

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Myelinisierung im Zentralnervensystem (ZNS) des Rindes mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen zu erfassen und damit eine Vergleichsgrundlage zur Bewertung von Gehirnalterationen, insbesondere Mißbildungen bei Rinderfeten und juvenilen Rindern zu schaffen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen die Myelinproteine Proteolipoprotein (PLP), Proteolipoprotein-Tridecapeptid (PLP-Tridecapeptid), myelinbasiertes Protein (MBP) und myelinassoziiertes Glykoprotein (MAG) konnten Myelinscheiden im Gehirn fetaler und postfetaler Rinder dargestellt werden. Mit Antikörpern gegen Transferrin ließen sich außer Oligodendrozyten auch Neuronen, einzelne Epithelzellen des Plexus chorioideus und vereinzelt Ependymzellen nachweisen. Weiterhin wurden mit Antikörpern gegen Transferrin Endothelzellen, Leukozyten und Blutplasmabestandteile nachgewiesen. Ein weiterer Antikörper, HNK-1, der eine Kreuzreaktion mit MAG zeigt, wies am paraffineingebetteten Gehirngewebe des Rindes keine Immunreaktivität auf. Formaldehydfixierte und paraffineingebettete Gehirne adulter Ratten zeigten dagegen eine Immunreaktivität mit HNK-1. Es kamen die indirekte Peroxidase-, die Peroxidase-Antiperoxidase- und die Avidin-Biotin-Komplex-Immunperoxidase-Methode zur Anwendung. Die immunhistologischen Methoden wurden im Hinblick auf ihre Sensitivität mit einer histologischen Färbemethode zur Darstellung von Myelinscheiden verglichen. Es handelte sich dabei um Luxol-Fast-Blue in der Methode nach KLÜVER und BARRERA (1953). Untersucht wurden die Gehirne von 60 Rinderfeten zwischen einem und neun Entwicklungsmonaten, von zwölf juvenilen Rindern im Alter von einem Tag bis neun Monaten und von sechs adulten Rindern, die über ein Jahr alt waren. Für die immunhistologischen und histologischen Untersuchungen wurden die Gehirne in 4%iger, neutral gepufferter Formaldehyd-, 4%iger Paraformaldehydlösung oder in einem Fall eines etwa sechs Entwicklungsmonate alten Rinderfetus auch in einer HgCl_2 -haltigen Formaldehydlösung für ein bis fünf Tage fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Querschnitte der Lokalisationen Medulla oblongata, Pons, Kleinhirn, Corpora quadrigemina, Thalamus, Basalganglien, Hippocampusformation und Großhirn zur Untersuchung angefertigt.

Mit Hilfe der Myelinproteinmarker Anti-MBP, Anti-MAG, Anti-PLP, Anti-PLP-Tridecapeptid und der Markscheidenfärbemethode mit Luxol-Fast-Blue konnte ein kaudorostrales Fortschreiten der Myelinisierung mit zunehmendem Entwicklungsalter im Gehirn des Rindes festgestellt werden. Sowohl die immunhistologischen Methoden als auch die histologische Methode erwiesen sich als gut geeignet, um die Myelinbildung beim Rind verfolgen zu können. Die immunhistologischen Methoden erwiesen sich dabei im allgemeinen als sensitiver als die Methode mit Luxol-Fast-Blue. Erste Myelinscheiden fanden sich im

Rhombencephalon innerhalb des Fasciculus longitudinalis medialis von Medulla oblongata und Pons mit etwa zwei Fetalmonaten. Ab drei Fetalmonaten waren sie auch in Kleinhirn und Mesencephalon, mit vier Entwicklungsmonaten auch im Diencephalon und in den Basalganglien des Telencephalon nachweisbar. Mit fünf Fetalmonaten fanden sie sich in der Hippocampusformation und mit sechs Fetalmonaten auch im Großhirn. Zum Zeitpunkt der Geburt ließ sich in allen Gehirnabschnitten Myelin nachweisen. Nach der Geburt fand lediglich noch eine Zunahme der Anzahl und Dicke der Markscheiden statt.

Die Myelinbildung in der weißen Substanz bzw. den Leitungsbahnen ging derjenigen in der grauen Substanz bzw. der Kerngebiete voran. Motorische Leitungsbahnen myelinisierten eher als sensible. Die Wurzeln der Gehirnnerven wiesen eher Markscheiden auf als ihre abgehenden Nerven, ihre Kerngebiete waren jeweils zuletzt myelinisiert. Lange motorische Leitungsbahnen wie Pyramidenbahn oder extrapyramidal-motorisches System hatten einen eigenen Myelinisierungsablauf: Hier trat erstes Myelin in allen Gehirnabschnitten, wo diese Bahnen verliefen, zu etwa denselben Zeitpunkten auf.

Im Gegensatz zu Untersuchungen an Gehirnen von Menschen und Labortieren ließen sich mit Antikörpern gegen MBP, PLP, PLP-Tridecapeptid und MAG Zelleiber von Oligodendrozyten nicht nachweisen. Oligodendrozyten konnten beim Rind dagegen mit Antikörpern gegen Transferrin dargestellt werden. Transferrin fand sich nur in Oligodendrozyten aus ZNS-Abschnitten, in denen bereits Myelinscheiden vorlagen. Transferrin konnte also nicht in Vorläuferzellen oder unreifen Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Lediglich junge, wahrscheinlich in Myelinisierung begriffene, und ausgereifte Oligodendrozyten waren positiv für Transferrin. Weiterhin ließen sich vorwiegend interfazikuläre Oligodendrozyten darstellen, während Satellitenzellen nur vereinzelt eine Transferrin-Immunreaktivität aufwiesen. Es ließ sich nicht die Gesamtpopulation der Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen Transferrin nachweisen. So war bei den Rinderfeteten, juvenilen und adulten Rindern maximal etwa die Hälfte der interfazikulären Oligodendrozyten der Leitungsbahnen Transferrin-immunreaktiv. Es konnte weiterhin ein kaudo-rostraler Verlauf der Transferrin-Expression in Oligodendrozyten und Neuronen mit zunehmendem Entwicklungsalter erkannt werden. Die Transferrin-Expression trat dabei zeitlich etwa 0,5 bis einen Entwicklungsmonat nach dem jeweiligen Myelinisierungsbeginn in den einzelnen Gehirnabschnitten auf.

Mit HNK-1, einem monoklonalen Antikörper, der gegen natürliche Killerzellen gerichtet ist und im Immunoblot eine Kreuzreaktion mit MAG zeigt, war am Gehirn des Rindes keine Immunreaktivität feststellbar. An Rattengehirnen zeigten die Zellmembranen großer Neuronen eine positive Reaktion. Oligodendrozyten oder Myelinscheiden ließen sich auch bei der Ratte nicht nachweisen. Vermutlich erkennt HNK-1 speziesspezifisch unterschiedliche Epitope.

Katrin Dorothea Urban:

Ontogeny of myelin development in the bovine central nervous system

This study was designed to demonstrate myelin development in the bovine central nervous system (CNS) using immunohistochemical methods, and, thus to establish a basis of comparison for the study of brain alterations, especially malformations of fetal and juvenile cattle. By means of myelin-protein-specific antibodies to anti-proteolipoprotein (PLP), anti-proteolipoprotein-tridecapeptid (PLP-tridecapeptid), anti-myelinbasic protein (MBP) and anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) myelin sheath development could be demonstrated in fetal and postnatal bovine brains. Besides oligodendrocytes, transferrin-specific antibodies also detected neurons, some epithelial cells of the choroid plexus, and ependymal cells. In addition, transferrin-specific antibodies identified endothelial cells, leukocytes and blood plasma. With another antibody, HNK-1, that has been shown to cross-react with MAG, paraffin-embedded brain tissue of cattle showed no immunoreactivity. HNK-1, however, showed immunoreactivity with formaldehyde fixed and paraffin-embedded brain tissue of rats.

Immunohistochemical staining was performed using the indirect peroxidase, peroxidase-anti-peroxidase, and avidin-biotin-peroxidase complex method. With regard to their sensitivity, the immunohistochemical methods were compared with histological staining methods for demonstration of myelin sheaths. The histological method used in this case was that of KLÜVER and BARRERA (1953) with luxol-fast-blue. The brains of 60 fetuses aged between one and nine months, 12 juvenile cows up to the age of nine months and six adult cows older than one year were examined. The histological and immunohistochemical methods were applied on paraffin sections, fixed for one to five days either in 4% neutral buffered formaldehyde, 4% paraformaldehyde, or in one case of a six months old bovine fetus in a solution of HgCl₂-enriched formaldehyde. The brains were sliced transversally so that medulla oblongata, pons, cerebellum, corpora quadrigemina, thalamus, basal ganglia, hippocampus formation and cerebrum could be studied.

With the help of MBP-specific, MAG-specific, PLP-specific and PLP-tridecapeptid-specific antibodies, or the histological method with luxol-fast-blue, a caudo-rostral progress in myelination could be observed with increasing gestational age in the bovine brains. Both, the immunohistochemical and the histological methods, were useful to investigate myelin development in cattle. Generally, the immunohistochemical methods were more sensitive than the histological luxol-fast-blue-staining method.

By two months of development, the first myelin sheaths were seen in the rhombencephalon, especially in the longitudinal medial fascicle of medulla oblongata and pons. After three gestational months, they could be demonstrated in cerebellum and mesencephalon, after four fetal months, a few myelin fibres were located in the diencephalon and in the basal ganglia of the telencephalon. By five months development, they could be found in the hippocampus formation, and by six fetal months in the cerebrum. With birth all parts of the brain showed myelin fibres. After birth there was only an increase in the number and thickness of the myelin sheaths.

Myelination occurred first in the white matter and fibre systems, respectively, and later in the grey matter and nuclear regions. The cranial nerve roots showed myelin sheaths prior to their nerve bundles, their nuclei were myelinated last. The long motor conducting paths, like the pyramidal tract and the extrapyramidal-motoric system, showed their own sequence of myelination: here, first myelination could be detected along the whole length of the tracts.

In contrast to investigations in brains of human and laboratory animals, the cytoplasm of oligodendrocytes was not demonstrable with MBP-, PLP-, PLP-tridecapeptid- and MAG-specific antibodies. In cattle, oligodendrocytes could be detected with transferrin-specific antibodies. Transferrin was located in oligodendrocytes of myelinated regions only. Thus, precursors of oligodendrocytes or immature oligodendrocytes could not be identified. The only transferrin-positive staining was seen in young myelinating, and mature oligodendrocytes. Furthermore, mainly the interfascicular oligodendrocytes were stained, whereas only single perineuronal oligodendrocytes showed transferrin-immunoreactivity. With transferrin-specific antibodies it was not possible to detect the whole population of oligodendrocytes. In fetal, juvenile and adult cattle, a maximum of about half of the interfascicular oligodendrocytes of the fibre tracts showed transferrin-immunoreactivity. In addition, with increasing gestational age, a caudo-rostral progress of transferrin-positive oligodendrocytes and neurones could be observed. The transferrin-expression appeared 0.5 to 1 gestational months after the first myelin was detectable in the respective brain region.

With HNK-1, a monoclonal natural-killer-cell-specific antibody that has been demonstrated to cross-react with MAG in immunoblots, the bovine brain showed no immunoreactivity. In brains of the rat membranes of large neurones showed positive staining. Oligodendrocytes or myelin sheaths could not be demonstrated in the rat brain at all. Probably, HNK-1 can only detect species-specific epitopes.