

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im ZNS klinisch gesunder Rinder, Kälber und Feten unterschiedlicher Altersstufen wurden mit polyklonalen kommerziellen Antiseren und der indirekten Immunperoxidase-Methode sowie der Avidin-Biotin-Komplex-Immunperoxidase-Methode zellklassenspezifische Markerproteine nachgewiesen. Die polyklonalen Antiseren wurden angewendet, um die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und das 200 kD-Neurofilamentprotein (200 kD-NF) als Neuronenmarker und das saure Gliafaserprotein (GFAP) als Astroglia-Marker darzustellen. Untersucht wurden die Gehirne von 56 Rinderfeten zwischen ein und acht Fetalmonaten, von 10 Kälbern bis zu einem Alter von drei Wochen und von fünf adulten Rindern, die über ein Jahr alt waren. Für die immunhistologischen Untersuchungen standen unterschiedlich fixierte Paraffinschnitte (Schmechelsche Lösung, Bouinsche Lösung, 5%iges neutrales, nach Lillie gepuffertes Formalin) aus dem Bereich der Medulla oblongata, der Pons cerebri, des Cerebellums, der Corpora quadrigemina, des Thalamus, der Hippocampusformation sowie des caudalen, medialen und cranialen Neocortex zur Verfügung.

NSE ließ sich gut in schmechelfixiertem Gehirngewebe nachweisen. In bouin- und formalinfixiertem Material war nur eine schwache Reaktion zu erkennen. Der Nachweis des 200 kD-NF erfolgte an formalinfixierten und der von GFAP an formalin- und bouinfixierten Paraffinschnitten. Bei den GFAP-exprimierenden Zellen der astroglialen Reihe war ein unterschiedliches Reaktionsverhalten zu beobachten. Während die fibrillären Astrozyten eine intensive Reaktion zeigten, lagen reaktive protoplasmatische Astrozyten nur in geringer Anzahl vor, und die Bergmann-Glia sowie die radiale Glia konnten nicht ohne Proteasevorbehandlung nachgewiesen werden. Nach Darstellung der Zellmarker im postfetalen Gehirn der Kälber und adulten Rinder, wurde deren zelluläre Lokalisation in den verschiedenen Gehirnarealen genau beschrieben.

Im Gehirn der Feten konnte die Expression der Marker zuerst in Zellen des Hirnstamms nachgewiesen werden. Im Groß- und Kleinhirn traten die zellklassenspezifischen Proteine erst in

einem späteren Entwicklungsstadium als braunes intrazelluläres Reaktionsprodukt in Erscheinung. Im Verlauf der fetalen Ontogenese zeigten die astroglialen und neuronalen Zellen im Bereich des Hirnstamms früher ein differenziertes morphologisches Erscheinungsbild, und die Proliferation von Zellen wurde in diesem Gehirnareal eher eingestellt als im Groß- und Kleinhirn. Die Hippocampusformation wurde erst ab Ende des vierten Fetalmonats (SSL 24 cm) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren die proliferativen Prozesse in diesem Gehirnareal weitgehend beendet und die Zellmarker traten in einer großen Zahl bereits differenzierter neuronaler bzw. astroglialer Zellen als braunes Reaktionsprodukt auf. Das erste Auftreten des jeweiligen Markerproteins und das morphologische Aussehen der immunreaktiven Zellen wurde bei den fetalen Gehirnen detailliert beschrieben.

Mittels Nachweis der Zellmarker konnten auch grundlegende funktionelle Entwicklungsvorgänge veranschaulicht werden. Im Zytoplasma von radialen Gliazellen, die als "Leitschienen" für die Migration von Proneuronen der ventrikulären Proliferationszonen zu ihrem Bestimmungsort dienen, konnte saures Gliafaserprotein dargestellt werden. Im Kleinhirn wurde die GFAP-positive Bergmann-Glia mit ihren Fortsätzen nachgewiesen. Sie leitet Proneuronen aus der äußeren Körnerschicht, der akzessorischen Proliferationszone des Kleinhirns, zur inneren Körnerschicht. Durch eine Gegenfärbung der immunhistologischen Präparate mit Hämalaun waren auch die undifferenzierten migrierenden Proneuronen, die in enger Beziehung zu den Fortsätzen der radialen Glia bzw. der Bergmann-Glia standen, zu erkennen.

Im Großhirn waren in den frühen Entwicklungsstadien die näher an der inneren (ventrikulären) Oberfläche gelegenen Neuronen in ihrer morphologischen Entwicklung weiter vorangeschritten als die Zellagen im Bereich der äußeren (pialen) Oberfläche, die außerdem im Gegensatz zu den morphologisch differenzierten Neuronen keine Neuronen-spezifische Enolase exprimierten. Diese Befunde belegen das "*Innen-außen Prinzip der zeitlichen Abfolge des Schichtenaufbaus*" im Neocortex.

## 5. SUMMARY

Nils Krueger:

### Cell markers in the bovine central nervous system

In the central nervous system of cattles, calves and fetuses of different age groups the occurrence of cell-type-specific markers was detected with commercial polyclonal antibodies and the indirect immunoperoxidase method as well as the avidin-biotin-complex immunoperoxidase method. The immunohistochemical staining methods were used to demonstrate with polyclonal antibodies neuron-specific enolase (NSE) and 200 kD-neurofilament protein (200 kD-NF) as markers for neurons and glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a marker for astroglia. To this end the brains of 56 fetuses aged between one and eight months, 10 calves up to the age of three weeks and five adult cows older than one year were examined. The immunoperoxidase methods were applied on differently fixed paraffin sections (Schmechel's fixative, Bouin's fixative, 5% neutral buffered formalin) of the medulla oblongata, pons cerebri, cerebellum, corpora quadrigemina, thalamus, hippocampus formation and caudal, medial and cranial neocortex.

NSE reacted best in brains which were fixed in Schmechel's fixative. The intensity of reaction in brains fixated in formalin and in Bouin's fixative was relatively weak. 200 kD-NF was detected in formalin fixed, GFAP in formalin and bouin fixed paraffin sections. The astroglial cells expressing GFAP showed a different reaction. Whereas fibrous astrocytes reacted intensively, immunoreactive protoplasmic astrocytes occurred only in small numbers and the Bergmann glia and radial glia did not react without protease treatment. After the cell markers had been detected in the postfetal brains of calves and adult cows their cellular location in the different brain areas was described.

The expression of markers in fetal brains could first be detected in cells of the brainstem. In the neocortex and

cerebellum the cell-type-specific proteins appeared at a later stage of development as a brown intracellular reaction product. In the course of the fetal ontogenesis the astroglial and neuronal cells of the brainstem showed a differentiated morphological phenotype at an earlier stage, and the proliferation of cells in this area of the brain terminated earlier than in the neocortex and cerebellum. The hippocampus formation was not examined before the end of the fourth month (crown-rump-length 24 cm) of fetal development. At this time the proliferation of cells had terminated and the cell markers appeared in large numbers of already differentiated neuronal or astroglial cells in the form of a brown reaction product. The first appearance of each marker protein in the fetal brain and the morphological characteristics of the immunoreactive cells was described in detail.

Through the detection of cell markers functional processes of development could be demonstrated as well. In the cytoplasm of radial glial cells, serving as a "guide rail" for the migration of proneurons of the ventricular proliferation zone to their destination, GFAP could be detected. GFAP-positive Bergmann glial cells and their processes were found in the cerebellum. These cells guide proneurons from the external granular layer, the accessory proliferation zone of the cerebellum, to the internal granular layer. By counterstaining of the immunohistological preparations with haemalaun the undifferentiated migrating proneurons, located closely to the processes of the radial glia and Bergmann glia, could be demonstrated.

In the early stages of the neocortex ontogenesis the morphological development of neurons located closer to the ventricular surface had advanced further than the development of the cells close to the pial surface, which in contrast to the morphologically differentiated neurons did not express NSE. These results show that internal layers were developed earlier than the external layers of the neocortex.