

---

## **3. Materialien und Methoden**

Die Bezugsquellen der verwendeten Materialien sind in einem tabellarischen Verzeichnis gesondert aufgeführt.

### **3.1. Aufbau des Experiments und Versuchstiere**

#### **3.1.1. Versuchstierhaltung**

Die Tierversuche wurden genehmigt (TVA Nummer: G0180/00, Gültigkeitsdauer des Antrags 24.07.2000 bis zum 31.07.2005.) alle hier erwähnten Experimente sind durch Lizenzen abgedeckt. Es wurden weibliche Mäuse des SJL-Inzuchtstammes mit einem Gewicht von circa 20g und einem Alter von 4 Wochen von der Firma Charles River bezogen. Die Tiere wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen (Makrolonkäfige, pelletiertes Mausalleinfutter, Holzgranulateinstreu und täglich frisches Wasser) im Tierstall des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums an der Charité Berlin gehalten und dort von geprüften Versuchstierpflegern betreut.

#### **3.1.2. Aufbau des Experiments**

Zuerst erfolgte eine Aufteilung der Mäuse in eine Untersuchungsgruppe und eine Kontrollgruppe nach dem Zufallsprinzip. Bei den Mäusen der Untersuchungsgruppe sollte eine aktive EAE durch Immunisierung mit PLP und CFA induziert werden, die Tiere der Kontrollgruppe sollten nur CFA erhalten. Beide Gruppen erhielten zusätzlich zwei Pertussistoxinjektionen (PTX). Durch diesen Versuchsaufbau wurde eine weitgehende Gleichbehandlung der Tiere gewährleistet, d.h. sie wurden jeweils der gleichen Anzahl von Injektionen sowie dem gleichen Injektionsschema bezüglich des Injektionsortes und der Injektionstiefe ausgesetzt. Da ein Ziel des Experimentes die Messung der Änderung von Genexpression im Zuge der EAE darstellte, war es wichtig, zu jedem Zeitpunkt eine korrespondierende, gleichaltrige Maus der Gruppe der scheinimmunisierten Tiere als Standard zu haben. Dadurch sollten mögliche Störgrößen, wie Alter und Lebensumstände, z.B. Futter und Stress, aber auch ein Effekt der bei der Immunisierung verwendeten Substanzen, wie PTX und CFA als Ursache der Genexpressionsänderungen ausgeschlossen werden. Es wurden neun Entnahmezeitpunkte festgelegt. Zu jedem sollten vier Tiere der Untersuchungsgruppe und zwei Tiere aus der Kontrollgruppe entnommen werden. Daraus ergab sich ein Bedarf von insgesamt 60 Tieren. Um eventuelle Einflussgrößen, wie Stress durch den Transport und Nahrungsumstellung auszuschließen, fand die Immunisierung erst nach 10 Tagen, in denen sich die Mäuse akklimatisieren konnten, statt.

### **3.2. Immunisierung**

Zum Zeitpunkt der Immunisierung waren die Tiere 40 Tage alt und wogen zirka 19 g.

Die Mäuse der Verumgruppe erhielten ein Immunisat aus folgenden Bestandteilen:

(Die Mengenangaben beziehen sich auf die Dosis pro Maus.)

- 100 µl CFA
- 200 µg H37Ra Mycobacterium tuberculosis gelöst in 100 µl PBS
- 90 µg PLP

Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten ein Immunisat aus folgenden Bestandteilen

(Die Mengenangaben beziehen sich auf die Dosis pro Maus.)

- 100 µl CFA
- 200 µg H37Ra Mycobacterium tuberculosis gelöst in 100 µl PBS

Das Injektionsvolumen betrug in beiden Gruppen pro Maus 200 µl. Diese wurden allen Tieren an 4 Stellen streng subkutan appliziert. Die Injektionsstellen befanden sich über den Flanken, so dass durch ihre Platzierung keine Behinderung der Bewegung und somit eine Verfälschung der klinischen Untersuchung und der Scorevergabe stattfinden konnte.

Am Tag der Immunisierung und am 2.Tag nach der Immunisierung wurde allen Tieren 200 ng Pertussistoxin in 200 µl PBS intraperitoneal gespritzt.

### **3.3. Untersuchung der Mäuse**

Die Tiere der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe wurden jeden Tag gewogen und untersucht. Jedem Tier wurde entsprechend des Krankheitsschweregrades ein Punktwert (Score) zugeordnet. Allen Tieren wurde Nahrung und Wasser auf Käfigebene leicht erreichbar angeboten. Tieren mit einem Scorewert ab 3 wurde zweimal Mal am Tag, nach dem Wiegen, 300µl 5% Glucoselösung intraperitoneal gespritzt.

**Tabelle 1 Vergabe der Scorewerte mit dem entsprechenden neurologischen Defizit:**

Score	Klinische Präsentation
0,5	Tonusabschwächung im Schwanz
1	Schwanzlähmung
1,5	„Righting Reflex“ abgeschwächt (siehe Abbildung 3 mit Erklärung)
2	„Righting Reflex“ fehlend (siehe Abbildung 3 mit Erklärung)
2,5	Parese der Hinterbeine (siehe Abbildung 4 mit Erklärung)
3	Plegie der Hinterbeine
3,5	Parese der Vorderbeine
4	Plegie der Vorderbeine
4,5	Moribund/ präfinal
5	Tod durch EAE

Der erteilte Punktwert richtete sich nach dem jeweils schwersten Defizit.

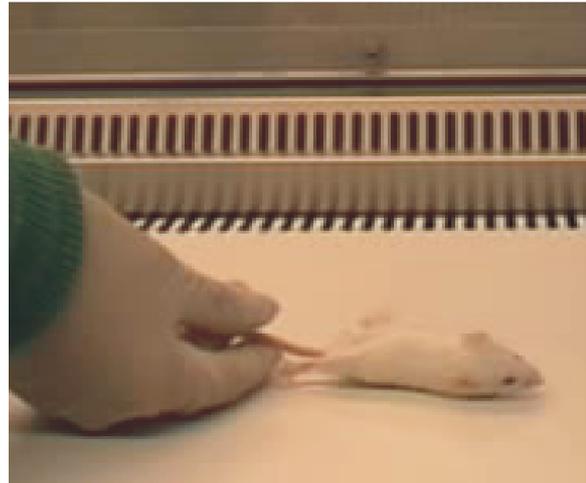
### 3.4. Perfusionsschema

Vorab wurden neun klinisch wichtige Zeitpunkte definiert, die als Entnahmezeitpunkte festgelegt wurden. Durch die tägliche klinische Untersuchung konnte das Erreichen eines Zeitpunktes festgestellt werden.

An diesen Tagen wurden je vier Tiere der Verumgruppe entnommen, deren Score dem Durchschnittsscore dieser Gruppe am nächsten war. Davon wurden zwei Tiere für die histologischen Untersuchungen und zwei für PCR-Untersuchungen aufgearbeitet. Zusätzlich wurden noch zwei Tiere der Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt entnommen, von denen je eine für histologische und für PCR-Untersuchungen bestimmt war. Am Tag 12 und Tag 30 wurden für histologische Studien je drei Tiere entnommen.

**Tabelle 2 Anzahl der entnommenen Tiere zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten:**

Gruppe	Anzahl gesamt entnommener Mäuse je Zeitpunkt	Anzahl der Mäuse für histologische Untersuchungen	Anzahl der Mäuse für PCR Untersuchungen
<b>(Verum) Untersuchungsgruppe</b>	4	2 (3 an den Tagen 12 und 30)	2
<b>Kontrollgruppe</b>	2	1	2



**Abbildung 3: Testen des „Righting reflexes“: am Beispiel von 2 erkrankten Mäusen. Beim Versuch, eine gesunde Maus am Schwanz auf den Rücken zu drehen, dreht sich diese blitzschnell wieder um und steht dann sicher auf den Füßen. Man führt diesen Versuch bei der klinischen Untersuchung der Mäuse fünfmal schnell hintereinander durch. Mäuse mit EAE, welche eine Schwäche dieses Reflexes haben, zeigen in der 3. bis 5. Wiederholung Probleme, sich aus der Rückenlage zu drehen, d.h. es geschieht deutlich langsamer als bei gesunden Mäusen. Mäuse mit einem Ausfall dieses Reflexes bleiben gleich für mehrere Sekunden hilflos auf dem Rücken liegen.**



**Abbildung 4: links eine Maus beim Gittertest, rechts die gleiche Maus bei der Fortbewegung auf ebener Fläche. Trotz einer Parese der Hinterbeine können sich die Mäuse auf glatter Oberfläche oft noch unauffällig fortbewegen. Ein sensibler Test zum Feststellen einer Parese ist, die Maus auf dem Käfiggitter in Richtung der Gitterstäbe laufen zu lassen. Bei einer Parese fällt dann das paretische Bein durch das Gitter und die Maus hat Schwierigkeiten, dieses wieder auf das Niveau des Käfiggitters hochzuziehen.**

### **3.5. Narkose und Perfusion der Tiere**

Die Tiere wurden gewogen und erhielten intraperitoneal, entsprechend ihres Gewichtes, eine tödliche Dosis einer Narkoselösung aus:

- 0,25 ml Xylazin
- 5 ml Ketamin
- 19,75ml PBS

→1-1,5 ml dieser Lösung sind für eine 20-25g schwere Maus tödlich.

Nach Erlöschen des „foodpad Reflexes“<sup>13</sup> (Zusammensucken der Maus nach Reizung der Fußsohle) in tiefer Analgesie wurde die Maus nach Absprühen mit 70% Ethanol mit einer sterilen Schere in der Mittellinie eröffnet. Die Rippen wurden jeweils seitlich eingeschnitten, um durch Hochklappen des Brustkorbs einen freien Zugang zum Herzen zu erreichen. Dann erfolgt eine kleine Inzision am linken Ventrikel für die Kanüle der Perfusorspritze, die dann mit einer Klemme festgeklemmt wurde. Danach wurde der rechte Vorhof eröffnet. Der Erfolg der Perfusion war durch die Entfärbung der Leber sehr schnell festzustellen. Entnommen wurden folgende Organe: Gehirn, Rückenmark, Thymus, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz sowie inguinale und zervikale Lymphknoten. Das Protokoll der Perfusion und der Organentnahme für die histologische Aufarbeitung unterschied sich von dem der für die PCR-Messungen vorgesehenen Mäuse.

#### **3.5.1. Perfusion und Organentnahme für PCR-Messungen**

Die Mäuse wurden mit je 30 ml 37°C warmen PBS perfundiert. Anschließend wurden die Organe entnommen auf eine sterile Petrischale überführt und mit einem sterilen Einmalskalpell in 50-60 mg Stücke geteilt. Die Gewebeproben wurden sofort in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, in einem Transportbehälter mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

#### **3.5.2. Perfusion und Organentnahme für histologische Aufarbeitung**

Die Mäuse wurden zunächst mit 20 ml 37°C warmen PBS und anschließend mit 25 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Die Organe wurden im Ganzen herauspräpariert und in PFA bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

---

<sup>13</sup> Das Erlöschen dieses Reflexes spricht für eine tiefe Analgesie.

### 3.6. Gesamt-RNA-Isolation

- 1.) Lyse/Homogenisierung: Zu den Gewebestücken von 50-60 mg (die sich schon für die Aufbewahrung in 1,5 ml Rundboden Eppendorf Reaktionsgefäße befanden) wurde 800 µl RNAClean hinzugegeben. Die Gewebestücke wurden durch wiederholtes Pipettieren homogenisiert.
- 2.) Phasenseparation: Danach wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben, alle Proben 10 Sekunden „gevortext“ und anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei 14000 UPM und 4°C. Nach der Zentrifugation trennt sich das Probengemisch in eine untere Phase, die aus Phenol-Chloroform besteht, eine weiße Interphase aus Protein und DNA und in eine obere farblose wässrige Phase, welche die aquaphile RNA enthält. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipetiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.
- 3.) RNA-Ausfällung: Zur RNA-Ausfällung wurden 400 µl Isopropanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend 15 Minuten mit 14000 UPM bei 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene RNA-Präzipitat formt ein etwa stecknadelkopfgroßes weißes Plättchen.
- 4.) Waschen der RNA: Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Plättchen wurde mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde 7 Minuten mit 14000 UPM (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Waschschrift wiederholt.
- 5.) Auflösen der RNA: Dann wurde das RNA-Plättchen im Eppendorf Tube 15 Minuten unter einer Sterilbank luftgetrocknet und anschließend für 10 Minuten bei 60°C mit offenem Deckel in den Thermomixer gestellt, um das Ethanol als potentiellen Polymerase-Inhibitor restlos zu entfernen. Anschließend wurde es in 60 µl Nuclease-freiem Wasser aufgelöst. 1 µl der Lösung wurden zur fotometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen.
- 6.) Konzentrationstest: Die Konzentration der RNA wurde durch eine photometrische Messung der Absorbtion bei 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Dazu wurden 1µl RNA 1/40 verdünnt und in eine Quarzglasküvette überführt. Als Maß für die Reinheit der vorliegenden RNA dient der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  dieser sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Quotienten  $< 1,8$  weisen auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder DNA hin, Quotienten  $> 2,0$  zeigen Verunreinigungen durch Salze oder Nukleotide an, wie sie bei fortschreitender Degradation auftreten. Im Mittel ergab sich eine Konzentration von 0,5 µg RNA pro µl, so dass für die reverse Transkription im Mittel 2 µl Volumen der RNA Lösung eingesetzt wurde, um 1 µg RNA umzuschreiben.

---

### 3.6.1. Laborausstattung und Geräte

Zur Vermeidung von Kontaminationen waren die PCR-Arbeitsplätze räumlich getrennt von anderen Arbeitsplätzen. Zusätzlich war eine Abtrennung der verschiedenen Bereiche der PCR notwendig. So gab es einen separaten Bereich für Nukleinsäure-Isolierung und Vorbereitung des PCR-Reaktionsansatzes. Um das Kontaminationsrisiko weiter zu senken, wurden Filter-Einweg-Pipettenspitzen verwendet.

### 3.7. Reverse Transkription

RNA kann im Rahmen einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt (Kawasaki, 1989). Es ist daher nötig, in einem Zwischenschritt mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstehende cDNA dient als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR. Als Primer für die Reverse Transkription kann man Oligo-dT-Primer, Hexamere oder spezifische Primer verwenden. Durch Einsatz von unspezifischen Primern, wie „*Random Hexamers*“ ist eine Umschreibung der kompletten RNA in cDNA möglich. Dieses hat den Vorteil, dass nun mit der vorliegenden cDNA als Basismatrize verschiedene Gene mit unterschiedlichsten Primern untersucht werden können.

Der RT Ansatz enthielt:

- 1 µg RNA in 2 µl RNase/DNase freiem Wasser
- 1 µl 10x PCR Buffer
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 „*Random Hexamers*“
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 0,5 µl Reverse Transkriptase
- 2 µl Trinukleotidphosphate (dTTPs) je 0,5 µl dGTP, dATP, dTTP, dCTP<sup>14</sup>

Die RNA mit dem entsprechenden Volumen an RNase freiem Wasser wurde für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um ein Aufbrechen der Sekundärstrukturen zu erreichen. Die Proben wurden dann unverzüglich auf Eis gestellt und die restlichen Reagenzien wurden dazugegeben. Damit ergab sich ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl. Dann wurde die Reverse Transkription im Thermocycler in folgenden Schritten durchgeführt:

---

<sup>14</sup> GTP: Guanintriphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, TTP: Thymidintriphosphat und CTP: Cytosintriphosphat

- 
- Reverse Transkription: 42°C für 15 Minuten
  - Denaturierung: 99°C für 5 Minuten
  - Kühlung: 5°C für 5 Minuten

Die cDNA wurde sofort auf Eis gestellt und mit 40 µl DNase und RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die cDNA wurde sofort für die Taqman PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **3.8. Theoretische Grundlagen der Taqman-PCR**

#### **3.8.1. Entwicklung der real-time-PCR**

Die quantitative real-time-PCR wurde zu Beginn der 90er Jahre entwickelt. Die ersten Ansätze bestanden darin, die PCR alle fünf Zyklen zu stoppen, ein Aliquot zu entnehmen und auszuwerten (Ginzinger, 2002). Insbesondere bei hohem Probenaufkommen war dieser Ansatz sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Durch Verwendung von radioaktiv, später Fluorochrommarkierten Sonden, die mit den Amplifikaten hybridisierten und durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase enzymatisch gespalten wurden, konnte eine indirekte Quantifizierung der PCR stattfinden (Holland et al., 1991). Dabei erfolgte die Auswertung durch Messung der Fluoreszenz vor und nach der PCR-Reaktion in einem separaten Gefäß. Durch die Kombination eines Thermocyclers mit einer Lichtquelle in Form einer Halogenlampe, eines Lasers oder LEDs (Licht-emittierende-Diode) sowie eines optischen Detektionsmoduls, konnte später die Fluoreszenz auch während der laufenden PCR gemessen werden. Eine Auswertung in Echtzeit (engl.: *real-time*) war nun möglich (Ishiguro et al., 1995; Wittwer et al., 1997).

Erst der Einsatz thermostabiler Polymerasen machte eine automatische Durchführung der PCR möglich, da diese nicht durch Hitze inaktiviert wurden. Dadurch entfiel die Notwendigkeit, nach jedem Denaturierungsschritt neue Polymerasen hinzuzufügen. Die thermostabilen Polymerasen wurden aus Bakterien isoliert, die in heißen Quellen leben (z.B. aus *Thermus aquaticus*: die Taq-Polymerase (Chien et al., 1976). Inzwischen werden sie gentechnisch hergestellt.

#### **3.8.2. Grundlagen der Funktionsweise der real-time-PCR**

Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Aufgrund dieser Proportionalität ist zudem eine Quantifizierung der Ausgangs-(c)DNA möglich. Die Visualisierung des Amplikons kann entweder mit einem nicht-spezifischen Detektionssystem, welches auf der Markierung des Amplikons durch

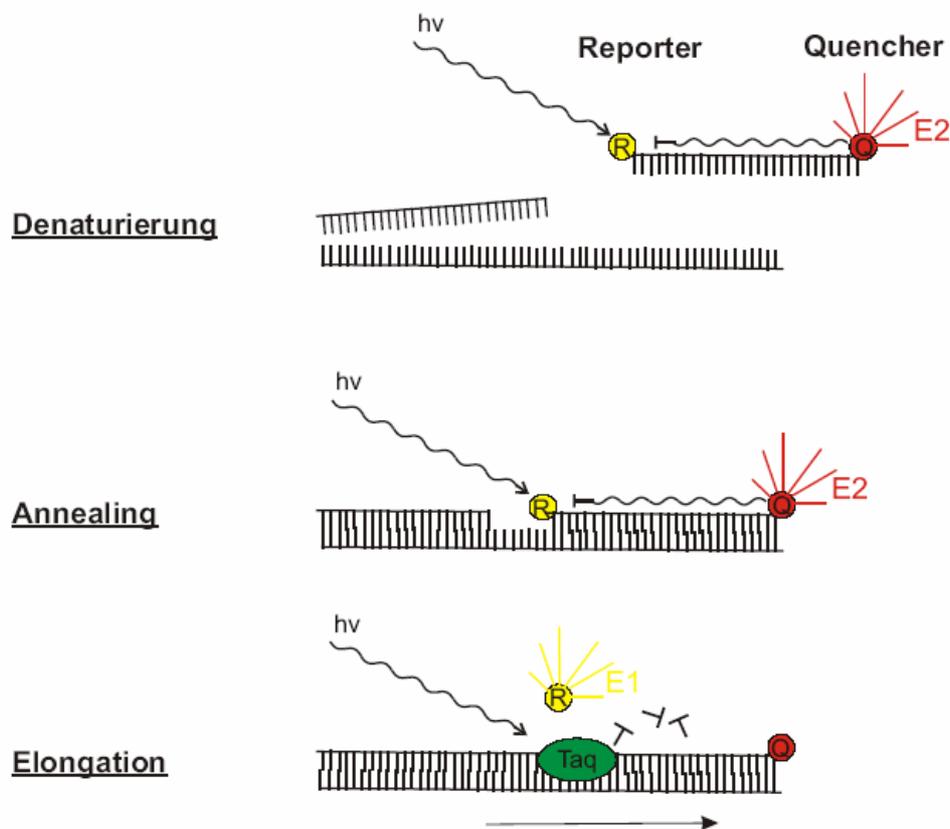
interkalierende Farbstoffe basiert, oder einem spezifischen Detektionssystem, das fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, erfolgen.

Sonden (engl.: „Probes“) sind mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrom) markierte Oligonukleotide, die während der PCR spezifisch in einem Bereich zwischen den beiden Primern hybridisieren. Sie sind in der Regel zwischen 20 und 30 Basen lang und ihre Sequenz muss, wie die der Primern auch, speziell für das zu untersuchende Amplikon ausgewählt werden. Bei Hybridisierung an die gewünschte Zielsequenz erfolgt eine Emission der Fluoreszenz. Es gibt eine Vielzahl verschiedener SONDENSYSTEME. Der Mechanismus, auf dem alle diese Systeme basieren, wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfer bezeichnet (Cardullo et al., 1988).

Ein Fluoreszenzfarbstoff wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) angeregt und strahlt Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab (Selvin, 1995). Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs sind dabei für diesen charakteristisch. Bringt man ein Fluorochrom (F1) in ausreichende Nähe zu einem zweiten (F2), dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (E1) entspricht, springt die Energie zwischen beiden über, wenn der Abstand nicht mehr als 17-20 Basen (10 – 100 Å) übersteigt (Cardullo et al., 1988). Die Energie wird dann direkt an Fluorochrom 2 weitergeleitet und von diesem als E2 emittiert. So kann man während der PCR die Lichtstärke bei Wellenlänge E1 oder E2 verfolgen und sieht daran, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit von einander getrennt (Messung von E1) oder nahe beieinander sind (Messung von E2). Wird E1 gemessen, bezeichnet man Fluorochrom 1 als Reporter und Fluorochrom 2 als Quencher (engl.: „to quench“ = löschen). Kann man E2 messen heißt Fluorochrom 1 Donor und Fluorochrom 2 Akzeptor. Konventionell wird der Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) als Reporter/Donor verwendet. Als Quencher/Akzeptor wird herkömmlich der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) verwendet, welches auch als Reporterfarbstoff nutzbar ist.

Eines der vielzähligen SONDENSYSTEME, die für die real-time-PCR zur Verfügung stehen, stellen die „Double-Dye-Sonden“ dar, der Reporterfarbstoff befindet sich hier am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Zusätzlich befindet sich am 3'-Ende der Sonde noch eine Phosphatgruppe, damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann (Cardullo et al., 1988). Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtstärke bei E1 gering, da fast die gesamte Lichtenergie aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher (F2) aufgenommen und in die Wellenlänge E2 umgeformt wird (Walker 2002). Das emittierte Licht des Reporterfarbstoffes wird „*gequenched*“, d.h. gelöscht. Dieser FRET-Effekt bleibt nach Bindung der Sonde an den komplementären DNA-Strang bestehen (Cardullo et al., 1988). Während der Elongationsphase

wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert (Lie und Petropoulos, 1998).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips. Double Dye Sonden tragen zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Der Reporterfarbstoff befindet sich am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtstärke des Reporters gering, da fast die gesamte Lichtenergie aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher aufgenommen wird. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie. Nach der Hydrolyse befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher. Die emittierte Fluoreszenz E1 kann jetzt gemessen werden.

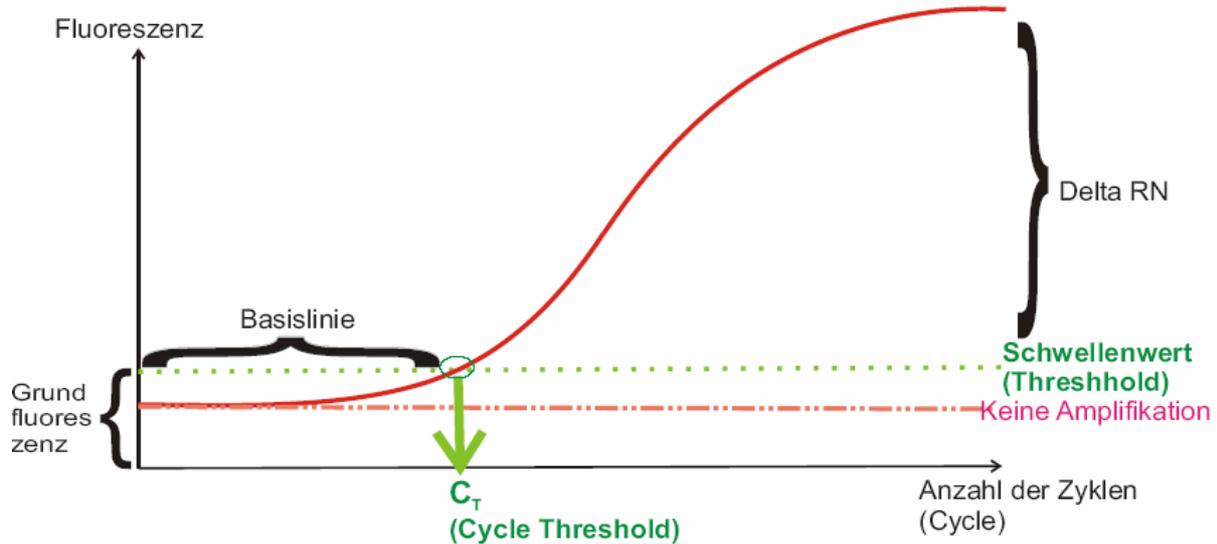
Nicht alle Polymerasen haben die Fähigkeit, ein Oligonukleotid (bzw. eine Sonde) während der Strangsynthese zu hydrolysieren. Dieses Prinzip wurde als erstes für die Taq-Polymerase beschrieben<sup>15</sup>.

#### 3.8.3. Auswertung der real-time-PCR

Die während des Amplifikationsprozesses gemessene native Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird als R, um den Fluoreszenzwert der Basislinie korrigiert dann als dR bezeichnet. Diese kann

<sup>15</sup> Da das Verhalten der Taq-Polymerase bei der Strangverlängerung einer Comicfigur aus einem Computerspiel der 1980er (*PacMan*) gleicht, wurde dieses Prinzip in Anlehnung daran TaqMan-Prinzip genannt (Leutenegger et al., 2001).

mit der Fluoreszenz eines Referenzfarbstoffes abgeglichen werden (Rn). Der Referenzfarbstoff, z.B. ROX, wird allen Reaktionsansätzen in konstanter Menge zugegeben. Er dient zur Abgleichung möglicher Fluoreszenzunterschiede der Sonde, aufgrund von unterschiedlichen Volumina (Pipettierfehlern) in den einzelnen Reaktionsgefäßen, sowie zum Abgleich variierender Fluoreszenzwerte. Diese entstehen durch die optische Detektionseinheit, welche von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß fährt. Aus den ermittelten Fluoreszenzwerten wird eine graphische Darstellung, die Amplifikationsgraphik, erzeugt. Die gemessene Fluoreszenz wird auf der Ordinate gegen die Zyklenanzahl auf der Abszisse aufgetragen:



**Abbildung 6: Darstellung einer Amplifikationsgraphik.** Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei zeigt der Reaktionsansatz schon eine gewisse Grundfluoreszenz (GF), bevor es zur Amplifikation gekommen ist. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15 multipliziert mit dem Faktor 10, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So ergibt sich der Schwellenwert (Threshold). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als Cycle-threshold (CT) bezeichnet. Er markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe weisen eine gewisse Grundfluoreszenz auf. Ferner haben auch die verschiedenen verwendeten Materialien, wie z.B. die Plastikreaktionsgefäße, bei Anregung eine gewisse Hintergrundfluoreszenz. Daher ist der Fluoreszenzwert, der beim Start der Reaktion gemessen wird, nicht gleich Null (Abbildung 6). Im Falle einer negativen RT-PCR verbleibt die gemessene Fluoreszenz unter dem Schwellenwert und verläuft in einer Linie bis zum Ende. Im Falle einer positiven Reaktion mit Amplifikation des Produkts steigt die Fluoreszenz im Laufe der Reaktion an. Vor dem Anstieg der Fluoreszenz verbleibt die gemessene Fluoreszenz für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert und verläuft als Linie parallel zur Abszisse. Dieser Bereich wird als Basislinie bezeichnet, dort kommt es zwar schon

zur Produktsynthese, die entstehenden Produktmengen sind jedoch so gering, dass es noch nicht zu einem deutlich messbaren Anstieg der Fluoreszenz kommt. Es muss nun ein Punkt definiert werden, ab dem eine gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden ist. Hierfür wird ein Schwellenwert gesetzt (Threshold). Der Schnittpunkt zwischen der Fluoreszenz und dem Schwellenwert projiziert auf die Abszisse und wird als Cycle-threshold ( $C_T$ ) bezeichnet und gibt somit eine Zyklenanzahl an. (Abbildung 6). Der  $C_T$ -Wert ist daher Grundlage für die Quantifizierung einer Reaktion, denn er verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure (Higuchi et al., 1993). So könnte rein theoretisch anhand des  $C_T$ -Wertes auf die ursprüngliche Matrizenmenge zurückgeschlossen werden, vorausgesetzt, die Vermehrungsrate der PCR wäre bekannt. Die Amplifikation eines bestimmten Fragments wird aber von vielen Faktoren beeinflusst, so dass es nicht möglich ist, die genaue Vermehrungsrate einer Reaktion zu ermitteln (Bustin, 2000). Deswegen erfolgt die Auswertung meist durch relative Quantifizierung. Diese erfasst die Veränderungen eines im Gleichgewicht befindlichen System und stellt für Genexpressionsstudien eine adäquate Quantifizierungsmethode dar. Bei dieser Quantifizierung handelt es sich um die Bestimmung des Verhältnisses der Menge an RNA/cDNA in der zu untersuchenden Probe 1 zu der Menge RNA/cDNA in einer anderen Probe 2. Für die Bestimmung muss weder die Konzentration der Zielsequenz bekannt sein, noch eine Standardkurve mit bekannter Konzentration erstellt werden, da nur ein Verhältnis beider Proben zueinander berechnet wird (Bustin, 2000; Livak und Schmittgen, 2001). Die unbekannte Menge der Zielsequenz wird semiquantitativ, d.h. bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz, abgeschätzt. Bei der sogenannten  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) wird neben der eigentlichen Zielsequenz auch eine „endogene Kontrolle“ als Referenzgen mitamplifiziert. Diese endogene Kontrolle wird als Housekeeping-Gen bezeichnet. Es setzt die Menge an Ziel-RNA ins Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA. Als endogene Kontrolle sollten Gene verwendet werden, die ubiquitär vorkommen und in einer weitgehend konstanten Menge in den verwendeten Zellen exprimiert werden, wie z.B. 18s rRNA, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) oder  $\beta$ -Aktin. Sie sollten unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen immer konstant exprimiert werden.

Man kann das Housekeeping-Gen und die Zielsequenz im selben Reaktionsgefäß messen (Multiplex-Ansatz) oder die zu untersuchende Probe aufteilen und die endogene Kontrolle und mehrere Zielgene gleichzeitig in getrennten Reaktionsgefäßen auswerten. Die Normalisierung der gemessenen Daten durch das Verhältnis zur endogenen Kontrolle verhindert Fehler, die auf gering veränderten PCR-Effektivitäten oder verschiedenen Ausgangskonzentrationen basieren. Werden

C<sub>T</sub>-Werte miteinander verglichen ist eine Standardkurve nicht nötig. Grundlage hierfür ist eine gleiche Effizienz der Housekeeping Gen-PCR und der Zielsequenz-PCR. Auf diese Weise ist es möglich, an der Stärke des Fluoreszenzsignals die Akkumulation der PCR-Produkte abzulesen. Dies wurde mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst. Ein Reaktionsansatz für die Taqman PCR bestand grundsätzlich aus folgenden Komponenten: Matrize (cDNA), Puffer, Primer, Magnesium-Ionen, Nukleotiden (dNTPs), Polymerase.

## 3.9. Praktische Durchführung der Taqman PCR

### 3.9.1. Eingesetzte Gewebeproben und definierte Zielgene

Es wurden Gewebeproben von zwei kranken Mäusen der Untersuchungsgruppe sowie von jeweils einer Maus der Gruppe der scheinimmunisierten Tiere pro definiertem Entnahmetag eingesetzt. Bei jeder Maus wurden Hirnstamm, Frontalhirn, Rückenmark (lumbal) und Milz untersucht. In allen Regionen wurden folgende Gene untersucht (die Primer/Sonden Sequenzen sind gesondert aufgeführt): GAPDH<sup>16</sup> (als Referenzgen = *House Keeping Gen*), TRAIL, DR5, CD95, CD95 Ligand

### 3.9.2. Primerdesign

Primer sind synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide. Sie dienen als Startpunkt für das Enzym Polymerase und sind somit grundlegende Voraussetzung für deren Funktion. Primer begrenzen die zu vermehrende Region. Sie wurden so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5'- bzw. zum 3'-Ende der Zielstränge sind. Dann konnten sie sich während der Annealingphase über Wasserstoffbrückenbindungen an die cDNA Einzelstränge anlagern. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Primer spielen eine maßgebende Rolle für das Gelingen einer PCR. Relevant sind vor allem Struktur und Sequenz der Primer. Die Sequenzen der Ziel-Gene sind speziesspezifisch in gängigen Datenbanken im Internet zu finden. Diese enthielten auch Informationen über Länge und Lage von Introns und Exons. Um eine mRNA-spezifische Amplifikation zu erreichen, sollte eine Sequenz, die sich an der Grenze zwischen zwei Exons befindet, gewählt werden. Das zwischen diesen zwei Exons befindliche Intron sollte dabei mindestens eine Größe von 1000 Basenpaaren haben. Die Sequenz wurde in einer Datenbank auf Sequenzhomologien mit anderen Genen überprüft (Blast), um die Gefahr einer unspezifischen Amplifikation zu vermeiden. Erfüllte die gefundene Sequenz die genannten

---

<sup>16</sup> GAPDH= Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Kriterien, wurden mit dem Programm Primer Express Primer und Sonden kreiert. (ABI PRISM Primer Express Software)

Es gibt einige Grundlagen beim Design, die beachtet werden sollten:

- Die Länge der Primern sollte 20 – 30 Basen betragen.
- Das Verhältnis AT/GC<sup>17</sup>- sollte zwischen 40 und 60 % liegen.
- Primer sollten keine „ungewöhnlichen“ Basenabfolgen wie Poly-A oder lange G/C Bereiche aufweisen, denn dadurch kann es zu Fehlhybridisierungen (Mispriming) und Leserasterverschiebungen (Frameshifts) kommen.
- AT- und GC-reiche Regionen sind zu vermeiden.
- Platziert man ein bis drei G/C-Basen an das 3'-Ende des Primers erreicht man eine stärkere Bindung und Elongation. Allerdings ist Vorsicht geboten, da mehr als drei G oder C an diesem Ende fehlhybridisierte Primer stabilisieren und somit die Gefahr der unspezifischen Amplifikation erhöhen.
- Die Schmelztemperatur der Primer sollte zwischen 55 und 80 °C liegen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben.
- Beide Primer sollten eine ähnlich hohe Schmelztemperatur haben.

Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren, d.h. sie dürfen keine komplementären Sequenzen besitzen, da bei Primerdimerisierung ein Teil der eingesetzten Primer verloren geht, die PCR-Effizienz stark reduziert und die Auswertung der PCR erheblich gestört wird. Interne Sekundärstrukturen, sogenannte Haarnadelstrukturen, sind ebenfalls zu vermeiden. Mit dem Computerprogramm Primer Express konnten die Primereigenschaften überprüft werden und so z.B. die Bildung von Haarnadelstrukturen ausgeschlossen werden.

#### 3.9.3. Sondendesign

Sonde und Primer wurden grundsätzlich in Abstimmung aufeinander entworfen. Beim Entwurf der fluorogenen Sonde war darauf zu achten, dass keine zu den Primern komplementären Sequenzbereiche vorhanden waren. Haarnadelstrukturen oder komplementäre Regionen innerhalb der Sonde müssen vermieden werden.

- Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes des PCR Primers befinden.
- Die Sondenlänge sollte 20-30 Basen umfassen.
- Der Cytosinanteil sollte zwischen 40 und 60 % betragen (Lie und Petropoulos, 1998).

---

<sup>17</sup> Adenin(A), Guanin(G), Cytosin(C), Thymin(T)

- Der Schmelzpunkt der Sonde muss mindestens 5 bis 10 °C über dem der Primer liegen (Lie und Petropoulos, 1998).
- Bei Sonden, die ein Fluorochrom am 5`-Ende tragen, darf sich dort kein Guanin befinden, da es sonst zu einem zusätzlichen Quenching des Reporterfarbstoffs kommt, welches bei Double-Dye-Sonden auch nach der Spaltung der Sonde noch anhält (Lie und Petropoulos, 1998).

#### 3.9.4. Kontrolle der Primer und Sonden

Die Kontrolle der spezifischen Amplifikation erfolgte in mehreren Schritten:

1. Durchführung einer konventionellen PCR mit cDNA und genomischer DNA mit Darstellung der Banden auf einem 2% Agarosegel. Bei einer spezifischer Amplifikation der cDNA muss sich das Produkt als einzelne Bande darstellen, die genomische DNA darf durch die Primer nicht amplifiziert werden.
2. Durchführung einer TaqMan-PCR mit isolierter Gesamt-RNA (ohne diese in cDNA umzuschreiben), um die unspezifische Transkription eventuell noch vorhandener DNA-Reste auszuschließen
3. Durchführung einer TaqMan-PCR mit drei verschiedenen Verdünnungen von cDNA (1:2; 1:4; 1:8), dabei war eine Änderung (Shift um den Wert 1) des Cycle Treshold Wertes in der Auswertung ein Maß für die Genauigkeit der PCR.

#### 3.9.5. Durchführung der Real-Time TaqMan PCR

Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl und setzte sich zusammen aus

- 12,5 µ Mastermix
- 2,0 µl Sense-Primer (Forward Primer) (300 nM)
- 2,0 µl Antisense Primer (Reverse Primer) (300 nM)
- 2,0 µl Sonde (Probe)(225 nM)
- 2,5 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl cDNA

Diese Reagenzien wurden in eine 96-Microtiterplatte pipettiert. Zur Analyse wurde die Microtiterplatte in das ABI PRISM™ 7700 Detection System überführt. Dieses verfügt über einen eingebauten Thermocycler, in welchem die Proben 40mal den folgenden Zyklus durchlaufen:

- 2 min 50°C (ab dem zweiten Zyklus Strangsynthese)
- 10 min 95°C (primärer Denaturierungsschritt)

- 15 sec 95°C (Denaturierung)
- 1 min 60°C (Primer-Annealing).

Über den Reaktionsgefäßen der Microtiterplatte befindet sich eine Linse, die den Strahl eines Argon-Lasers (488 nm) in die Gefäße weiterleitet, wodurch eine Fluoreszenzanregung erfolgen kann. Die Fluoreszenzemission wird über denselben optischen Leiter gemessen.

#### 3.9.6. Quantifizierung mittels TaqMan-Technologie

Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Bei dieser Quantifizierung wird das Verhältnis der Menge an eingesetzter RNA/cDNA in der Probe 1 zu der Menge eingesetzter RNA/cDNA in einer Probe 2 bestimmt. Es wurde neben der eigentlichen Zielsequenz auch ein Referenzgen GAPDH als housekeeping gen (hkg) mitamplifiziert. Es setzt die Menge an Ziel-RNA ins Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA.:

**Abbildung 7: Berechnung der relativen Genexpression aus den CT Werten des Referenzgens und des Zielgens**

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_x} - \Delta C_{T_{hkg}}$$

$\Delta C_T$  ist der normalisierte CT für das Zielgen,

$\Delta C_{T_{hkg}}$  ist der normalisierte CT für GAPDH.

Geht man von einer Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus aus, so gilt folgende Gleichung:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ (angegeben ohne Einheiten)}$$

### **3.10. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows. Die Tiere der Untersuchungsgruppe wurden mit den korrespondierenden gesunden Tieren der Kontrollgruppe verglichen. Dazu diente der Mann-Whitney-U Test in dem jedes Gen, bzw. histologische Merkmal (getrennt nach Gewebe und Krankheitsstadium) mit der entsprechenden Kontrolle verglichen wurde.

### **3.11. Histologische Aufarbeitung**

#### **3.11.1. Anfertigen von Vibratomschnitten**

Das in PFA befindliche Gehirn und Rückenmark wurden nach Spülen in PBS in 4% Agarose eingebettet. Mit Hilfe eines Vibratoms wurden 50 µm dicke, horizontale Schnitte angefertigt. Diese wurden, für jede Maus getrennt, in 48 well Zellkulturplatten mit 0,1 molaren Phosphatpuffer überführt. So konnten aufeinanderfolgende Schnitte identifiziert werden. Die Schnitte wurden sofort für die Experimente eingesetzt. Die restlichen Schnitte wurden in ethylenglycolhaltiger Kryoprotektionslösung bei -20°C gelagert.

#### **3.11.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Quantifizierung**

Die Schnitte von verschiedenen Regionen des Gehirns und des Rückenmarks wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, angetrocknet und in Glasküvetten nach folgendem Protokoll gefärbt:

- Einbringen in Millipore-Wasser für 5 Minuten
- Überführen in Hämatoxylin-Lösung für 10 Minuten
- Abspülen mit laufendem Wasser (kein direkter Strahl auf die Schnitte) unter ständiger mikroskopischer Kontrolle der Färbung
- Färbung der Schnitte mit Eosin für 45 Sekunden
- Kurzes Eintauchen der Schnitte in Aqua bidest. und Durchlaufen einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 2 Minuten in 70%, 96%, 100% Ethanol
- Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in Xylol unter dem Abzug
- Eindecken der Schnitte mit Etalan

Die Quantifizierung der Inflammation erfolgte durch zwei geblindete Untersucher. Es wurden lichtmikroskopisch bei einer 20-fachen Vergrößerung je 4 Areale sowohl im Hirnstamm als

auch im Rückenmark begutachtet. Die Stärke der Inflammation wurde durch Zählen und Einteilung der Läsionen in drei Gruppen entsprechend ihrer Größe beurteilt. Entsprechend der Größenzuordnung wurde die Läsionszahl dann mit dem dazugehörigen Faktor multipliziert.

**Tabelle 3 Läsionsgröße mit dem entsprechenden Faktor zur Bestimmung des Inflammationsindex:**

<b>Läsionsgröße</b>	<b>Faktor</b>
Bis 30 µm	1
30-70 µm	2
> 70 µm	3

Die sich ergebenden Punkte wurden für jede Maus addiert und durch die Anzahl der gezählten Areale geteilt. Der sich ergebende Wert wurde als Inflammationsindex bezeichnet und ist ein Maß für die Dichte der Inflammation pro Areal.

Die (para)meningeale Infiltration wurde gesondert aufgrund ihrer Stärke bewertet:

- + leichte meningeale Infiltration (vereinzelte inflammatorische Zellen und Zellgruppen)
- ++ mittelstarke meningeale Infiltration (durchgehendes Zellband von 2-4 Lagen Zellen)
- +++ starke meningeale Infiltration (Zellband von > 5 Lagen Zellen)

#### **3.11.3. Klüver-Barrera-Färbung und Quantifizierung**

Luxol-Fast-Blue zeigt eine hohe Affinität zu Neurokeratin und ermöglicht so eine Myelinscheidendarstellung. Entmarkungsherde stellen sich als nicht gefärbte, weiße Flecken (patches) dar. Durch die Kombination mit einer Kresylviolett-färbung (Nissl-Färbung) können Zellsomata von Nervenzellen (genauer sogenannte Nissl-Körperchen, welche dem endoplasmatischen Retikulum entsprechen) dargestellt werden. In dieser Kombination wird die Färbung als Klüver-Barrera-Färbung bezeichnet.

- Aufziehen der Schnitte auf gelatinisierte Objektträger
- Inkubation über Nacht bei 4°C in einer 0,1% LFB Lösung
- Überführen der Schnitte in 96% Ethanol, um die Überfärbung auszuwaschen
- Kurzes Eintauchen der Schnitte in 50% Ethanol
- Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 5 Minuten
- 3 Sekunden Einbringen in 0,125 % Lithiumcarbonat und anschließend für wenige Sekunden in 70% Ethanol zur Differenzierung der Färbung. Diese Schritte müssen unter

---

mikroskopischer Kontrolle erfolgen, um eine zu starke oder zu geringe Entfärbung der Schnitte zu verhindern.

- Waschen der Schnitte für 2x 5 Minuten in Aqua dest.
- Gegenfärbung in Kresylviolettlösung für 10 Minuten und Abspülen mit laufendem Wasser (kein direkter Wasserstrahl auf die Schnitte)
- Entwässerung der Schnitte für 5 Minuten in 70% Ethanol, 30 Sekunden in 96% Ethanol und 2x 5 Minuten in 100% Isopropanol
- Belassen der Schnitte für 10 Minuten in Xylol unter dem Abzug
- Eindeckeln der Schnitte mit Etalan.

Durch die LFB/HE Färbung konnte die Demyelinisierung im Zusammenhang mit der Inflammation beurteilt werden. Entmarkungsherde wurden bis zu einer Ausdehnung unter 50 µm als kleine und über 50 µm als große Herde gewertet.

Die Demyelinisierung wurde von zwei geblindeten Untersuchern in je vier Arealen sowohl im Hirnstamm als auch im Rückenmark begutachtet und nach ihrer Stärke beurteilt:

Grad 1: leichte Demyelinisierung (kleine Entmarkungsherde in 1-2 Arealen eines Schnittes)

Grad 2: mittelstarke Demyelinisierung (kleine Entmarkungsherde in allen Arealen eines Schnittes)

Grad 3: starke Demyelinisierung (große Entmarkungsherde in 1-2 Arealen eines Schnittes)

Grad 4: sehr starke Demyelinisierung (große Entmarkungsherde in allen Arealen eines Schnittes)

### **3.12. Immunhistochemie**

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden in 24-well-Zellkulturplatten mit frei schwimmenden Schnitten angefertigt. Das Protokoll der APP und aktivierte-Caspase3-Färbung unterschied sich lediglich in den verwendeten primären Antikörpern und deren Konzentrationen, welche in Kapitel Materialien genau aufgeführt sind.

Beide Färbungen erfolgten nach der Biotin-(Strept)-Avidin Methode. Für diese Methode benötigt man einen Primärantikörper, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet. Zu diesem wird dann ein biotinkoppelter Sekundärantikörper (Brückenantikörper) gegeben, der an den

ersten bindet. Das dritte Reagenz ist ein peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex, der eine ausgeprägte Affinität zu Biotin hat. Das Enzym Peroxidase wird durch DAB<sup>18</sup> sichtbar gemacht.

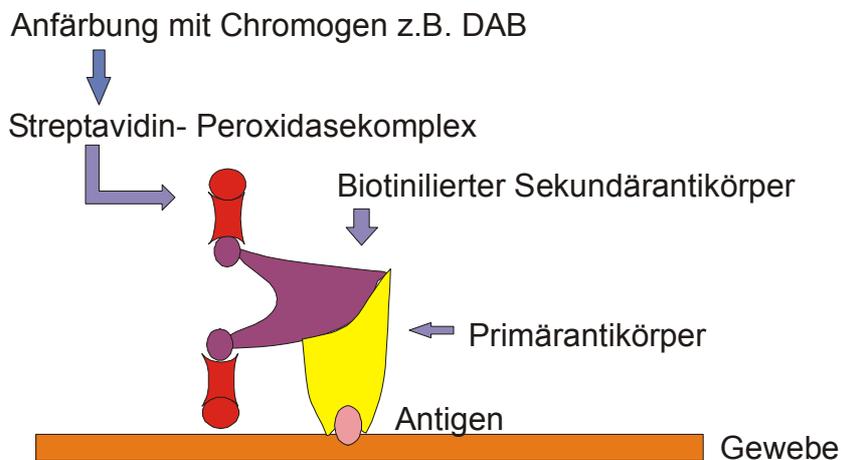


Abbildung 8:Prinzip der Immunhistochemischen Färbemethode, die für die DAB Färbungen verwandt wurde

### 3.12.1. Aktivierte-Caspase 3-Färbung

Caspasen sind Proteasen, die in allen Zellen als inaktive Proenzymformen vorkommen. Sie werden durch proapoptotische Stimuli in sequentieller Reihenfolge aktiviert. Dieser Vorgang wird auch als Caspasen-Kaskade bezeichnet (Hirata et al., 1998), bei der einige Caspasen als sogenannte Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9, 10) und andere als Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7) fungieren. Bis heute wurde keine Caspaseaktivierung bei nekrotischem Zelltod nachgewiesen. Caspase 3 ist fast immer bei apoptotischen Vorgängen aktiviert und wird als Haupteffektor angesehen (Sahara et al., 1999). Sie aktiviert ihrerseits Desoxyribonukleasen, welche die DNA fragmentieren (Nagata, 2000) und Enzyme, welche das Zytoskelett der Zelle zerstören. Der verwendete Primärantikörper erkennt ausschließlich die bei der Aktivierung der Caspase3 entstehende große Untereinheit. Er bindet nicht an das intakte Proenzym. Somit ist das Signal nur in Zellen mit aktivierter Caspase 3 positiv und damit ein sehr spezifischer Apoptosenachweis.

Das folgende Protokoll wurde für die Caspase 3 und die APP-Färbung verwendet und unterschied sich nur durch die entsprechenden Antikörper:

- Waschen der Schnitte für 2x 5 Minuten in PBS
- Einbringen der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 3% Wasserstoffperoxydlösung zur Reduktion der Hintergrundfärbung

<sup>18</sup> DAB: 3'-3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid ist ein sensitives und lichtstabiles Chromogen, welches sich als braun schwarzes Produkt darstellt

- Blockade unspezifischer Bindung mit 10% Ziegen Serum (Normal Goat Serum=NGS) für 30 Minuten, da der Sekundärantikörper aus der Ziege stammte
- Waschen der Schnitte für 2x 5 Minuten in PBS und Inkubieren der Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht (zirka 16 h), Kontrollschnitte wurden ohne Primärantikörper inkubiert
- Waschen der Schnitte mit PBS und Inkubieren der Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 2 Stunden
- Waschen der Schnitte für 3x 5 Minuten in PBS und Inkubieren der Schnitte für 90 Minuten in frisch angesetzter ABC-Lösung
- Waschen der Schnitte für 3x 5 Minuten in PBS und Inkubieren der Schnitte in DAB-Lösung für 2 bis 5 Minuten
- Stoppen der Reaktion durch Abpipettieren der DAB-Lösung und Waschen der Schnitte in PBS
- Entwässern der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe
- Belassen der Schnitte für 10 Minuten in Xylol unter dem Abzug
- Eindeckeln der Schnitte mit Etalan.
- anschließend wurde zur Darstellung der neuronalen Zellsomata eine Nissl-Färbung nach dem bereits im Kapitel 3.1.3. beschriebenen Schema durchgeführt

Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der neuronalen Apoptose durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher. Es wurden lichtmikroskopisch bei einer 40-fachen Vergrößerung je vier Areale von einem Schnitt bei drei Schnitten pro Versuchstier sowohl im Hirnstamm als auch im Rückenmark begutachtet. Dabei wurden Caspase3-positive, apoptotische Neurone gezählt und die Gesamtanzahl durch die Anzahl der gezählten Areale geteilt. Der entstehende Wert wurde als Apoptoseindex bezeichnet und ist ein Maß für die durchschnittliche Zahl der apoptotischen Neurone pro Areal.

#### **3.12.2. APP-Färbung**

APP (Amyloid Precursor Protein) ist ubiquitär in Neuronen vorhanden und wird durch schnellen anterograden axonalen Transport befördert. Wenn das Zytoskelett von Neuronen instabil wird, ist der axonale Transport gestört, und APP akkumuliert an der Stelle des Schadens. Normale Konzentrationen von APP sind nicht immunhistochemisch darstellbar, erst bei Akkumulation, verursacht durch axonalen Schaden, gelingt dies (Ferguson et al., 1997). APP ist somit ein Marker für frühen axonalen Schaden im Sinne von Integritäts- und Funktionsverlust des Axons

(Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000). Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Schaden reversibel ist. Die APP-Immunreaktivität ist nur in akuten Läsionen hoch, in alten Läsionen (von früheren Krankheitsschüben) ist sie gering (Ferguson et al., 1997; Lewen et al., 1995). Es kann also nur der akute Schaden, nicht aber der gesamte axonale Schaden gemessen werden. Das immunhistochemische Protokoll ist bis auf den verwendeten Primärantikörper mit dem der Caspasefärbung identisch.

Die Quantifizierung erfolgte durch Zählen der APP-positiven Axone durch zwei geblindete Untersucher bei einer 40 fachen Vergrößerung (Ferguson et al, 1997; Kornek et al, 2000). Es wurden je vier Areale im Hirnstamm und acht Areale im Rückenmark ausgezählt und so ein Index für axonalen Schaden ermittelt, der die durchschnittliche Anzahl der APP positiven Neurone pro Areal bezeichnet.