologie entwickelten Danzer et al ein Rattenmodell zur Untersuchung von MMCs, welches für die vorliegende Arbeit genutzt wurde.<sup>50,125</sup>

#### 2.2.1.1 Muttertiere

Weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 205 bis 398 g zum Zeitpunkt der Verpaarung (Charles River Laboratories, Germany) wurden gezielt über 24 Stunden einzeln mit Sprague Dawley Böcken verpaart. Die Muttertiere wurden anschließend in Gruppen von 3-4 in einem Standard-Hell-Dunkel-Zyklus (12:12 mit Beleuchtung von 6:00 – 18:00; 21°C) mit freiem



Zugang zu Wasser und einer Standard-Diät gehalten. Am zehnten Tag der Trächtigkeit (E10) erhielten die Ratten 60mg All-trans retinoic acid (ATRA) pro kg Körpergewicht per Gavage intragastral verabreicht. Die für jedes Tier entsprechende Menge wurde hierzu bei Raumtemperatur in Olivenöl in einer Konzentration von 10mg ATRA pro 1 ml Olivenöl gelöst. Die ATRA-Lösung war innerhalb einer Stunde aufzubrauchen. Kontrolltiere erhielten 2ml reinen Olivenöls. Insgesamt wurden 20 schwangere Ratten in die Studie einbezogen. 15 Ratten erhielten ATRA in Olivenöl und 5 reines Olivenöl.

#### **2.2.1.2 Jungtiere**

Zur Vorbereitung der weiteren Untersuchungsmethoden galt es, die Jungtiere per Sectio zu gewinnen. Zur Beurteilung des embryologischen Verlaufs der Schadenskaskade wurden für die Sectio die Tage E16, E18 und E22 ausgewählt. Die Muttertiere wurden mit Ketamin ( $C_{13}H_{16}ClNO$ ) 1µl/g KG und Xylazin ( $C_{12}H_{16}N_2S$ ) 2% 0,8µl/g KG anästhesiert und anschließend durch atlanto-axiale Dislokation getötet. Der Uterus wurde präpariert und die Neugeborenen daraus entnommen. Anschließend wurden die Jungtiere gewogen und vermessen. Es folgte die makroskopische Untersuchung auf das Vorliegen einer spinalen Fehlbildung. Bei Vorliegen einer Fehlbildung wurde das Ausmaß dieser bestimmt sowie das Tier auf weitere assoziierte Fehlbildungen untersucht. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Canon EOS 6D.

Da sich für molekularbiologische und für histologische Untersuchungen das weitere Vorgehen unterschied, wurden an diesem Punkt sowohl Versuchs- als auch Kontrolltiere der unterschiedlichen Zeitpunkte (E16, E18, E22) in zwei Gruppen separiert (s. Tabelle 3).

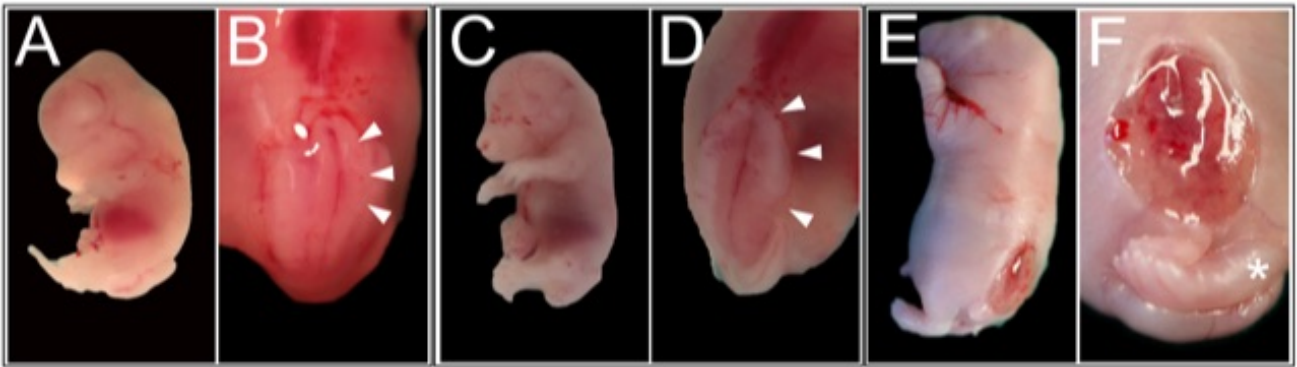


Abbildung 10: Fotografische Dokumentation von Tieren mit Myelomeningozele zu den Zeitpunkten E16 (A, B), E18 (C, D), E22 (E, F). Pfeile deuten auf Fehlbildung, Stern deutet auf Rattenschwanz

### ***Aufarbeitung der Tiere für die molekularbiologische Analyse***

Die Maßgabe für die geplanten molekularbiologischen Untersuchungen war ein möglichst RNA-erhaltendes Vorgehen. Dies beinhaltete ein direktes Aufarbeiten der Tiere mit raschem, anschließendem Einfrieren. Hierzu wurden die Tiere zunächst per Durchtrennung des Halses getötet. Nach Spülen in PBS wurden die Tiere mit Kanülen auf einer Unterlage fixiert. Es folgte die Präparation des Rückenmarks und bei Vorhandensein der Fehlbildung. Bei den Kontrolltieren wurde das Rückenmark in Gänze verwendet. Bei Tieren mit MMC erfolgte durch einen transversalen Schnitt die Separation der Fehlbildung vom übrigen Rückenmark. Die Plakode und das übrige Rückenmark der MMC-Tiere wurden im Folgenden als separate Proben behandelt. Das Material wurde in Eppis überführt, für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff gekühlt und daraufhin bei -80°C gelagert.

### ***Aufarbeitung der Tiere für die histologische Analyse***

Für die histologischen Untersuchungen galt es die Tiere durch das Fixieren in Formaldehydlösung (4,5%) mit darauffolgender Einbettung in Paraffin zu konservieren. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Kanülen auf einer Unterlage fixiert und nach Präparation des Herzens durch Eröffnung der Ventrikel getötet. Nach Spülen in PBS wurden die Tiere durch 24-stündiges Einlegen in Formalin fixiert. Daraufhin wurden die Gliedmaßen und die in Thorax und Abdomen befindlichen Organe entfernt. Das nun noch stehende Gerüst wurde durch transversale Schnitte mit einem Skalpell zerteilt. Bei den Versuchstieren wurde Schnittführung direkt kranial der Fehlbildung gewählt, bei den Kontrolltieren erfolgte dies an einer korrespondierenden Stelle im lumbosakralen Bereich. Für E18- und E22-Tiere wurde zusätzlich ein transversaler Schnitte im thorakalen und zervikalen Bereich durchgeführt, so dass für diese beiden Zeitpunkte Analysen von Gradienten

entlang der spinalen Achse möglich wären. Für E16-Tiere war dies aufgrund der Größe der Präparate nicht durchführbar. Für zukünftige Untersuchungen wurde des Weiteren der Kopf vorbereitet zur Einbettung. Zur Vorbereitung für das Schneiden der Präparate wurden diese für 10 Minuten in eine entkalkende Lösung (s. unten) gegeben. In diesem Schritt kommt es u.a. zur Auflösung von knöchernem Gewebe, welches den Schneidevorgang erheblich stören würde. Zur Entwässerung erfolgte ein abermaliges Einlegen in Formalin 4% für eine Stunde. Es folgte eine aufsteigende Ethanolreihe mit 70% für 60 Minuten, 96% für 50 Minuten und darauffolgend 60 Minuten, 100% für 50 Minuten, 60 Minuten und wiederum für 60 Minuten. Die Tiere wurden nun zweimal für je 50 Minuten und einmal für 60 Minuten in Xylol überführt. Es schlossen sich Paraffin-Bäder für einmal 60 Minuten und dreimal 50 Minuten an.

*Tabelle 10: Entkalkende Lösung*

---

Entkalkende	715ml Aqua dest.
Lösung	110ml 25%ige Salzsäure (HCl)
	75ml Ameisensäure

---

### ***Einbettung in Paraffin***

Nach vollendeter Fixierung und Präparation erfolgte die Einbettung in Paraffin. Hierzu wurden die vorbereiteten Präparate jeweils mit der kranialen Schnittfläche nach unten in einem Metallkörbchen platziert. Eine präzise Ausrichtung war hierbei für eine exakt transversale Schnittführung im nachfolgenden Schneidevorgang entscheidend. Nun wurde das Metallkörbchen in warmes, flüssiges Paraffinwachs gestellt. Dieses verfestigte sich beim anschließenden Abkühlen auf einer Kälteplatte.

### ***Schnittvorgang***

Es wurde für die Schnitte eine Schichtdicke von 1µm ausgewählt. Nach kurzem Schwimmen in einem kühlen Wasserbad zur Glättung der Schnitte wurden diese auf Objektträgern platziert. Hier trockneten diese für 10-30 Minuten.

## **2.2.2 Molekularbiologische Analyse**

Per Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgte die Quantifizierung der Genexpression verschiedener Marker im untersuchten Gewebe. Hierzu galt es zunächst, die Gesamt-RNA zu isolieren und sie in einem weiteren Schritt in cDNA umzuschreiben. Aufgrund der Anfälligkeit von

RNA für den Abbau durch RNase erfolgten die folgenden Arbeitsschritte mit RNase-freiem Material.

#### **2.2.2.1 RNA-Isolation mittels TRIzol®**

Die RNA-Isolation erfolgte mit der TRIzol®-Methode, ein für Gewebeproben standardmäßig angewandtes Verfahren. Auf eine quantitative Denaturierung von RNasen durch Guanidiniumisothiocyanat (GITC) folgt eine saure Phenolextraktion mit anschließender Isopropanfällung.<sup>126,127</sup>

Nach Auftauen des kryokonservierten Materials wurde den Proben jeweils 800µl TRIzol®-Reagenz hinzugegeben, ein Lösung aus Chlorophorm, Phenol und Guanidiniumisothiocyanat. Das Gemisch wurde mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, nachdem dieser zuvor in NaOH gereinigt worden war. Zwischen den einzelnen Proben erfolgte jeweils eine Reinigung des Ultra-Turrax mit Aqua dest., Ethanol und nochmalig Aqua dest.. Nach Überführen der homogenisierten Proben in ein Cup bildeten sich durch 10-minütiges Zentrifugieren der Proben mit 12000 rcf bei 4°C zwei Phasen. Der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung in ein neues Cup überführt und das Pellet bestehend aus Zelldetritus verworfen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200µl Chloroform zugegeben und erneut für 2-3 Minuten inkubiert. In der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation mit 12000 rcf bei 4°C bildeten sich drei Phasen: Eine untere Chlorophorm-Phase mit Zelldetritus und Proteinen, eine mittlere, DNA-beinhaltende Interphase und eine wässrige, obere Phase mit der relevanten RNA. Letztere galt es zu überführen, mit 500µl Isopropanol zu versetzen und 40 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach dieser Fällungsphase und einer 5-minütigen Zentrifugation mit 12000 rcf bei 4°C lag die RNA als gelartiges Pellet vor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch 75%iges Ethanol und Vortexen gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren mit 7500 rcf bei 4°C für 5 Minuten, konnte der wässrige Überstand entfernt werden. Das Pellet wurde nun einer ca. einstündigen Trocknungsphase unterzogen. Hierauf folgte das Lösen in 20-30µl (je nach Menge des Materials) RNase-freiem Aqua bidest. durch mehrmaliges Durchmischen und eine 10-minütige Inkubation bei 58°C. Die RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie und Qualitätsbeurteilung**

Vor einer weiteren Verarbeitung galt es, die RNA-Konzentrationen der Proben zu vereinheitlichen. Hierzu wurden diese zunächst photometrisch mittels Nanodrop 2000c Spectrophotometer® (Thermo Scientific, Wilmington, USA) quantifiziert und im Weiteren mittels Aqua dest. adjustiert.

Ein Photometer bestimmt die Konzentration eines gelösten Stoffes durch die Messung der Lichtabsorption. RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 260nm, weswegen aus der optischen Dichte (OD) bei 260nm auf die RNA-Konzentration der Lösung rückschließen lässt. Auch kann mithilfe des Photometers die Reinheit der Proben beurteilt und eine eventuelle Kontamination erkannt werden. Das Absorptionsmaximum von verunreinigenden Proteinen liegt bei 280nm. Setzt man das Ausmaß der Lichtabschwächung, auch Extinktion genannt, bei den Absorptionsmaxima von RNA und Proteinen ins Verhältnis, gibt dieser Quotient Aufschluss über die Art der Verunreinigung:

$$[1] \quad \text{Extinktionswert}_{260\text{nm}} / \text{Extinktionswert}_{280\text{nm}}$$

Bei Vorliegen einer reinen Probe liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2. Ein Wert unter 1,8 spricht für die Kontamination mit Proteinen, einer über 2 für eine Kontamination mit Phenol.

Zu Beginn wurde das Spektrometer durch Aufgeben von 2µl Aqua dest. geeicht. Nach dem Auftauen der RNA-Proben wurde deren Konzentration durch Aufgeben von 2µl gemessen. Zwischen den Messungen der einzelnen Proben wurde zur Reinigung des Photometers stets mindestens eine Messung mit Aqua dest. durchgeführt. Die RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben konnten nun auf das angestrebte Verhältnis von 2µg RNA ad 7µl Aqua dest. vereinheitlicht werden. Das hierzu nötige Volumen der Probe wurde durch folgende Formel berechnet:

$$[2] \quad \text{Volumen(RNA)} [\mu\text{l}] = 2\mu\text{g} / \text{Konzentration(RNA)} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]$$

#### **2.2.2.3 DNA-Verdau & Umschreibung in cDNA**

Im nächsten Schritt wurde aus der isolierten RNA durch reverse Transkription cDNA synthetisiert. Hierfür wurde die RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase genutzt. In diesem Zuge muss ebenfalls die Lösung von darin befindlicher genomischer DNA gereinigt werden, da diese in der folgenden PCR das Messergebnis beeinflussen würde. Sowohl die Reinigung von genomischer DNA als auch die darauffolgende Umschreibung der RNA in cDNA fanden im Gradienten-Cycler statt und werden deswegen im Folgenden gemeinsam abgehandelt:

Zu 7µl der RNA-Proben wurde ein zuvor hergestellter Mix aus je 1µl DNase-Puffer (10x) und 1µl DNase (1u/µl) gegeben. Die hierdurch eingeleitete Verdau-Phase befreite in einer 15-minütigen

Inkubation bei 37°C die Proben von DNA. Durch Zufügen von 1µl EDTA wurde diese gestoppt, woran sich eine Inkubation für 10 Minuten bei 65°C anschloss.

Nun wurde den Proben 2µl *Random Hexamer-Primer*-Gemisch im Verdünnungsverhältnis 1:10 zugegeben. Diese kurzen Oligonukleotidsequenzen mit zufälliger Basenfolge können sich unspezifisch über die gesamte Länge an die RNA lagern. Im folgenden Transkriptionsprozess dienten sie als Startpunkte. Die anschließende Inkubation bei 70°C für 5 Minuten hatte den Zweck, die Sekundärstrukturen der RNA zu schmelzen. Die Proben wurden darauffolgend auf Eis gekühlt, wodurch sich die zuvor zugegebenen Primer an die RNA lagerten. Nach kurzem Zentrifugieren bei 10.000 rcf wurde 8µl Mastermix zugegeben, bestehend aus folgenden Komponenten:

*Tabelle 11: Mastermix für die reverse Transkription*

---

Mastermix	4µl Reaktionspuffer
	2µl dNTP-Mix (10mM)
	1µl ddH <sub>2</sub> O
	1µl reverse Transkriptase

---

Während der ersten Phase, dem Annealing lagerten sich die Oligonukleotide bei 25°C dem RNA-Strang an. Die reverse Transkriptase polymerisierte in der folgenden, 60-minütigen Elongation bei 42°C die cDNA. Durch eine 10-minütige Denaturierung bei 70°C wurde das Enzym inaktiviert und die Reaktion beendet. Nach erneutem Abkühlen auf Eis wurden durch Zugabe von 20µl Aqua bidest. Verdünnungen von 50ngDNA/µl hergestellt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### **2.2.2.4 Real-Time PCR**

Nach der RNA-Isolation, der Bestimmung und Vereinheitlichung der RNA-Konzentrationen, dem DNA-Verdau und der anschließenden reversen Transkription waren alle Vorbereitungen für die quantitative Real-Time PCR abgeschlossen. Letztere ist eine Variante der konventionellen PCR zum Nachweis der Expression eines Gens. Sie bietet die Möglichkeit, mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs amplifizierte PCR-Produkte in Echtzeit zu quantifizieren und visualisieren. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Amplifikate zu. Durch Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem Amplifikationszyklus können so Rückschlüsse auf das Ausmaß der Amplifikation gezogen werden. Hierbei wird die logarithmisch-lineare Phase der Fluoreszenzzunahme zur Auswertung herangezogen, da hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

Für die Real-Time PCR wurde das „iQ5™ Multi Color Real-Time PCR Detection System“ verwendet. Es stellt eine Kombination dar aus Thermocycler und Fluoreszenzoptik. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wird softwaregestützt der Fluoreszenzschwellenzyklus ermittelt. Auch als Cycle of Threshold (kurz C<sub>T</sub>-Wert) bezeichnet beschreibt dieser den Amplifikationszyklus, in dem ein Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wird. Folglich lässt ein hoher C<sub>T</sub>-Wert auf eine geringe mRNA-Menge einer untersuchten Zielsequenz schließen, ein niedriger C<sub>T</sub>-Wert spricht für einen hohen Gehalt ebendieser. Die Auswahl der untersuchten Zielsequenz erfolgt durch den Einsatz spezifischer Primer, die Fluoreszenzmarkierung mithilfe der Taqman-Methodik. An die zu amplifizierende cDNA bindet hierbei eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde. Diese Taqman-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff, genauer einem Fluorescein-Derivat, am 5′-Ende und einem nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3′-Ende. Der NFQ, ein Rhodamin-Derivat, unterdrückt bei Anregung durch ultraviolettes Licht bei räumlicher Nähe zum Reporterfarbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) dessen Fluoreszenzsignal.

Bei Beginn der Real-Time PCR erfolgt durch Temperaturerhöhung auf 95°C die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA. Durch Senken der Reaktionstemperatur auf 60°C hybridisiert die Sonde mit den Primern an den Matrizenstrang. Sie wird in der folgenden Extensionsphase durch Aktivierung der 5′-3′-Exonuklease-Aktivität der TaqMan-Polymerase hydrolysiert und so der Reporterfarbstoff abgetrennt. Hierdurch distanzieren sich Reporter und Quencher räumlich. Der FET wird aufgehoben und ein Fluoreszenzsignal des Reporters messbar. Die Intensitätssteigerung dieses Fluoreszenzsignals verhält sich dabei proportional zur Menge der PCR-Amplifikate. Freie, nicht-hybridisierte Sonden erfahren keine Spaltung, so dass das entstehende Fluoreszenz-Signal sequenzspezifisch ist.<sup>127</sup>

*Tabelle 12: Real-Time PCR-Programm*

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Prozess
1	0	10 Minuten	95°C	Polymeraseaktivierung
2	50	15 Sekunden	95°C	Denaturierung
3	0	1 Minute	60°C	Annealing und Kettenverlängerung

Um die C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RNA-Proben vergleichbar zu machen, wurden diese zusätzlich auf ihren Gehalt des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) untersucht. Die Expression dieses Gens ist unabhängig von Zelltyp oder äußeren Einflüssen, wodurch es ein

Haushaltsgen darstellt. Es diente in der vorliegenden Arbeit als interne Kontrolle zur Normierung, also zum Mengenvergleich der eingesetzten RNA. Zur Validierung der GAPDH-Referenz wurde bei deren Messung zusätzlich eine Positivkontrolle durchgeführt.

Mit der Anfertigung von No-template-controls erfolgte die Überprüfung der Primer-spezifischen Reaktionsansätze (s. unten) auf Verunreinigungen. Bei ordnungsgemäßer Arbeitsweise zeigen sich in diesen Negativkontrollen keine PCR-Amplifikate.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

### ***Durchführung der PCR:***

Vor Verwendung der Proben erfolgte die Verdünnungen der cDNA mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10. Pro Well wurden nun 2µl cDNA als Doppelbestimmung auf einer 96-Well-Platte vorgelegt, was somit jeweils einer cDNA-Masse von 10ng entspricht. Wie zuvor beschrieben wurde für jeden Primer eine Negativkontrolle durchgeführt. Hier erfolgte die Gabe von 2µl ddH<sub>2</sub>O anstatt von cDNA in die entsprechenden Wells. Für die GAPDH-Untersuchung fand wie beschrieben zusätzlich eine Positivkontrolle statt. Im nächsten Schritt wurde 18µl eines Primer-spezifischen Reaktionsansatzes hinzugegeben, woraus sich ein Gesamtvolumen von 20µl pro Well ergab. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt aus Primer-spezifischem Target-Assay-Mix, Taqman Master Mix und ddH<sub>2</sub>O zusammen.

*Tabelle 13: Primer-spezifischer Reaktionsansatz*

Reagenzien	10µl TaqMan Universal Master Mix
	7µl ddH <sub>2</sub> O
	1µl Target Assay Mix

Sämtliche cDNA-Proben wurden auf den Gehalt der folgenden Primer untersucht: IL-1β, IL-1RI, TNF-α, TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX3CL1, CX3CR1.

Es erfolgte das Abdichten der Platte mit einer optischen Folie. Zur anschließende Analyse wurde die Platte in das „iQ5™ Multi Color Real-Time PCR Detection System“ eingebracht.

### ***2.2.2.5 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte***

Die Quantifizierung der Genexpressionswerte der untersuchten Marker erfolgte, wie bereits erwähnt, in Relation zur GAPDH-Expression der jeweiligen Probe. Dies geschah durch Berechnung des  $\Delta C_T$ -Werts durch folgende Formel:



$$[3] \quad \Delta C_{Tp} = \frac{C_T(p1) + C_T(p2)}{2} - \frac{C_T(GAPDH_1) + C_T(GAPDH_2)}{2}$$

Hierbei steht  $C_{Tp}$  für die benötigten Zyklen bis zum Überschreiten des Schwellenwert (englisch Threshold) bei Verwendung eines Primer-Ansatzes und  $C_{T\text{ GAPDH}}$  analog bei Verwendung des GAPDH-Ansatzes. Wie oben erwähnt wurde für jeden untersuchten Primer eine Doppelbestimmung durchgeführt, wofür die Zahlen 1 und 2 stehen. Nach Berechnung des Mittelwerts dieser beiden wird von diesem der Mittelwert beider bestimmten GAPDH-Werte subtrahiert. Hierdurch erhält man den  $\Delta C_{Tp}$ -Wert des jeweiligen Primeransatzes, welcher sich antiproportional zur Fluoreszenzzunahme und zur Menge der PCR-Amplifikate verhält. Bei Verwendung von 10ng cDNA pro Well entspricht die Zunahme des  $\Delta C_T$ -Wertes um den Faktor 3,3 einer Abnahme der Genexpression um den Faktor 0,1.<sup>56</sup>

Um Rückschlüsse auf die Expression zu ziehen und zur weiteren Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels statistischer Testverfahren galt es die  $\Delta C_T$ -Werte mit folgender Formel zu entlogarithmieren:

$$[4] \quad E = 2^{-\Delta CT}$$

### ***Die n-fache Über- oder Unterexpression f der einzelnen Marker***

Um die Expression verschiedener Gruppen oder Zeitpunkte zu vergleichen, können diese ins Verhältnis gesetzt werden. Hierdurch erhält man den n-fachen Unterschied  $f$  der Genexpression zwischen dem Plakodengewebe und dem gesunden Kontrollgewebe. Er entspricht der n-fachen Über- oder Unterexpression der einzelnen Marker und berechnet sich wie folgt:

$$[5] \quad f = \frac{E_1}{E_2}$$

## **2.2.3 Histologische Analyse**

Zu Beginn jeder histologischen Färbung wurde die Schnitte entparaffiniert. Anschließend wurden HE- und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Für letztere wurde die DAB-Färbungen mit der Avidin-Biotin-Methode sowie Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen angewendet.

### **2.2.3.1 Entparaffinierung**

Die zur Konservierung angewandte Einbettung des Gewebes in Paraffin machte vor der Färbung den Schritt der Entparaffinierung notwendig. Hierzu erfolgte eine zweimalige Waschung in Xylol (je 10 Min.). Unter Verwendung einer absteigenden Ethylalkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%; je 2x 2 Min) wurden die Schnitte hydriert und darauffolgend mittels Gabe in ein 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Methanol-Gemisch die endogene Peroxidaseaktivität blockiert (10 Min.). Auf zweimaliges Waschen in Aqua dest. und einmaliges Waschen in PBS (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (je 1 Min.) folgte die Antigen-Demaskierung mittels Citratpuffer. Bei diesem für die Immunhistochemie essenziellen Schritt werden durch die Fixierung in Paraffin zwischenzeitlich unkenntlich gemachte Epitope wieder verfügbar für Antikörperbindungen. Die so wiederhergestellte Fähigkeit zur Immunoreaktivität sorgt für ein spezifischeres Färbeergebnis. Hierfür werden die Schnitte in einem Schnellkochtopf bei Dampfstufe 2 für 2 Minuten in Citratpuffer gekocht und kühlen anschließend in eben diesem für ca. 20 Minuten ab.

### **2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur Beurteilung der Schnittqualität und korrekten Schnittrichtung sowie zur anatomischen Charakterisierung des Gewebes wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) modifiziert nach McManus et al. durchgeführt. Schnittserien mit Artefakten sowie mit nicht transversal getroffener Schnittführung wurden an dieser Stelle vor der Durchführung immunhistochemischer Färbungen aussortiert.

#### ***Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung:***

Nach der Entparaffinierung erfolgte die Fixierung der Schnitte in depolymerisiertem Paraformaldehyd (4%) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) für 30 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 10 Minuten schloss sich die Kernfärbung in Hämatoxylin (5 Min) an. Darauf folgte ein kurzes Eintauchen in ein Alkohol-Essigsäuregemisch. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte nun gebläut (5 Min.) und darauffolgend mit Eosin (0,1%) gelöst in Aqua dest. gegengefärbt (1 Min.). Mittels zweimaligem Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte von überschüssigem Eosin befreit und anschließend mit einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe dehydriert (zweimal 96%, zweimal 100%, je 2 Min). Nach zweimaligem Waschen in Xylol (je 5 Min.) wurden die Schnitte eingebettet und mit einem Deckgläschen schützend abgedeckt.

*Tabelle 14: Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendete Färbelösungen*

Färbelösungen	Hämatoxylin:
	1g Hämatoxylin
	50g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecyhydrat reinst
	0,2g Kaliumjodat
	in 1000ml Aqua dest. lösen
	5ml 25%ige Salzsäure
	Eosin:
	1g Eosin
	in 1000ml Aqua dest. lösen

### **2.2.3.3 Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung**

Zur genaueren anatomischen Charakterisierung des Gewebes und der Identifizierung der beteiligten Zelltypen wurden immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen strukturellen Antikörpern durchgeführt. Dies geschah mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode). Auf dieselbe Weise erfolgte die Untersuchung der Verteilung der Botenstoffe und derer Rezeptoren durch die Verwendung der entsprechenden Antikörper (s. Tabelle 7).

Die ABC-Methode beruht auf der hohen Affinität des Proteins Avidin und des Vitamins Biotin. Als tetravalentes Molekül ist Avidin zur Bindung von bis zur vier biotinylierten Konjugaten fähig. Will man eine gewünschte Zielstruktur mittels ABC-Methode sichtbar machen, erfolgt zuerst die Verwendung eines spezifischen, primären Antikörpers. An diesem bindet im zweiten Schritt der sekundäre Antikörper. Letzterer ist biotinyliert, also versehen mit einem Biotinrest. Freies Avidin wird nun mit einem biotinylierten Enzym, wie zum Beispiel der Horseradish-Peroxidase (HRP), präinkubiert. Hierbei kommt es zur Formung großer Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe. Nach Zugabe dieser ABC-Lösung kommt es über das Avidin zur Bindung der Komplexe an den sekundären Antikörper. Um diese Bindung sichtbar zu machen, wurde im nächsten Schritt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. DAB ist ein Derivat von Benzol, welches häufig Verwendung als Chromogen in der Immunhistochemie (IHC) findet. Dies funktioniert über die im ABC-Komplex befindliche Horseradish Peroxidase (HRP). Die HRP oxidiert das DAB, welches in oxidierter Form braune Präzipitate an der Stelle der Reaktion bildet. Anschließend kann dies über ein Lichtmikroskop ausgewertet werden.<sup>128,129</sup>

Zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Verdünnung für die bevorstehenden Färbungen erfolgte zunächst eine Titrierung der Antikörper. Nach Anfertigen von Verdünnungsreihen der primären

Antikörper wurden Färbungen mit ebendiesen durch Mikroskopieren verglichen. Es erfolgt die Auswahl der geeigneten Verdünnung. Für einige Primärantikörper konnte auf Erfahrungswerte aus anderen Projekten zurückgegriffen werden (s. Tabelle 7). Hinsichtlich der Verdünnungen der Sekundärantikörper wurden nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet (s. Tabelle 8).<sup>127</sup>

#### ***Durchführung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung:***

Auf die zuvor beschriebene Entparaffinierung folgte ein zweimaliges Waschen in PBS und die 30-minütige Gabe in eine mit einer 0,3%ige TritonX-100-PBS-Mischung gefüllte Küvette, in die kurz vor der Verwendung  $H_2O_2$  gegeben wurde (3%). Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit 10%igem Serum bedeckt, welches vom Ursprungstier des sekundären Antikörpers stammte. Dieser 60-minütige Schritt führt zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Im Anschluss erfolgte über Nacht die Inkubation des primären Antikörpers, welcher zunächst in entsprechender Verdünnung in 2%igem Blockierungsserum der zuvor schon verwendeten 0,3%igen TritonX-100-PBS-Mischung gelöst wurde. Am nächsten Tag erfolgte nach zweimaligem Waschen in PBS die Inkubation mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Dieser war zuvor mit der Verdünnung 1:200 in 1,5%igem Blockierungsserum in PBS gelöst worden. Nach erneutem, zweimaligem Waschen in PBS schloss sich die 60-minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectorstain-Elite-ABC-Kit) bei Raumtemperatur an. Auf zweimaliges Waschen mit PBS folgte nun die 2-minütige Färbung mit Diaminobenzidin, welche mit Leitungswasser gestoppt wurde. Nach der Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für eine Minute wurden die Schnitte zunächst in Aqua dest. gewaschen und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Verwendung von lauwarmem Leitungswasser führt hierbei zu einem kräftigeren Blauton. In einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte daraufhin die Dehydrierung (70%, 80%, 95%, 100%). Auf ein 1:1-Gemisch aus Alkohol und Roticlear folgte die zweimalige Gabe in Roticlear für je 15 Minuten. Mit Roti-Mount und einem Deckgläschen wurden die Schnitte abschliessend eingedeckt.

#### ***2.2.3.4 Qualitätskontrolle der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung***

##### ***Positives Kontrollgewebe***

Um zu Anfang die Primärantikörper der proinflammatorischen Zytokine ( IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$  und TNF-R) auf ihre Eignung zu überprüfen, erfolgten Färbungen auf positivem Kontrollgewebe. Dies ist Gewebe, welches bekanntermaßen das untersuchte Antigen enthält, und in gleicher Weise

fixiert, verarbeitet und eingebettet wurde. Für die vorliegende Arbeit wurde entzündetes, adultes Hirngewebe ausgewählt.

### ***Negativ-/Serumkontrollen***

Um unspezifische und unerwünschte Färbungen zu erkennen, wurden bei jedem Färbedurchlauf Negativkontrollen in Form von Serumkontrollen durchgeführt. Hierbei wurde der Schnitt nur mit dem jeweiligen Serum anstelle von in Serum gelöstem Primärantikörper inkubiert.

Bei Färbung dieser Negativ-/Serumkontrollen wurden die Proben verworfen, der Ablauf bzgl. möglicher Fehlerquellen eruiert und die Färbung wiederholt.

### ***2.2.3.5 Doppelimmunfluoreszenzfärbung***

Zur Präzisierung der zellulären Lokalisation der Zytokine wurden abschließend Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Markierung der Proteine erfolgt hierbei über mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelte Antikörper. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Primärantikörpern können hierbei zwei verschiedene Proteine sichtbar gemacht werden. Der erste Primärantikörper stellte dabei jeweils einen strukturellen Marker dar (NeuN, NF200, Nestin, Vimentin, GFAP, Iba-1), der zweite Primärantikörper ein proinflammatorisches Zytokin, bzw. dessen Rezeptor (IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$  und TNF-R1). Die Bestimmung der Verdünnung der primären Antikörper mit den besten Färbereigenschaften erfolgte über Titrierung der Antikörper oder konnte aus vorherigen Projekten übernommen werden (s. Tabelle 7).

### ***Durchführung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung:***

Zu Beginn wurden die durch die Entparaffinierung vorbereiteten Schnitte in einer Aceton-Methanol(1:1)-Mischung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Auf dreimaliges Waschen in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST) folgte die Dehydrierung in Form einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (20%, 70%, je 2 Minuten) und die 10-minütige Kontrastfärbung mit Sudanswarz (1% in 70%igem Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte durch das Schwenken in 70%igem Ethanol und die 2-minütige Einlage in 20%igem Ethanol rehydriert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Schnitte für 60-80 Minuten durch 0,1% BSA und 0,2% Glycin verdünnt in TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) blockiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Primärantikörper, welcher in TBST gelöst war, erfolgte über Nacht bei 4°C. Zu Beginn des zweiten Tages wurde das Labor für die nachfolgenden Schritte abgedunkelt und die Schnitte zunächst dreimal in TBST gewaschen. Nach 60-minütiger Inkubation mit dem

fluoreszierenden, sekundären Primärantikörper verdünnt in TBST folgte wiederum dreimaliges Waschen in TBST und das Auftropfen des primären Sekundärantikörpers. Es folgte die Inkubation dessen bei 4°C über Nacht. Zu Beginn des dritten Tages erfolgte nach dreimaligem Waschen die 60-minütige Markierung bei 37°C mit dem fluoreszierenden, sekundären Sekundärantikörper, welcher in TBST verdünnt war. Es schloss sich ein Waschen der Schnitte in TBST und zweimalig in TBS für jeweils 10 Minuten an. Nach der Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verdünnt in TBS (1:30000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und einer abschließenden, dreimaligen Waschung mit TBS wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt. Das Einbetten erfolgte mit Immomount und den passenden Deckgläschen.

#### **2.2.3.6 Mikroskopie**

Für die Betrachtung der Schnitte wurde ein Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss) und ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit Apotome (Observer.Z1 + Apotome.2, Power Supply 232, Zeiss) verwendet. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit den Programmen Axiovision Rel.4.9.1 und ZEN pro 2012 (AxioCam MRC5 und MRm, Zeiss).

#### **2.2.4 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurden Mittelwerte und deren Standardabweichungen gemäß den üblichen Methoden ermittelt. Mittels dem Student'schem T-Test wurde auf Signifikanz geprüft mit einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0.05. Als sehr signifikant wurde ein  $p < 0.01$ , als hoch signifikant ein  $p < 0.001$  gewertet. Der jeweilige Signifikanzgrad wird markiert durch Asterisks abhängig vom ermittelten p-Wert: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Das Datenmanagement und die statistische Analyse erfolgten unter Zuhilfenahme des Datenanalyseprogramms Graph Pad Prism 9.0.0 ® Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3 Ergebnisse

Die Untersuchung der an der Schadenskaskade beteiligten Botenstoffe erfolgte auf molekularbiologische und immunhistochemische Art und Weise.

### 3.1 Vorarbeiten

#### 3.1.1 Vorarbeiten zur molekularbiologischen Untersuchung der MMC-Tiere:

##### Analyse des Fehlbildungsgewebes und des kranial davon gelegenen

##### Rückenmarksgewebes separat oder gemeinsam?

Bei Präparation der Ratten zur Vorbereitung auf die molekularbiologische Analyse wurden durch einen transversalen Schnitt Rückenmark und Fehlbildung voneinander separiert. Bei den fehlgebildeten Tieren wurden im Folgenden Rückenmark und Fehlbildung separat und bei den Kontrolltieren das Rückenmark in Gänze kryokonserviert. Im weiteren Prozess stellte sich die Frage, ob die Plakode und das Rückenmark der fehlgebildeten Tiere getrennt der PCR unterzogen oder zuvor wieder zusammengeführt werden sollten. Um herauszufinden, inwiefern sich eine separate Beurteilung von der Fehlbildung und des dazugehörigen Rückenmarks auf die Ergebnisse auswirkt, wurde folgende Testreihe mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt:

Für die RT-PCR wurden die Proben von vier Tieren verwendet, deren Fehlbildungs- und Rückenmarksgewebe nach Auftauen des kryokonservierten Materials und vor Beginn der RNA-Isolation zusammengeführt wurde. Diesen gegenübergestellt wurden die Proben zweier Tiere, deren Fehlbildungs- und Rückenmarksgewebe separat analysiert wurde sowie sechs Kontrolltiere. Alle zwölf Tiere gehörten zur Gruppe, die an Tag E18 gewonnen worden war. Nach der RNA-Isolation, dem DNA-Verdau und der Umschreibung in cDNA wurde die cDNA der Proben dieser zwölf Tiere per RT-PCR auf den Gehalt der folgenden Primer untersucht: IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$ , TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX3CL1, CX3CR1.

Tabelle 15: Mittelwerte der entlogarithmierten  $\Delta CT$ -Werte ( $E_{mean} \cdot 10^3$ ) für verschiedene Primer (IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF $\alpha$ , TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX3CL1, CX3CR1) für das Rückenmarksgewebe der Kontrollgruppe (Kontrolle – RM), das Plakodengewebe der MMC-Gruppe (MMC – P), das nicht fehlgebildete Rückenmarksgewebe der MMC-Gruppe (MMC – RM) und die zusammengeführten Proben von nicht fehlgebildetem Rückenmarksgewebe und Fehlbildungsgewebe der MMC-Gruppe (MMC – RM + P). n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{PversusK}$ ), n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{PversusRM}$ ), n-facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{RMversusK}$ ), n-facher Expressionsunterschied des zusammengeführten Plakodengewebes und nicht fehlgebildetem Rückenmarksgewebes der MMC-Tiere ( $f_{RM+PversusK}$ )

Primer	Mittelwerte der entlogarithmierten $\Delta CT$ -Werte: $E_{mean} \cdot 10^3$				n-facher Expressionsunterschied f			
	Kontrolle	MMC	MMC	MMC	$f_{PversusK}$	$f_{PversusRM}$	$f_{RMversusK}$	$f_{RM+PversusK}$
	RM	P	RM	RM + P				
IL-1 $\beta$	0,592	1,254	0,429	0,283	2,12	2,92	0,72	0,48
IL-1RI	2,338	17,798	3,790	1,858	7,61	4,7	1,62	0,79
TNF- $\alpha$	0,078	1,187	0,391	0,200	15,22	3,04	5,01	2,56
TNF-R1	7,593	310,868	6,126	5,459	40,94	50,75	0,81	0,72
CXCL12	22,142	1401,097	34,359	17,503	63,28	40,78	1,55	0,79
CXCR4	32,011	472,952	39,110	21,233	14,77	12,09	1,22	0,66
CX <sub>3</sub> CL1	44,990	252,449	56,257	26,158	5,61	4,49	1,25	0,58
CX <sub>3</sub> CR1	8,547	153,667	6,237	5,221	17,98	24,64	0,73	0,61

Es zeigte sich für alle Primer, dass in der Plakode separat betrachtet eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zum nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{PversusRM} > 1$ ) und im Vergleich zum Kontrollrückenmark ( $f_{PversusK} > 1$ ) vorliegt.

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend zeigten sich für IL-1 $\beta$ , TNF-R1 und CX<sub>3</sub>CR1 niedrigere entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte als im Kontrollgewebe ( $f_{RMversusK} < 1$ ) und für IL-1RI, TNF- $\alpha$ , CXCL12, CXCR4 und CX<sub>3</sub>CL1 höhere entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte als im Kontrollgewebe ( $f_{RMversusK} > 1$ ).

Die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX<sub>3</sub>CL1 und CX<sub>3</sub>CR1 in den zusammengeführten Proben von Plakoden- und nicht fehlgebildetem Rückenmarksgewebe der MMC-Tiere war vermindert ( $f_{RM+PversusK} < 1$ ). Lediglich für TNF- $\alpha$  fand sich ein im Vergleich zum Kontrollgewebe erhöhtes Expressionsniveau ( $f_{RM+PversusK} = 2,56$ ).

**Fazit:** Trotz im Vergleich zum Kontrollgewebe hohen entlogarithmierten  $\Delta CT$ -Werten des Plakodengewebes zeigten sich diese nicht in der Auswertung der zusammengeführten Proben. Gegenteilig fanden sich in den zusammengeführten Proben im Vergleich zu Kontrollgruppe



verminderte entlogarithmierte  $\Delta\text{CT}$ -Werte. Folglich wurden die Proben für das weitere Vorgehen separat per RT-PCR quantifiziert.

### 3.1.2 Vorarbeiten zur immunhistochemischen Untersuchung:

#### Kontrollfärbungen

In den Serumkontrollen für die verwendeten Seren von Hase, Pferd und Ziege auf fetalem Kontrollrückenmark fand sich keine Färbung mit DAB (s. Abbildung 11).

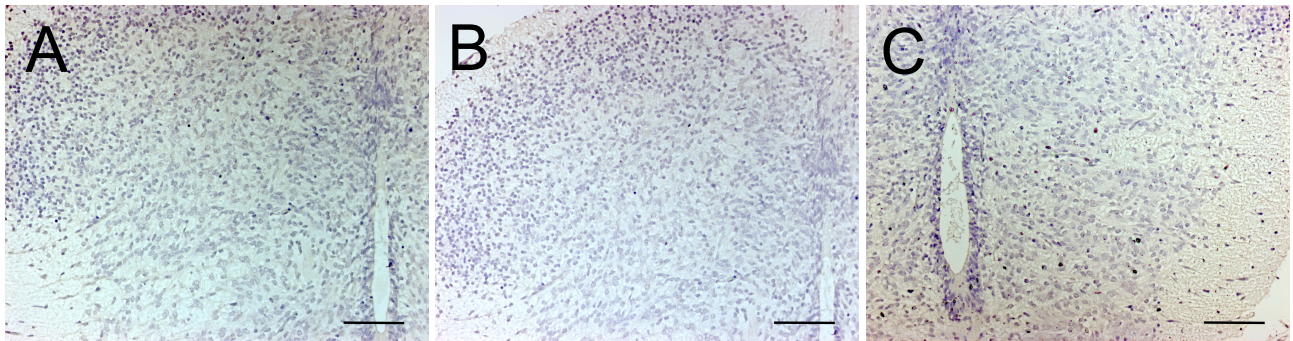


Abbildung 11: Serumkontrollen

Aufnahmen in 10x-Vergrößerung von DAB-Färbungen des Kontrollgewebes (fetales Kontrollrückenmark). A) Serumkontrolle Ziege. B) Serumkontrolle Pferd. C) Serumkontrolle Hase. Maßstabsskala: (A-C): 100µm

Zur Etablierung der proinflammatorischen Antikörper gegenüber IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und deren Rezeptoren wurden Positivkontrollen durchgeführt. Als Probenmaterial verwendeten wir entzündetes, anonymisiertes, adultes Hirngewebe (s. Abbildung 12). Es zeigte sich in allen Positivkontrollen eine deutliche Färbung. In entsprechender Verdünnung sind diese Antikörper folglich als geeignet anzusehen, um die entzündlichen Geschehnisse in der Plakode abzubilden.

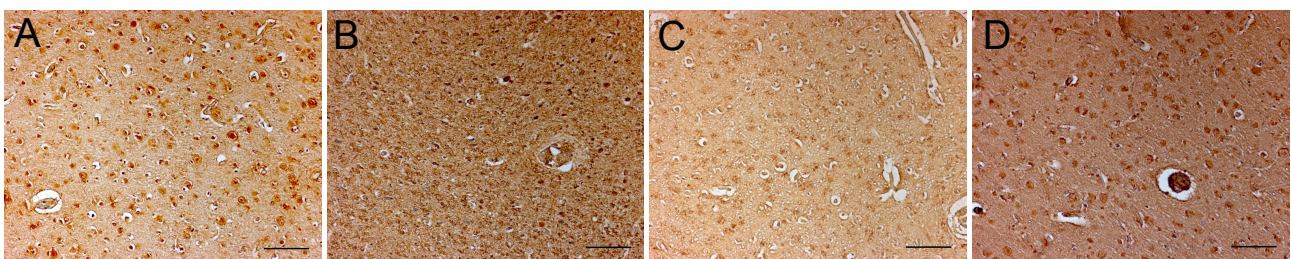


Abbildung 12: Positivkontrollen

Aufnahmen in 10x-Vergrößerung von DAB-Färbungen von entzündetem, adultem Hirngewebe mit einem Antikörper gegen A) IL-1 $\beta$ , B) IL-1-RI, C) TNF- $\alpha$ , D) TNF-R1

## **3.2 Histologische Vorstudien: Anatomische Charakterisierung der Plakode**

Um einen Einblick in die strukturellen Gegebenheiten der Fehlbildung zu gewinnen, wurden zunächst einige histologische Vorstudien an Plakoden- und Kontrollgewebe vorgenommen. Hierzu wurden die Fehlbildung und das Kontrollrückenmark mittels HE-Färbungen morphologisch analysiert. In einem nächsten Schritt fanden immunhistochemische Färbungen statt zur Untersuchung auf den Gehalt an strukturellen Markern (NeuN, NF200, Nestin, Vimentin, GFAP, Iba-1).

### **3.2.1 Histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte**

Im Folgenden findet sich eine vergleichende Beschreibung der beobachteten, histologischen Veränderungen in der Plakode und im gesunden, lumbosakralen Rückenmark in der späten, fetalen Phase.

#### **3.2.1.1 E16**

Zum Zeitpunkt E16 (s. Abb. 13D) imponierte die Plakode erhaben über dem Hautniveau. Ventral von ihr befindlich war mesenchymales Gewebe zu erkennen, wo derweil die Differenzierung zu verschiedenen Stütz- und Bindegeweben wie beispielsweise dem Wirbelkörper stattfindet. Seitlich des Wirbelkörpers fand sich das Knochengewebe des Wirbelbogens, welcher hier aufgrund der nicht vollzogenen Neurulation keine gebogene Form einnahm sondern nach lateral abflachte.

Die Plakode selbst betrachtend ließen sich Matrix-, Mantel- und Marginalzone differenzieren.

#### ***Matrix- und Mantelzone***

Die Motorneurone in der Basalplatte der Plakode und des Kontrollrückenmarks befanden sich in unseren Untersuchungen in einem ähnlichen Entwicklungsstadium (s. Abb. 13 C, F). Sie zeigten reichlich auswachsende Axone. Auch begannen sie mit der Ausbildung von Dendriten. Hierzu nahmen sie eine bipolare Form ein und richteten sich parallel zur Grenzfläche zwischen Mantel- und Marginalzone aus. In der intermediären Zone finden sich zu diesem Zeitpunkt im Kontrollgewebe abwechselnde Zonen von horizontal orientierten, spindelförmigen Zellen und vertikal orientierten, kleinen Zellen. Erstere stellten ipsilateral projizierende Relay-Neurone dar, welche zu diesem Zeitpunkt nach lateral migrierten. Aus diesem Grund fanden sich von diesen Zellen ausgehende nach lateral reichende Fasern. Die kleinen vertikal orientierten Zellen waren am

ehesten assoziiert mit angeschnittenen zirkumferentiell projizierenden Fasern.<sup>76</sup> In der Plakode zeigte sich dieses alternierende Muster von horizontal orientierten, spindelförmigen Zellen und kleinen vertikal orientierten Zellen ebenfalls. Die Fasern der lateral migrierenden, ipsilateral projizierenden Relay-Neurone verliefen aufgrund der andersartigen Form der Plakode nicht wie im Kontrollgewebe orthogonal zum Neuroepithel, sondern schräg nach lateral abfallend. Wie im Kontrollgewebe waren kontralateral projizierende Neurone zu sehen, deren Fasern in Richtung der Commissura alba anterior zogen.

Im Bereich der Flügelplatte ließ sich im Kontroll- und Plakodengewebe zu diesem Zeitpunkt ein dichter Zellverband beobachten (s. Abb. 13 B, E). Ein Großteil der Interneurone des späteren Hinterhorns war entstanden und wird sich innerhalb der nächsten zwei Tage den Weg dorthin bahnen.<sup>76</sup>

### ***Marginalzone***

Der ventrolaterale Funiculus wurde zu großen Teilen gebildet durch die aussprossenden Fasern der kontra- und ipsilateral projizierenden Relay-Neurone und in einem kleinen Teil durch die nach ventral aussprossenden Fasern der Motorneurone des Vorderhorns.<sup>76</sup> Verglich man Plakode und Kontrollrückenmark fiel ein deutlich größerer Durchmesser des Funiculus ventrolateralis in der Plakode auf (gemessen orthogonal zur glialen Grenzmembran) (s. Abb. 13 C, F). Plakode und das Kontrollrückenmark boten den dorsalen Funiculus betreffend ein sehr ähnliches Bild zu diesem Zeitpunkt.

#### **3.2.1.2 E18**

Zunächst die Umgebung der Plakode betrachtend fielen morphologische Veränderungen im Vergleich zum Zeitpunkt E16 auf. Die beiden lateralen Auswüchse des Wirbelkörpers, die sich bei vollkommener Neurulation dorsal des Rückenmarks zum Wirbelkörper vereinigen, hatten sich zum Zeitpunkt E16 noch in frontaler Ebene ausgerichtet. Zum Zeitpunkt E18 waren diese aus der Frontalebene im 45°-Winkel nach dorsal rotiert. In die so geformte Kuhle legte sich die Plakode, woraus eine Senkung in Richtung des Hautniveaus folgte (s. Abb. 13 J). Im Vergleich zu E16 zeigte die Plakode an Tag E18 ein weniger aufgeklapptes und von lateral nach medial verdichtetes Erscheinungsbild. Zudem schien das Plakodengewebe im Vergleich zu E16 nicht mehr so stabil im umliegenden Bindegewebe fixiert zu sein, da es für die Zeitpunkte E18 und E22 vermehrt zu Riss-Artefakten zwischen Plakode und Dura kam. Der zwischen Wirbelkörper und Plakode befindliche

Subarachnoidalraum präsentiert sich nun mit aufgelockerten Arachnoidalsepten und von Rückenmarkshäuten umzogen. (s. Abb. 13 J)

### ***Matrix- und Mantelzone***

Das Neuroepithel wirkte sowohl im Plakoden- als auch im Kontrollgewebe im Vergleich zu E16 verdünnt. Ein Großteil der Zellen hatten die Matrixzone verlassen und migrierten nun in Richtung ihrer endgültigen Lokalisation innerhalb der Mantelzone. Das Plakodengewebe in Gänze betrachtend wirkte es zur Plakodenoberfläche hin fasrig, aufgelockert und unstrukturiert. Die Zellkerne wiesen im oberflächlichen Aspekt z.T. keine runde oder ovale Form auf, sondern wirkten verzerrt oder eckig. Auch kam es hier vermehrt zu Riss-Artefakten der Präparate (s. Abb. 13 J-L).

Die Zellen der Basalplatte von Plakode und Kontrollrückenmark zeigten ein ähnliches Erscheinungsbild. Hier fand derweil die finale Ausdifferenzierung der Motorneurone statt (s. Abb. 13 L). Die Intermediärzone wirkte in der Plakode zum Zeitpunkt E18 dichter gepackt als zu E16. Die zuvor im Neuroepithel entstandenen Interneurone siedelten sich im gesunden Rückenmark nun im dorsomedialen Grau und im Hinterhorn ab. Auch im Plakodengewebe fand sich diese Migrationsbewegung von E16 zu E18 in Richtung des Hinterhorns. In der Kopfregion des Hinterhorns zeigten Plakode und gesundes Rückenmark ein ähnliches Bild, in der Nackenregion hingegen unterscheiden sie sich. Im Kontrollgewebe zeigten sich Zellen mit größerem Kern und reichlich Dendriten, welche in transversaler Ebene aufgespannt waren (s. Abb. 13 H, K). Diese repräsentierten am ehesten Anteile des Nucleus proprius und projizierten in den ipsilateralen, lateralen Funiculus und in den kontralateralen, ventralen Funiculus.<sup>76</sup> In der Plakode fanden sich in der Nackenregion Zellen in mediolateral ausgerichteter Spindelform.

### ***Marginalzone***

Wie schon zum Zeitpunkt E16 ließ sich eine aufgelockerte Struktur sowie eine deutliche Verbreiterung des ventrolateralen Funiculus erkennen. Von der Grenze zur Mantelzone bis zur Pia mater nahm er eine Breite von ca. 150µm ein, während er im Kontrollgewebe stets unter 100µm maß (s. Abb. 13 J).

Im gesunden Rückenmark fand zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine Fortsetzung der Rotation des sich bildenden dorsalen Funiculus von lateral in Richtung der sagittalen Mittellinie des Rückenmarks statt. Dieses rotierende Wachstum ließ sich auch in der Plakode von E16 zu E18 betrachten, fand jedoch aufgrund des aufgeklappten Charakters der Plakode, nicht in Richtung der Mittellinie, sondern der Plakodenoberfläche statt (s. Abb. 13 J).

### **3.2.1.3 E22**

Im Vergleich zu E18 zeigte die Plakode an Tag E22 ein kompakteres und weniger aufgeklapptes Erscheinungsbild (s. Abb. 13 P). Außerdem schien sie sich weiter in Richtung des Hautniveaus gesenkt zu haben. Die schon an Tag E18 zu erkennende Kuhle wirkte prominenter und der Knochen, der diese Kuhle bildet, präsentierte sich differenzierter. Im zwischen Plakode und Knochen aufgespannten Subarachnoidalraum zeigten sich in den Präparaten merklich weniger Arachnoidalsepten. Die noch verbleibenden Septen bildeten die Straßen für Gefäße und Nervenfasern. Deutlich zu erkennen war die laterale Zona epithelioserosa, wo sich die Rückenmarkshäute vereinigen und übergehen in epidermale und dermale Strukturen. Von dieser lateralen Zone kommend drangen reichlich Blutgefäße in die Plakode ein und durchzogen die Mantelzone (s. Abb. 13 Q, R). Teile dieser Gefäße zeigten beachtliche Durchmesser und waren prall gefüllt mit Zellen. Auch fanden sich vereinzelt Extravasate.

#### ***Matrix- und Mantelzone***

Das noch verbliebene, ausgedünnte Neuroepithel begrenzte die Plakode in ihrem medialen Teil zur Oberfläche hin. Dort ließ es sich klar von der Mantelzone abgrenzen. Nach lateral blickend verjüngte es sich zunächst und verlor sich nach 200-300µm (s. Abb. 13 R).

Auf die Mantelzone der Plakode blickend zeigten sich die ventralen Anteile weniger von den Veränderungen betroffen. Das Vorderhorn der Plakode präsentierte sich in einem vergleichbaren Reifungsgrad wie jenes des Kontrollrückenmarks und mit einer annähernd physiologischen Zytoarchitektur. Das intermediäre Grau sowie das Hinterhorn hingegen zeigten sich in den untersuchten Plakoden in unterschiedlichem Grad verändert. Zum Teil wirkten sie in Gänze destruiert, zum Teil nur in ihren zur Plakodenoberfläche weisenden Anteilen (s. Abb. 13 Q). Auch wirkte das Gewebe aufgelockert und unstrukturiert.

#### ***Marginalzone***

Im Vergleich zum Zeitpunkt E18 stellte sich der ventrale Funiculus in der Plakode nicht mehr verbreitert dar. Der laterale Funiculus wies noch immer einen größeren Durchmesser auf, zeigte ansonsten aber eine ähnliche Struktur wie in den Kontrollen (s. Abb. 13 N, O). Es ließ sich der Nucleus dorsolateralis erkennen, ebenso wie die typische Verdickung der Marginalzone an der Stelle der Nackenregion des Hinterhorns (s. Abb. 13 Q, R).

Das schon von E16 zu E18 in der Plakode beobachtete rotierende Wachstum des dorsalen Funiculus zur Plakodenoberfläche hin setzte sich von E18 zu E22 fort. Es fand aufgrund des aufgeklappten

Charakters der Plakode weiterhin nach lateral gerichtet statt. So ließ sich der dorsale Funiculus am äußeren, lateralen Rand der Plakode erkennen und zog in einigen untersuchten Präparaten noch auf der Plakodenoberfläche in medialer Richtung.

*Beschreibung zu Abbildung 13 auf S. 64:*

*(A)-(F) Zeitpunkt E16: Kontrollrückenmark (A)-(C) und MMC-Plakoden (D-F) in transversaler Ebene. Bis auf morphologische Unterschiede zwischen Plakode und Kontrollrückenmark, die gegeben sind aufgrund der andersartigen Anordnung des Gewebes, lassen sich zum Zeitpunkt E16 keine strukturellen Unterschiede feststellen. Auffällig in der Plakode ist lediglich ein größerer Durchmesser des ventrolateralen Funiculus.*

*(G)-(L) Zeitpunkt E18: Kontrollrückenmark (G)-(I) und MMC-Plakoden (J)-(L) in transversaler Ebene. In der Plakode (J)-(L) zeigt sich der Zellverband aufgelockert und unstrukturierter als im Kontrollgewebe. Die Zellkerne im Plakodengewebe weisen keine runde oder ovale Form auf, sondern wirken verzerrt oder eckig. In der Nackenregion des Hinterhorns (K) zeigen sich Zellen in Spindelform, wo im Kontrollgewebe (H) in viele Richtungen aufgespannte Zellen zu erkennen sind. Auch kommt es an der Plakodenoberfläche sowie ventral der Plakode vermehrt zu Riss-Artefakten der Präparate. Wie schon zum Zeitpunkt E16 findet sich ein größerer Durchmesser des ventrolateralen Funiculus.*

*(M)-(R) Zeitpunkt E22: Kontrollrückenmark (M)-(O) und MMC-Plakoden (P)-(R) in transversaler Ebene. Die Plakode zeigt im Vergleich zu E18 Veränderungen. Die oberflächlichen, dorsalen Anteile wirken fasrig zerworfen und destruiert (Q, R). Dort befindliche Zellen weisen mit ihren abgeflachten Zellkernen ohne abgrenzbares Zytoplasma ein weniger vitales Erscheinungsbild auf.*

*Maßstabsskala und Vergrößerung: (A, D, F, M): 200µm, 4er-Vergrößerung. (J, P): 250µm, 2,5er-Vergrößerung. (B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q, R): 100µm, 10er-Vergrößerung.*



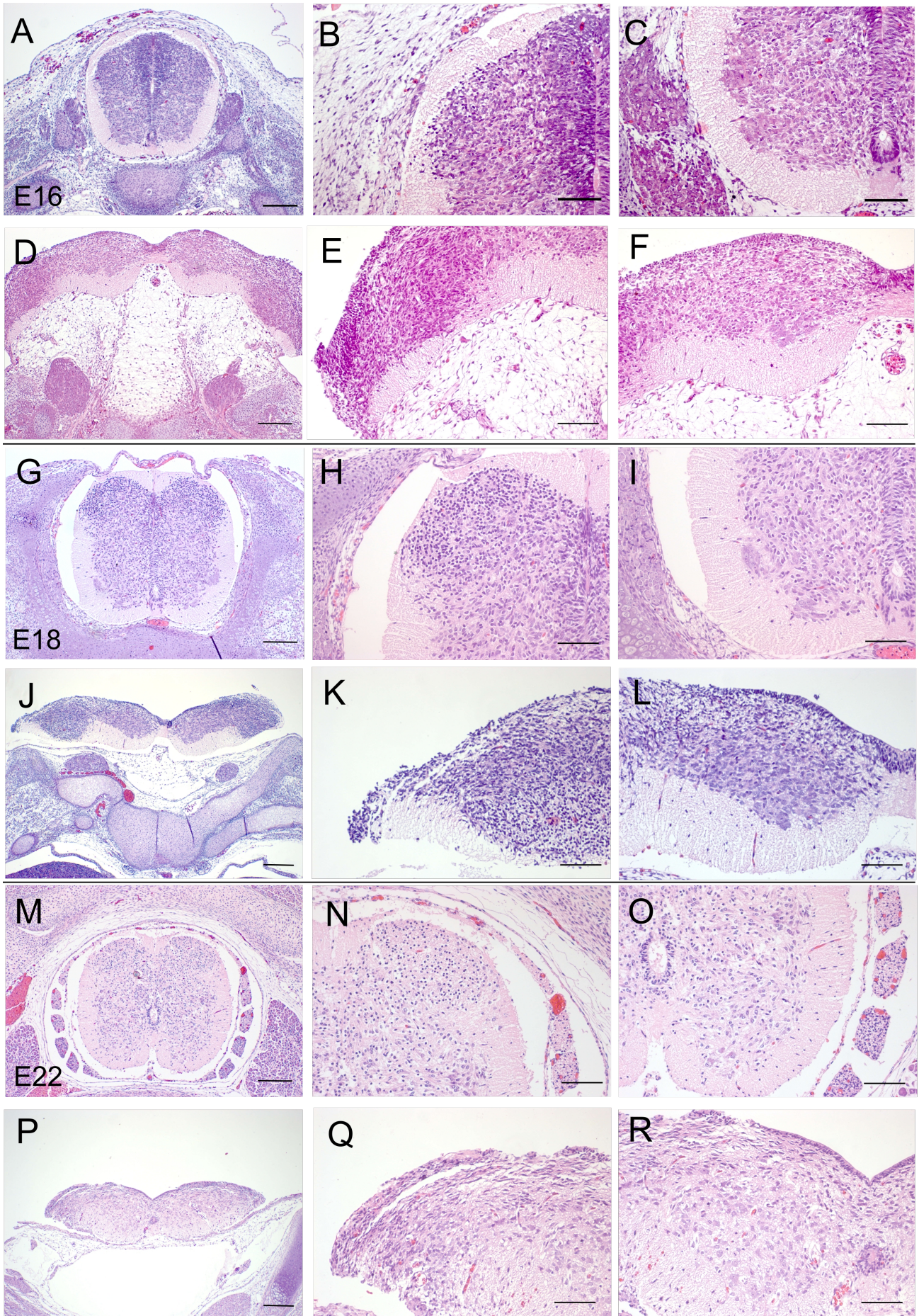


Abbildung 13: HE-Färbungen von Plakoden und Kontrollrückenmark zu verschiedenen Zeitpunkten.  
Zur Beschreibung siehe vorherige Seite.



### **3.2.2 Analyse der DAB-Färbungen: Erarbeiten eines strukturellen Profils der Plakode**

In dieser Arbeit wurden folgende Gewebemarker verwendet: NeuN, NF200kD, Nestin, Vimentin, Iba-1 (für genauere Erläuterungen siehe oben). Die Auswertung der DAB-Färbungen erfolgte sowohl qualitativ als auch semiquantitativ. In der semiquantitativen Auswertung wurde die Immunoreaktivität (IR) mithilfe einer zuvor definierten Punkteskala zwischen minus Eins (-) und plus Drei (+++) bewertet. (-) entsprach hierbei keiner feststellbaren Färbung und (0) einer dezenten Färbung bzw. Hintergrundfärbung. (+) wurde für eine mäßige, (++) für eine starke und (+++) für eine sehr starke Färbung vergeben. (s. Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18)

#### **3.2.2.1 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E16**

##### ***NeuN***

In der Matrixzone des Kontrollrückenmarks präsentierte sich die Färbung von NeuN zu diesem Zeitpunkt schwach sowie diffus in Nukleus und Zytosol verteilt (s. Tabelle 16). Während der Migration der Neurone von der Matrixzone zu ihrer endgültigen Destination in der Mantelzone nahm der Gehalt an NeuN im Nukleus zu. So fand sich in den Präparaten am Übergang von Mantelzone zu Marginalzone die deutlichste Färbung. Hervorzuheben waren die Motoneurone des Vorderhorns sowie Neurone in der äußersten Zone des Hinterhorns (s. Abb. 14 A, B). In der Marginalzone fand sich weitreichend keine Anfärbung für NeuN. Lediglich ein paar vereinzelte Zellen mit angefärbtem Nucleus waren zu erkennen, die zu zukünftigen, in der weißen Substanz befindlichen Kerngebieten gehörten.

In der Matrixzone des Plakodengewebes findet sich zum Zeitpunkt E16 schon eine mäßige Färbung, welche sich am deutlichsten in der Membrana limitans interna zeigte (s. Tabelle 16, Abb. 14 C, D). Die Färbung mit NeuN präsentierte sich in der Mantelzone der Plakode zu diesem Zeitpunkt wie im Kontrollgewebe. Die Färbung der Marginalzone der Plakode fiel sowohl im ventrolateralen sowie im dorsalen Funiculus etwas stärker aus als im Kontrollgewebe (s. Tabelle 18).

##### ***NF200kD***

In der Matrixzone des Kontrollrückenmarks präsentierte sich die Färbung von NF200kD zu diesem Zeitpunkt mäßig ausgeprägt (s. Abb. 14 E, F). In den ventralen Anteilen des Neuroepithels fand sich NF200kD diffus verteilt im Zytosol, während es sich in den dorsalen Anteilen eher im Nucleus konzentrierte.



Tabelle 16: Semiquantitative Analyse der Matrixzone mit den Gewebemarkern NeuN, NF200kD, Nestin, Vimentin und Iba-1

Immunreaktivität in den MMC-Plakoden (P) und im Kontrollrückenmark (K); NE=Neuroepithel, MNE= Mediales Neuroepithel, LNE= Laterales Neuroepithel; +++= sehr starke Immunreaktivität, ++= starke Immunreaktivität, += mäßige Immunreaktivität, 0 = schwache Immunreaktivität/Hintergrundfärbung, - = keine Färbung

	E16			E18			E22		
	K	P		K	P		K	P	
Gewebemarker	NE	MNE	LNE	NE	MNE	LNE	NE	MNE	LNE
NeuN	0	+	+	0	++	++	0	0	0
NF200kD	+	++	++	+	++	++	+	0	+
Nestin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0
Vimentin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
Iba-1	0	++	++	+	++	++	0	0	+

Tabelle 17: Semiquantitative Analyse der Mantelzone mit den Gewebemarkern NeuN, NF200kD, Nestin, Vimentin und Iba-1

Immunreaktivität in den MMC-Plakoden (P) und im Kontrollrückenmark (K); VH= Vorderhorn, IG = Intermediäres Grau, HH = Hinterhorn; +++= sehr starke Immunreaktivität, ++= starke Immunreaktivität, += mäßige Immunreaktivität, 0 = schwache Immunreaktivität/Hintergrundfärbung, - = keine Färbung

	E16						E18						E22					
	K			P			K			P			K			P		
Gewebemarker	VH	IG	HH	VH	IG	HH	VH	IG	HH	VH	IG	HH	VH	IG	HH	VH	IG	HH
NeuN	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
NF200kD	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+	+	+
Nestin	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vimentin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Iba-1	0	0	0	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 18: Semiquantitative Analyse der Marginalzone mit den Gewebemarkern NeuN, NF200kD, Nestin, Vimentin und Iba-1**  
 Immunreaktivität in den MMC-Plakoden (P) und im Kontrollrückenmark (K); CA= Commissura alba anterior, FV = Funiculus ventralis, FL = Funiculus lateralis, FD = Funiculus dorsalis; +++= sehr starke Immunreaktivität, ++= starke Immunreaktivität, += mäßige Immunreaktivität, 0 = schwache Immunreaktivität/Hintergrundfärbung, - = keine Färbung

	E16								E18								E22							
	K				P				K				P				K				P			
Gewebemarker	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD
NeuN	-	-	-	-	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NF200kD	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
Nestin	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	0	+	+	+	++	++	++	+
Vimentin	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+++	++	++	0
Iba-1	-	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	++

**Tabelle 19: Semiquantitative Analyse von IL-1 $\beta$ , IL-1-RI, TNF- $\alpha$ , TNF-R1 zum angegebenen Zeitpunkt**  
 Immunreaktivität in den MMC-Plakoden (P) und im Kontrollrückenmark (K); NE=Neuroepithel, MNE= Mediales Neuroepithel, LNE= Laterales Neuroepithel, VH= Vorderhorn, IG = Intermediäres Grau, HH = Hinterhorn, CA= Commissura alba anterior, FV = Funiculus ventralis, FL = Funiculus lateralis, FD = Funiculus dorsalis; + ++= sehr starke Immunreaktivität, ++= starke Immunreaktivität, += mäßige Immunreaktivität, 0 = schwache Immunreaktivität/Hintergrundfärbung, - = keine Färbung

		Matrixzone			Mantelzone						Marginalzone							
		K	P		K			P			K				P			
Zytokine	Zeitpunkt	NE	MNE	LNE	VH	IG	HH	VH	IG	HH	CA	FV	FL	FD	CA	FV	FL	FD
IL-1β	E22	0	++	++	+	0	0	++	++	++	0	0	0	0	+	+	+	+
IL-1-RI	E16	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
IL-1-RI	E22	+	+	++	0	0	0	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	++
TNF-α	E22	+	0	+	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+
TNF-R1	E22	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++

Die Mantelzone betrachtend fand sich derselbe mediolaterale Gradient wie für NeuN. So waren lateral befindliche Zellen am Übergang zwischen Mantel- und Marginalzone am stärksten gefärbt. Hervorzuheben waren wie auch für NeuN die Motoneurone des Vorderhorns sowie die Zellen in der äußersten Zone des Hinterhorns. In der Marginalzone fanden sich vereinzelt angefärbte Fasern von Nervenzellen. Ins Auge fielen die aussprossenden Axone der Motoneurone des Vorderhorns. Auch im lateralen und dorsalen Funiculus ließen sich gefärbte, zur Mantelzone reichende Fasern erkennen.

In der Matrixzone des Plakodengewebes fand sich zum Zeitpunkt E16 eine stärkere Färbung als im Kontrollgewebe (s. Tabelle 16). Die Mantel- und Marginalzone betrachtend fand sich zum Kontrollgewebe kein Unterschied in der Immunoreaktivität für NF200kD (s. Tabelle 17, 18, Abb. 14 E-H).

### ***Nestin***

In der Matrixzone fand sich eine sehr starke Anfärbung mit Nestin (s. Tabelle 16). Diese war in der Membrana limitans interna zu erkennen und umringte die Zellkerne im Neuroepithel. Von dort ausstrahlend durchzogen Nestin-positive Fasern die Mantelzone, an welchen sich die Zellkerne der Neurone aufreiheten. In der Marginalzone bildeten diese Fasern ein Netz, welches in der Commissura alba anterior besonders dicht erschien (s. Abb. 14 J).

Die Matrix- und Marginalzone betrachtend fand sich in der Plakode zum Kontrollgewebe kein Unterschied und auch in der Mantelzone zeigte sich in den ventralen Anteilen ein ähnliches Bild wie im Kontrollgewebe (s. Abb. 14 I-L). Im Bereich des intermediären Graus und des Hinterhorns verlor sich die typische Anordnung der Faserzüge. Hier zeigten sich von Nestinfasern umgebene Zellkerne und die Plakode erhielt ein Honigwaben-artiges Aussehen.

### ***Vimentin***

Für Vimentin fand sich zum Zeitpunkt E16 im Kontrollgewebe ein ähnliches Bild wie in Nestin-gefärbten Präparaten (s. Abb. 14 M, N). Es fand sich eine deutliche Anfärbung der Membrana limitans interna (s. Abb. 14 m'). Von dort umringte die Färbung die Zellkerne des Neuroepithels und verjüngte sich in Fasern, welche die Mantelzone durchzogen. Die Vimentinfasern der Mantelzone wirkten schmäler, akzentuierter und nicht so dicht gepackt wie jene Fasern der Nestin-gefärbten Präparate. Im Unterschied zur Färbung mit Nestin wiesen auch die Zellkerne der Neurone der Mantelzone eine leichte, gleichmäßige Färbung auf. Auch in der Marginalzone waren Vimentin-positive Fasern zu erkennen (s. Abb. 14 n'). Diese waren radiär akzentuiert und bildeten kein Netz

wie jene Nestin-positiven Fasern. Auch die Commissura alba anterior wies eine deutliche Färbung auf (s. Abb. 14 N).

In der Plakode bot sich wiederum ein ähnliches Bild wie in der Kontrolle (s. Abb. 14 O, P). Lediglich in den lateralen Anteilen der Plakode verlor sich die typische, faserartige Anordnung zugunsten eines Honigwaben-artigen Musters, wie es auch in den Nestin-gefärbten Präparaten erkennbar war.

### ***Iba-1***

Die Anfärbung mit Iba-1 zeigte sich in der Matrixzone des Kontrollgewebes schwach. Die Mantel- und die Marginalzone betrachtend präsentierten sich verstreut angefärbte Perikarya, jeweils ohne Färbung des Nukleus (s. Abb. 14 Q, R). Gehäuft fanden sich Iba-1-positive Zellen am Übergang von Mantel- zu Marginalzone, was besonders im Bereich des Hinterhorns auffällig erschien sowie in der Region lateral der Bodenplatte.

In der Plakode fiel zu diesem Zeitpunkt eine deutlichere Färbung des Neuroepithels als im Kontrollgewebe auf (s. Abb. 14 S, T). Die Mantelzone präsentierte sich wie im Kontrollgewebe. In der Marginalzone fanden sich zusätzlich vereinzelt sternförmige Iba-1-positive Zellen.

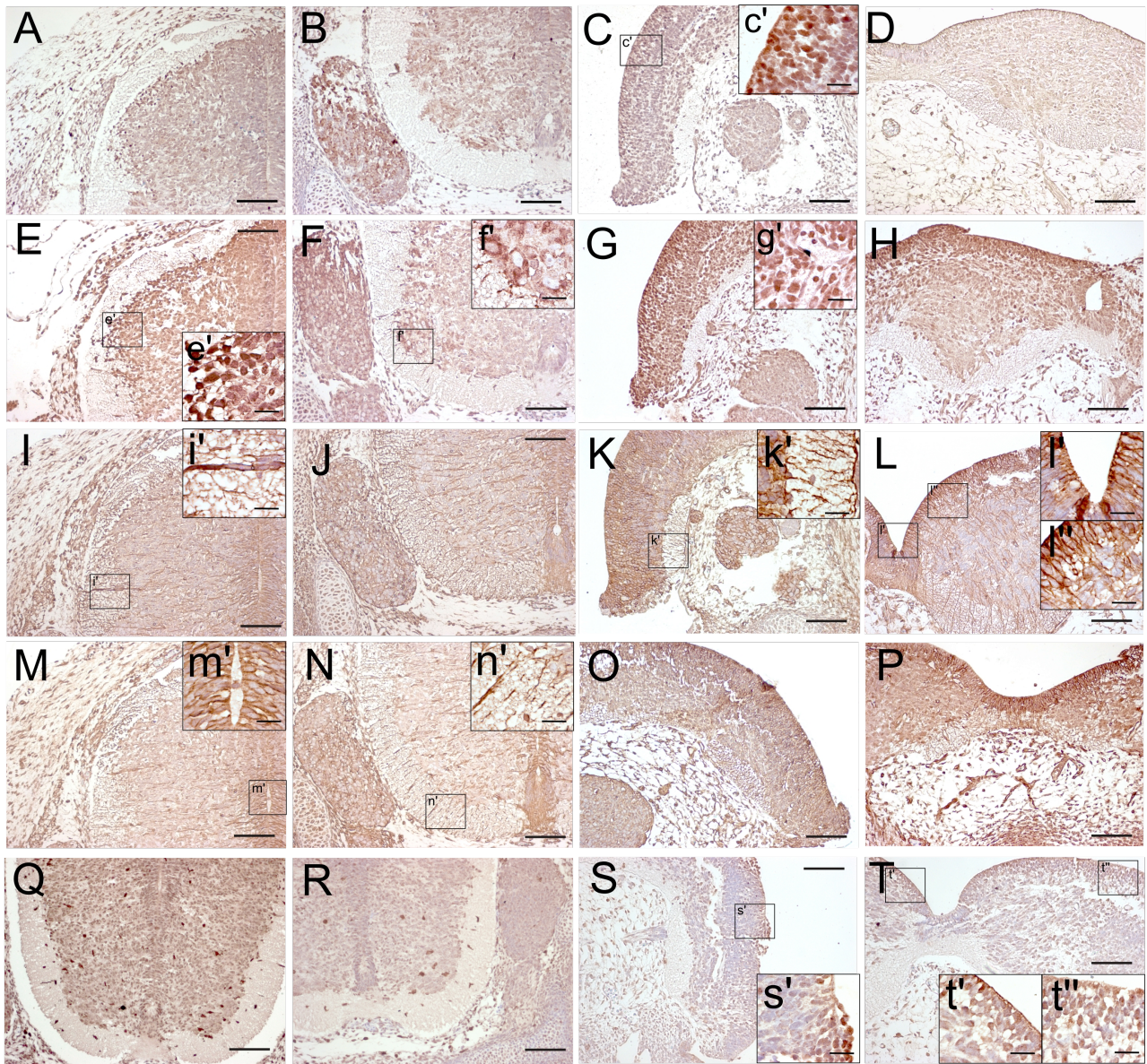


Abbildung 14: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E16.

Zur Bildbeschreibung siehe folgende Seite

Beschreibung zu Abbildung 14 auf S. 70:

Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R) und in MMC-Plakoden (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T) zum Zeitpunkt E16 in transversaler Ebene.

(A)-(D) Färbung mit einem Antikörper gegen NeuN. In (C) und (D) zeigt sich die deutliche Anfärbung der Plakodenoberfläche respektive des Neuroepithels und der Membrana limitans interna, detailliert in (c').

(E)-(H) Färbung mit einem Antikörper gegen NF200kD. In (E) kann man die starke Färbung der Inter- und Relay-Neurone des Hinterhorns erkennen, detailliert in (e'). In (F) zeigt sich der mediolaterale Gradient Immunoreaktivität für NF200kD. Außerdem zu erkennen die deutliche Anfärbung der Motoneurone und derer aussprossender Axone, detailliert in (f'). In (G) und (H) zeigt sich die deutlichere Anfärbung der Matrixzone. Ansonsten bietet die Plakode ein ähnliches Bild wie das Kontrollrückenmark. In (g') zu sehen ist ein erweitertes Blutgefäß.

(I)-(L) Färbung mit einem Antikörper gegen Nestin: In den Kontrollen (I) und (J) mit charakteristischem Faserverlauf. (i') zeigt eine die weiße Substanz durchspannende Nestin-positive Zelle. In der Plakode weicht der charakteristische Faserverlauf in den lateralen Anteilen (K) einer honigwabenartigen Anordnung. In (k') finden sich die von der Mantel- durch die Marginalzone reichenden Fasern, welche in der pialen Oberfläche enden. (l') und (l'') zeigen die deutliche Anfärbung der Membrana limitans interna sowie die von dort die Neuroepithelzellen umringenden Nestin-positiven Fasern.

(M)-(P) Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin. Es zeigt sich im Kontrollgewebe (M, N) ein ähnliches Bild wie für Nestin mit Betonung des Neuroepithels (m'). (n') zeigt die weiße Substanz durchziehende Fasern. Auch die Plakode (O, P) präsentiert sich ähnlich der Nestin-gefärbten Schnitte.

(Q)-(T) Färbung mit einem Antikörper gegen Iba-1. In Kontrollgeweben (Q, R) zeigt sich eine schwache Färbung mit einigen Iba-1-positive Zellen. In der Plakode findet sich eine Betonung der Plakodenoberfläche, detailliert in (s', t' und t'').

Maßstabsskala und Vergrößerung: (A - T): 100µm, 10er-Vergrößerung, (a' - t'/t''): 20µm, 63er-Vergrößerung.

### 3.2.2.2 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E18

#### NeuN

Die Färbung des Kontrollrückenmarks präsentierte sich zu diesem Zeitpunkt wie schon zum Zeitpunkt E16 (s. Abb. 15 A,B). Lediglich wiesen die Zellen z.T. ein differenzierteres Erscheinungsbild auf.

In der Matrixzone des Plakodengewebes fand sich im Vergleich zum Kontrollgewebe und im Vergleich zu E16 eine deutliche Anfärbung für NeuN (s. Tabelle 16, Abb. 15 C, D). Die Membrana limitans interna zeigte sich medial als klare Linie mit stark gefärbten neuroepithelialen Zellen. Aber auch lateral, wo sich die Membrana limitans interna verlor, fanden sich die oberflächlichen Zellreihen stark angefärbt. Die Färbung der Mantelzone und der Marginalzone präsentierte sich in der Plakode zu E18 ähnlich der im Kontrollgewebe.

#### NF200kD

Die Färbung des Kontrollrückenmarks präsentierte sich zu diesem Zeitpunkt wie schon zum Zeitpunkt E16 (s. Abb. 15 E, F). Lediglich wiesen die Zellen z.T. ein differenzierteres Erscheinungsbild auf.



In der Matrixzone des Plakodengewebes fand sich wie schon zum Zeitpunkt E16 eine stärkere Färbung als im Kontrollgewebe (s. Tabelle 16, Abb. 15 G, H). Die Mantel- und Marginalzone betrachtend fand sich zum Kontrollgewebe kein Unterschied.

### ***Nestin***

Das Bild, das sich zum Zeitpunkt E18 bei Färbungen mit Nestin im Kontrollrückenmark zeigte, ähnelte jenem von E16 (s. Abb. 15 I, J). Im Vergleich zu E16 wirkten die Fasern feiner. Außerdem waren sie strenger in radiärer Richtung und weniger netzartig angeordnet. Im Bereich der glialen Grenzmembran und der Pia Mater zeigte sich eine vermehrte Färbung mit akzentuierten, dunklen Zellkernen.

Die Plakode betrachtend stellte sich die Färbung (s. Abb. 15 K, L) wie im Kontrollgewebe dar.

### ***Vimentin***

Die Färbung für Vimentin zeigte sich im Kontrollgewebe zum Zeitpunkt E18 unverändert zu E16 (s. Abb. 15 M, N).

Die Plakode betrachtend stellte sich die Färbung der Matrixzone wie im Kontrollgewebe dar. In der Mantel- und Marginalzone erschien die Färbung diffuser (s. Abb. 15 O, P).

### ***Iba-1***

Die Anfärbung mit Iba-1 zeigte sich in der Matrixzone des Kontrollgewebes mäßig ausgeprägt (s. Abb. 15 Q, R). An der Grenze zur Mantelzone, der Membrana limitans externa fanden sich vereinzelt stark gefärbte Zellen mit langen Zellausläufern sowie kleinere Zellen in Spindel- oder Dreiecksform. An der Grenze von Mantel- zu Marginalzone fanden sich wieder vereinzelt die zuvor beschriebenen, stark gefärbten Zellen mit langen Zellausläufern. In der Marginalzone selbst ließen sich langgestreckte Zellen erkennen (s. Abb. 15 q').

In der Plakode fiel zu diesem Zeitpunkt eine starke Färbung des Neuroepithels auf mit Betonung der Membrana limitans interna. Die Mantelzone zeigte generell eine stärkere Färbung als das Kontrollgewebe (s. Abb. 15 S, T). Verteilt in ihr fanden sich Zellen mit bizarr geformten Zellausläufern. Diese fanden sich ebenso beidseits lateral der Commissura alba anterior. In der Marginalzone zeigten sich stark gefärbte, runde bis längliche Zellen, z.T. mit Zellausläufern (s. Abb. 15 s', t').

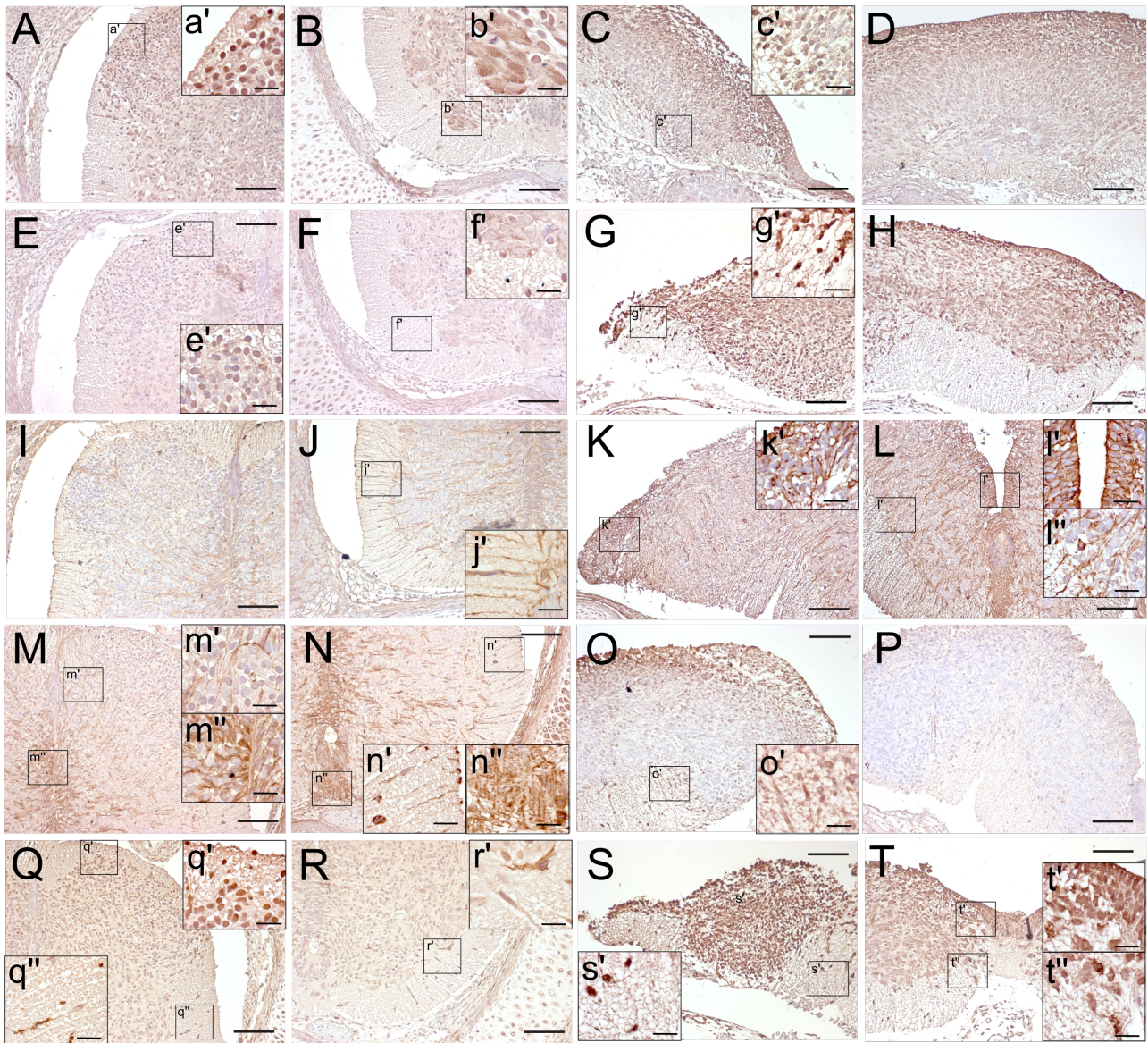


Abbildung 15: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E18.

Zur Bildbeschreibung siehe folgende Seite

### 3.2.2.3 Expression der Gewebemarker zum Zeitpunkt E22

#### NeuN

In der Matrixzone des Kontrollrückenmarks präsentierte sich die Färbung von NeuN zu diesem Zeitpunkt schwach (s. Abb. 16 A, B). In der Mantelzone fand sich die charakteristische Anfärbung der Neurone. Die Fasern der Marginalzone zeigten sich mäßig gefärbt. In diese eingebettet fanden sich im lateralen Funiculus Kerngebiete mit stark gefärbten Neuronen.

In der Plakode fand sich ein dem Kontrollgewebe ähnliches Färbeverhalten. Lediglich erschien die Färbung diffuser (s. Abb. 16 C, D).



Beschreibung zu Abbildung 15 auf S. 73:

Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R) und in MMC-Plakoden (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T) zum Zeitpunkt E18 in transversaler Ebene.

(A)-(D) Färbung mit einem Antikörper gegen NeuN. Es findet sich eine deutliche Anfärbung von Neuronen des Hinterhorns (a', c') und der Motoneurone des Vorderhorns (b'). In (C) und (D) zeigt sich die deutliche Anfärbung der Plakodenoberfläche respektive des Neuroepithels und der Membrana limitans interna.

(E)-(H) Färbung mit einem Antikörper gegen NF200kD. In (E) und (e') kann man die starke Färbung der Inter- und Relay-Neurone des Hinterhorns erkennen sowie in (f') der Motoneurone und derer aussprossender Axone. In (G) und (H) zeigt sich die deutlichere Anfärbung der Matrixzone. In (g') zu sehen ist die deutliche Färbung einiger kleiner Zellen am Übergang zwischen weißer und grauer Substanz.

(I)-(L) Färbung mit einem Antikörper gegen Nestin: In den Kontrollen (I), (J) zeigt sich der schon von E16 bekannte Faserverlauf. (j') zeigt den Rand der Mantelzone und einige Nestin-positive Zellen, die von dort die weiße Substanz durchspannen. In der Plakode findet sich ein ähnliches Bild wie in den Kontrollen. (k') zeigt von der Plakodenoberfläche ins Innere ziehende Nestin-positive Fasern. (l') zeigt die deutliche Anfärbung der Membrana limitans interna sowie die von dort die Neuroepithelzellen umringenden Nestin-positiven Fasern. In (l'') sieht man Fasern, welche von Mantel- zu Marginalzone ziehen.

(M)-(P) Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin. Es zeigt sich im Kontrollgewebe (M, N) ein ähnliches Bild wie für Nestin mit Betonung des Neuroepithels (m''). (n') zeigt die weiße Substanz durchziehende Fasern und (n'') sich kreuzende Fasern im Bereich der Commissura alba anterior. Auch die Plakode (O, P) präsentiert sich ähnlich der Nestin-gefärbten Schnitte, jedoch wirkt die Färbung deutlich diffuser.

(Q)-(T) Färbung mit einem Antikörper gegen Iba-1. In Kontrollgeweben (Q, R) zeigt sich eine schwache Färbung mit einigen Iba-1-positive Zellen. (q') zeigt einige Iba-1-positive Zellen im Bereich des Hinterhorns sowie an der glialen Grenzmembran der Rückenmarksoberfläche. (r') zeigt eine Iba-1 positive Zelle am Rande des Vorderhorns. In der Plakode (S, T) findet sich eine Betonung der Plakodenoberfläche, detailliert in (t''). (s') und (t') zeigen einige Iba-1-positive Zellen in der weißen Substanz.

Maßstabsskala und Vergrößerung: (A - T): 100µm, 10er-Vergrößerung, (a' - t'/t''): 20µm, 63er-Vergrößerung.

## **NF200kD**

In der Matrixzone des Kontrollrückenmarks präsentierte sich die Färbung von NF200kD zu diesem Zeitpunkt mäßig ausgeprägt. In der Mantelzone hervorzuheben warne wie auch an Tag E16 und E18 die Motoneurone des Vorderhorns (s. Abb. 16 F, f') sowie die kleinen Interneurone des Hinterhorns (s. Abb. 16 E, e'). Darüber hinaus zeigten sich auch im intermediären Grau und im lateralen Funiculus mittelgroße Neurone mit deutlich gefärbtem Zytoplasma sowie kleine runde Neurone, welche in Gänze dunkel gefärbt waren. In der Marginalzone fanden sich vereinzelt angefärbte Fasern von Nervenzellen.

In der Matrixzone des Plakodengewebes fand sich zum Zeitpunkt E22 medial eine schwache Färbung (s. Tabelle 16, Abb. 16 G, H). Die Zellen der Mantelzone wiesen im Vergleich zum Kontrollgewebe eine plumpere Form mit weniger stark gefärbten Perikarya und kleineren Zellausläufern auf (s. Abb. 16 h'). Die Marginalzone betrachtend fand sich zum Kontrollgewebe kein Unterschied.

## **Nestin**

Das Bild, das sich zum Zeitpunkt E22 bei Färbungen mit Nestin im Kontrollrückenmark zeigte, war ein gänzlich anderes als zu den Zeitpunkten E16 und E18. Die Fasern, welche zu den vorherigen

Zeitpunkten von der Membrana limitans interna bis zur Rückenmarksoberfläche ziehend zu erkennen gewesen waren, waren zu E22 nicht mehr ersichtlich. Es fand sich eine schwache Färbung der Matrix-, Mantel- und Marginalzone, welche keine radiäre Komponente aufweist (s. Tabelle 16, 17, 18, Abb. 16 M, N). Vereinzelt zeigten sich in der Mantelzone kleine Zellen mit dunkel gefärbtem Zytoplasma.

Die Plakode betrachtend zeigte sich zu E22 ein ähnliches Bild wie zum Zeitpunkt E18, welches somit vom Kontrollgewebe divergierte. Die Membrana limitans interna wies eine mäßige Färbung auf. In der Mantelzone waren wie zum Zeitpunkt E18 noch radiäre Fasern zu sehen, jedoch waren diese nur in den nach ventral gerichteten Teilen der Mantelzone noch deutlich zu erkennen. Dort fanden sich ebenso mittelgroße Zellen mit ungefärbtem Kern, deren lange Ausläufer dunkel gefärbt waren (s. Abb. 16 K, L). In der Marginalzone waren radiäre Fasern ersichtlich, die z.T. von kleinen polymorphen Zellen begleitet wurden.

### ***Vimentin***

Vom Zeitpunkt E18 zu E22 war im Kontrollrückenmark ein ähnlicher Rückgang der Immunoreaktivität für Vimentin zu erkennen wie für Nestin (s. Tabelle 16, 17, 18). Die Fasern, welche sich zu den vorherigen Zeitpunkten von der Membrana limitans interna bis zur Rückenmarksoberfläche erstreckt hatten, zeigten sich zum Zeitpunkt E22 nur noch vereinzelt. Weiterhin sehr stark gefärbt war die Matrixzone, die ventrale sowie die dorsale Kommissur (s. Abb. 16 m', m'', n').

In der Plakode war vordergründig die weiterhin starke Färbung der Marginalzone auffällig, welche sich in den Kontrollgeweben von E18 zu E22 verloren hatte (s. Abb. 16 O, P). Es waren radiäre Fasern zu erkennen, die z.T. von kleinen polymorphen Zellen begleitet werden. Deutlich angefärbt war zudem die Plakodenoberfläche ventral wie dorsal. In der Mantelzone waren, abweichend zum Kontrollrückenmark, wie zum Zeitpunkt E18 noch radiäre Fasern zu sehen, jedoch waren diese nur in den nach ventral gerichteten Teilen der Mantelzone klar abgrenzbar. Dort fanden sich wie in den Nestin-gefärbten Präparaten mittelgroße Zellen mit ungefärbtem Kern und langen Ausläufern.

### ***Iba-1***

Die Anfärbung mit Iba-1 zeigte sich in der Matrixzone des Kontrollgewebes mäßig ausgeprägt. Es fanden sich um den Zentralkanal vereinzelt kleine, runde Zellen mit starker Färbung (s. Abb. 16 Q, R, r'). Diese kleinen Zellen waren ebenso verstreut in der Mantelzone zu finden. Ansonsten wies diese ein schwach gefärbtes Erscheinungsbild auf (s. Tabelle 17).

In der Plakode zeigte sich eine mäßig gefärbte Matrixzone mit einzelnen stark gefärbten Zellen (s. Abb. 16 T, t'). Die Mantelzone wies in Gänze eine ähnliche starke Grundfärbung auf wie das Kontrollgewebe. In höherer Vergrößerung zeigten sich jedoch zahlreiche dunkle, mittelgroße Zellen. Einige von ihnen wiesen multiple Zellausläufer auf, andere hatten eine ovale Form. Beidseits lateral der Bodenplatte sowie an der Grenze zwischen Mantel- und Marginalzone fanden sich diese Zellen vermehrt. Die Marginalzone zeigte sich stark gefärbt. In ihr fielen viele kleine, sehr dunkle Zellen auf (s. Abb. 16 t'). Im lateralen Funiculus waren zudem einige Zellen mit größeren Perikarya zu sehen.

*Beschreibung zu Abbildung 16 auf S. 77:*

*Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R) und in MMC-Plakoden (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T) zum Zeitpunkt E22 in transversaler Ebene.*

*(A)-(D) Färbung mit einem Antikörper gegen NeuN. In (d') ist die schwache Anfärbung des Neuroepithels zu erkennen.*

*(E)-(H) Färbung mit einem Antikörper gegen NF200kD. In (E) kann man die starke Färbung der Inter- und Relay-Neurone des Hinterhorns erkennen, detailliert in (e'). In (f') zu erkennen ist die deutliche Anfärbung der Motoneurone und derer aussprossender Axone. In (h') findet sich die Färbung der Plakodenoberfläche. (h'') zeigt eine Vorderhornzelle, welche plumper wirkt als jene im Kontrollgewebe.*

*(I)-(L) Färbung mit einem Antikörper gegen Nestin: In den Kontrollen (I), (J) sind keine Fasern mehr ersichtlich. In der Plakode hingegen (K), (L) zeigt sich ein Muster, welches dem von E18 gleicht. lediglich wirkt die Färbung diffuser.*

*(M)-(P) Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin. Es zeigt sich im Kontrollgewebe (M, N) ein Verlust der Fasern im Vergleich zu E18. Lediglich im Bereich der Matrixzone (m'), der ventralen (n') und dorsalen Kommissur (m') sowie an der Rückenmarksoberfläche (n') finden sich noch Vimentin-positive Bereiche. In der Plakode (O, P) zeigt sich kein vergleichbarer Rückgang der Immunoreaktivität. Im Vergleich zu E18 wirkt die Färbung jedoch diffuser.*

*(Q)-(T) Färbung mit einem Antikörper gegen Iba-1. In Kontrollgeweben (Q, R) zeigt sich eine schwache Färbung mit einigen Iba-1-positive Zellen (r'). In der Plakode (S, T) finden sich immunoreaktive Zelle für Iba-1 an der Plakodenoberfläche (t') und in der weißen Substanz (t'').*

*Maßstabsskala und Vergrößerung: (A - T): 100µm, 10er-Vergrößerung, (a' - t'/t''): 20µm, 63er-Vergrößerung.*

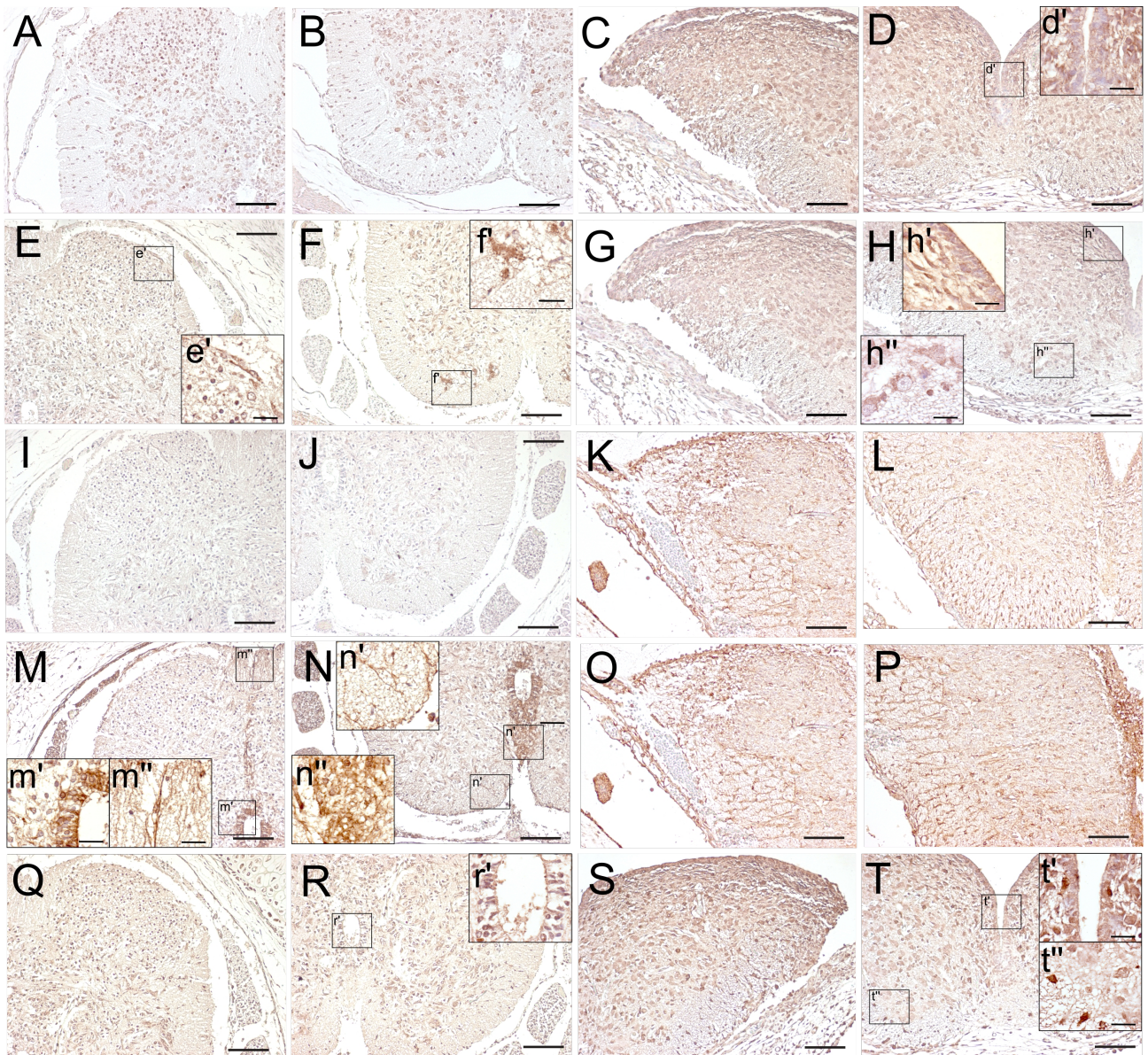


Abbildung 16: Immunhistochemisches Expressionsmuster struktureller Marker im Kontrollrückenmark zum Zeitpunkt E22.

Zur Bildbeschreibung siehe vorherige Seite



### 3.3 Charakterisierung der Schadenskaskade

Zur Charakterisierung der Schadenskaskade wurde das Tiermaterial per RT-PCR auf den Gehalt an mRNA verschiedener Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$ , TNF-R1, CXCL12, CXCR4, CX3CL1, CX3CR1) untersucht. Aus den mittels RT-PCR ermittelten  $C_T$ -Werten wurden  $\Delta C_T$ -Werte bestimmt. Diese wurden daraufhin entlogarithmiert, um auf die Expression  $E$  rückschließen zu können. Um die Expression verschiedener Gruppen oder Zeitpunkte vergleichen zu können, erfolgte zusätzlich die Berechnung des n-fachen Expressionsunterschieds  $f$  (alle hierfür verwendeten Formeln finden sich unter 2.2.2.5).

Um die Schadenskaskade histologisch aufzuarbeiten, erfolgten immunhistochemische Färbungen für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$  und TNF-R1. Die Auswertung der DAB-Färbungen erfolgte sowohl qualitativ als auch semiquantitativ mithilfe einer zuvor definierten Punkteskala zwischen minus Eins und plus Drei (s. Tabelle 19). Durch daraufhin durchgeführte Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnten die Expressionsmuster der Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-1RI, TNF- $\alpha$  und TNF-R1) weiter aufgeschlüsselt und Koexpressionen der Zytokine mit strukturellen Markern dargestellt werden. Als strukturelle Primärantikörper kamen hierbei NeuN, NF200, Nestin, Vimentin, GFAP und Iba-1 zur Anwendung.

#### 3.3.1 IL-1 $\beta$

##### 3.3.1.1 PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  war an Tag E22 signifikant erhöht nachweisbar im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 0,0063$ , Plakode vs. Kontrolle). An Tag E16 und E18 zeigten sich keine Unterschiede zwischen MMC-Tieren und den Kontrollen.

Die Tiere der Kontrollgruppe betrachtend fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=1,073$ ) über E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=0,592$ ) zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=0,318$ ) eine Abnahme der Expression von IL-1 $\beta$  statt. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,552$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,356$ .

Der Expressionsverlauf in den Plakoden stellte sich gegensätzlich dar ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=0,884$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E18})=0,905$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E22})=1,957$ ). Fanden sich zu E16 noch ähnliche Expressionslevel wie im Kontrollrückenmark ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=0,824$ ), kam es im Weiteren zu einer Zunahme der Expression von IL-1 $\beta$  im Plakodengewebe. Zum Zeitpunkt E22 lag eine um den Faktor  $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=5,131$  erhöhte Expression gegenüber der Kontrollgruppe vor, welche statistisch signifikant war ( $p = 0,0063$ , Plakode vs. Kontrolle).

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend lag im Vergleich zu den Kontrollen zu E16 und E18 eine verminderte Expression vor ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=0,288$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=0,686$ ). Wo in den Kontrolltieren zu E22 jedoch ein Abfall der Expression zu beobachten war, fand sich wie in den Plakoden auch im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere eine gesteigerte Expression im Vergleich zur Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=3,153$ ). Diese war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in der Plakode selbst ( $f_{\text{PversusRM}}=1,628$ ).

*Tabelle 20, IL-1 $\beta$ : Entlogarithmierte  $\Delta\text{CT}$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ ). RM= Rückenmark, P=Plakode*

	Kontrolle – RM			MMC – P			MMC – RM		
Zeitpunkt	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$	1,450	0,842	0,497	0,438	1,631	1,552	0,173	0,387	0,861
mit: $E = 2^{-\Delta\text{CT}}$	1,305	0,552	0,187	0,700	0,877	2,913	0,447	0,471	0,709
	0,473	0,990	0,189	2,941	0,826	1,732	0,182	0,407	1,666
	1,063	0,305	0,441	0,135	0,709	1,608	0,533	0,237	1,433
		0,426	0,593	0,205	0,481	1,979	0,210	0,530	1,344
		0,438							
$E_{\text{mean}}$	1,073	0,592	0,381	0,884	0,905	1,957	0,309	0,406	1,203
$f_{16}$		0,552	0,356		1,024	2,214		1,315	3,892
$f_{\text{PversusK}}$				0,824	1,528	5,131			
$f_{\text{RMversusK}}$							0,288	0,686	3,153
$f_{\text{PversusRM}}$				2,857	2,224	1,628			

### 3.3.1.2 IHC-Analyse

Im Kontrollgewebe präsentierten sich die Immunoreaktivität für IL-1 $\beta$  schwach in Matrix-, Mantel- und Marginalzone zum Zeitpunkt E22. Lediglich im Vorderhorn fanden sich IL-1 $\beta$  positive Zellen (s. Abb. 17A). Im Plakodengewebe zeigte sich, verglichen mit den Kontrollen eine starke Färbung in Matrix-, Mantel- und Marginalzone (s. Abb. 17B & C). In der Marginalzone fanden sich mittelgroße Zellen mit hoher Immunoreaktivität. (s. Tabelle 19)

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigte in der Marginalzone der Plakode zum Zeitpunkt E22 (s. Abb. 19A) eine Koexpression von Iba-1 und IL-1 $\beta$ . Auch fand sich eine Koexpression mit NeuN.

### 3.3.2 IL-1RI

#### 3.3.2.1 PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von IL-1RI war im Plakodengewebe an Tag E16 ( $p = 0,038$ , Plakode vs. Kontrolle) und E22 ( $p = 0,0041$ , Plakode vs. Kontrolle) signifikant erhöht nachweisbar im Vergleich zu Kontrollen. An Tag E18 fanden sich keine Unterschiede zwischen MMC-Tieren und Kontrollen. Die Tiere der Kontrollgruppe betrachtend fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=2,618$ ) über E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=1,961$ ) zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=1,467$ ) eine Abnahme der Expression von IL-1RI statt. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,749$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,560$ .

In den Plakoden zeigte sich von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=8,913$ ) zu E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=5,38$ ) eine Abnahme ( $f_{16}(\text{E18})=0,604$ ) der Expression. Von E18 zu E22 zeigte sich das Expressionsniveau stabil ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=5,784$ ;  $f_{16}(\text{E22})=0,649$ ). Plakoden- und Kontrollrückenmarksgewebe vergleichend stellte sich an allen drei Zeitpunkten in den Plakoden ein erhöhtes Expressionslevel dar ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=3,404$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E18})=2,746$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=3,943$ ), welches an E16 und E22 statistisch signifikant war (s.o.).

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend lag im Vergleich zu den Kontrollen zu E16 eine verminderte Expression ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=0,771$ ) und zu E18 ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=1,595$ ) und E22 ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=1,410$ ) eine gesteigerte Expression vor. Im Verlauf stellte sich im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere von E16 zur E18 ein Anstieg ( $f_{16}(\text{E18})=1,551$ ) und von E18 zu E22 ein Abfall des Expressionslevels zurück auf das E16-Niveau ( $f_{16}(\text{E22})=1,025$ ) dar.

Tabelle 21, IL-1RI: Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte (E), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ), n-facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ), n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ), n-facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ), n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ ). RM= Rückenmark, P=Plakode.

Zeitpunkt	Kontrolle – RM			MMC – P			MMC – RM		
	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$ mit: $E = 2^{-\Delta CT}$	4,459	3,314	2,921	13,624	12,140	6,653	2,295	3,209	1,632
	0,950	1,817	0,572	3,573	3,707	5,940	1,923	4,371	1,331
	0,816	0,979	0,403	13,636	3,031	5,951	2,217	3,761	2,744
	2,261	1,310	1,901	4,111	2,661	7,551	1,689	2,684	2,433
	4,605	2,383	1,538	9,623		3,306	1,963	1,615	2,199
						5,303			
$E_{\text{mean}}$	2,618	1,961	1,467	8,913	5,38	5,784	2,017	3,128	2,068
$f_{16}$		0,749	0,560		0,604	0,649		1,551	1,025
$f_{\text{PversusK}}$				3,404	2,746	3,943			
$f_{\text{RMversusK}}$							0,771	1,595	1,410
$f_{\text{PversusRM}}$				4,418	1,721	2,797			

### 3.3.2.2 IHC-Analyse

Zu E16 zeigte sich im Kontrollgewebe eine Immunoreaktivität der Zellen der Mantelzone mit Betonung jener im Vorderhorn (s. Abb. 17D) sowie jener in der äußeren Lage des Hinterhorns. In Vergleich dazu fand sich in der Plakode zum Zeitpunkt E16 eine verstärkte Färbung der Vorderhornzellen (s. Abb. 17E) sowie von Zellen an der Grenze zwischen Mantel- und Marginalzone. Ebenso fiel eine verstärkte Färbung der Matrixzone (s. Abb. 17F) auf.

Zu E22 zeigte sich im Kontrollgewebe eine schwache Färbung (s. Abb. 17G) der Zellen der Mantelzone, während sich in der Plakode eine starke Färbung (s. Abb. 17H & I) präsentierte. Auch Zellen des lateralen Neuroepithels sowie der Marginalzone wiesen in der Plakode zum Zeitpunkt E22 eine starke Färbung auf. (s. Tabelle 19)

In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigte sich IL-1RI koexprimiert mit Iba-1 (s. Abb. 19B, C & D) und mit NeuN.



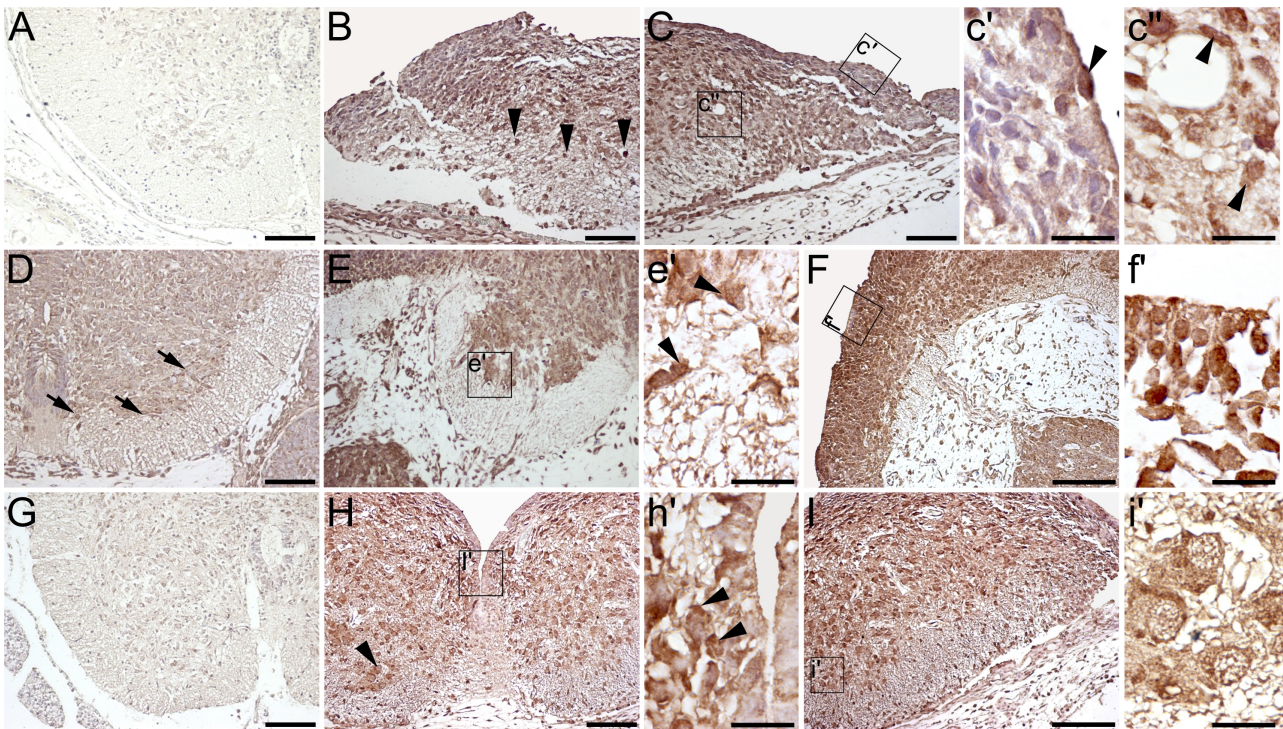


Abbildung 17: DAB-Färbungen mit Fokus auf IL-1 $\beta$  und IL-1RI

(A) Transversaler Schnitt eines Kontrolltiers zum Zeitpunkt E22 ohne nennenswerte Immunoreaktivität für IL-1 $\beta$ . (B) und (C) zeigen MMC-Plakoden zum Zeitpunkt E22 mit IL-1 $\beta$ -positiven Zellen in der weißen Substanz (Pfeilspitzen). (c') und (c'') stellen Details aus (C) dar mit einzelnen IL-1 $\beta$ -positiven Zellen an der Plakodenoberfläche und in der grauen Substanz (Pfeilspitzen). (D) Transversaler Schnitt eines Kontrolltiers zum Zeitpunkt E16 gefärbt mit einem Antikörper gegen IL-1RI. Es zeigt sich eine blasse Färbung im ventralen Aspekt des Rückenmarks (Pfeile). (E) und (F) zeigen MMC-Plakoden zum Zeitpunkt E16 gefärbt mit einem Antikörper gegen IL-1RI: In (E) findet sich ein Schnitt einer MMC mit zellulärer Betonung von IL-1RI in der Grundplatte (Pfeilspitzen und e') und in (F) starke IL-1RI-Färbung an der Plakodenoberfläche in höherer Vergrößerung in (f'). (G) zeigt ein Kontrollrückenmark in transversaler Schnittführung zum Zeitpunkt E22 gefärbt mit einem Antikörper gegen IL-1RI. (H) und (I) zeigen MMC-Plakoden zum Zeitpunkt E22 gefärbt mit einem Antikörper gegen IL-1RI. In (H) finden sich einzelne IL-1RI-positive Zellen im Vorderhorn (Pfeilspitze) sowie unterhalb der Plakodenoberfläche (h'). (I) zeigt die laterale Region der Plakode mit akzentuierter Färbung in der grauen und weißen Substanz, Details des Vorderhorns aus (I) sind gezeigt in (i').

Maßstabsskala: (A - I): 100 $\mu$ m, (c'/c'' - i'): 20 $\mu$ m

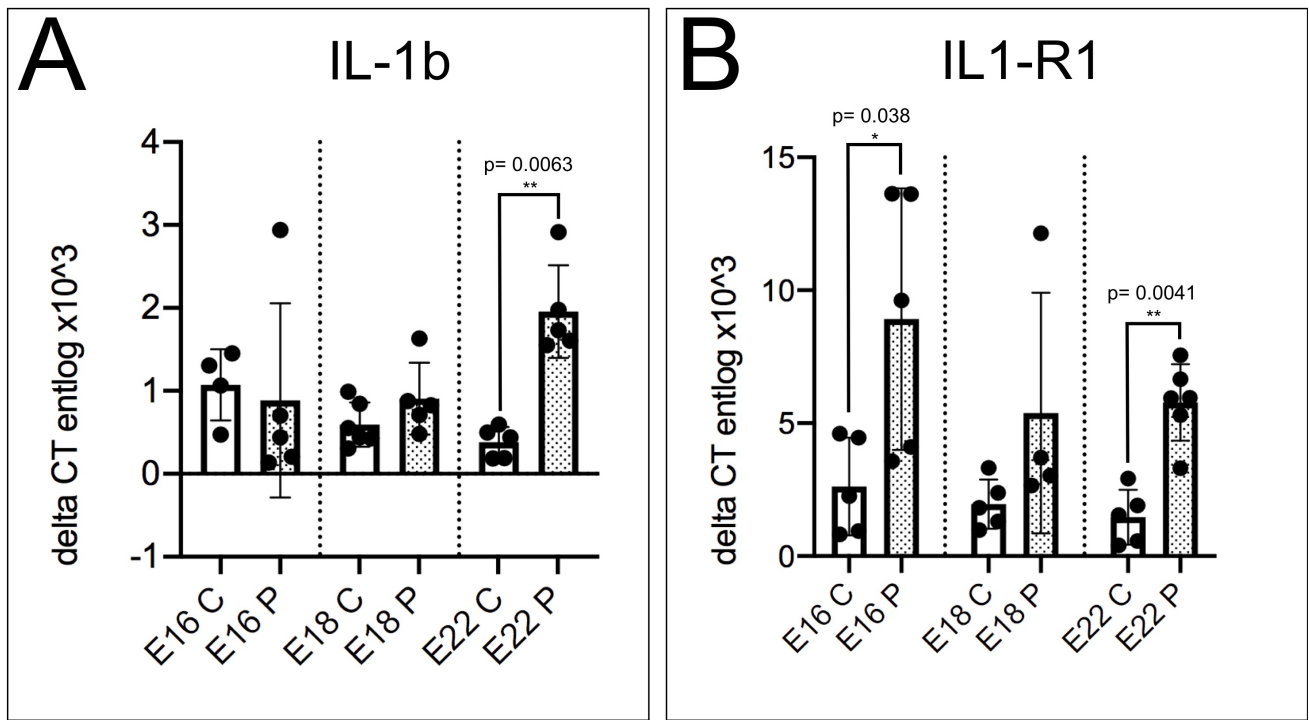


Abbildung 18: Real-time RT-PCR-Ergebnisse für IL-1 $\beta$  (A) und IL-1R1 (B) zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten.

C: Kontrolle. P: Plakode. (A) Signifikante Ergebnisse zu E22 ( $p = 0.0063$ ). (B) Signifikante Ergebnissen zu E16 ( $p = 0.038$ ) und E22 ( $p = 0.0041$ ).

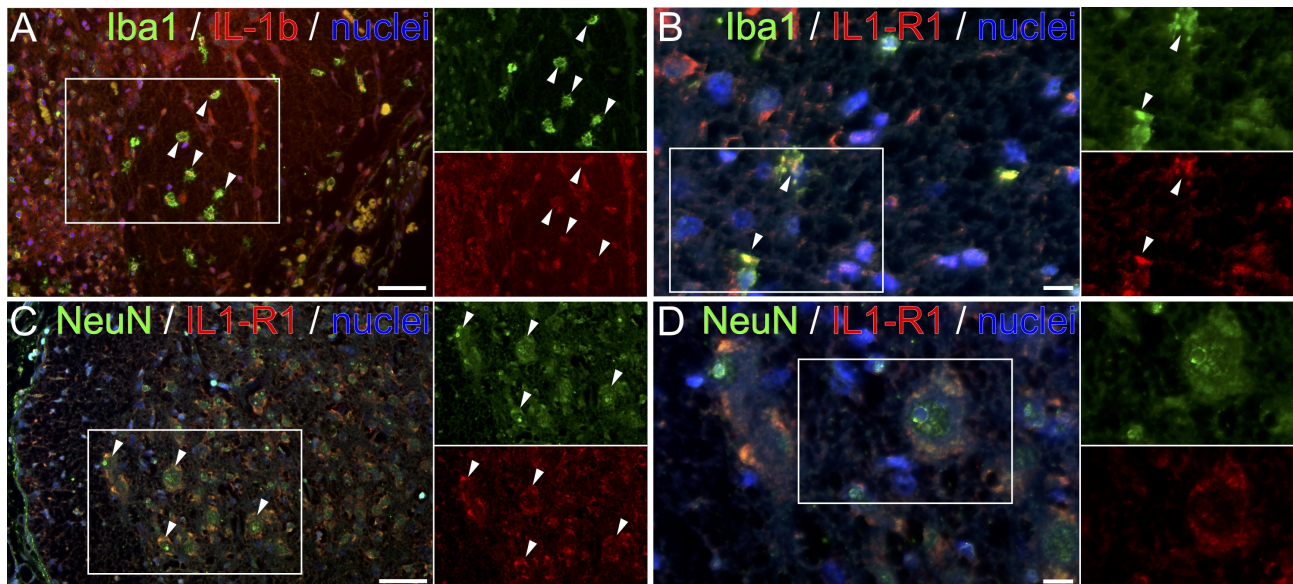


Abbildung 19: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMC-Plakoden mit Fokus auf IL-1 $\beta$  und IL-1R1 Koexpression von Iba-1 mit IL-1 $\beta$  (A) und IL-1R1 (B) sowie von NeuN mit IL-1R1 (C – D) Maßstabsskala: (A) und (C): 50 $\mu$ m. (B) und (D): 10 $\mu$ m.

### 3.3.3 TNF- $\alpha$

#### 3.3.3.1 PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  zeigte sich im Plakodengewebe an Tag E22 signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 0,0314$ , Plakode vs. Kontrolle). Auch an den Tagen E16 und E18 fand sich eine gesteigerte Expression, die jedoch statistisch nicht signifikant war.

Die Tiere der Kontrollgruppe betrachtend fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=0,125$ ) über E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=0,078$ ) zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=0,059$ ) eine Abnahme der Expression von TNF- $\alpha$  statt. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,624$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,469$ .

In den Plakoden fand sich zu allen Zeitpunkten eine gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=5,730$ ,  $f_{\text{PversusK}}(\text{E18})=8,875$ ,  $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=3,616$ ), die jedoch nur an Tag E22 signifikant wurde ( $p = 0,0314$ , Plakode vs. Kontrolle). Den Expressionsverlauf in den Plakoden beschreibend zeigte sich eine Expressionsabnahme über die Zeit ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=0,719$ ,  $E_{\text{mean}}(\text{E18})=0,694$ ,  $E_{\text{mean}}(\text{E22})=0,213$ ).

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend lag im Vergleich zu den Kontrollen zu E16 eine verminderte Expression vor ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=0,351$ ). Im weiteren Verlauf fand sich im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere eine gesteigerte Expression im Vergleich zur Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=3,601$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=1,405$ ). Vergleicht man das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere mit der Plakode, fiel vor allem die gesteigerte Expression an Tag E16 auf ( $f_{\text{PversusRM}}(\text{E16})=16,330$ ).



Tabelle 22,  $TNF-\alpha$ : Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{mean}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{PversusK}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{RMversusK}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{PversusRM}$ )

Zeitpunkt	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$ mit: $E = 2^{-\Delta CT}$	0,182	0,171	0,088	0,282	1,225	0,347	0,062	0,085	0,055
	0,029	0,071	0,023	0,217	1,150	0,113	0,045	0,697	0,040
	0,033	0,009	0,021	1,225	0,948	0,180	0,020	0,550	0,071
	0,177	0,087	0,051	1,150	0,081	0,253	0,027	0,050	0,116
	0,206	0,053	0,111		0,066	0,170	0,066	0,026	0,131
$E_{mean}$	0,125	0,078	0,059	0,719	0,694	0,213	0,044	0,282	0,083
$f_{16}$		0,624	0,469		0,966	0,296		6,400	1,877
$f_{PversusK}$				5,730	8,875	3,616			
$f_{RMversusK}$							0,351	3,601	1,405
$f_{PversusRM}$				16,330	2,464	2,574			

### 3.3.3.2 IHC-Analyse

Im Kontrollgewebe zeigte sich zum Zeitpunkt E22 eine mäßige Immunoreaktivität von neuronalen Zellen (s. Abb. 20C, s. Tabelle 19) des Vorderhorns sowie von vereinzelt Zellen der intermediären Zone. Außerdem fanden sich mäßig gefärbte Zellen im Nucleus dorsolateralis und der äußersten Zone des Hinterhorns. Im Vergleich hierzu fielen in der Plakode an Tag E22 zwei Arten immunoreaktiver Zellen (s. Abb. 20B, s. Tabelle 19) auf. Die erste Gruppe hatte ein rundes, aufgeblasen wirkendes Erscheinungsbild, während die zweite Gruppe klein war und spitze, kurze Zellausläufer vorwies. Auch die Plakodenoberfläche zeigte eine verstärkte Färbung (s. Abb. 20C & c', s. Tabelle 19).

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Plakodengewebe zum Zeitpunkt E22 zeigte eine Kofärbung von  $TNF-\alpha$  und Iba-1 (s. Abb. 22A). Es fanden sich kogefärbte Zellen in der Matrixzone der Plakodenmitte und vereinzelt in der Mantelzone (s. Abb. 22B). Zudem fanden sich positive Zellen für  $TNF-\alpha$  und Vimentin in der Plakode (s. Abb. 22C). Nestin zeigte sich ebenfalls kogefärbt in  $TNF-\alpha$  positiven Zellen, welche die Marginalzone (s. Abb. 22E) der Plakode zum Zeitpunkt E22

durchspannten. Auch an der Grenze zwischen Mantel- und Marginalzone (s. Abb. 22F) fanden sich einzelne Zellen, die immunoreaktiv für Nestin und TNF- $\alpha$  sind.

### 3.3.4 TNF-R1

#### 3.3.4.1 PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von TNF-R1 war im Plakodengewebe an Tag E22 signifikant erhöht nachweisbar im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 0,0242$ , Plakode vs. Kontrolle). An Tag E16 und E18 fanden sich keine Unterschiede zwischen MMC- und Kontrolltieren.

Die Tiere der Kontrollgruppe betrachtend nahm von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=9,267$ ) zu E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=6,764$ ) die Expression von TNF-R1 ab, um dann zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=6,412$ ) auf ähnlichem Niveau zu verbleiben. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,730$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,692$ .

Zu E16 und E18 fanden sich ähnliche Expressionslevel wie im Kontrollrückenmark ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=10,261$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=1,107$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E18})=6,234$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E18})=0,922$ ). Zu E22 zeigte sich ein Anstieg der Expression ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=14,830$ ), so dass im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um den Faktor  $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=2,313$  erhöhte Expression vorlag. Diese war statistisch signifikant ( $p = 0,0242$ , Plakode vs. Kontrolle).

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend lag im Vergleich zu den Kontrollen zu E16 und E18 eine verminderte Expression vor ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=0,611$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=0,712$ ). Zu E22 fand sich die Expression im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere auf einem ähnlichen Niveau ein wie in den Kontrolltieren ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=1,120$ ).

Tabelle 23, TNF-R: Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ )

	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
Zeitpunkt	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$ mit: $E = 2^{-\Delta CT}$	16,332	13,039	9,565	18,572	5,412	15,163	9,197	5,564	6,112
	12,152	12,332	3,106	6,994	6,932	17,579	6,778	6,688	3,742
	2,554	1,887	2,500	14,437	6,359	16,201	4,531	5,795	7,721
	2,541	3,127	7,484	7,500		10,070	6,658	2,340	9,681
	10,780	4,132	9,406	7,267		15,137	1,938	3,689	8,650
	11,243	6,066		6,794			4,852		
$E_{\text{mean}}$	9,267	6,764	6,412	10,261	6,234	14,830	5,659	4,815	7,181
$f_{16}$		0,730	0,692		0,608	1,445		0,851	1,269
$f_{\text{PversusK}}$				1,107	0,922	2,313			
$f_{\text{RMversusK}}$							0,611	0,712	1,120
$f_{\text{PversusRM}}$				1,813	1,295	2,065			

### 3.3.4.2 IHC-Analyse

Im Kontrollgewebe (s. Abb. 20D) präsentierte sich die Immunoreaktivität von TNF-R1 zum Zeitpunkt E22 in Matrix- und Marginalzone vergleichbar mit seinem Ligand TNF- $\alpha$ . In der Mantelzone fand sich zum Zeitpunkt E22 im Kontrollgewebe nur eine mäßige Färbung. Im gesamten Plakodengewebe zeigten sich zu E22 runde Zellen immunoreaktiv für TNF-R1 (s. Abb. 20E). In der Marginalzone präsentierte die Plakode verglichen mit dem Kontrollgewebe eine verstärkte Anfärbung. Hier waren runde, bauchige Zellen zu finden. Des Weiteren waren TNF-R1-positive Endothelzellen zu erkennen. (s. Tabelle 19)

Zellen im Vorderhorn der Plakode zeigen zum Zeitpunkt E22 eine Kofärbung für TNF-R1 und NeuN (s. Abb. 22D). Zusätzlich fand sich Iba-1 kogefärbt mit TNF-R1 in einzelnen Zellen in der Marginalzone im lateralen Teil der Plakode (s. Abb. 22G) sowie in der Mittellinie der (s. Abb. 22H) Plakodenoberfläche.

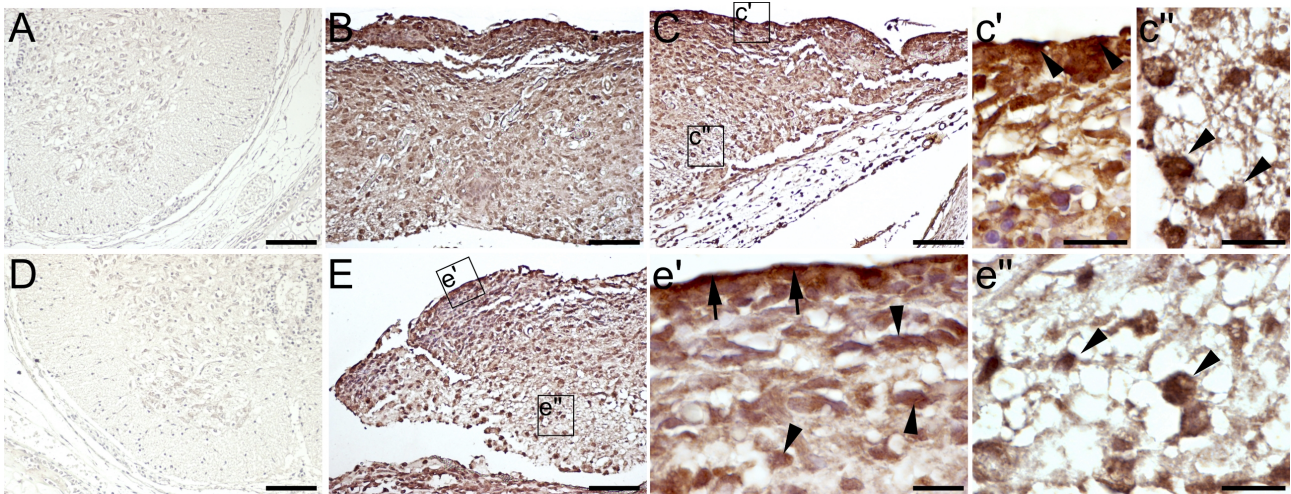


Abbildung 20: DAB-Färbungen mit Fokus auf TNF- $\alpha$  und TNF-R1

(A) Transversaler Schnitt eines Kontrolltiers zum Zeitpunkt E22, in welchem sich lediglich im ventralen Aspekt eine blasse Färbung für TNF- $\alpha$  zeigt. (B) und (C) zeigen MMC-Schnitte zum Zeitpunkt E22 mit TNF- $\alpha$ -positiven Zellen verteilt über den gesamten Durchmesser der Plakode. Details sind gezeigt in (c') an der Plakodenoberfläche und (c'') in der weißen Substanz. (D) Transversaler Schnitt eines Kontrolltiers zum Zeitpunkt E22 gefärbt mit einem Antikörper gegen TNF-R1. (E) zeigt eine Plakode zum Zeitpunkt E22 im transversalen Schnitt. Es finden sich TNF-R1-positive Zellen (e') an der Plakodenoberfläche und (e'') in der weißen Substanz.

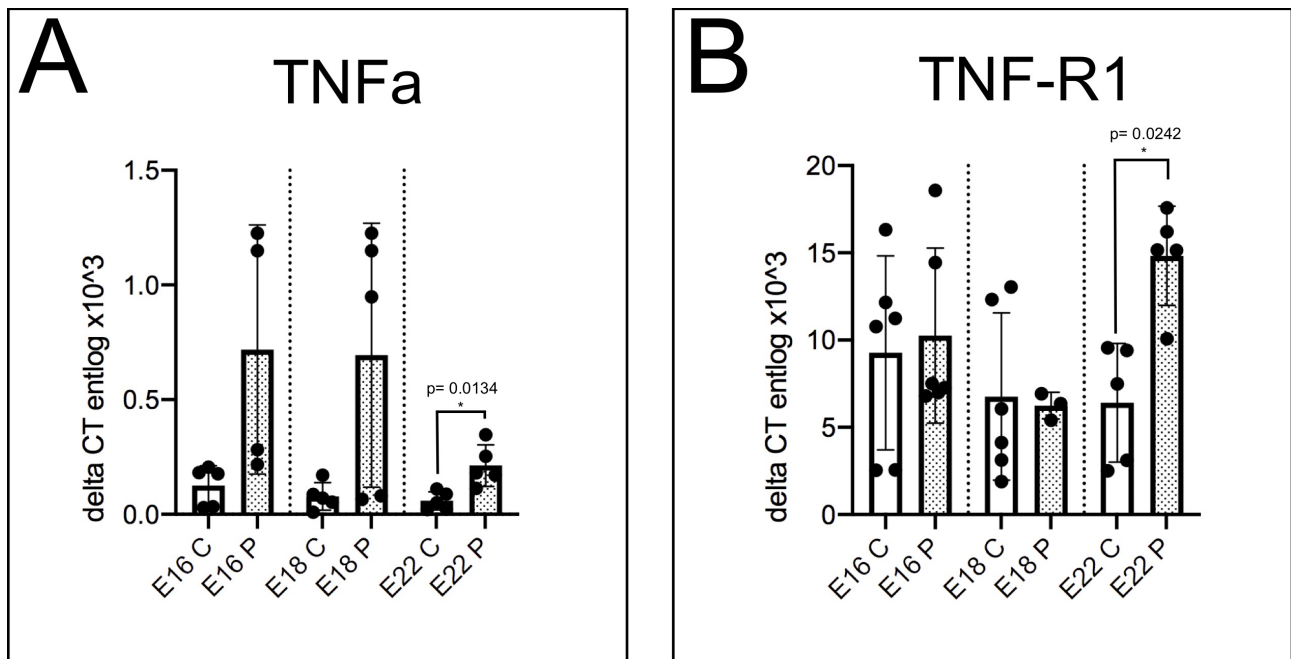


Abbildung 21: Real-time RT-PCR-Ergebnisse für TNF- $\alpha$  (A) und TNF-R1 (B) zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten

C: Kontrolle. P: Plakode. (A) Signifikante Ergebnisse für TNF- $\alpha$  zu E22 ( $p = 0.0134$ ). (B) Signifikante Ergebnisse für TNF-R1 zu E22 ( $p = 0.0242$ ).



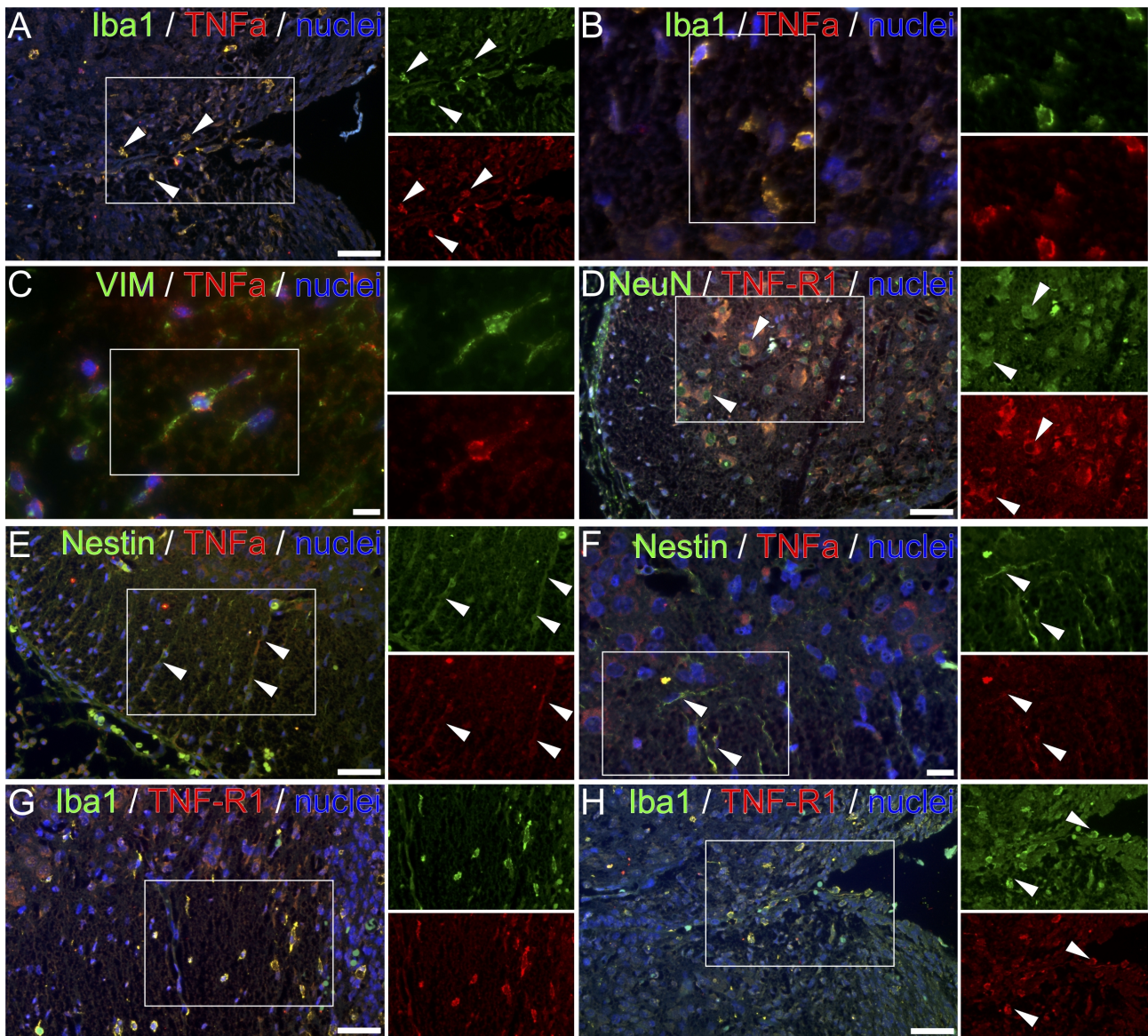


Abbildung 22: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMC-Plakoden mit Fokus auf TNF- $\alpha$  und TNF-R1  
 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMC-Plakoden. Koexpression von TNF- $\alpha$  mit Iba-1 (A und B) und mit Vimentin (C). Darüber hinaus wird TNF- $\alpha$  koexprimiert mit Nestin (E und F) in Zellen, die die weiße Substanz durchspannen, sowie in Zellen am Übergang von grauer zu weißer Substanz. TNF-R1 zeigt eine Kofärbung mit dem neuronalen Marker NeuN (D) in Zellen im anterioren Aspekt der Plakode. (G) In der weißen Substanz und (H) an der Plakodenoberfläche weisen Zellen Kofärbung von Iba-1 und TNF-R1 auf.  
 Maßstabsskala: (A), (D), (E), (G) und (H): 50 $\mu$ m. (F): 20 $\mu$ m. (B) & (C): 10 $\mu$ m.



### 3.3.5 CXCL12

#### 3.3.5.1 PCR-Ergebnisse

Die Expression von CXCL12 betrachtend konnten in den Untersuchung der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

In der Kontrollgruppe fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=38,485$ ) über E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=22,142$ ) zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=18,729$ ) eine Abnahme der Expression von CXCL12 statt. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,575$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,487$ .

Die Expression in den Plakoden ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=43,997$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E18})=27,391$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E22})=23,009$ ) stellte sich im Vergleich zum Kontrollgewebe auf leicht erhöhtem Niveau dar ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=1,143$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E18})=1,237$ ;  $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=1,229$ ). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere lag im Vergleich zu den Kontrollen zu E16 und zu E22 eine verminderte Expression vor ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=0,609$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=0,695$ ). Am Tag E18 fand sich im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ein ähnliches Expressionsniveau wie in den Kontrolltieren ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=0,996$ ).

Tabelle 24, CXCL12: Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ )

Zeitpunkt	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$ mit: $E = 2^{-\Delta CT}$	58,843	44,338	33,989	50,615	30,216	35,922	26,944	27,562	13,078
	13,556	29,785	12,897	46,554	26,694	23,508	33,434	41,156	8,454
	20,660	5,507	9,883	46,982	25,262	20,382	20,090	23,201	16,500
	36,166	16,247	18,011	31,838		12,223	15,359	8,041	13,887
	63,202	10,942	18,864				21,325	10,350	13,118
		26,035							
$E_{\text{mean}}$	38,485	22,142	18,729	43,997	27,391	23,009	23,430	22,062	13,007
$f_{16}$		0,575	0,487		0,623	0,523		0,942	0,555
$f_{\text{PversusK}}$				1,143	1,237	1,229			
$f_{\text{RMversusK}}$							0,609	0,996	0,695
$f_{\text{PversusRM}}$				1,878	1,242	1,769			

### 3.3.6 CXCR4

#### 3.3.6.1 PCR-Ergebnisse

CXCR4 betrachtend konnten in den Untersuchung der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

In der Kontrollgruppe fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=53,987$ ) über E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=32,011$ ) zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=20,683$ ) eine Abnahme der Expression von CXCR4 statt. Dies bedeutet einen Rückgang der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(\text{E18})=0,593$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(\text{E22})=0,383$ .

In den Plakoden nahm die Expression von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=30,034$ ) zu E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=18,926$ ) ab, um zu E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=31,392$ ) wieder anzusteigen. Im Vergleich zum Kontrollgewebe lag zu den Zeitpunkten E16 ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E16})=0,556$ ) und E18 ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E18})=0,591$ ) in der Plakode eine verminderte Expression von CXCR4 vor. Zu E22 stellt sich eine gesteigerte Expression in der Plakode dar ( $f_{\text{PversusK}}(\text{E22})=1,518$ ).

Das Expressionsniveau im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere verhielt sich ähnlich dem der Kontrolltiere. Lediglich zu E16 fand sich eine dezente gesteigerte Expression ( $f_{\text{RMversusK}}(\text{E16})=1,181$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E18})=1,062$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(\text{E22})=0,923$ ).

*Tabelle 25, CXCR4: Entlogarithmierte  $\Delta\text{CT}$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ )*

	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
Zeitpunkt	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$	85,788	62,915	41,666	37,512	25,307	24,915	112,653	37,257	16,613
mit: $E = 2^{-\Delta\text{CT}}$	91,491	45,775	11,569	39,177	23,288	33,850	58,768	40,964	24,329
	25,000	21,446	10,778	14,351	18,943	35,412	63,517	34,419	17,509
	23,217	20,783	15,944	21,473	11,218		58,271	28,768	19,532
	55,914	10,845	23,457	9,151	15,872		38,403	28,572	17,429
	42,514	30,304		58,538			50,994		
$E_{\text{mean}}$	53,987	32,011	20,683	30,034	18,926	31,392	63,768	33,996	19,082
$f_{16}$		0,593	0,383		0,630	1,045		0,533	0,299
$f_{\text{PversusK}}$				0,556	0,591	1,518			
$f_{\text{RMversusK}}$							1,181	1,062	0,923
$f_{\text{PversusRM}}$				0,471	0,557	1,645			

### 3.3.7 CX3CL1

#### 3.3.7.1 PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von CX3CL1 war an Tag E16 im Plakodengewebe verglichen mit den Kontrollen signifikant vermindert nachweisbar ( $p = 0,0348$ , Plakode vs. Kontrolle). An Tag E18 und E22 fanden sich keine Unterschiede zwischen Plakoden- und Kontrollgewebe.

Die Tiere der Kontrollgruppe betrachtend fand von E16 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=0,715$ ) zu E18 ( $E_{\text{mean}}(\text{E18})=0,592$ ) eine Verdreifachung der Expression von CX3CL1 statt ( $f_{16}(\text{E18})=3,510$ ). An E18 und E22 zeigte sich dann ein konstantes Expressionslevel ( $E_{\text{mean}}(\text{E22})=42,447$ ;  $f_{16}(\text{E22})=3,311$ ). Der Expressionsverlauf in den Plakoden stellte sich ähnlich dar mit einem niedrigen Niveau an E16 und hohen Werten zu E18 und E22 ( $E_{\text{mean}}(\text{E16})=6,452$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E18})=49,385$ ;  $E_{\text{mean}}(\text{E22})=59,278$ ). Die

Steigerung der Expression war jedoch mit einem Faktor von  $f_{16}(E18)=7,654$  und  $f_{16}(E22)=9,187$  deutlicher ausgeprägt.

Das nicht fehlgebildete Rückenmark der MMC-Tiere betrachtend lag ebenfalls ähnliche Expressionsniveaus wie im Kontrollgewebe vor ( $f_{RMversusK}(E16)=1,042$ ;  $f_{RMversusK}(E18)=0,844$ ). Lediglich an Tag E22 fand sich eine nennenswerte gesteigerte Expression von CX3CL1 ( $f_{RMversusK}(E22)=1,426$ ).

*Tabelle 26, CX3CL1: Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte ( $E$ ), Mittelwerte ( $E_{mean}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{PversusK}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{RMversusK}$ ),  $n$ -facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{PversusRM}$ )*

	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
Zeitpunkt	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$	18,713	83,204	23,577	9,292	119,988	48,056	23,991	56,571	56,742
mit: $E=2^{-\Delta CT}$	17,658	74,964	21,880	6,878	23,149	54,468	9,775	55,943	41,589
	4,569	11,175	58,755	5,119	35,670	67,579	13,825	35,886	61,627
	3,860	20,129	65,574	4,340	18,731	57,313	12,627	24,667	66,810
	17,378	31,680		6,485		68,975	6,790	16,682	75,897
	14,738	48,789		6,600			13,106		
$E_{mean}$	12,819	44,990	42,447	6,452	49,385	59,278	13,352	37,950	60,533
$f_{16}$		3,510	3,311		7,654	9,187		2,842	4,534
$f_{PversusK}$				0,503	1,098	1,397			
$f_{RMversusK}$							1,042	0,844	1,426
$f_{PversusRM}$				0,483	1,301	0,979			

### 3.3.8 CX3CR1

#### 3.3.8.1 PCR-Ergebnisse

Die Expression CX3CR1 betrachtend konnten in den Untersuchung der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

In der Kontrollgruppe fand von E16 ( $E_{mean}(E16)=7,947$ ) über E18 ( $E_{mean}(E18)=8,548$ ) zu E22 ( $E_{mean}(E22)=10,287$ ) eine geringe Zunahme der Expression von CX3CR1 statt. Dies bedeutet einen

Anstieg der Expression ab E16 zu E18 um den Faktor  $f_{16}(E18)=1,076$  und zu E22 um den Faktor  $f_{16}(E22)=1,294$ .

Der Expressionsverlauf in den Plakoden stellte sich ähnlich dar ( $E_{\text{mean}}(E16)=5,064$ ;  $E_{\text{mean}}(E18)=7,040$ ;  $E_{\text{mean}}(E22)=14,184$ ). Es fand sich jedoch im Vergleich zum Kontrollgewebe ein deutlicherer Anstieg im Verlauf ( $f_{16}(E18)=1,390$ ;  $f_{16}(E22)=2,801$ ). Zeigte sich zu E16 und E18 ( $f_{\text{PversusK}}(E16)=0,637$ ;  $f_{\text{PversusK}}(E18)=0,824$ ) im Plakodengewebe verglichen mit den Kontrolltieren eine verminderte Expression, ließ sich zu E22 eine gesteigerte Expression von CX3CR1 erkennen ( $f_{\text{PversusK}}(E22)=1,379$ ).

Im nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere verhielt sich zum Zeitpunkt E22 die Expression ähnlich wie in der Plakode, jedoch mit einer deutlich gesteigerten Expression ( $f_{\text{RMversusK}}(E16)=0,707$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(E18)=0,601$ ;  $f_{\text{RMversusK}}(E22)=1,759$ ).

*Tabelle 27, CX3CR1: Entlogarithmierte  $\Delta CT$ -Werte (E), Mittelwerte ( $E_{\text{mean}}$ ), n-facher Expressionsunterschied bezogen auf E16 ( $f_{16}$ ), n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{PversusK}}$ ), n-facher Expressionsunterschied des nicht fehlgebildeten Rückenmarks der MMC-Tiere gegenüber der Kontrolle ( $f_{\text{RMversusK}}$ ), n-facher Expressionsunterschied der Plakode gegenüber dem nicht fehlgebildeten Rückenmark der MMC-Tiere ( $f_{\text{PversusRM}}$ )*

	Kontrolle - Rückenmark			MMC - Plakode			MMC - Rückenmark		
Zeitpunkt	E16	E18	E22	E16	E18	E22	E16	E18	E22
$E \cdot 10^3$	13,741	14,943	20,218	7,131	5,447	15,436	5,231	6,388	14,346
mit: $E=2^{-\Delta CT}$	3,075	14,006	4,405	3,649	7,781	17,008	5,807	6,087	11,217
	2,525	3,582	3,474	7,194	7,893	11,307	6,754	5,263	20,970
	10,059	2,922	10,215	2,668		11,945	6,454	4,754	25,734
	10,333	5,700	13,122	4,679		15,226	3,833	3,204	18,223
		10,133							
$E_{\text{mean}}$	7,947	8,548	10,287	5,064	7,040	14,184	5,616	5,139	18,098
$f_{16}$		1,076	1,294		1,390	2,801		0,915	3,223
$f_{\text{PversusK}}$				0,637	0,824	1,379			
$f_{\text{RMversusK}}$							0,707	0,601	1,759
$f_{\text{PversusRM}}$				0,902	1,370	0,784			

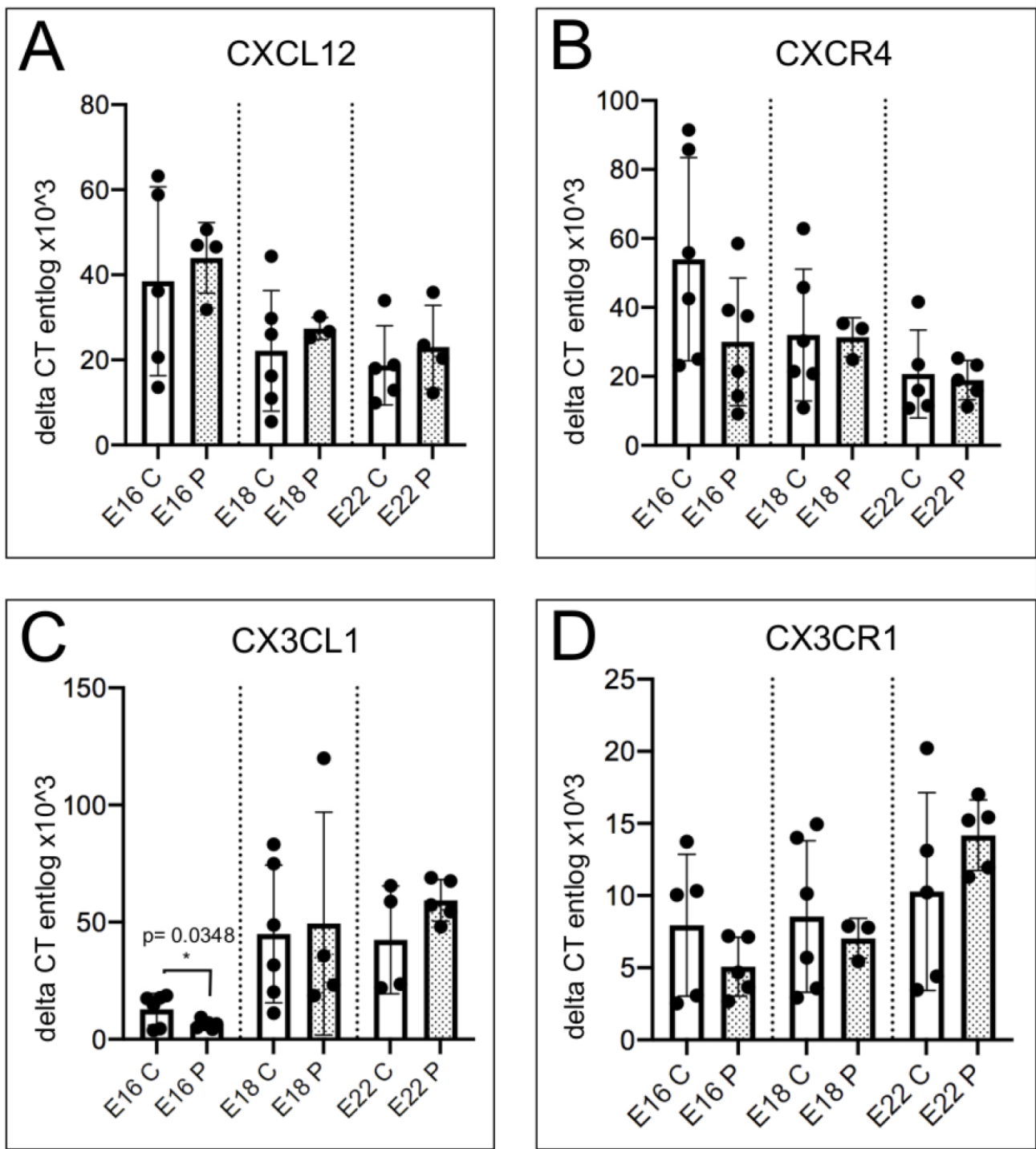


Abbildung 23: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der Chemokine in Kontrollrückenmark und Plakoden zu verschiedenen pränatalen Zeitpunkten.

C: Kontrolle. P: Plakode. (A) Real-time RT-PCR-Ergebnisse für CXCL12 und (B) seinen Rezeptor CXCR4. (C) zeigt real-time RT-PCR- Ergebnisse für CX3CL1. Zum Zeitpunkt E16 zeigt sich eine signifikant höhere Expression im Kontrollrückenmark verglichen mit dem Plakodengewebe ( $p = 0.0348$ ). (D) zeigt real-time RT-PCR-Ergebnisse für CX3CR1.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Das Tiermodell

Die Untersuchung molekularer Mechanismen, welche der sekundären Schädigung in offenen Neuralrohrdefekten zugrunde liegen, ist aufgrund der Verfügbarkeit von humanem Material herausfordernd. Probleme stellen neben dem ethischen Aspekt die exakte Bestimmung der relevanten Zeitpunkte sowie die begrenzte Zahl von Fällen dar. So existieren viele Tiermodelle, in welchen Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen erfolgen können. Alle stellen sie eine Simulation natürlicher Gegebenheiten dar und bringen Vor- und Nachteile mit sich. So ist die Auswahl eines Tiermodells abhängig von der spezifischen Fragestellung einer Studie. Genetische Tiermodelle<sup>45,94,130</sup> werden der komplexen Genetik von offenen Dysraphien oft nicht gerecht. Das Curly-tail-(ct/ct)-Tiermodell ist eines der meist genutzten Tiermodelle zur Untersuchung offener Dysraphien. Der Defekt entsteht hier nicht im neuroepithelialen, sondern im nicht neuralen Gewebe der Schwanzknospe an Tag E9.5. Durch eine fehlgeleitete Zellproliferation kommt es zur Wachstumsimbalance resultierend in einer verstärkten ventralen Krümmung der Körperachse in der kaudalen Region. Dieser Prozess opponiert der Neurulation und kann dazu führen, dass der Verschluss des Neuroporus posterior gänzlich ausbleibt und eine Myelomeningozele entsteht.<sup>131</sup> Jedoch kommt es nur bei 15-20% der Feten zur Ausbildung einer Myelomeningozele und viele der Feten überleben nicht bis zur Geburt.<sup>50</sup> Ein weiterer Nachteil genetischer Tiermodelle ist, dass sie in vielen Fällen nicht in ausgearbeiteter Form die bei Menschen beobachteten Phänotypen zeigen. So werden assoziierte Komplikationen wie die Chiari-II-Malformation oder Klumpfußdeformitäten nicht abgebildet.<sup>50</sup> Dies gilt ebenso für Tiermodelle, in welchen die Fehlbildung durch Manipulation induziert wird.<sup>66</sup> In dem von Meuli et al. 1995 entwickelten Schaf-Modell geschieht die Manipulation, welche zur Ausbildung des Defektes führt, erst zu einem späten Zeitpunkt der Gravidität. Untersuchungen der frühen, fetalen Geschehnisse sind aus diesem Grund nicht möglich. Neben genetischen Tiermodellen und solchen, in welchen Neuralrohrdefekte durch experimentelle Manipulation produziert werden, besteht die Möglichkeit Neuralrohrdefekte durch Teratogene auszulösen. So auch in dem von Danzer et al.<sup>50</sup> entwickelten Rattenmodell, in welchem Myelomeningozelen induziert werden durch die Gabe von All-Trans-Retinsäure. Die Applikation erfolgt an Tag E10 auf einfache Weise in Form einer Gavage und die Reproduzierbarkeit der

Läsionen ist mit 81,4% hoch. Die Applikation von 60mg/kg KG All-Trans-Retinsäure verursachte am verlässlichsten MMC-Fehlbildungen mit charakteristischem Erscheinungsbild. Auch zeigen sich in diesem Modell assoziierte Gegebenheiten wie die Chiari-II-Malformation oder Klumpfußdeformitäten. Darüber hinaus weisen RA-induzierte Plakoden das charakteristische Muster der fehlgebildeten Anatomie auf.<sup>50</sup>

In Zusammenschau der dargestellten Aspekte wurde das Modell als passend angesehen für den Zweck der geplanten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

#### **4.1.2 Vorarbeiten zur molekularbiologischen Untersuchung der MMC-Tiere:**

##### **Analyse des Fehlbildungsgewebes und des kranial davon gelegenen**

##### **Rückenmarksgewebes separat oder gemeinsam?**

Im Prozess stellte sich die Frage, ob die Plakode und das Rückenmark der MMC-Tiere getrennt oder zusammengeführt der PCR unterzogen werden sollten. Zur Klärung der Frage, wie sich das jeweilige Vorgehen auf die Ergebnisse der PCR auswirkt, wurde die unter 3.1.1.1 beschriebene Testreihe durchgeführt. Hierbei zeigten sich im Vergleich zum Kontrollgewebe hohe, entlogarithmierte  $\Delta C_T$ -Werte des Plakodengewebes. In der Auswertung der zusammengeführten Proben von Rückenmark und Plakode ließ sich diese Tendenz nicht nachweisen. Gegenteilig fanden sich in den zusammengeführten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte, entlogarithmierte  $\Delta C_T$ -Werte. Folglich wurden die Proben für das weitere Vorgehen separat per Real-Time PCR quantifiziert.

Der Vorteil einer separaten Beurteilung von Rückenmark und Fehlbildung war, dass entzündliche Prozesse in der Plakode in der RT-PCR sensibler detektiert werden konnten. Des Weiteren ließen sich lokalisierte Unterschiede zwischen der Fehlbildung und dem darüber befindlichen Rückenmark herausarbeiten. Der Vorteil einer gemeinsamen Analyse von Rückenmark und Fehlbildung wäre eine bessere Vergleichbarkeit der MMC-Gruppe mit der Kontrollgruppe gewesen, da gleichartige Gewebemengen der Isolation zugeführt würden.

#### **4.2. Histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte**

Wie unter Abschnitt 3.2 dargestellt, fanden sich in der Begutachtung der HE-gefärbten Schnitte die charakteristischen Merkmale der fehlgebildeten Anatomie der MMC. Das nicht neurulierte Rückenmark zeigte sich wie ein aufgeklapptes Buch als zweigeteilte, meist symmetrische Läsion, in



welche von lateral reichlich Blutgefäße einsprossen. Das neurale Gewebe lag auf einer zystischen, mit Liquor gefüllten Vorwölbung, dem fehlgebildeten Korrelat des Subarachnoidalraums. Dieser beinhaltete die aus dem fehlgebildeten Rückenmark nach ventral abgehenden Nervenwurzeln sowie die zu- und abführenden Gefäße.<sup>79</sup> In der Plakode ließen sich Matrix-, Mantel- und Marginalzone differenzieren. Aufgrund des aufgeklappten Charakters der Plakode befanden sich typischerweise im gesunden Rückenmark ventral gelegene Regionen in der Plakode medial und im gesunden Rückenmark dorsal befindliche Regionen in der Plakode lateral. So zeigten sich die Basalplatte und der ventrale Funiculus medial, während die Flügelplatte und der dorsale Funiculus lateral lagen. Die vorliegende Arbeit stellt die erste strukturierte, anatomische Aufarbeitung des pränatalen Verlaufs der Myelomeningozele dar. Aus diesem Grund bedarf es in der Zukunft weiterer histologischer Aufarbeitung der pränatalen, histopathologischen Dynamik, um wissenschaftliche Vergleichbarkeit zu schaffen.

### ***Inflammatorische Infiltrate***

Zum Zeitpunkt E22 zeigten sich in den Plakoden vereinzelt Extravasate von Zellen, welche Leukozyten darstellen könnten. Auch Reis et al.<sup>132</sup> beobachteten in einem Mausmodell zum Zeitpunkt E18.5 in HE-Färbungen eine leukozytäre Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, die in frühen Gestationsphasen (E14.5 und E16.5) nicht erkennbar war. George & Cummings<sup>80</sup> beschrieben ebenso inflammatorische Infiltrate in Proben, welche während chirurgischer Korrekturen von MMCs gewonnen worden waren. Als Erklärung für das nur vereinzelte Auftreten der Extravasate könnte u.a. die bei der Ratte im Vergleich zum Menschen verspätete Entwicklung des Immunsystems herangeführt werden.<sup>133</sup> So fanden sich beispielsweise in der Milz der Ratte B- und T-Lymphozyten erst in kleiner Anzahl zum Zeitpunkt der Geburt, während diese bei Menschen schon zu Beginn des zweiten Trimesters nachweisbar sind.

Inflammatorische Infiltrate sind Zeichen einer entzündlichen Gewebereaktion. Bei der Migration von Leukozyten aus Blutgefäßen ins Gewebe spielen proinflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle.<sup>134</sup> Durch die lokale Ausschüttung dieser Entzündungsmediatoren (wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) kommt es im Endothel zur Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen. Dies erleichtert die Anheftung und Extravasation von Leukozyten. Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt zusätzlich zu einer Steigerung der lokalen Gefäßpermeabilität. So könnten die in der vorliegenden Arbeit in der späten Schwangerschaft beobachteten Extravasate ein Hinweis auf die Beteiligung von Zytokinen sein (s. 4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-1RI). Die Beobachtungen diesbezüglich beruhen auf der Auswertung von HE-Färbungen, welche keine sichere Identifikation des Zelltyps zulassen.

Spezifische immunhistochemische Färbungen könnten in zukünftigen Untersuchungen Klarheit schaffen über die zelluläre Identität der beobachteten Extravasate.

### **4.3 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen:**

#### **Das strukturelle Profil der Plakode**

Nach einer ersten histopathologischen Begutachtung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbungen erfolgte die Analyse der Plakoden auf zellulärer Ebene mittels immunhistochemischer Färbungen. Hierbei wurden neuropathologisch etablierte Standardmarker verwendet, um ein zelluläres Profil der Plakode zu erstellen. Es existieren einige Studien zur Untersuchung der embryonalen Expression struktureller Markerproteine in der Plakode. Unter den Nagetieren stellen Mäuse die primären Versuchstiere im Rahmen dieser Studien dar. Aufgrund einer ähnlichen Embryogenese beider Arten lassen sich viele Aspekte der Entwicklung von Mäusen auf jene der Ratten übertragen.<sup>133</sup> Trotzdem war für die weitere Auswertung ein genauer Einblick in die pränatalen Expressionsmuster sowie deren Dynamik im embryonalen Verlauf im Plakodengewebe speziell für die Ratte essenziell. Vergleicht man embryologische Zeitpunkte von Maus und Ratte, so muss dabei stets klar sein, dass die Geburt der Maus nach ca. 19 Tagen<sup>130</sup> und jene der Ratte nach ca. 22 Tagen erfolgt.

##### **4.3.1 Neurone**

In Anlehnung an vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe<sup>87</sup> sowie die Studie von George & Cummings<sup>80</sup> wurden für die Färbungen u.a. Antikörper gegen NeuN und NF200kD zur Identifizierung neuronenassoziierter Strukturen verwendet.

In der qualitativen Auswertung der frühen Phase zeigte die Matrixzone im Plakodengewebe sowohl für NeuN als auch für NF200kD eine höhere Immunoreaktivität als im Kontrollgewebe. Diese höhere Immunoreaktivität beschränkte sich vor allem auf die Membrana limitans interna, von der radiäre Ausläufer nach ventral um die Zellen des Neuroepithels aussprossen. Das Bild erinnerte an das Färbungsmuster der zentralen Ausläufer radiärer Glia und könnte auf eine anormale Expression von NeuN in diesen Zellen hindeuten. Zu dieser Beobachtung lassen sich bislang keine weiteren Quellen heranziehen, weswegen dies Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein sollte. In der späten Gestationsphase verlor sich dieses Muster und für NeuN und NF zeigte sich zum Zeitpunkt E22 in der Plakode ein dem Kontrollgewebe entsprechendes, schwaches Färbeverhalten.

### 4.3.2 Glia

In Anlehnung an vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe<sup>56,87</sup> wurden Antikörper gegen Nestin, Vimentin, GFAP und Iba-1 zur Identifizierung zellulärer Untergruppen von Glia verwendet. Iba-1 diente der Darstellung aktivierter Mikroglia. Nestin, Vimentin und GFAP dienten der Anfärbung von astrozytären Vorläuferzellen und Astrozyten. Da diese Marker jeweils in einem anderen Stadium der Entwicklung von neuroepithelialen Zellen zu Astrozyten anfärbbar sind, konnten sie zur differenzierten Einschätzung des Entwicklungsgrades verwendet werden.<sup>113</sup> Barry & McDermott erstellten 2005 eine ausführliche Darlegung der Transformation von radialen Glia zu Astrozyten. Hierin charakterisierten sie unter anderem die Anfärbbarkeit durch verschiedene gliale Marker in den jeweiligen Entwicklungsstufen. So ist Nestin ein Marker von Zellen neuroepithelialen Ursprungs und wird ebenso exprimiert in radialen Glia und unreifen Astrozyten.<sup>113,135,136</sup> Unter den genannten glialen Markern ist Nestin in der embryonalen Entwicklung am frühesten anfärbbar, verliert sich aber ab der vollständigen Reifung der Astrozyten in der späten Gestationsphase. Vimentin kommt später ins Spiel als Nestin und wird exprimiert in radialen Glia sowie unreifen und reifen Astrozyten. Als letzter der verwendeten Marker ist GFAP anfärbbar, welches sich erst ab dem Entwicklungsstadium des unreifen Astrozyten um den Zeitpunkt der Geburt zeigt.<sup>113</sup> Aufgrund der im pränatalen Verlauf späten Immunoreaktivität der Glia für GFAP floss die Analyse von GFAP-gefärbten Schnitten nicht in die semiquantitative Analyse der vorliegenden Arbeit ein, sondern wurde nur zur beispielhaften Veranschaulichung genutzt.

Im lumbalen Kontrollrückenmark fanden sich zum Zeitpunkt E16 in den Präparaten radiale Glia mit typischem Erscheinungsbild. Sie zeigten sich als bipolare Vimentin- und Nestin-immunoreaktive Zellen im Neuroepithel, welche einen kurzen Zellfortsatz in Richtung des Zentralkanals und einen langen Zellfortsatz in Richtung der pialen Oberfläche des Rückenmarks aussandten. Barry & McDermott<sup>113</sup> zeigten diese Vimentin- und Nestin-immunoreaktiven Zellen im rostralen Rattenrückenmark zum Zeitpunkt E14. Unter Berücksichtigung des rostrokaudalen Gradienten in der Entwicklung des Rückenmarks sind die gemachten Beobachtungen für das Kontrollgewebe folglich mit jenen kongruent.

Die Plakode semiquantitativ betrachtend präsentierten sich Vimentin und Nestin zum Zeitpunkt E16 und E18 gleich stark exprimiert wie im Kontrollrückenmark. Folglich befanden sich die Glia zu diesen Zeitpunkten im Plakodengewebe in einem ähnlichen Entwicklungsstadium wie im Kontrollgewebe. Im medialen Bereich der Plakode zeigte sich die typische radiäre Anordnung der Faserzüge. Betrachtete man die lateralen Anteile der Plakode, fand sich jedoch ein anderes Erscheinungsmuster. Hier zeigten sich von Nestin- und Vimentin-positiven Fasern umgebene

Zellen, wodurch die Plakode ein honigwabenartiges Aussehen erhielt. Bedingt sein könnte dies durch eine nicht mehr in der Transversalebene verlaufende Anordnung der Faserzüge in den lateralen Anteilen der Plakode aufgrund der andersartigen Morphologie. Auch könnte aufgrund der andersartigen Morphologie ein gerichtetes Auswachsen dieser Zellfortsätze gestört sein, resultierend in einem chaotischen Muster. Zuletzt könnte dieses Erscheinungsbild eine frühe Reaktion der radiären Glia auf die extrinsische Schädigung darstellen. Es existieren bisher keine Studien zur Expression von Vimentin und Nestin in embryonalen Stadien der Plakode. Die Klärung des Sachverhalts bleibt folglich Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zum Zeitpunkt E22 fanden sich im lumbalen Kontrollrückenmark keine Nestin-positiven Zellen mehr. Vimentin zeigte sich noch in vermindertem Maße, nämlich in Astrozyten in der weißen und grauen Substanz. Weder in Nestin- noch in Vimentin-gefärbten Schnitten fanden sich zu diesem Zeitpunkt radiäre Faserzüge zwischen Zentralkanal und Pia Mater. Die negative Immunoreaktivität gegenüber Nestin und die Abnahme der Immunoreaktivität gegenüber Vimentin ist zurückzuführen auf die fortschreitende Reifung der Glia.<sup>113</sup>

Betrachtete man die Plakode zum Zeitpunkt E22 wies diese noch Nestin-positive und Vimentin-positive Faserzüge im für die vorherigen Zeitpunkte beschriebenen Muster auf. Lediglich in den dorsalen Anteilen der Plakode blasste dieses Muster zugunsten einer diffusen Färbung ab. Zusätzlich fanden sich in den ventralen Anteilen der Mantelzone mittelgroße Zellen mit ungefärbtem Kern, deren lange Ausläufer dunkel gefärbt waren. Diese erweckten den Anschein, die zu den radiären Fasern gehörenden Perikarya zu sein und somit radiäre Glia darzustellen. Folglich zeigten die Glia in der Plakode zu diesem Zeitpunkt erstmals ein im Vergleich zum Kontrollrückenmark abweichendes Färbeverhalten. Die z.T. radiär angeordneten Faserzüge von Nestin- und Vimentin-positiven Zellen wiesen daraufhin, dass sich in der Plakode zum Zeitpunkt E22 noch Glia befanden, welche in einem früheren Entwicklungsstadium waren verglichen mit dem Kontrollrückenmark. Dies könnte auf zweierlei Gründe zurückzuführen sein. Zunächst wäre eine verzögerte Differenzierung der Glia möglich, welche beispielsweise durch die Traumatisierung des Gewebes ausgelöst sein könnte. Gerade inflammatorische Prozesse des ZNS und die dortige Sekretion von Zytokinen und Chemokinen können Differenzierungsvorgänge beeinflussen.<sup>97,137,138</sup> Wäre die These der Differenzierungsverzögerung korrekt, so würden sich zum Zeitpunkt E22 weniger GFAP-positive Zellen in der Plakode befinden. In der qualitativen Auswertung erster exemplarischer Färbungen, welche zur Klärung dieses Sachverhalts durchgeführt wurden, fand sich jedoch keine verminderte Immunoreaktivität. Im Gegenteil wiesen die Plakoden in qualitativer Beurteilung eine starke Immunoreaktivität für GFAP auf, die jene des

Kontrollrückenmarks übertraf. Die Glia in der Plakode schienen zum Zeitpunkt E22 nicht nur in den unreifen, sondern auch den reifen Entwicklungsstadien vermehrt vorzuliegen. Eine allgemeine Vermehrung von Glia in der Plakode würde passen zu bisherigen Beobachtungen der Arbeitsgruppe. So fanden sich eine erhöhte Vimentin- und GFAP-Immunoreaktivität schon in humanen Proben gewonnen während der postnatalen Versorgung der Myelomeningozelen.<sup>87</sup> Dieselben Ergebnisse fanden sich für humanes Gewebe, welches aus Untethering-Operationen von Patienten mit Tethered-Cord-Syndrom stammte.<sup>86</sup> Auch Reis et al. wiesen in einem Mausmodell eine erhöhte GFAP-Immunoreaktivität in zum Geburtszeitpunkt gewonnenem Plakodengewebe nach.<sup>94</sup> So lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erstmalig ableiten, dass in frühen Gestationsstadien keine gliale Vermehrung vorliegt, sondern diese erst perinatal ersichtlich wird. Für eine fundierte Aufarbeitung der beteiligten Glia-Entwicklungsstufen gilt es, in Zukunft eine größere Menge an Färbungen mit verschiedenen glialen Markern zum Geburtszeitpunkt durchzuführen und quantitativ auszuwerten. Die Erkenntnis, dass die gliale Reaktion im Plakodengewebe erst in der finalen Gestationsphase einsetzt, bietet eine vielversprechende therapeutische Perspektive hinsichtlich der pränatalen Prävention dieser mit dem Tethered-Cord-Syndrom assoziierten Umbauprozesse.

Die Färbungen mit einem Antikörper gegen Iba-1 erfolgten zur Darstellung aktivierter Mikroglia. Diese spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Gewebereaktionen des ZNS und zeigen im aktivierten Zustand einen amöboid-geformten Zellkörper. Inaktive Mikroglia fallen durch ihre zahlreichen, verzweigten Ausläufer auf.<sup>139</sup> Zum Zeitpunkt E16 fanden sich in der Plakode nur in der Marginalzone vereinzelte, mäßig-gefärbte, sternförmige Zellen, welche folglich inaktive Mikroglia darstellten. Dieser Zustand änderte sich über E18 zu E22, wo sich in der Mantel- und in der Marginalzone sowohl die besagten Zellen mit Ausläufern als auch oval geformte Zellen fanden. Das vermehrte Auftreten sowohl inaktiver als auch aktivierter Mikroglia zu diesem Zeitpunkt passt in das Bild der aggravierten Schädigung in der späten Gestationsphase (s. 4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-1RI), Auch nach traumatischen Rückenmarksverletzungen akkumulieren und proliferieren Mikroglia im Läsionsbereich.<sup>140</sup> Liddelow et al. zeigten, dass aktivierte Mikroglia diverse Zytokine sezernieren (unter ihnen beispielsweise auch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ). Über die Ausschüttung von IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und C1q induzieren sie die Bildung einer bestimmten Art von Astrozyten. Diese A1-Astrozyten verlieren ihre Funktion der Synaptogenese und Phagozytose und sind durch die Sekretion eines Neurotoxins verantwortlich für den Tod von Neuronen und Oligodendrozyten.<sup>141</sup> In Analogie hierzu scheinen Mikroglia auch in der Pathogenese der MMC von Bedeutung zu sein. Cohrs et al.<sup>86</sup> wiesen aktivierte Mikroglia in Proben von MMC-Patienten mit Tethered-Cord-

Syndrom nach, welche im Rahmen des Untetherings gewonnen worden waren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun erstmals, dass die mikrogliale Reaktion schon pränatal ihren Anfang nimmt. So liegt es nahe, dass Mikroglia an den in der Plakode ablaufenden Destruktionsprozessen beteiligt sind. In der Ausübung dieser Funktion könnten Zytokine eine entscheidende Rolle spielen (s. nächster Abschnitt).

#### **4.4 Beurteilung der molekularbiologischen Analyse sowie der Immunfluoreszenzfärbungen: Expression der Zytokine in der Plakode**

Nach der grundlegenden histopathologischen Analyse erfolgte die molekularbiologische und immunhistochemische Begutachtung der Plakode. Das Ziel war die Aufarbeitung der sekundären Schadenskaskade und der Expressionsmuster beteiligter Mediatoren. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag dabei auf den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und den Chemokinen CXCL12 und CX3CL1 (sowie deren Rezeptoren). In gesundem, adulten Gewebe des ZNS sind IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gar nicht oder nur in sehr geringen Ausmaß zu finden.<sup>56,137</sup> Kommt es jedoch zu Stress (beispielsweise im Rahmen von Entzündungen, Tumorwachstum, Infektionen oder Trauma), führt dies zur Hochregulierung der Zytokinexpression.<sup>56,137,138</sup> Dies wiederum unterhält weitere Signalwege der Zellkommunikation, die verschiedene destruktive, läsionsverstärkende Prozesse anstoßen. Hierzu gehören die Störung der zellulären Homöostase, Apoptose sowie Astrozytose mit der Bildung einer glialen Narbe, etc. Diese Prozesse führen über den eigentlichen Läsionsort hinaus zur Störung angrenzenden, primär intakten Gewebes.<sup>142,143</sup> Entsprechend der Hypothese des Tertiärschadens in der Plakode (s. 1.7.2 Third Hit) scheinen diese Zytokine auch in der Pathogenese der MMC von Bedeutung zu sein, was in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe dargelegt wurde.<sup>86,87,144</sup> IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie deren Rezeptoren wurden in humanem MMC-Gewebe, welches während des postnatalen, primären Verschluss des Defektes gewonnen worden war, auf signifikant erhöhten mRNA-Level nachgewiesen.<sup>56,87</sup> Auch im Rahmen der Spätkomplikation des Tethered-Cord-Syndroms sind sie an der inflammatorischen Reaktion beteiligt. Cohrs et al. zeigten in Proben aus dem Untethering von Patienten mit Tethered-Cord-Syndrom eine signifikant erhöhte Immunoreaktivität von IL-1 $\beta$ /IL-1RI und TNF- $\alpha$ /TNF-R1.<sup>86</sup> In dieser Arbeit galt es nun den pränatalen Verlauf dieser proinflammatorischen Antwort zu ergründen.

#### 4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$ und IL-1RI

Es zeigten sich in den Untersuchungen zum Zeitpunkt E22 signifikant erhöhte mRNA-Level von IL-1 $\beta$  und IL-1RI in der Plakode. IL-1RI betreffend zeigte sich zudem eine signifikant erhöhte mRNA-Expression schon an Tag E16 sowie eine nicht signifikante Erhöhung an Tag E18.

Warum sich die Steigerung mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  vor allem in der späten Phase der Gestation ereignete, könnte auf die Aggravation extrinsischer Schädigung zurückgeführt werden. Zum einen wird das empfindliche neurale Gewebe der Plakode am Rücken des Fetus vermehrt mechanischen Traumata ausgesetzt, da durch das stete Wachstum des Feten der intrauterine Raum mehr und mehr begrenzt ist und sich zudem fetale Bewegungen häufen.<sup>9,45,94</sup> Die Beobachtungen von Zieba et al. liefern diesbezüglich weitere Erklärungsansätze. Sie wiesen in einem Rattenmodell verminderte Level von Hyaluronsäure in der Amnionflüssigkeit von MMC-Feten in der späten Entwicklungsphase des Rückenmarks nach.<sup>145</sup> Dies resultiere in einem „inadäquaten, viskoelastischen Schutz“ oder einer „inadäquaten Lubrikation an der Wunderoberfläche“ des exponierten Nervengewebes zum Zeitpunkt E21. Auch konnte ein schädigender Effekt einer über das physiologische Maß prolongierten Einwirkung der Amnionflüssigkeit auf das Plakodengewebe nachgewiesen werden.<sup>9,45</sup>

Die erhöhte IL-1 $\beta$ -Expression folgte in den Untersuchungen jener von IL-1RI nach. Wang et al. beobachteten in einem Rattenmodell nach traumatischen Rückenmarksverletzungen ebenso eine enge Verbindung im zeitlichen Expressionsverlauf von IL-1RI und IL-1 in neuronalen und glialen Zellen des ZNS. Sie vermuteten einen „autokrinen“ Feedbackmechanismus, in dem Zellen, die vermehrt IL-1RI exprimieren, direkt beeinflusst sind durch die Konzentration an IL-1. Für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit war dies leider kein passender Erklärungsansatz, da erst nach beobachteter, stimulierter IL-1RI-Expression in der Plakode die Steigerung der IL-1 $\beta$ -Expression erfolgte. Für eine eindeutige Schlussfolgerung diesbezüglich wären weitere Untersuchungen notwendig, unter anderem, um die Beobachtungen in den speziellen Kontext der Entwicklung einzuordnen. Interessant ist ebenso, dass die stimulierte mRNA-Expression von IL-1RI auch den histopathologisch sichtbaren Veränderungen zuvorkommt. So könnte sie eine erste Reaktion darstellen auf die Mehrung der Traumata in der fortgeschrittenen Gestation.

Die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen betrachtend fanden sich zum Zeitpunkt E22 Koexpressionen von IL-1 $\beta$  und IL-1RI sowohl mit Iba-1 also auch mit NeuN. Auch nach traumatischen Rückenmarksverletzungen fand sich eine erhöhte IL-1-Expression.<sup>146–149</sup> Für diese frühe, posttraumatische Reaktion werden endogene Zellen wie Neurone und Glia verantwortlich gemacht. Mikroglia scheinen nach ZNS-Verletzungen die früheste und bedeutendste Quelle von

IL-1 zu sein. Sie exprimieren Caspase-1, ein Enzym, das Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form überführt.<sup>150</sup> Auch für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten konnte hier eine IL-1-Produktion nachgewiesen werden. Diese scheint jedoch eine untergeordnete Rolle im Vergleich mit jener der Mikroglia einzunehmen.<sup>151–154</sup> Diese Beobachtungen nach traumatischen Rückenmarksverletzungen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die deutlichste IL-1 $\beta$ -Koexpression fand sich mit Iba-1, dem Marker für Mikroglia. IL-1RI konnte ebenso in Neuronen und Mikroglia nachgewiesen werden. Yang et al. zeigten nach traumatischen Rückenmarksverletzungen IL-1RI in Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia. Im gesunden Rückenmark hingegen war es nur in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten, aber nicht in Mikroglia zu finden.<sup>155</sup>

Bei Überlegungen zur Bedeutung von IL-1 $\beta$  in der Pathogenese der MMC sollten sonstige Funktionen des Zytokins bedacht werden. Dabei muss klar sein, dass Zytokine über die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche ihre Funktion ausüben. Darausfolgend ist es die Eigenschaft der aktivierten Rezeptoren, die die funktionalen Eigenschaften eines Zytokins definieren.<sup>156</sup> Für IL-1 $\beta$  sind zwei Rezeptoren spezifisch (IL-1RI, IL-1RII, s. 1.8.3 IL-1 $\beta$ ), von denen jedoch nur IL-1RI am IL-1/IL-1RI-Signalweg beteiligt ist. Laut aktueller Studienlage scheint der IL-1/IL-1RI-Signalweg nach traumatischen Rückenmarksverletzungen sowohl an Schädigungs- als auch Reparaturprozessen beteiligt zu sein. So ist IL-1 $\beta$  auf der einen Seite nach Schädigung des ZNS ein essenzieller Bestandteil der Schädigungskaskade. Es induziert unter anderem die Produktion von zytotoxischen Molekülen.<sup>155</sup> Es stimuliert die Produktion von IL-6<sup>157</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>158</sup>, colony-stimulating factors<sup>159</sup> sowie von sich selbst in einem positiven Feedback-Mechanismus<sup>160</sup>. Auf der anderen Seite kann sich IL-1 $\beta$  protektiv auswirken, wenn es in moderaten Mengen ausgeschüttet wird.<sup>155</sup> Es induziert die Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren. Hierzu gehört beispielsweise fibroblast growth factor 2 (FGF2), der als trophischer Faktor für Motoneurone agiert<sup>161</sup>. Auch stimuliert IL-1 $\beta$  Astrozyten, die darauf die Blut-Hirn-Barriere wiederherstellen und aufrechterhalten<sup>162</sup>. IL-1 $\beta$  ist des Weiteren an der Regulation der Angiogenese beteiligt. So könnte es für die von Reis et al. beobachteten vaskulären Veränderungen in der späten Gestationsphase mitverantwortlich sein.<sup>163</sup> IL-1 $\beta$  könnte somit bidirektionale Effekte in der inflammatorischen Antwort nach Traumata des ZNS haben.<sup>155</sup>

Auch in der Entwicklung des Nervensystems nimmt IL-1 $\beta$  eine ambivalente Rolle ein. Brenneman et al. zeigten, dass IL-1 $\beta$  das Überleben neuronaler Zellen in Kulturen aus fetalem Rückenmark der Maus fördert.<sup>164</sup> Außerdem unterstützt es Astrozytose im Rückenmark von mutierten Mäusen mit motorischen Erkrankungen zu prä- und postnatalen Zeitpunkten.<sup>165</sup> Auch Ergebnisse von de la Mano et al. zu IL-1 $\beta$  und IL-1RI sind in dieser Hinsicht interessant. So zeigten sie, dass während



der Rückenmarksentwicklung von Ratte und Huhn IL-1 $\beta$  in der Flügelplatte Proliferation vermittelt, während es in der Basalplatte eine verminderte Proliferation bewirkt und einen differenzierungsfördernden Effekt hat.<sup>166</sup> Außerdem zeigten sie eine frühe IL-1 $\beta$ -Expression in neuroepithelialen Zellen von Flügel- Basal-, Boden- und Deckplatte, in Zellen der sensiblen Ganglien sowie in Nervenfasern in der Marginalzone und den Nervenwurzeln. Auch in *Xenopus laevis* fand sich eine IL-1 $\beta$ -Expression in sensiblen Neuronen, Motoneuronen und Zellen der Spinalganglien in frühen Entwicklungsstadien.<sup>167</sup> IL-1 $\beta$  ist folglich in den jeweiligen Stadien der Rückenmarksentwicklung verschiedener Spezies von unterschiedlicher Bedeutung.

So kann in Analogie in der Pathogenese der MMC ebenfalls bislang keine einseitige Schlussfolgerung aus der erhöhten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IL-1RI gezogen werden. Die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-1RI bleibt somit in Teilen Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Weitere Studien in-vitro und in-vivo könnten eine mögliche Verbindung zwischen proinflammatorischen Zytokinen und neuronalem Zellverlust aufdecken. So könnte beispielsweise analysiert werden, ob der sekundäre, neuronale Zelluntergang, den beispielsweise George & Cummings nachwiesen, durch IL-1 $\beta$ /IL-1RI vermittelte Apoptose verursacht wird.<sup>56,80</sup> Dies böte neue Möglichkeiten für innovative Therapieansätze offener, spinaler Dysraphien.

#### **4.4.2 Die Rolle von TNF- $\alpha$ und TNF-R1**

Es zeigten sich in den Untersuchungen zum Zeitpunkt E22 signifikant erhöhte mRNA-Level von TNF- $\alpha$  und TNF-R1 in der Plakode. TNF- $\alpha$  betreffend zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression schon an Tag E16 und E18, jedoch z.T. nicht auf signifikantem Niveau. Wie schon beim Zytokin-Rezeptorpaar IL-1 $\beta$ /IL-1RI beobachtet, zeigten sich signifikant erhöhte mRNA-Level somit erst zum Zeitpunkt E22. Als Begründung hierfür ist ebenso die Aggravation extrinsischer Schädigung in der späten Gestationsphase anzuführen (s. 4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-1RI).

TNF- $\alpha$  agiert in vielerlei Hinsicht proinflammatorisch. Es erleichtert die Extravasation von Immunzellen wie Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten, indem es die lokale Adhäsion dieser am Endothel erleichtert und die Permeabilität des Endothels steigert.<sup>168–170</sup> Auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich mit dem Auftreten signifikant erhöhter mRNA-Level von TNF- $\alpha$  und TNF-R1 zum Zeitpunkt E22 erstmalig inflammatorische Infiltrate im Plakodengewebe. Akassoglou et al. zeigten, dass neuronal und astrozytär sezerniertes TNF- $\alpha$  zur Rekrutierung von Leukozyten ins ZNS führt.<sup>170,171</sup> Darüber hinaus induziert TNF- $\alpha$  die Synthese einer Vielzahl an Zytokinen, einschließlich IL-1, IL-6, colony-stimulating factors und durch einen Autofeedback-Mechanismus von TNF- $\alpha$  selbst.<sup>172</sup> Da auch IL-1 $\beta$  letztere, synthesesestimulierende Eigenschaften für die genannten Moleküle

aufweist (s. 4.4.1 Die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-1RI), erscheint es logisch, dass signifikante IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Level zu einem ähnlichen Zeitpunkt (E22) erreicht werden.

Das ZNS betreffend wurde für Astrozyten, Mikroglia und Neurone die Fähigkeit zur TNF- $\alpha$ -Produktion beschrieben. Während im intakten ZNS Neurone als einziger Zelltyp TNF- $\alpha$  sezernieren,<sup>173</sup> werden durch pathologische Stimuli (beispielsweise im Rahmen von Entzündungen, Tumorwachstum, Infektionen oder Trauma) Astrozyten und Mikroglia zur Hauptquelle von TNF- $\alpha$  im ZNS. Nach Aktivierung produzieren sie große Mengen an TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 und sind so für die inflammatorische Antwort im ZNS von entscheidender Bedeutung.<sup>174,175</sup> Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Beobachtungen überein. So zeigte sich zum Zeitpunkt E22 in der Matrix- und Mantelzone der Plakode TNF- $\alpha$  koexprimiert mit Iba-1, als Marker aktivierter Mikroglia. Auch für Vimentin und Nestin, als stellvertretende Marker der radiären Glia, den Vorläufern der Astrozyten, fanden sich die Marginalzone durchspannend kugeförmige Zellen. Probert et al. wiesen nach, dass die gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  in transgenen Mäusen zur Mikrogliose und Astrozytose führt. Eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression, wie sie sich in der Plakode zeigte, könnte folglich auch in der Pathogenese der MMC direkt oder indirekt für die in anderen Arbeiten beobachtete Astrozytose mit verantwortlich sein.<sup>170,176</sup>

Neben ihrer Bedeutung für pathologische Prozesse spielen Zytokine auch eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems.<sup>177</sup> So ist TNF- $\alpha$  involviert in die in der Entwicklung des Nervensystems essenzielle Regulation des Zelltods.<sup>178</sup> Sedel et al. zeigten in einem Rattenmodell, dass unter physiologischen Bedingungen an Tag E12 und E13, in der frühen Entwicklungsphase des Vorderhorns, TNF- $\alpha$  durch Makrophagen freigesetzt wird, die TNF-R1-exprimierende Motoneurone umgeben.<sup>179</sup> Es kommt zur Aktivierung des Zelltodprogramms und in diesem Zuge an Tag E15 zur Apoptose der besagten Motoneurone. Eine verlängerte oder übermäßige Expression von TNF- $\alpha$  in der Plakode könnte folglich zu einer übersteuerten, apoptotischen Signalkaskade führen, die das normale Ausmaß des neuronalen Zelltods im Rahmen der Entwicklung überschreitet. Für eine physiologische Entwicklung ist dabei eine Balance aus pro- und anti-apoptotischen Signalen notwendig. In Betrachtung der Ergebnisse könnte die nicht-physiologische Induktion pro-apoptotischer Zytokine diese Balance stören und so zu einer weiteren Schädigung im Entwicklungsprozess der Plakode führen.<sup>144</sup> Unterstützen würden dies die Beobachtungen von Avagliano et al., die eine erhöhte Apoptoserate in humanem Plakodengewebe nachwiesen.<sup>180</sup> Diese zeigte sich in den späten Gestationsphasen, als sich in den Untersuchungen erhöhte mRNA-Level der Zytokine präsentierten.<sup>132</sup> Ebenso beobachteten George und Cummings einen „Mangel an reifenden Neuronen“ in humanem, postnatal gewonnenem Plakodengewebe.<sup>80</sup>

#### **4.4.3 Die Rolle der Chemokine**

Die untersuchten Chemokine zeigten keine relevanten Veränderungen der Expressionslevel. Dies ist verwunderlich, fanden sie sich doch in vorherigen Studien nach experimentellen, traumatischen Rückenmarksverletzungen auf signifikant erhöhtem Niveau im Vergleich zu Kontrollrückenmarksproben.<sup>92,181</sup> Chemokine haben sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten ZNS bedeutende, regulatorische Funktionen und werden von diversen Zelltypen exprimiert.<sup>182</sup> So sind CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 involviert in neuronale Migration, Proliferation und im zielgerichteten Auswachsen von Axonen.<sup>97</sup> In der pränatalen Schädigungskaskade scheinen sie laut den hier vorgestellten Ergebnissen jedoch keine entscheidende Rolle zu spielen. Da sich aus den aktuellen Beobachtungen keine Ansätze für zukünftige Therapiestrategien auftun, erfolgten in der vorliegenden Arbeit über die molekularbiologischen hinaus keine weiteren, immunhistochemischen Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Trotz medizinischer Fortschritte in der Behandlung von MMC-Patienten ist deren langfristiger Krankheitsverlauf oft unzufriedenstellend. So findet sich in vielen Fällen einer progressiver Verlust neurologischer Funktion und die Therapie von Komplikationen stellt eine Schwierigkeit dar. In der Entwicklung innovativer Therapiekonzepte zur Versorgung von MMC-Patienten ist das Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge in der Plakode, insbesondere den pränatalen Verlauf betreffend, essenziell. Hierbei sind zwei grundlegende, pathophysiologische Aspekte zu berücksichtigen. Neben dem primär strukturellen Defekt der fehlerhaften Neurulation sind durch sekundäre Traumata angestoßene Läsionskaskaden im Sinne der Second-/Third-Hit-Hypothese zu bedenken. Die bisherige Datenlage bezüglich der zugrundeliegenden, zellulären Schädigungsmechanismen ist sehr dünn. Insbesondere der Zeitpunkt der Induktion dieser Mechanismen sowie deren potentiell pränataler Verlauf sind bislang wenig verstanden. Folglich hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, erstmals einen Einblick zu gewinnen in die pränatale Dynamik dieser Schädigungskaskade.

Dies erfolgte im Rahmen eines Rattenmyelomenigozelenmodells durch die molekularbiologische, histologische und immunhistochemische Analyse des Plakodengewebes zu verschiedenen Zeitpunkten im späten, fetalen Verlauf. Im Vergleich zu gesundem, fetalen Kontrollrückenmark zeigten sich zum perinatalen Zeitpunkt E22 erhöhte mRNA-Expressionslevel von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie derer Rezeptoren. Auch in den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich in der semiquantitativen Analyse zu den Zeitpunkten E22 eine erhöhte Immunoreaktivität für die Zytokine und ihre Rezeptoren. Um die verantwortlichen Zelltypen zu identifizieren, wurden im Folgenden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hier offenbarten sich sowohl Neurone, radiäre Glia/Astrozyten und Mikroglia als Träger der Schädigungsmechanismen, wobei letztere in den Analysen die deutlichste Immunoreaktivität zeigten. Auch nach ZNS-Verletzungen stellen Mikroglia die bedeutendste Quelle der Zytokinproduktion dar.<sup>150</sup> Die immunhistochemische Analyse zeigte Proliferation und Aktivierung dieses Zelltyps zum Zeitpunkt E22. Somit bestätigten die Beobachtungen, dass die zellulären und molekularen Veränderungen, welche im Rahmen traumatischer Rückenmarksschädigung als Komponenten der sekundär induzierten Schadensabläufe von entscheidender Bedeutung sind, auch im neuroepithelialen Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Diese Mediatoren könnten folglich für den bei MMC-Patienten beobachteten Verlust neurologischer Funktion sowie für histopathologische Veränderungen in der späten Gestationsphase verantwortlich sein.<sup>45,183</sup> In dieser Arbeit konnte zudem erstmalig der pränatale Verlauf dieser Mediatoren dargelegt

und eine zum Zeitpunkt E22 aggravierende, inflammatorische Reaktion des neuroepithelialen Gewebes aufgezeigt werden. Die Befunde unterstützen den Ansatz eines frühen therapeutischen Eingreifens zur Minimierung jeglicher Komplikationen und bieten darüber hinaus interessante Aspekte für die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Norman MG, McGillivray BC, Kalousek DK, Hill A, Poskitt KJ, Barkovicb AJ. Congenital malformations of the brain: Pathological, embryological, clinical, radiological and genetic aspects by x New York, Oxford University Press, 1995. *Ann Neurol.* 1996;39(5):687-688.
2. Ten Donkelaar HJ, Lammens M, Hori A. *Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System.* Springer; 2006.
3. Michael T, Moers A Von, Strehl E, Haberl H, Lebek S. *Spina Bifida - Interdisziplinäre Diagnostik, Therapie Und Beratung.* 2nd ed. de Gruyter; 2018.
4. Geelen JAG, Langman J, Lowdon JD. The influence of excess vitamin A on neural tube closure in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl).* 1980;159(2):223-234.
5. Geelen JAG. *The Teratogenic Effects of Hypervitaminosis A on the Formation of the Neural Tube.*; 1980.
6. Müller F, O’Rahilly R. Development of anencephaly and its variants. *Am J Anat.* 1991;190(3):193-218.
7. Müller F, O’Rahilly R. Cerebral dysraphia (future anencephaly) in a human twin embryo at stage 13. *Teratology.* 1984;30(2):167-177.
8. Geelen JAG, Peters PWJ. Hypervitaminosis a induced teratogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 1979;6(4):351-375.
9. Özek MM, Cinalli G, Maixner WJ. *The Spina Bifida - Management and Outcome.* Springer; 2008.
10. Fidas A, MacDonald HL, Elton RA, Wild SR, Chisholm GD, Scott R. Prevalence and patterns of spina bifida occulta in 2707 normal adults. *Clin Radiol.* 1987;38(5):537-542.
11. Boone D, Parsons D, Lachmann SM, Sherwood T. Spina bifida occulta: Lesion or anomaly? *Clin Radiol.* 1985;36(2):159-161.
12. Greene NDE, Copp AJ. Neural Tube Defects NTDs: Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci.* 2014;37:221-242.
13. International Center on Birth Defects IC for BDMS (ICBDMS). Annual Report 2011 with Data for 2009. <http://www.icbdsr.org>.
14. Li Z, Ren A, Zhang L, et al. Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi Province, China. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* 2006;76(4):237-240.

15. Moore CA, Li S, Li Z, et al. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *Am J Med Genet.* 1997;73(2):113-118.
16. Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD, et al. Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis--United States, 1985-1994. *MMWR CDC Surveill Summ.* 1995;44(4):1-13.
17. Canfield MA, Ramadhani TA, Shaw GM, et al. Anencephaly and spina bifida among Hispanics: Maternal, sociodemographic, and acculturation factors in the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* 2009;85(7):637-646.
18. Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. In: Posada de la Paz M, Groft S, eds. *Rare Diseases Epidemiology. Advances in Experimental Medicine and Biology* 349. Vol 686. Springer; 2010:349-364.
19. Carter CO, Evans K. Spina bifida and anencephalus in greater London. *J Med Genet.* 1973;10(3):209-234.
20. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(14):4305-4312.
21. Leck I. Causation of neural tube defects: clues from epidemiology. *Br Med Bull.* 1974;30(2):158-163.
22. Copp AJ, Greene NDE. Neural tube defects-disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(2):213-227.
23. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(8):653-669.
24. Copp AJ, Greene N DE. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol.* 2010;220(2):217-230.
25. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79(3):187-210.
26. Juriloff DM, Harris MJ. A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(10):824-840.
27. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child.* 1976;51(12):944-950.
28. Obican SG, Finnell RH, Mills JL, Shaw GM, Scialli AR. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2010;24(11):4167-4174.

29. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child*. 1981;56(12):911-918.
30. Koletzko B, Pietrzik K. Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr. *Dtsch Arztebl*. 2004;101(23):1670-1681.
31. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust*. 1989;150(11):613-619.
32. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *J Am Med Assoc*. 1988;260(21):3141-3145.
33. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology*. 1995;6(3):219-226.
34. Werler MM. Periconceptional Folic Acid Exposure and Risk of Occurrent Neural Tube Defects. *JAMA J Am Med Assoc*. 1993;269(10):1257-1261.
35. Milunsky A. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *J Am Med Assoc*. 1989;262(20):2847-2852.
36. Stothard KJ, Tennant PWG, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;301(6):636-650.
37. Carmichael SL, Rasmussen SA, Shaw GM. Prepregnancy obesity: a complex risk factor for selected birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(10):804-810.
38. Pai YJ, Leung K-Y, Savery D, et al. Glycine decarboxylase deficiency causes neural tube defects and features of non-ketotic hyperglycinemia in mice. *Nat Commun*. 2015;6:6388.
39. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36734-36741.
40. Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet (London, England)*. 1982;2(8304):937.
41. Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, et al. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr*. 2004;134(4):711-716.
42. Hendricks KA, Simpson JS, Larsen RD. Neural tube defects along the Texas-Mexico border, 1993-1995. *Am J Epidemiol*. 1999;149(12):1119-1127.
43. Al-Mendalawi MD. Towards a national program to combat neural tube defects in Iraq. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2014;54(2):123-undefined.



44. Seidahmed MZ, Abdelbasit OB, Shaheed MM, et al. Epidemiology of neural tube defects. *Saudi Med J*. 2014;35(3):S29-S35.
45. Stiefel D, Copp AJ, Meuli M. Fetal spina bifida in a mouse model: Loss of neural function in utero. *J Neurosurg*. 2007;106(3):213-221.
46. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, et al. In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *J Pediatr Surg*. 1996;31(3):397-402.
47. Marlétaz F, Holland LZ, Laudet V, Schubert M. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci*. Published online 2006.
48. Ghyselinck NB, Duester G. Retinoic acid signaling pathways. *Dev*. 2019;146(13):1-7.
49. Wagner M, Thaller C, Jessell T, Eichele G. Polarizing activity and retinoid synthesis in the floor plate of the neural tube. *Nature*. Published online 1990.
50. Danzer E, Schwarz U, Wehrli S, Radu A, Adzick NS, Flake AW. Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: Characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging. *Exp Neurol*. 2005;194(2):467-475.
51. Morriss GM. Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *J Anat*. 1972;113(Pt 2):241-250.
52. Marin-Padilla M. Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;15(3):261-269.
53. Garne E, Loane M, Dolk H, et al. Prenatal diagnosis of severe structural congenital malformations in Europe. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;25(1):6-11.
54. Sebire NJ, Noble PL, Thorpe-Beeston JG, Snijders RJM, Nicolaides KH. Presence of the “lemon” sign in fetuses with spina bifida at the 10-14-week scan. Published online 1997:403-405.
55. Nicolaides KH, Gabbe SG, Campbell S, Guidetti R. Ultrasound Screening for Spina Bifida: Cranial and Cerebellar Signs. *Lancet*. 1986;328(8498):72-74.
56. Kowitzke B. Immunhistochemische und molekularbiologische Analysen der Schadenskaskaden in Myelomeningozelengewebe in Korrelation zum klinischen Verlauf. Published online 2017.
57. Van den Hof MC, Nicolaides KH, Campbell J, Campbell S. Evaluation of the lemon and banana signs in one hundred thirty fetuses with open spina bifida. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162(2):322-327.
58. Brand MC. Part 2: Examining the newborn with an open spinal dysraphism. *Adv Neonatal Care*. 2006;6(4):181-196.
59. Dias MS, McLone DG. Hydrocephalus in the Child with Dysraphism. *Neurosurg Clin N Am*. 1993;4(4):715-726.

60. McLone DG, Knepper PA. The cause of Chiari II malformation: A unified theory. *Pediatr Neurosci*. 1989;15(1):1-12.
61. Tortori-Donati P, Rossi A, Cama A. Spinal dysraphism: A review of neuroradiological features with embryological correlations and proposal for a new classification. *Neuroradiology*. 2000;42(7):471-491.
62. Luthy DA, Wardinsky T, Shurtleff DB, et al. Cesarean Section before the Onset of Labor and Subsequent Motor Function in Infants with Meningomyelocele Diagnosed Antenatally. *N Engl J Med*. 1991;324(10):662-666.
63. Sharpe N. SPINA BIFIDA. *Ann Surg*. 1915;61(2):151-165.
64. Scott Adzick N. Fetal surgery for spina bifida: Past, present, future. *Semin Pediatr Surg*. 2013;22(1):10-17.
65. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, et al. In utero surgery rescues neurological function at birth in sheep with spina bifida. *Nat Med*. 1995;1(4):342-347.
66. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, et al. Creation of myelomeningocele in utero: A model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg*. 1995;30(7):1028-1032.
67. Bruner JP, Tulipan NE, Richards WO. Endoscopic coverage of fetal myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;180(1):153-158.
68. Adzick NS, Sutton LN, Crombleholme TM, Flake AW. Successful fetal surgery for spina bifida. *Lancet*. 1998;352(1941):1675-1676.
69. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *N Engl J Med*. 2011;364(11):993-1004.
70. Iskandar BJ, Tubbs S, Mapstone TB, Grabb APA, Bartolucci AA, Oakes WJ. Death in shunted hydrocephalic children in the 1990s. *Pediatr Neurosurg*. 1998;28(4):173-176.
71. Colas JF, Schoenwolf GC. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn*. 2001;221(2):117-145.
72. Drews U. *Taschenatlas Embryologie*. 1st ed. Georg Thieme Verlag; 2006.
73. Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. 11th ed. Georg Thieme Verlag; 2008.
74. Morriss-Kay GM. Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation. *J Embryol Exp Morphol*. 1981;65(Suppl.):225-241.
75. Kostovic-Knezevic L, Gajovic S, Svajger A. Morphogenetic features in the tail region of the rat embryo. *Int J Dev Biol*. 1991;35(3):191-195.
76. Altman J, Bayer SA. *The Development of the Rat Spinal Cord*. Vol 85. Springer Berlin Heidelberg; 1984.

77. Chen VS, Morrison JP, Southwell MF, Foley JF, Bolon B, Elmore SA. Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5. *Toxicol Pathol.* 2017;45(6):705-744.
78. Meuli M, Moehrlen U. Fetal surgery for myelomeningocele is effective: A critical look at the whys. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(7):689-697.
79. Avagliano L, Parazzini C, Righini A, Bulfamante G Pietro, Massa V. *Histopathology of Neural Tube Defects*. SMGroup; 2016.
80. George TM, Cummings TJ. The immunohistochemical profile of the myelomeningocele placode: Is the placode normal? *Pediatr Neurosurg.* 2003;39(5):234-239.
81. Knerlich-Lukoschus F, Juraschek M, Blömer U, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Force-Dependent Development of Neuropathic Central Pain and Time-Related CCL2/CCR2 Expression after Graded Spinal Cord Contusion Injuries of the Rat. *J Neurotrauma.* 2008;25(5):427-448.
82. Knerlich-Lukoschus F, Noack M, Von Der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Spinal cord injuries induce changes in CB1 cannabinoid receptor and C-C chemokine expression in brain areas underlying circuitry of chronic pain conditions. *J Neurotrauma.* 2011;28(4):619-634.
83. Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Spatiotemporal CCR1, CCL3(MIP-1 $\alpha$ ), CXCR4, CXCL12(SDF-1 $\alpha$ ) expression patterns in a rat spinal cord injury model of posttraumatic neuropathic pain. *J Neurosurg Spine.* 2011;14(5):583-597.
84. Knerlich-Lukoschus F. Chemokine und Chemokine-Rezeptoren in der sekundären Schadenskaskade nach experimentellem spinalen Trauma in der Ratte. Published online 2011.
85. Noack M. Immunhistochemische Analysen zur Cannabinoid-Rezeptor- und Chemokine-Expression in Schmerz- und Lernassoziierten Gehirnregionen in einem spinalen Traumamodell der Ratte. Published online 2019.
86. Cohrs G, Drucks B, Sürle JP, et al. Expression profiles of pro-inflammatory and pro-apoptotic mediators in secondary tethered cord syndrome after myelomeningocele repair surgery. *Child's Nerv Syst.* 2019;35(2):315-328.
87. Kowitzke B, Cohrs G, Leuschner I, et al. Cellular profiles and molecular mediators of lesion cascades in the placode in human open spinal neural tube defects. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(9):827-842.
88. Hutchins GM, Meuli M, Jordan MA, Heffez DS, Blakemore KJ. Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1996;16(5):701-712.

89. Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM, Freeman JM. The Paralysis Associated with Myelomeningocele: Clinical and Experimental Data Implicating a Preventable Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*. 1990;26(6):987-992.
90. Heffez DS, Aryanpur J, Rotellini NAC, Hutchins GM, Freeman JM. Intrauterine repair of experimental surgically created dysraphism. *Neurosurgery*. 1993;32(6):1005-1010.
91. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, Seller MJ, Harrison MR, Adzick NS. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: Implications for fetal surgery. *J Pediatr Surg*. 1997;32(3):448-452.
92. Knerlich-Lukoschus F, Von Der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion injuries in adult rats. *Glia*. 2010;58(8):916-931.
93. Emery JL, Lendon RG. The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). *J Pathol*. 1973;110(1):83-96.
94. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Costa M, Ribeiro A, Hutchins GM. Immunocytochemical characterization of astrogliosis along the spinal cord of loop-tail/curly-tail mice with myelomeningocele. *Pediatr Neurosurg*. 2008;44(4):288-295.
95. Voll R, Lamprecht P, Warnatz K, Schulze-Koops H, Peter H-H, Pichler W. Zytokine des Immunsystems. In: Blum HE, Müller-Wieland D, eds. *Klinische Pathophysiologie*. Vol 11. Georg Thieme Verlag KG; 2020.
96. Knerlich F, Schilling L, Görlach C, Wahl M, Ehrenreich H, Sirén AL. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 $\beta$  and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Mol Brain Res*. Published online 1999.
97. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS Development. *Neuron*. 2009;64(1):61-78.
98. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*. 1988;8(2):709-714.
99. National Center for Biotechnology Information. PubChem Protein Summary IL. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
100. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 $\beta$  for IFN- $\gamma$  production from human T cells. *Int Immunol*. 2000;12(2):151-160.
101. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(6):1521-1529.
102. Ma L, Li X, Zhang S, et al. Interleukin-1  $\beta$  guides the migration of cortical neurons. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):114.

103. Park S-Y, Kang M-J, Han J-S. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Mol Brain*. 2018;11(1):39.
104. National Center for Biotechnology Information. PubChem Pathway Summary Interleukin-1 signaling. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
105. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: A potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*. 2010;10(5):263-270.
106. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201-211.
107. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, et al. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1167-1171.
108. Shaw G, Osborn M, Weber K. Reactivity of a panel of neurofilament antibodies on phosphorylated and dephosphorylated neurofilaments. *Eur J Cell Biol*. 1986;42(1):1-9.
109. Oudega M, Lakke EAJF, Marani E, Thomeer RTWM. *Development of the Rat Spinal Cord: Immuno- and Enzyme Histochemical Approaches*. Springer-Verlag; 1993.
110. Lin WW, Friedman MA, Wang X-F, Abou-Donia MB. Acrylamide-regulated neurofilament expression in rat pheochromocytoma cells. *Brain Res*. 2000;852(2):297-304.
111. Cho T, Tiffany-Castiglioni E. Neurofilament 200 as an indicator of differences between mipafox and paraoxon sensitivity in Sy5Y neuroblastoma cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2004;67(13):987-1000.
112. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177-2195.
113. Barry D, McDermott H. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia*. 2005;50(3):187-197.
114. Sahin Kaya S, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Chopp M. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain. *Brain Res*. 1999;840(1-2):153-157.
115. Lindqvist J, Torvaldson E, Gullmets J, et al. Nestin contributes to skeletal muscle homeostasis and regeneration. *J Cell Sci*. 2017;130(17):2833-2842.
116. Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*. 1981;90(2):435-447.
117. Roessmann U, Velasco ME, Gambetti P, Autiuel-Gambetti L. Neuronal and astrocytic differentiation in human neuroepithelial neoplasms: An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1983;42(2):113-121.
118. Yung WKA, Luna M, Borit A. Vimentin and glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *J Neurooncol*. 1985;3(1):35-38.

119. Herpers MJHM, Ramaekers FCS, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 1986;70(3-4):333-339.
120. Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* 1980;193(3):815-840.
121. Deck JHN, Eng LF, Bigbee J, Woodcock SM. The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol.* 1978;42(3):183-190.
122. Duffy PE, Graf L, Rapport MM. Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1977;36(4):645-652.
123. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res.* 1998;57(1):1-9.
124. Schulze JO, Quedenau C, Roske Y, et al. Structural and functional characterization of human Iba proteins. *FEBS J.* 2008;275(18):4627-4640.
125. Danzer E, Kiddoo DA, Redden RA, et al. Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2007;292(1):197-206.
126. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159.
127. Kubelt C. Untersuchungen zur epithelialen-mesenchymalen Transition im Glioblastom und Glioblastomrezidiv. Published online 2015.
128. Thermo Fisher Scientific. Blocking Endogenous Targets Prior to IHC. [thermofisher.com](http://thermofisher.com).
129. Hendrickson W. BioTechniques. In: ; 1985:346-354.
130. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Hutchins GM. In utero topographic analysis of astrocytes and neuronal cells in the spinal cord of mutant mice with myelomeningocele. *J Neurosurg.* 2007;106(6):472-479.
131. van Straaten HW, Copp AJ. Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anat Embryol (Berl).* 2001;203(4):225-237.
132. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Costa M, Hutchins GM. Vascular and apoptotic changes in the placode of myelomeningocele mice during the final stages of in utero development: Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr.* 2008;2(2):150-157.
133. Holsapple MP, West LJ, Landreth KS. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Res Part B - Dev Reprod Toxicol.* 2003;68(4):321-334.

134. Bruder D, Dörries R. Immunologie - Mechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr. In: Hof H, Schlüter D, Dörries R, eds. *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 7th ed. Georg Thieme Verlag; 2019.
135. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*. 1985;5(12):3310-3328.
136. Kálmán M, Ajtai BM. A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int J Dev Neurosci*. 2001;19(1):101-108.
137. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci*. 1995;18(2):83-88.
138. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci*. Published online 1995.
139. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4th ed. Georg Thieme Verlag; 2012.
140. Devanney NA, Stewart AN, Gensel JC. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma. *Exp Neurol*. 2020;329:1-9.
141. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-487.
142. Oyibo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(2):281-299.
143. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague- Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*. 1997;377(3):443-464.
144. Cohrs G, Blumenröther A-K, Sürle J-P, Synowitz M, Held-Feindt J, Knerlich-Lukoschus F. Fetal and perinatal expression profiles of proinflammatory cytokines in the neuroplacodes of rats with myelomeningoceles: A contribution to the understanding of secondary spinal cord injury in open spinal dysraphism. *J Neurotrauma*. Published online September 19, 2021.
145. Zieba J, Walczak M, Gordienko O, Gerstenhaber JA, Smith GM, Krynska B. Altered Amniotic Fluid Levels of Hyaluronic Acid in Fetal Rats with Myelomeningocele: Understanding Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2019;36(12):1965-1973.
146. Pan JZ, Ni L, Sodhi A, Aguanio A, Young W, Hart RP. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. *J Neurosci Res*. 2002;68(3):315-322.
147. Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 $\beta$  mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res*. 1997;759(2):190-196.

148. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN. Early Expression and Cellular Localization of Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Human Traumatic Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(9):966-971.
149. Yang L, Jones NR, Blumbergs PC, et al. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *J Clin Neurosci*. 2005;12(3):276-284.
150. Eriksson C, Van Dam AM, Lucassen PJ, Bol JGJM, Winblad B, Schultzberg M. Immunohistochemical localization of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 $\beta$  converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience*. 1999;93(3):915-930.
151. Blasi F, Riccio M, Brogi A, et al. Constitutive expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in rat oligodendrocytes. *Biol Chem*. 1999;380(2):259-264.
152. Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Paul Stroemer R, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1 $\beta$  expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(1):87-98.
153. Parish CL, Finkelstein DI, Tripanichkul W, Satoskar AR, Drago J, Horne MK. The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J Neurosci*. 2002;22(18):8034-8041.
154. Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1 $\beta$  protein in microglia and astrocytes: Correlation with the progression of cell death. *Glia*. 1999;25(4):311-323.
155. Wang XF, Huang LD, Yu PP, et al. Upregulation of type I interleukin-1 receptor after traumatic spinal cord injury in adult rats. *Acta Neuropathol*. 2006;111(3):220-228.
156. John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: Powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*. 2003;9(1):10-22.
157. Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 1994;152(2):841-850.
158. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol*. 1990;144(8):2999-3007.
159. Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW. GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia*. 1994;12(4):309-318.
160. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2001;21(15):5528-5534.



161. Albrecht PJ, Dahl JP, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW. Ciliary Neurotrophic Factor Activates Spinal Cord Astrocytes, Stimulating Their Production and Release of Fibroblast Growth Factor-2, to Increase Motor Neuron Survival. *Exp Neurol*. 2002;173(1):46-62.
162. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. 2004;89(5):1092-1100.
163. Fahey E, Doyle SL. IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front Immunol*. 2019;10.
164. Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I. Cytokine Regulation of Neuronal Survival. *J Neurochem*. 1992;58(2):454-460.
165. Aït-Ikhlef A, Hantaz-Ambroise D, Jacque C, Belkadi L, Rieger F. Astrocyte proliferation induced by wobbler astrocyte conditioned medium is blocked by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1beta (IL-1beta) neutralizing antibodies in vitro. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1999;45(4):393-400.
166. de la Mano A, Gato A, Alonso MI, Carnicero E, Martín C, Moro JA. Role of interleukin-1 $\beta$  in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine*. 2007;37(2):128-137.
167. Jelaso AM, Acevedo S, Dang T, Lepere A, Ide CF. Interleukin-1 $\beta$  and its type 1 receptor are expressed in developing neural circuits in the frog, *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*. 1998;394(2):242-251.
168. Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor- $\alpha$  increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol*. 1986;136(12):4548-4553.
169. Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med*. 1989;169(6):1977-1991.
170. Angeles Muñoz-Fernández M, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998;56(3):307-340.
171. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol*. 1997;158(1):438-445.
172. Wallach D. A decade of accumulated knowledge and emerging answers. The 6th international congress on TNF Rhodes, Greece. May 1996. *Eur Cytokine Netw*. 1996;7(4):713-724.

173. Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor- $\alpha$ -like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 1993;337(4):543-567.
174. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997;20(6):252-258.
175. Perry VH, Bell MD, Brown HC, Matyszak MK. Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5(5):636-641.
176. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):11294-11298.
177. Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* 2015;38(3):145-157.
178. Golan H, Levav T, Mendelsohn A, Huleihel M. Involvement of Tumor Necrosis Factor Alpha in Hippocampal Development and Function. *Cereb Cortex.* 2004;14(1):97-105.
179. Sedel F, Béchade C, Vyas S, Triller A. Macrophage-Derived Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , an Early Developmental Signal for Motoneuron Death. *J Neurosci.* 2004;24(9):2236-2246.
180. Avagliano L, Doi P, Tosi D, et al. Cell death and cell proliferation in human spina bifida. *Birth Defects Res (Part A).* 2016;106(2):104-113.
181. Knerlich-Lukoschus F, Krossa S, Krause J, Mehdorn HM, Scheidig A, Held-Feindt J. Impact of chemokines on the properties of spinal cord-derived neural progenitor cells in a rat spinal cord lesion model. *J Neurosci Res.* 2015;93(4):562-571.
182. Williams JL, Holman DW, Klein RS. Chemokines in the balance: Maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(154).
183. Sival DA, Van Weerden TW, Vles JSH, et al. Neonatal loss of motor function in human spina bifida aperta. *Pediatrics.* 2004;114(2):427-434.

## 6.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dr. med. Gesa Cohrs für ihre allgegenwärtige Unterstützung während des Projekts danken. Durch ihre Begeisterung und ihre großzügige Art fand ich schnell einen Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten und Freude an experimenteller Forschung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus für die Möglichkeit, auf dem Gebiet der pädiatrischen Neurochirurgie zu promovieren. Sie hat mich durch ihre wissenschaftliche Denkweise und intensive Betreuung stets unterstützt.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Janka Held-Feindt für viele wissenschaftliche Anregungen, finanzielle Unterstützung, organisatorische Hilfestellung, ihr ehrliches Feedback sowie die Möglichkeit zur Nutzung der Laborräume.

Prof. Dr. med. Michael Synowitz danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren, für die finanzielle Unterstützung sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des neurochirurgischen Labors Fereshteh Ebrahim und Brigitte Rehmke für die freundliche Aufnahme, das kollegiale Arbeitsklima und die technische Unterstützung. Außerdem danke ich dem pathologischen Institut des UKSH und hier hervorgehoben Frau Iversen für die Hilfe bei Konservierung und Schnitt des Tiermaterials. Ein weiterer Dank gilt dem anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität für die Möglichkeit zur Nutzung der Laborräume. Hier möchte ich im Besonderen Katrin Neblung-Masuhr danken für viele unterstützende Hilfestellungen und die freundliche Weitergabe von labortechnischem Wissen.

Dr. med. Dr. med. dent. Bea Drucks und Jan-Philip Sürle danke ich für die tolle Vorarbeit und die stete Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen.

Der letzte und größte Danke gilt meiner Familie für deren bedingungslosen Rückhalt und endlose Ermutigung.