

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Präparation der Mikrogliazellkulturen

Für die Herstellung der Gliaprimärkulturen wurden die Gehirne neugeborener NMRI Mäuse (Moellegard Breeding Culture Deutschland GmbH, Schönewalde, Deutschland) verwendet, und es wurde nach einer modifizierten Methode von Drejer und Mitarbeitern (1985) präpariert. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Die Mäuse wurden über einer gekühlten Petrischale dekapitiert, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn entnommen. Anschließend wurden sie in einer Petrischale mit gekühlter „Hank's balanced salt solution“ (HBSS, Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland) gesammelt. Das Stammhirn, das Kleinhirn und die olfaktorischen Bulben wurden abgetrennt und verworfen. Durch sorgfältige Entfernung der Hirnhäute wurde eine Verunreinigung der Kulturen durch zum Beispiel Endothelzellen oder Fibroblasten weitgehend verhindert.

Das möglichst vollständige Dissoziieren in Einzelzellen erfolgte durch die Kombination eines enzymatischen und eines mechanischen Verfahrens: das Gewebe wurde mit 1 % Trypsin (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 0,05 % DNase (Worthington, Lakewood, USA) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase degradiert ausgetretene DNS und verhindert somit ein erneutes Verklumpen der Zellen. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem „Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium“ (DMEM, Zusammensetzung siehe 2.1.1) abgestoppt. Der Überstand wurde abgenommen und zu dem Zellpellet DNase sowie serumhaltiges DMEM hinzugefügt. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe einer 10 ml Pipette mechanisch dissoziiert und 12 Minuten bei 960 Umdrehungen pro Minute (Upm) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 960 Upm für 12 Minuten bei 4 °C wurde der Zellsuspension eine geeignete Menge Medium hinzugefügt (5 ml/Gehirn). Jeweils 10 ml dieser Zellsuspension wurden in eine mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 100 µg/ml) beschichtete Kulturflasche (Grundfläche 75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Wiesbaden) gegeben. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luft, 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen zweimal mit serumhaltigem DMEM gewaschen. Nach fünf bis sieben Tagen hat sich in der Kultur ein konfluent Astrozytenmonolayer entwickelt, auf dem sich locker adhärente Mikrogliazellen befanden. Die Mikrogliazellen konnten durch Schütteln der Kulturflaschen von dem

Astrozytenmonolayer abgelöst werden. Der Überstand wurde für zehn Minuten bei 800 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und entweder in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96 Well Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) oder in einer Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen auf unbeschichtete, aber entfettete Deckgläschen in 37 °C vorgewärmten Standardmedium gegeben.

### 2.1.1 Serumhaltiges DMEM

Das serumhaltige Kulturmedium DMEM mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) wurde sowohl für die Primärkulturen als auch für die 96 Well Mikrotiterplatten und Mikrogliazellen auf Deckgläschen verwendet.

DMEM	(Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein)
Penicillin	50 U/ml (Seromed/Biochrome, Berlin)
Streptomycin	50 µg/ml (Seromed/Biochrome, Berlin)
L-Glutamin	2 mM (Seromed/Biochrome, Berlin)
FKS	0,1 ml/ml DMEM (Life Technologies/GibcoBRL, Eggenstein)

Der pH-Wert von 7,3 stellte sich durch die Begasung mit 10 % CO<sub>2</sub> ein und blieb während der Inkubation mit CO<sub>2</sub> konstant.

## 2.2 Präparation von Gewebeschnitten

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen im akut isolierten Schnitt wurden acht Wochen alte C57/Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Den Mäusen wurde unmittelbar nach Dekapitation das Gehirn entnommen, und es wurde auf einen aufgerauten Glasblock mit Acrylzyanatkleber (SuperAttack, Loctite, England) geklebt. Mit Hilfe eines Vibratoms (Vibracut, FTB Feinwerktechnik, Bensheim, Deutschland) wurden in kalter Bikarbonatlösung (Zusammensetzung siehe Seite 24, Tabelle 2) 130 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Behälter mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub>) begastem Bicarbonatpuffer aufbewahrt. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Schnitte auf einem Deckgläschen plziert und mit Hilfe eines Grids (U-förmig gebogenem Platindrahts mit Nylonfäden) fixiert.

Die Identifizierung der Mikroglia im Hirnschnitt erfolgte durch eine Lebendfärbung mit dem Texas-Red markiertem Lektin der Tomate *Lycopersicon esculentum* (Tomatenlektin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Dieses Tomatenlektin bindet spezifisch an einen Poly-

N-acetyl-laktosaminrest, der im Gehirn nur auf der Zelloberfläche von Mikroglia- und Endothelzellen vorkommt (Acarin et al., 1994).

Die Hirnschnitte wurden vor Beginn der Messung für 45 Minuten mit dem Tomatenlektin (100 µg/ml) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Texas-Red wurde Licht der Wellenlänge 560 nm benutzt, als Emissionsfilter kam ein Bandpassfilter mit einem Transmissionsmaximum bei 635 nm zum Einsatz. Durch Umschalten zwischen Phasenkontrast und Fluoreszenz konnten die Mikrogliazellen erkannt und elektrophysiologisch untersucht werden. Tomatolektin färbt ebenfalls Endothelzellen, die aufgrund ihrer Morphologie jedoch eindeutig von Mikrogliazellen unterschieden werden konnten.

### **2.3 Knockout Tiere**

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten homozygoten CCR7 (Forster et al., 1999) und CXCR3 (Hancock et al., 2000) Knockout-Mauslinien wurden von Prof. Lipp (MDC, Berlin, Deutschland) und Prof. Gerard (Children's Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Knockout Tiere wurde in der zitierten Literatur beschrieben. Die CXCR3 Knockout Mäuse besaßen einen C57Bl/6 Hintergrund und wurden im Tierstall gezüchtet (Max-Delbrück Center, Berlin, Deutschland).

### **2.4 Patch-clamp-Technik**

Im Folgenden sollen die wichtigsten Bestandteile der Messapparatur, die für die elektrophysiologischen Messungen an der Mikroglia in der Kultur und im akuten Hirnschnitt verwendet wurden, näher erläutert werden.

#### **2.4.1 Experimenteller Aufbau des Meßstands**

Die Meßapparatur wurde durch einen schwingungsgedämpften Tisch (Mikroplan, St. Wendes, Deutschland) vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung abgeschirmt. Auf diesem Tisch befanden sich Mikroskop, Meßkammer und Mikromanipulator mit Pipettenhalter und Vorverstärker. Der Meßstand war mit einem geerdeten Faraday-Käfig umgeben, um elektromagnetische Störungen zu minimieren. Außen an dem Faraday-Käfig war die Perfusionsanlage befestigt. Die Meßkammer aus Plexiglas war auf dem Objektisch montiert, der am Mikroskop befestigt war. Bei Messungen an akuten Hirnschnitten wurden diese in der Meßkammer mit einem Grid (Nylongitter) in der Perfusionskammer fixiert. Die Patch-clamp-Experimente wurden bei

Raumtemperatur durchgeführt. Das Gewebe oder die Zellen tauchten in die umspülende Badlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) ein, wodurch ein Flüssigkeitsaustausch von allen Seiten gewährleistet war.

**Tabelle 2: Verwendete Badlösungen und Pipettenlösungen in mMol/l.**

1. Bikarbonat-Badlösung, 2. HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S)-gepufferte Badlösung, 3. HEPES-gepufferte Badlösung mit verringerter Chloridkonzentration; 4. Pipettenlösung. Zur Identifizierung von Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt wurde in einigen Versuchen der Pipettenlösung der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt.

Substanz	1	2	3	4
NaCl	134	150	-	-
KCl	2,5	5,4	-	130
NaGluconat	-	-	150	-
KGluconat	-	-	5,4	-
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,3	1	1	3
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2	2	2	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	1,25	-	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	26	-	-	-
HEPES	-	5	5	10
EGTA	-	-	-	5
Glucose	10	10	10	10
pH	7,4	7,4	7,4	7,3

Die für die akuten Hirnschnitte verwendete Bikarbonat Badlösung wurde während des gesamten Experimentes mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Die Perfusion der Zellen in der Meßkammer erfolgte durch ständigen gleichmäßigen Zu- und Ablauf der Badlösungen über Gravitation. Lösungen mit einer veränderten Ionen-Zusammensetzung konnten zur Stimulation der Zellen durch Wechseln des Perfusionskanals appliziert werden. So wurde die niedrig Chlorid enthaltenden Badlösung, wo NaCl durch equimolare Mengen von Natriumgluconat ersetzt wurden, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) und 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) appliziert. Für die lokale Applikation der rekombinanten Chemokine CCL21 und CXCL10 (PeproTech Inc, London, England) oder CCL19 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde eine zweite Mikropipette (Stimulationspipette) verwendet. Diese Stimulationspipette positionierte man in der Nähe

der zu untersuchenden kultivierten Zelle oder dicht über der Schnittoberfläche. Durch einen angelegten Druck konnte der Inhalt der Stimulationspipette in das Bad abgegeben werden. Die Badperfusion wurde bei der lokalen Applikation nicht gestoppt, so daß die Substanzen nach Beendigung der Applikation schnell ausgewaschen wurden.

Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axiovert FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Für Messungen an kultivierten Zellen wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (Zeiss, NA = 0,75) und für Messungen an akuten Hirnschnitten ein Objektiv mit 63-facher Vergrößerung (Zeiss, NA = 0,90) verwendet. Beide Objektive waren Wasserimmersionsobjektive, wodurch eine unebene Luft-Wasser-Grenzfläche im Strahlengang vermieden wurde. Der Arbeitsabstand des Objektivs betrug ein bis drei Millimeter, wodurch die Ableitelektrode, die im Folgenden als Pipette bezeichnet wird, in einem Winkel von 23° zwischen Objektiv und Kammer eingeführt werden mußte. Fokussiert wurde durch Verschieben des Objektivrevolvers (verstellbarer Objektivhalter).

Am Mikroskop war eine lichtstarke Videoeinrichtung installiert. Durch elektronische Kontrastverstärkung, Mittelung oder Hintergrundsubtraktion mit Hilfe der Videoanlage konnte der Kontrast der Bilder verstärkt werden. Der Chip in der Kamera (Variocam, Phase, Lübeck, Deutschland) vergrößerte das Bild zusätzlich.

Die Pipette konnte durch einen Mikromanipulator (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) in der Nähe der Zelle plziert werden. Sie wurde zuvor in den Pipettenhalter eingesetzt, der wiederum mit dem Vorverstärker über einen Silber/Silberchlorid-Draht (Elektrode) verbunden war. Über einen Schlauch war die Pipette an einem U-Rohr angeschlossen, durch welches man einen Druck aufbauen konnte. Ein Hahn zwischen dem Schlauch und dem U-Rohr ermöglichte das Aufrechterhalten eines Überdruckes. Dies war notwendig für die Experimente im akuten Hirnschnitt, um ein Verstopfen der Pipette beim Eintreten in den Gehirnschnitt zu verhindern.

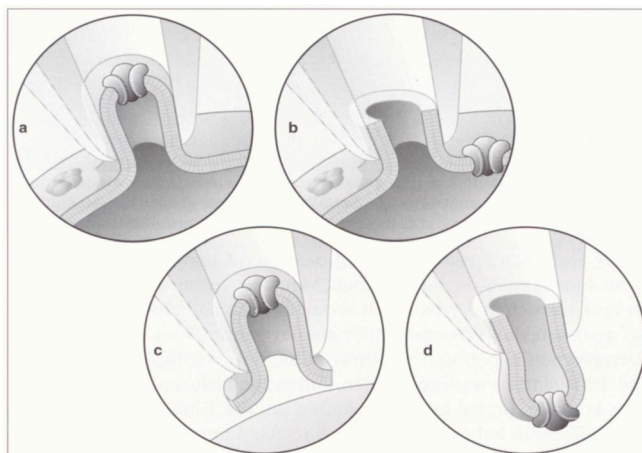
Für die Pipette wurden Borsilikatglaskapillaren mit einem Filament und einer Wandstärke von 0,5 mm verwendet (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland). Sie wurden vor jedem Experiment mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgeräts (Model P-2000, Sutter Instruments, Novato, USA) hergestellt. Die Pipette wurde mit einer Elektrolytlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) so weit gefüllt, daß der Elektrodendraht im Pipettenhalter gerade in die Flüssigkeit eintauchte. Der Widerstand der Pipette betrug im Falle von kultivierten Mikrogliazellen vier bis fünf Megaohm und im akuten Hirnschnitt sechs bis acht Megaohm.

Der Vorverstärker war mit dem Hauptverstärker (EPC-9-Amplifier HEKA electronics, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) verbunden, der das Stromsignal maß und es als Spannung auslas (Strom-Spannungs-Wandler). Die unkompensierten Membranströme wurden mit einer Frequenz von 3 kHz oder 150 Hz aufgenommen und mit 2,9 kHz gefiltert. Über den integrierten Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) konnten die Signale aus dem Verstärker mit Hilfe der Datenerfassungssoftware (WinTIDA, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) in einen Computer übertragen werden. Dieses Programm kontrollierte weiterhin einen Digital-Analog-Wandler (DA-Wandler), der die komplizierten Spannungskommandos an den Verstärker weiter gab. Der Computer wurde somit für die Aufnahme, Analyse und Darstellung der Daten, der Steuerung von Verstärker und Ventilen der Perfusionsanlage und der Erzeugung von Reizsequenzen bei der Untersuchung spannungs- und ligandengesteuerter Ströme verwendet.

#### 2.4.2 Die Patch-clamp-Technik in Kultur und im akuten Hirnschnitt

Die Entwicklung der Patch-clamp-Technik von Neher und Sakmann (1976) ermöglicht zweierlei Dinge: sowohl Ströme der gesamten Zellmembran, als auch den Strom einzelner Ionenkanäle zu messen und zu untersuchen.

Bei dieser Technik wird eine Glasmikroelektrode in die Nähe der Zellmembran plaziert. Durch ein leichtes Saugen wird ein Membranstück vorsichtig an die Pipettenöffnung angesaugt, und es kommt zu einem direkten Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche (Seal). Dieses Membranstück wird so elektrisch effektiv von der Umgebung isoliert, wobei die Widerstände zwischen Pipetteninnerem und Bad im Bereich mehrerer Gigaohm liegen können (Gigaseal). Dies erlaubt die Messung von Strömen durch Ionenkanäle mit einer hohen Auflösung. Diese Anordnung wird auch als „cell attached“-Konfiguration bezeichnet (Abb. 2a).



**Abbildung 2: Patch-clamp-Konfigurationen**

Die Abbildung stellt die vier verschiedenen Konfigurationen der Patch-clamp-Technik dar: (a) „cell-attached“, (b) „whole-cell“, (c) „inside-out“ und (d) „outside-out“ Konfiguration. Die verschiedenen Konfigurationen werden im Text näher erklärt.

(Aus: Patch-clamp-Technik, Numberger & Draguhn, Spektrum Verlag, 1996)

Die mechanische Stabilität dieser Glas-Membran-Verbindung erlaubt es, die Pipette von der Zelle abzuziehen, ohne das angesaugte Stück zu beschädigen. Dies gestattet Untersuchungen an der isolierten, zellfreien Membran. Weist die ursprünglich dem Zytoplasma zugewandte Membranseite zur Badlösung, spricht man von einer „inside-out“-Konfiguration, weist diese dagegen zur Pipettenlösung, spricht man von einer „outside-out“-Konfiguration (Abb. 2c und d).

Eine weitere Variante der Patch-clamp-Technik ist die Ganzzelleableitung („whole-cell“) (Hamill et al., 1981, Abb. 2b). Nachdem die „cell attached“ Konfiguration erreicht wurde, kann durch einen weiteren Saugpuls das in der Pipette liegende Membranstück durchbrochen werden. Man erhält so einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren, ohne die hochohmige Verbindung zwischen Elektrode und Membran zu zerstören. Die Ganzzelleableitung erfäßt die gesamte Membran einer Zelle und kann als eine Mittelung simultan aktiver Ionenkanäle aufgefaßt werden. Sie geben das makroskopische Strommuster einer Zelle wieder, ohne daß man unmittelbar den Beitrag der einzelnen Kanäle sieht.

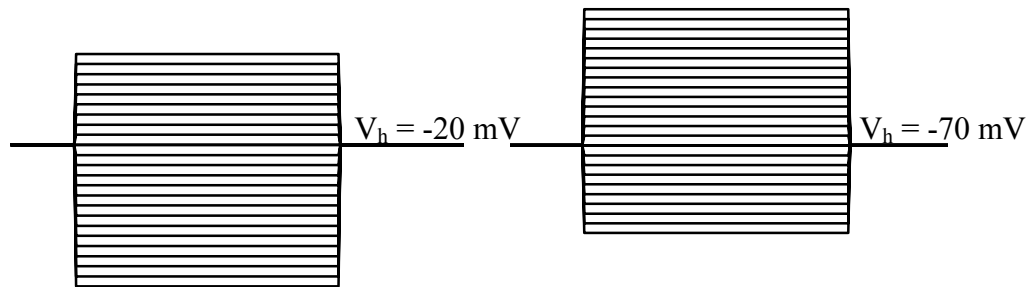
Während der Ganzzelleableitung tauscht sich nach kurzer Zeit die Pipettenlösung durch Diffusion mit dem Zytoplasma aus, so daß die intrazellulären Ionenverhältnisse durch die Pipettenlösung vorgegeben werden. Sobald die Membran durchbrochen worden ist, legt man ein Haltepotential an, das etwa dem zu erwartenden Ruhemembranpotential der Zelle entspricht. Die in dieser Arbeit beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit der Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp-Verfahren durchgeführt (Sigworth, 1985). Bei dieser Art der Ganzzelleableitung wird das Potential der Zelle durch das Kommandopotential vorgegeben.

### **2.4.3 Verwendete Spannungsprotokolle**

#### *Erfassung der spannungsaktivierten Ströme (Spannungsprotokoll 1)*

Das Spannungsprotokoll 1 wurde bei jeder abgeleiteten Zelle angewendet, um die dominierenden spannungsaktivierten Ströme der Zellmembran zu erfassen. Die Membran wurde von einem Haltepotential von  $-70$  und  $-20$  mV nacheinander sprunghaft auf neun depolarisierende und hyperpolarisierende Potentiale mit einem Spannungsintervall von  $10$  mV pro Sprung geklemmt. Die Dauer dieser Potentialsprünge betrug  $50$  ms. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen auf die verschiedenen Haltepotentiale lagen jeweils  $800$  ms. In dieser Zeit wurde zur übersichtlicheren Darstellung die Datenaufnahme unterbrochen, und die so entstandenen einzelnen Blöcke übereinander gelagert (Abb. 3).

Durch das Auftragen der einzelnen Stromwerte gegen die entsprechende Klemmspannung konnte das Umkehrpotential ermittelt werden. Das Umkehrpotential entspricht dem Schnittpunkt der Strom-Spannungskurve mit der X-Achse. Wurde dieses Spannungsprotokoll während eines induzierten Stroms gemessen, so konnte dieser vom Ruhestrom abgezogen werden und so der Anteil des hinzugekommenen Stroms ermittelt werden.

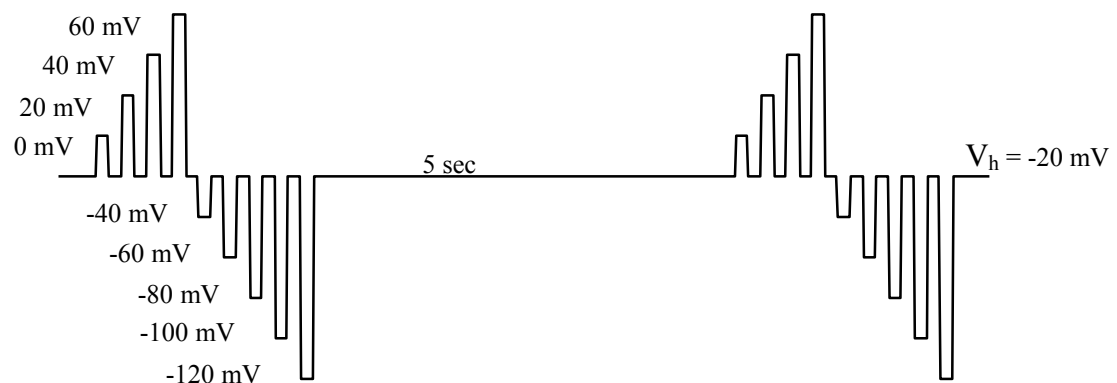


**Abbildung 3:** Spannungsprotokoll 1 zur elektrophysiologischen Charakterisierung von spannungsaktivierten Strömen.

#### *Erfassung der ligandenaktivierten Ströme (Spannungsprotokoll 2)*

Dieses Spannungsprotokoll wurde angewendet, um langsame Stromänderungen zu untersuchen. Von einem Haltepotential von  $-20 \text{ mV}$  aus wurden vier Sprungsequenzen in depolarisierender und fünf Sprünge in hyperpolarisierender Richtung mit  $20 \text{ mV}$  Spannungsdifferenz durchgeführt. Die Sprungdauer sowie die Zeit zwischen den einzelnen Sprüngen betrug  $100 \text{ ms}$ . Diese Sequenz wurde alle fünf Sekunden wiederholt, für eine Gesamtzeit von  $10 \text{ Minuten}$  angewandt und kontinuierlich aufgezeichnet (Abb. 4).

Dieses Spannungsprotokoll ermöglichte ebenfalls die Ermittlung des Umkehrpotentials hinzugekommener oder blockierter Ströme.



**Abbildung 4:** Spannungsprotokoll 2 zur elektrophysiologischen Charakterisierung von ligandenaktivierten Strömen.



## 2.5 Untersuchung der Migration mit Hilfe des Chemotaxisassay

Die durch Chemokine induzierte Wanderung von Mikrogliazellen wurde in einer 48-Well Mikrochemotaxiskammer (Neuroprobe Inc., Bethesda, USA) untersucht. Die unteren Löcher der Kammer wurden jeweils mit 29  $\mu$ l CCL21 oder CXCL10 in einer Konzentration von 0,01, 0,1, 1, 10, 100 und 1000 nM gefüllt. Als Positivkontrolle wurde C5a (Sigma, Deisehofen, Deutschland) in einer Konzentration von 100 nM und als Negativkontrolle DMEM verwendet. Alle Experimente wurden in Dreifachansätzen durchgeführt. Die oberen und unteren Wells der Kammer wurden durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 8  $\mu$ m (Poretics, Livermore, USA) getrennt. In die obere Kammer wurde 50  $\mu$ l der frisch gewonnenen Mikrogliazellsuspension ( $2-3 \times 10^4$  Zellen/Well) gegeben. Die Chemotaxiskammer wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Stunden inkubiert. Der Filter wurde nach der Inkubationszeit entnommen und für zwei Minuten mit Diff-Quick Fixierungslösung (Baxter Diagnostics, Düringen, Schweiz) fixiert. Anschließend wurde der Filter für zwei Minuten mit Diff-Quick Färbelösung 1, einer eosinophilen (roten) Färbelösung, und anschließend für fünf Minuten mit Diff-Quick Färbelösung 2, einer basophilen (blauen) Färbelösung gefärbt. Nach der zweiten Färbung wurde der Filter in destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Nicht gewanderte Zellen an der Oberseite des Filters wurden am nächsten Tag mit einem feuchten Wattestäbchen entfernt. Es wurden vier zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Well (entspricht 12 Felder pro Versuchsgruppe) am Mikroskop mit einem 40-fachen Hellfeld Objektiv ausgezählt. Daraus wurde die Wanderungsrate der Mikroglia ermittelt. Die Chemokin-induzierte Wanderung wurde auf die Kontrolle (nur DMEM) normalisiert und als Prozent der Kontrolle dargestellt.

## 2.6 Zytotoxizitätstest mit Trypanblau

Trypanblau (3,3'-[3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyl]bis(azo)]bis-(5-amino-4-hydroxy-2,7-naphthalin-disulphonische Säure)-tetranatrium Salz) ist ein membranimpermeabler Farbstoff und färbt daher nur tote Zellen oder Zellen mit einer beschädigten Plasmamembran. Da Trypanblau sehr schnell an lösliches Protein wie Serumprotein binden kann, wurden alle Versuche in DMEM ohne Serum durchgeführt. Die kultivierten Zellen wurden mit den zu testenden Lösungen inkubiert und anschließend für fünf Minuten mit Trypanblau behandelt. Durch Auszählung der gefärbten und nicht gefärbten Zellen konnte der prozentuale Anteil der toten Zellen ermittelt werden.

## 2.7 Messung der Stickstoffmonoxyd (NO)-Produktion

Dieser Test wurde zur Bestimmung der Akkumulation von Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) als Abbauprodukt von NO im Kulturüberstand von Mikrogliazellen verwendet.

Zur Bestimmung der NO-Freisetzung wurden frisch isolierte Mikrogliazellen auf Zellkulturplatten (24-Well) in einer Dichte von  $1 - 1,5 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies DMEM ausgetauscht und CCL21 in einer Konzentration von 1, 10 oder 100 nM hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS, *Escherichia coli* K-235, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurde der Kulturüberstand für den Nitratnachweis entnommen und 100  $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte in einem Mikrotiter-Platten-Reader (Victor, 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland) bei 550 nm gemessen. Aus den so erhaltenen Nitritwerten wurde der Mittelwert gebildet und prozentual auf den Nitritwert von unstimulierten Mikrogliazellen bezogen.

## 2.8 Freisetzung von Zytokinen nach Chemokinstimulation

Eine mögliche Freisetzung von Zytokinen oder Chemokinen durch Mikrogliazellen nach Applikation mit dem Chemokin CCL21 wurde mit Hilfe von ELISAs untersucht.

Hierfür wurden Mikrogliazellen in einer Mikrotiterplatte (96 Löcher) in DMEM kultiviert und für 24 Stunden mit dem Chemokin CCL21 in einer Konzentration von 0,1, 1 und 10 nM behandelt. Als Positivkontrolle wurden Mikrogliazellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Um eine mögliche regulative Eigenschaft von CCL21 auf die LPS bedingte Zytokinfreisetzung zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem Mix aus 0,1, 1 oder 10 nM CCL21 und LPS stimuliert. Nach entsprechender Induktionszeit wurde die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 in den Überständen mit Hilfe spezifischer ELISAs (Quantikine<sup>TM</sup>M, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) untersucht. Die verschiedenen Lösungen wurden gemäß der Produktbeschreibungen des Herstellers angesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit einem Antikörper beschichtet und am nächsten Tag dreimal mit Waschpuffer (Phosphatpuffer (PB) + 0,05 % Tween 20) gewaschen. Eine anschließende einstündige Inkubation mit einem Blockpuffer diente zum Absättigen unspezifischer Bindungen. Die Platten wurden anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation der Probenüberstände erfolgte für zwei Stunden.

Nach viermaligem Waschen der Mikrotiterplatten inkubierte man diese für zwei Stunden mit einem biotinyliertem Antikörper. Nach weiteren vier Waschschrritten erfolgte eine Inkubation mit Meerrettichperoxidase („Horseradish Peroxidase“, HRP, 1:200 Verdünnung) für den TNF $\alpha$  ELISA oder mit HRP (Verdünnung 1:20000) für den IL-6 ELISA für 30 Minuten. Die Platten wurden erneut viermal gewaschen und zur Entwicklung der Farbreaktion 20 Minuten mit Tetramethylbenzidin (TMB) versetzt. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Photometer (STL, Spectra, LabInstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

## 2.9 Messung der Zellproliferation mit Hilfe des BrdU ELISA

Die Proliferation von Mikrogliazellen wurde mit Hilfe des 96-Well Mikrotiterplatten Zell-ELISA Kits („5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III“, Boehringer Mannheim, Deutschland) gemessen. Dieser Test basiert auf der Messung von 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU), das während der DNS Synthese eingebaut wird. Dieses in die DNS inkorporierte BrdU wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper gegen BrdU nachgewiesen, welcher direkt mit dem Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt war. Das lösliche Substrat der Peroxidase, 2,2'-Azino-di [3-ethylbenzthiazolinsulfonat] (ABTS), ermöglichte eine kolorimetrische Auswertung und Quantifizieren der eingebauten BrdU-Menge.

Zur Durchführung dieser Proliferationsmessungen wurden die Mikrogliazellen in einer Mikrotiterplatte für 24 Stunden in serumhaltigem DMEM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit CCL21 in einer Konzentration von 10 und 100 nM, welches in DMEM ohne Serum gelöst wurde, für 24 Stunden stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Spontanproliferation), als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Überstand von der Fibroblasten Zelllinie L929 behandelt. Alle Stimulationstests wurden in Sechsfach-Bestimmungen durchgeführt. 24 Stunden nach der ersten Stimulation wurde die Stimulation wiederholt. Anschließend wurde für 18 Stunden 110  $\mu$ M BrdU hinzugefügt. Die Stimulation wurde durch zweimaliges Waschen mit serumhaltigem DMEM gestoppt. Mit gekühltem Fixans (70 % Ethanol in 0,5 mol/l HCl) wurden die Zellen für 30 Minuten bei -20 °C fixiert und anschließend mit serumhaltigem DMEM gewaschen. Die Zellen wurden mit Nuklease für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dies diente der partiellen Verdauung der DNS. Dieser Schritt wurde unter Ausschluß von CO<sub>2</sub> durchgeführt. Die Platten wurden anschließend mit serumhaltigem DMEM gewaschen. Für die Detektion des inkorporierten BrdUs wurde

monoklonales Anti-BrdU-POD-Fab Fragment (Endkonzentration: 20 U/ml) verwendet, welches für 30 Minuten in die Ansätze gegeben und bei 37 °C inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten dreimal mit dem im Kit enthaltenem Waschpuffer gewaschen und mit einer Peroxidase Substratlösung mit Substratverstärker solange bei Raumtemperatur versetzt, bis einige Löcher eine grüne Farbe zeigten (20 bis 30 Minuten), die klar von der Farbe von purem Peroxidase-Substrat zu unterscheiden war. Die Absorption wurde im Mikrotiter-Platten-Reader (Victor, 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland) bei 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm) gemessen.

### **2.10 Läsion des Nervus facialis**

Die Läsion des Nervus facialis stellt ein gut etabliertes Tiermodell dar, um neuronale Degenerations- und Regenerationsprozesse zu untersuchen (Blinzinger & Kreutzberg, 1968; Kreutzberg, 1996). Im Kerngebiet des Nervus facialis, dem Nucleus nervi facialis, kommt es beim Versuchstier nach Durchtrennen des Nerven zu einer retrograden Degeneration der Motorneurone, begleitet von einer Reaktion der Mikroglia (Blinzinger & Kreutzberg, 1968; Kreutzberg, 1996; Boucsein et al., 2000). Obwohl sich die Zellkörper der axotomierten Motoneurone im ZNS befinden, ist die Verletzung peripher, wodurch die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt. Die motorischen Axone sind in der Lage, ihre Innervationsareale, die Gesichtsmuskulatur und die Muskulatur der langen Barthaare, wieder zu erreichen und erfolgreich zu reinnervieren.

Acht bis zwölf Wochen alte Wildtyp Mäuse (C57Bl/6J (C57)) und CXCR3 Knockout Mäuse im selben Alter wurden mit 50 mg/kg Nembutal (=Natrium-Pentobarbital, Sanofi, Hannover, Deutschland) anästhesiert. Hinter einem Ohr wurde ein 8 mm langer Schnitt durch die Haut gesetzt und das darunterliegende Muskelgewebe zur Seite geschoben. Nach Freipräparation wurde der Nervus facialis knapp nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum durchtrennt und die Hautwunde anschließend verschlossen. Die erfolgreiche Schädigung konnte dadurch bestätigt werden, daß das wache Tier die Barthaare der lädierten Seite nicht mehr bewegen konnte. Die Läsion wurde unilateral durchgeführt, so daß die Zellen der kontralateralen Seite jeweils als interne Kontrolle dienen. Drei Tage nach Läsion, ein Zeitpunkt an dem die Proliferation der Mikroglia einsetzt, wurden die Tiere betäubt und perfundiert (siehe Material und Methoden 2.12.1). Die tierexperimentellen Arbeiten waren vom Berliner Senat unter der Projektnummer G0086/98 (Verantwortliche: C. Nolte) genehmigt.

### 2.11 Entorhinale Kortex Läsion (ECL)

Ein weiteres Modell zur Untersuchung von De- und Regenerationsprozessen im ZNS stellt die stereotaktische ECL dar (Lynch et al., 1975; Frotscher et al., 1997). Die ECL führt zur anterograden Degeneration der Axone im Terminationsgebiet des Tractus perforans, nämlich in der mittleren (MML) und äußeren Molekularschicht (OML) des Gyrus dentatus (vom medialen entorhinalen Kortex projizieren die Axone in die MML, vom lateralen entorhinalen Kortex in die OML) und im Stratum lacunosum-moleculare von CA1 und CA3. Daraus resultiert ein Verlust von ca. 90 % der Synapsen der äußeren Molekularschicht der Fascia dentata ipsilateral zur Läsion (Steward & Vinsant 1983). Die anterograde Degeneration von Axonen nach ECL wird begleitet von einer Veränderung der Morphologie sowie der Anzahl von Gliazellen im ehemaligen Terminationsgebiet der durch die Läsion durchtrennten entorhinalen Fasern. Während Astrozyten hypertrophieren, verlieren Mikrogliazellen ihre typische Ramifikation und nehmen die Gestalt amoeboider Zellen an (Gall et al., 1979; Gehrman et al., 1991; Jensen et al., 1994). Innerhalb von 30 Tagen nach Läsion werden die degenerierten Synapsen zu 70 % des Ausgangswertes durch Auswachsen nicht geschädigter Axone ersetzt (Steward & Vinsant 1983).

Die Tiere wurden mit einem Gemisch bestehend aus 20 % Ketamin (CuraMed GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 8 % Rompun (Bayer Vital GmbH, Frankfurt, Deutschland) gelöst in 0,9 % Natriumchlorid narkotisiert. Unter tiefer Anaesthesie wurden die Mäuse in einen stereotaktischen Apparat (Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt und die Augen abgedeckt. Die Schädeldecke der Maus wurde durch einen Hautschnitt freigelegt. Ein 2 mm breites Messer wurde mit seiner rechten Begrenzung lotrecht auf den  $\lambda$ -Punkt eingestellt und von dort aus 1,2 mm nach rostral und 0,4 mm nach lateral verschoben. Die nun unter dem Messerende liegenden Anteile des Os parietale wurden mit einem Bohrer eröffnet. Unter einem Mikroskop wurden die Leptomeningen abpräpariert. Das Messer wurde in die Tiefe bis auf das Felsenbein bewegt und dadurch der entorhinale Kortex knapp caudal der Fissura hippocampi durchtrennt und anschließend wurde die Haut genäht. Die Tiere wurden 36 Stunden, 3 oder 8 Tage nach Läsion narkotisiert und perfundiert. Die tierexperimentellen Arbeiten waren vom Berliner Senat unter der Projektnummer G0155/00 (Verantwortlicher: I. Bechmann) genehmigt.

## 2.12 Immunhistochemische Färbung

Um einen Unterschied in der Aktivierung der Mikroglia zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Tieren *in vivo* festzustellen, wurden die Tiere wie unter 2.10 und 2.11 lädiert und das Gehirngewebe nach bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe von immunhistochemische Färbungen untersucht.

### 2.12.1 Perfusionfixierung

Gewebe, welches aus seinem natürlichen Zusammenhang herausgelöst wird, verändert sich nach kurzer Zeit. Um diese Autolyse (Selbstaflösung) zu verhindern, wurden die Gehirne der Tiere fixiert, indem man das Tier über den Gefäßweg mit dem Fixierungsmittel Paraformaldehyd (4 % in 0,1 M PB, pH = 7,4) durchspülte. Da Blut durch die Einwirkung des Fixativs koagulieren und damit die Gefäße verstopfen würde, wurde es zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) ausgespült.

Die Perfusionsfixierung wurde am tief narkotisierten Tier durchgeführt. Der Brustkorb wurde eröffnet und das Herz freigelegt. Der Herzbeutel wurde vorsichtig aufgetrennt, ohne das Herz zu verletzen. Um einen Abfluß des Blutes und der Perfusionslösung zu ermöglichen, wurde eine Hohlvene, die in die rechte Herzhälfte führt, durchtrennt. In den linken Ventrikel wurde von der Herzspitze aus eine Kanüle hineingeführt, die an einen Schlauch angeschlossen war. Über diesen wurde mit Hilfe einer Schlauch-Pumpe NaCl und anschließend 4 %iges Paraformaldehydlösung (100 ml Paraformaldehyd pro Maus) in das Tier eingeleitet. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und in 4 % Paraformaldehyd für 24 Stunden nachfixiert. Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Gehirne nach der Nachfixierung in 30 %iger Saccharose-Lösung bis zum Absinken der Gewebestücke aufbewahrt. Für Schnitte am Vibratom wurden die Gehirne in 0,1 M PB bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.12.2 Herstellung von Vibratom- oder Gefrierschnitten

Mit Hilfe des Vibratoms wurden von den fixierten Gehirnen Schnitte mit einer Dicke von 50 µm hergestellt. Bei einer Fazialisläsion wurden coronale Gewebeschnitte aus der Verletzungsregion angefertigt. Die Schnitte wurden in Mikrotiterplatten, die mit 0,1 M PB gefüllt waren, gesammelt.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das fixierte Gehirn in das Einbettungsmittel TISSUE TEK® (Skura Finetek, Torrance, USA) gelegt und mit Hilfe von Trockeneisgekühltem Methylbutan eingefroren. Anschließend wurden 40 µm dicke Schnitte in einem

Gefriermikrotom (Leica CM3000, Bensheim, Deutschland) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  angefertigt. Die Schnitte wurden auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen, getrocknet und bis zur Färbung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.12.3 Immunhistochemische Charakterisierung

Für die immunhistochemische Charakterisierung der fixierten Schnitte wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Bei dieser Methode bindet ein antigenspezifischer unkonjugierter Antikörper (primärer Antikörper) an das Antigen. Um diese Bindung zu visualisieren, wird im Falle einer Fluoreszenzfärbung (a) ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, verwendet. Bei der Diaminobenzidin [3,4,3',4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid] (DAB) Färbung (b) wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet, der mit dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex reagiert, welcher wiederum mit dem Substrat DAB reagiert. Auf diese Weise werden die Signale verstärkt.

#### a) Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen

Die immunhistochemische Detektion von proliferierenden Zellen erfolgte durch das Ki-67-Antigen in Zellen. Ki-67 wird in allen Phasen des Zellzyklus außer der  $G_0$ - und der frühen  $G_1$ -Phase exprimiert, die höchste Expression wird in der  $G_2$ - und der M-Phase erreicht (Gerdes et al., 1984). Der Nachweis dieses Antigens erfolgte über den gleichnamigen Maus anti-Human monoklonalen Ki-67 Antikörper (BD Biosciences, BD PharMingen, San Diego, USA).

Die Gefrierschnitte auf den Deckgläschen wurden für fünf Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 0,1 M PB gewaschen. Da es sich um ein intrazellulär gelegenes Antigen handelte, wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PB gewaschen und für 45 Minuten mit einer Lösung aus 2 % FKS, 2 % normalem Ziegenerum, 2 % Pferdeserum und 10 % Triton X-100 versetzt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken. Nach dreimaligem Waschen mit PB wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Ki-67 (Verdünnung 1:150) über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M PB entfernt und zur Detektion der sekundäre Antikörper Anti-Maus-Immunglobulin gekoppeltes Indocarbocyanin (Cy3, Ziege-anti-Maus-IgG, 1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland) für zwei Stunden auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte dreimal gewaschen und mit Moviol

(Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland) eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Oberkochen, Deutschland), das mit Filtern zur Detektion von Fluorescein-iso-thiocyanat (FITC, Anregungswellenlänge 480 nm, Emissionsmaxima 535 nm) ausgerüstet war. Die Anzahl von proliferierenden Zellen im Nucleus nervi facialis wurde durch Auszählung von vier zufällig gewählten Gesichtsfeldern in Schnittserien von mindestens drei Schnitten pro Maus bestimmt. Im Hippocampus wurden alle Ki-67-positiven Zellen in Schnittserien des Gyrus dentatus gezählt (drei Schnitte pro Maus). Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwert Zellen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

b) Färbungen mit Diaminobenzidin [3,4,3',4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid]

Die immunhistochemische Detektion von Mikrogliazellen erfolgte über das Makrophagen-Granulozyten spezifische Antigen Mac-1 (CD11b/CD18; Leinco Technologies, St. Louis, USA) und die Detektion von Astrozyten durch GFAP (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland). Der Antikörper Parvalbumin (Swant, Bellinzona, Schweiz) wurde verwendet, um Interneurone darzustellen, die Gamma Amino Buttersäure (GABA) als Transmitter verwenden. Ein Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurde verwendet, um apoptotische Zellen nachzuweisen. In Tabelle 3 sind die verschiedenen primären Antikörper, ihre Verdünnungen sowie die verwendeten Sekundärantikörper zusammengefaßt.

**Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper, deren Verdünnungen und Sekundärantikörper.**

Alle biotinylierten Sekundärantikörper stammen von der Firma Linaris Biologische Produkte GmbH (Wertheim, Deutschland).

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen anti Maus Caspase 3	1:1000	biotinylierte anti-Kaninchen Antikörper	1:250
Kaninchen anti Maus GFAP	1:400	biotinylierte anti-Kaninchen IgG Antikörper	1:250
Maus anti Human Ki-67	1:100	biotinylierte anti-Maus IgG Antikörper für DAB Färbungen Ziege anti Maus IgG Cy3 für	1:250
Ratte anti Maus Mac-1	1:100	biotinylierte anti Ratten IgG Antikörper	1:250
Kaninchen anti Maus Parvalbumin	1:5000	biotinylierte anti Kaninchen IgG Antikörper	1:250



Die Vibratom- oder Gefrierschnitte wurden einmal mit 0,1 M PB gespült, um Zelltrümmer vollständig zu entfernen. Zur Absättigung endogener Peroxidasen wurden die Vibratomschnitte mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1 M PB und Gefrierschnitte mit 0,04 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1 M PB für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1 M PB wurden unspezifische Bindungen mit einer Lösung bestehend aus 1,5 % Triton X-100, 5 % normalem Ziegenerum (NGS, Linaris, Wertheim, Deutschland) und 5 % Kälberserum (BSA, Linaris, Wertheim, Deutschland) in 0,1 M PB für zehn Minuten geblockt. Das Blocken wurde durch einen Waschgang gestoppt und die Schnitte mit der primären Antikörperlösung (verwendete Antikörper und deren Verdünnungen siehe Tabelle 3) bestehend aus Antikörper, 1 % NGS, 1,5 % Triton X-100 in 0,1 M PB über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung mit dem Primäantikörper entfernt, und die Schnitte wurden mit 0,1 M PB mehrmals gespült. Die Präparate wurden anschließend zwei Stunden mit dem jeweiligen biotinylierten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 3) inkubiert. Die Inkubationsreaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M PB gestoppt. Es folgte die Inkubation mit dem Avidin:Biotin:Peroxidase Komplex (ABC Lösung, Vectastain Elite ABC Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 „A“ und 1:250 „B“ für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden danach zweimal in PB gewaschen. Als unlösliches Substrat für die Peroxidase wurde DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; 10 mg DAB in 15 ml PB mit 0,3 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) verwendet. Die Farbreaktion wurde unter optischer Kontrolle durchgeführt. Bei einer Braunfärbung der Schnitte wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen der Gefrierschnitte auf den Objektträgern oder durch Überführen der Vibratomschnitte in PB abgebrochen. Die Vibratomschnitte wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen. Sowohl die Gefrier- als auch die Vibratomschnitte wurden über Nacht getrocknet. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) wurden die Schnitte entwässert, für fünf Minuten in Xylol inkubiert, mit Enthelan eingedeckelt und lichtmikroskopisch untersucht.

### 2.13 Quantifizieren

Unter Verwendung einer Magnafire Digitalkamera (Intas, Göttingen, Deutschland) wurden digitale Fotografien mit einem 20-fachen Objektiv angefertigt. Die Ki-67 gefärbten Zellen im axotomierten Fazialiskern und im Gyrus dentatus nach Läsion des entorhinalen Kortex von CXCR3 Knockout (n = 3) und Wildtyp (n = 3) Mäusen wurden gezählt. Dabei wurden

mindestens neun aufeinanderfolgende Schnitte pro Maus verwendet. Im jeweiligen Schnitt wurden vier zufällig gewählte Gebiete analysiert, die anschließend gemittelt wurden.

Für die verblindeten Untersuchungen, wurden jeweils ein Schnitt eines CXCR3 Knockout und ein Schnitt eines Wildtyp Tiers auf einem Objektträger fixiert. Dabei war die Reihenfolge zufällig gewählt. Anschließend versuchten Experimentatoren, die die Reihenfolgen nicht kannten, zu bestimmen, zu welcher Mausgruppe der jeweils betrachtete Schnitt gehört.

#### 2.14 Vermessung der Dendritenlänge

Für die Vermessung der Parvalbumin-positiven Dendriten in Schnitten von Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen wurde ein selbstgeschriebenes Pixelmessungsprogramm verwendet. Die Vermessung der einzelnen Präparate erfolgte ohne Kenntnis über die Versuchsgruppenzugehörigkeit (Doppelblind). Der Gyrus dentatus wurde mit einem 10er Objektiv digital aufgenommen (Abb. 5A). Dabei war es nötig, den Gyrus dentatus in einen oberen und unteren Teil zu trennen. Die äußere Molekularschicht wurde markiert und in einem neuen Fenster abgespeichert, wo auch der Kontrast verstärkt wurde (Abb. 5B). Die Dendriten in der Molekularschicht des Gyrus dentatus wurden mit Hilfe dieses Programms nachgefahren und so die Länge und die Fläche der Molekularschicht in [Pixel] pro Schnitt ermittelt (Abb. 5C). Da mehr als ein Schnitt pro Tier analysiert wurde, wurde zuerst der Mittelwert gebildet und anschließend diese Zahl auf die Fläche der nachgefahrenen Molekularschicht bezogen.



**Abbildung 5: Ermittlung der Länge von Parvalbumin-positiven Dendriten in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus mit Hilfe eines Pixelmessungsprogramms.**

Der obere und untere Part des Gyrus dentatus wurde digital aufgenommen (A, 10-fache Vergrößerung). Die äußere Molekularschicht wurde umfahren und in einem neuen Fenster dargestellt (B) und nachgefahren (C).

### **2.15 Statistische Auswertung**

Die Zahlen der Ki-67-positiven Zellen und die Gesamtlänge der Parvalbumin-positiven Neuronen wurden ihren Versuchsgruppen zugeordnet. Mit Hilfe von PC-Standardsoftware wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Meßwerte berechnet. Um die Daten untereinander zu vergleichen, wurden die Mittelwerte auf die Kontrolle normiert und prozentual dargestellt (Kontrolle = 100 %).

Zur Berechnung der Signifikanz der Verschiedenheit von Daten wurde der t-Test angewandt. Die Signifikanzgrenze lag bei  $p < 0,01$ .