

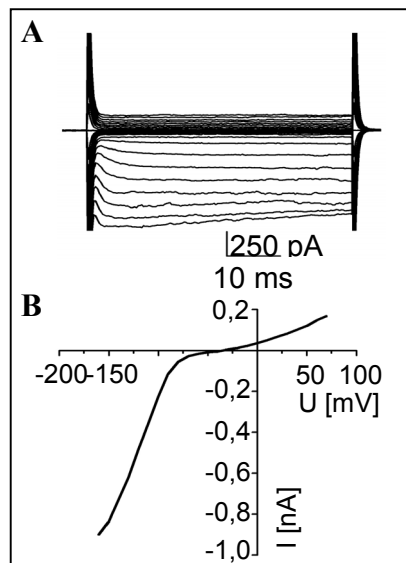
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 CCL21 bewirkt eine Änderung in der Membranleitfähigkeit kultivierter Mikrogliazellen

Elektrophysiologische Antworten stellen die schnellste Art der zellulären Kommunikation dar. Die Membranströme von kultivierten Mikrogliazellen wurden mit Hilfe der Patch-clamp-Technik im „whole-cell“-Modus (Hamill et al., 1981) gemessen, um festzustellen, ob diese Zellen funktionelle CCL21 Rezeptoren besitzen, die auf die Applikation von CCL21 reagieren. Mikrogliazellen werden isoliert von anderen Zelltypen kultiviert, wodurch Interaktionen mit anderen Zellen ausgeschlossen werden können. Die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen waren bereits vor der Anfertigung dieser Arbeit bekannt (Kettenmann et al., 1990). Um einen CCL21-induzierten Strom zu messen, war es jedoch notwendig, die Hauptstromkomponenten der Membran der Mikrogliazellen vor Stimulation mit CCL21 zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden kultivierte Mikrogliazellen der Maus verwendet, die innerhalb von zwei bis fünf Tagen nach Abschütteln von den Primärkulturen untersucht wurden. Unmittelbar nach Durchbrechen der Membran wurde bei jeder untersuchten Zelle das Membranpotential gemessen. Dieses variierte bei einer Haltespannung von  $-20$  mV zwischen  $-11$  und  $-77$  mV und lag im Mittel bei  $-41 \pm 2,17$  mV ( $n = 58$ ). Um die Hauptstromkomponenten der Membran der Mikrogliazellen zu ermitteln, wurde das Spannungsprotokoll 1 (siehe Material und Methoden 2.4.3) verwendet.

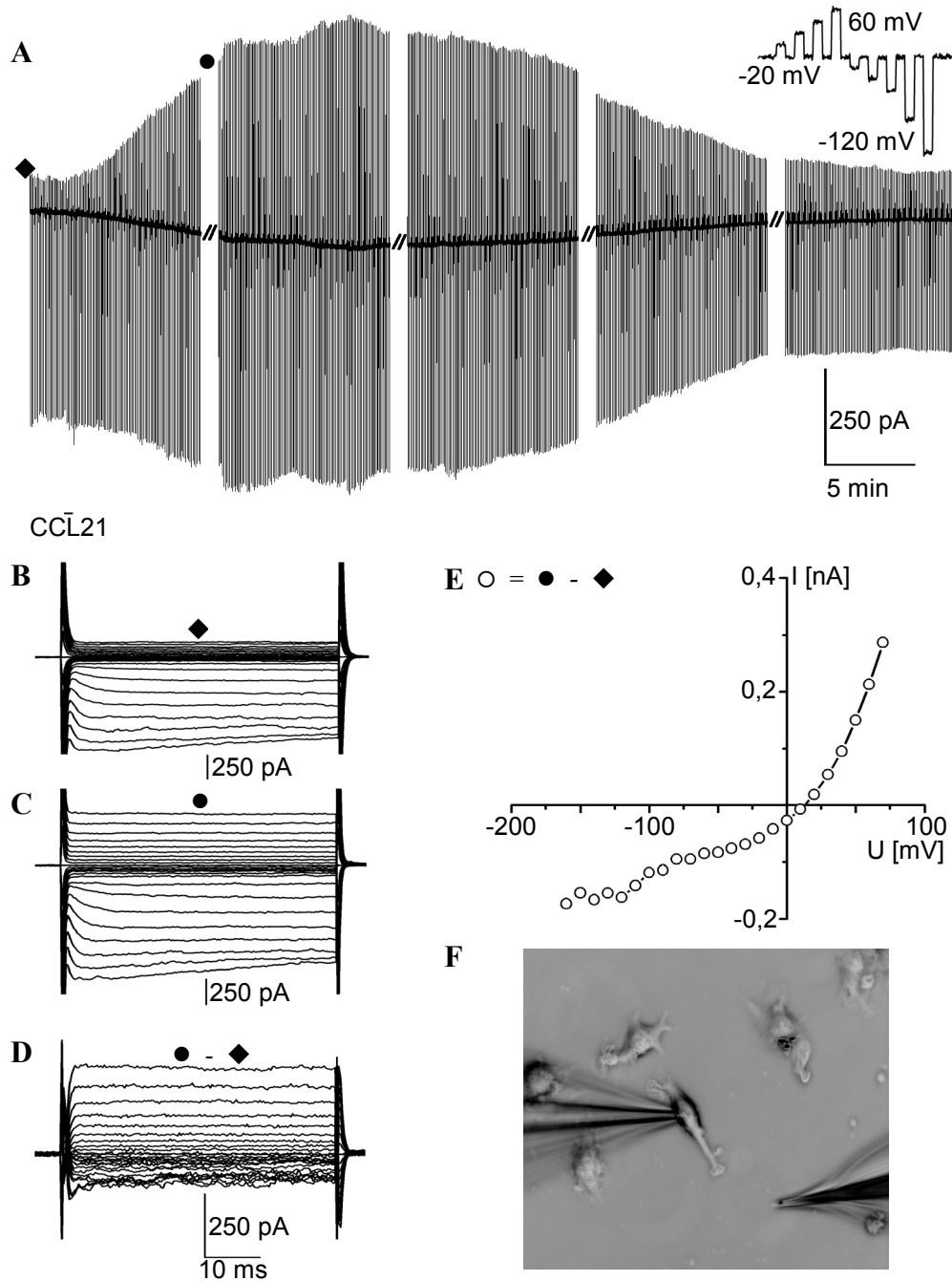
Mikrogliazellen in Kultur besitzen einen charakteristischen einwärts-gleichrichtenden Kaliumstrom und keine Auswärtsströme (Kettenmann et al., 1990; Abb. 6A und B). Die einwärts-gleichrichtenden Ströme werden bei einem Klemmpotential negativer als  $-90$  mV aktiviert und nehmen bei Spannungssprüngen in hyperpolarisierender Richtung zu (Abb. 6 B). Bei Klemmspannungen negativer als  $-140$  mV zeigen diese Ströme eine Inaktivierung. Dieses Muster in der Aktivierung der spannungsabhängigen Ströme der Mikroglia ist einzigartig für Zellen des ZNS und kann außerdem von dem Strommuster peripherer Makrophagen unterschieden werden. Dieser physiologische Fingerabdruck wird für die Identifizierung von Mikrogliazellen in der Kultur und in akuten Hirnschnitten verwendet.



**Abbildung 6: Spannungsabhängige Kaliumströme bei kultivierten Mikrogliazellen.**

Kultivierte Mikrogliazellen der Maus wurden für elektrophysiologische Untersuchungen von den Primärkulturen abgeschüttelt und auf Deckgläschen kultiviert. In (A) ist exemplarisch die Stromantwort einer kultivierten Mikroglia auf das Spannungsprotokoll 1 dargestellt: von einem Haltepotential von  $-20$  mV wurde die Membran nacheinander von  $-160$  mV bis  $+70$  mV mit einem Spannungsintervall von  $10$  mV für  $50$  ms geklemmt. In (B) ist die zugehörige Strom-Spannungskennlinie der spannungsaktivierten Ströme dargestellt.

Um CCL21-induzierte Stromänderungen zu messen, wurde die Membran der Mikrogliazelle wiederholt alle fünf Sekunden von einem Haltepotential von  $-20$  mV für eine Serie von Spannungssprüngen von  $-120$  mV bis  $+60$  mV geklemmt (Spannungsprotokoll 2, siehe Material und Methoden 2.4.3.2). Die Stimulationspipette wurde in der Nähe der zu messenden Zelle positioniert und CCL21 ( $10$   $\mu$ M, gelöst in PB) für  $30$  Sekunden appliziert (Abb. 7 F). In  $12$  von  $21$  gemessenen Zellen bewirkte CCL21 eine Änderung in der Membranleitfähigkeit (Abb. 7 A). Die einzelnen Spannungssprünge können bei dieser Vergrößerung nicht aufgelöst werden. Der Strom aktivierte sehr langsam nach Applikation von CCL21 und stieg weiter an, obwohl CCL21 durch die anhaltende Badperfusion innerhalb von wenigen Sekunden ausgewaschen war. Die CCL21-induzierte Membranleitfähigkeit erreichte ihr Maximum ungefähr fünf Minuten nach der Applikation. Im Mittel betrug die Zunahme der Leitfähigkeit  $5,2 \pm 0,73$  nS. Wenn die Leitfähigkeit auf die Kapazität der Zellmembran normiert wurde, betrug die Zunahme  $0,3349 \pm 0,039$  nS/pF ( $n = 10$ ). Zehn Minuten nach der Applikation von CCL21 besaß die Zelle eine vergleichbare Membranleitfähigkeit wie vor der Applikation.



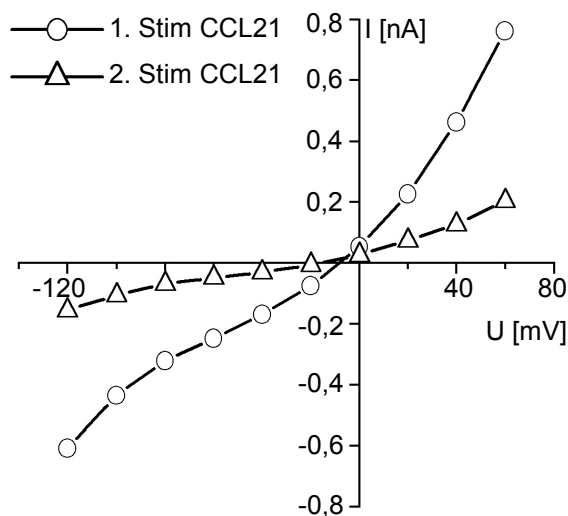
**Abbildung 7: Induktion von CCL21 aktivierten Strömen in kultivierten Mikrogliazellen der Maus.**

(A) Von einem Haltepotential von  $-20$  mV wurde die Membran der Mikroglia von  $-120$  mV bis  $+60$  mV mit einem Spannungsintervall von  $20$  mV für  $100$  ms geklemmt (Spannungsprotokoll 2). Dieses Protokoll wurde alle fünf Sekunden wiederholt. CCL21 ( $10\mu\text{M}$ ) wurde für  $30$  Sekunden appliziert (siehe Balken). Das Symbol  $\blacklozenge$  steht für eine Unterbrechung der Messung für eine Minute. In dieser Zeit wurde die Membran von  $-160$  mV bis  $+70$  mV mit einem Spannungsintervall von  $10$  mV für  $50$  ms geklemmt (B, C, D, Spannungsprotokoll 1). Die drei Serien von Membranströmen zeigen gemessene Ströme vor der Applikation von CCL21 (B,  $\blacklozenge$ ), nach dem Anstieg der Leitfähigkeit (C,  $\bullet$ ) und der resultierende CCL21-induzierte Strom (D,  $\bullet - \blacklozenge$ ). Durch Subtraktion des vor Applikation von CCL21 gemessenen Stromes vom Strom nach der Applikation von CCL21 konnte der CCL21-induzierte Strom berechnet werden. In (E) ist die Strom-Spannungskennlinie des CCL21-induzierten Stroms dargestellt. In (F) ist die Position der Stimulationspipette zur Zelle dargestellt.

Um den CCL21-induzierten Strom mit einer höheren zeitlichen Auflösung zu messen, wurde das Spannungsprotokoll 1 für die Aufzeichnung der CCL21 Antwort verwendet: für 50 ms von einem Haltepotential von  $-20$  mV wurde die Membran auf neun depolarisierende und hyperpolarisierende Spannungssprünge geklemmt (Abb.7 B, C und D). Dafür wurde das Spannungsprotokoll 2 für eine Minute unterbrochen.

Um die CCL21-induzierte Leitfähigkeit von der Kaliumleitfähigkeit („Ruheleitfähigkeit“) zu isolieren, wurden die gemessenen Ströme vor der CCL21 Applikation (Abb. 7 B) von den Strömen, die während der CCL21-induzierten Antwort aufgenommen wurden (Abb. 7 C), subtrahiert (Abb. 7 D). Die so ermittelten Nettoströme wurden gegen die Spannung aufgetragen (Strom-Spannungskennlinie, Abb. 7 E). Die Strom-Spannungskennlinie des CCL21-induzierten Stroms zeigt eine Rektifizierung bei positiven Klemmspannungen und ein Umkehrpotential von  $0$  mV. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der CCL21-induzierte Strom entweder durch eine nicht selektive Leitfähigkeit von Kationen oder durch eine Chloridleitfähigkeit bewirkt wird. In beiden Fällen würde ein Strom resultieren, dessen Umkehrpotential um  $0$  mV liegt.

Lediglich in 4 von 12 Zellen konnte eine zweite elektrophysiologische Antwort auf CCL21 ausgelöst werden. CCL21 wurde ungefähr 15 Minuten nach der ersten CCL21 Stimulation ein weiteres Mal lokal appliziert. Die Leitfähigkeitszunahme durch die zweite Applikation von CCL21 war geringer als die nach der ersten Applikation von CCL21 (Abb. 8).

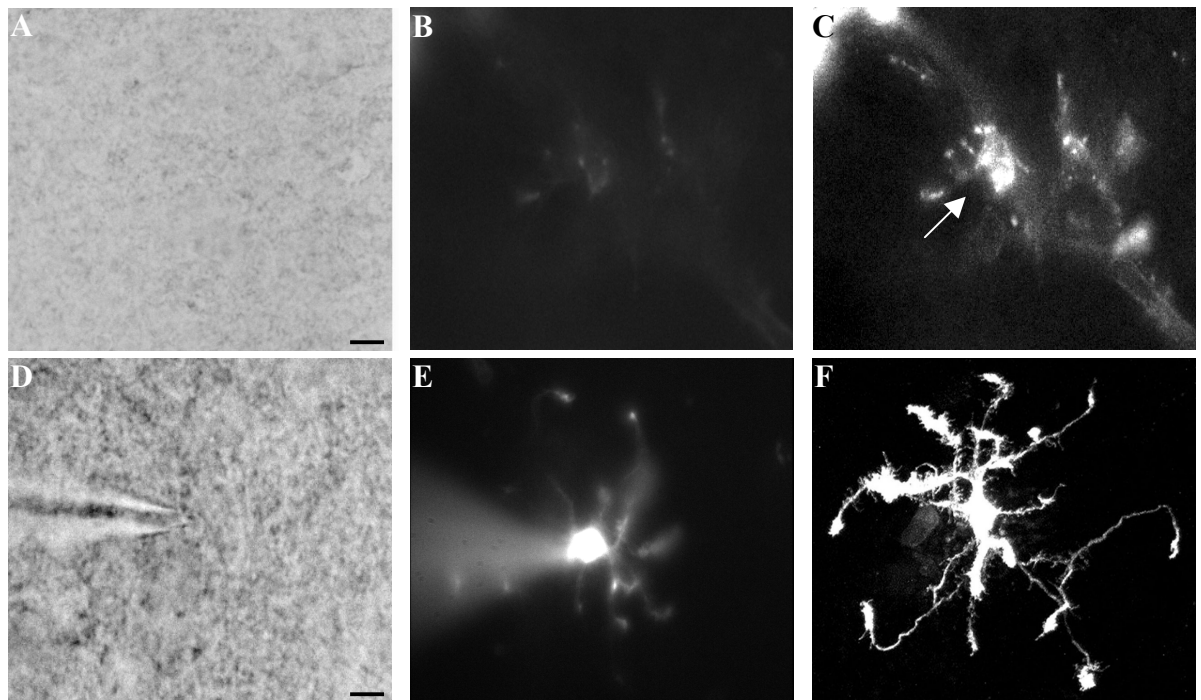


**Abbildung 8: Zweimaliges Auslösen des CCL21-induzierten Stroms.**

Von einem Haltepotential von  $-20$  mV wurde die Membran von kultivierten Mikrogliazellen auf die gleichen Spannungspotentiale geklemmt wie in Abbildung 6 und 7. 17 Minuten nach der Auslösung der ersten CCL21-induzierten Spannungsänderung ( $\circ$ ) wurde mit dem selben Applikationsparadigma ein zweiter CCL21-induzierter Strom ausgelöst ( $\Delta$ ).

### 3.2 Im akuten Hirnschnitt induziert CCL21 einen Strom in Mikrogliazellen

Kultivierte Mikrogliazellen befinden sich durch den Kultivierungsprozess bereits in einem aktivierten Zustand (Brockhaus et al., 1993; Slepko & Levi, 1996). Um zu überprüfen, ob Mikrogliazellen in ihrer natürlichen Umgebung und in einem nicht aktivierten Zustand ebenfalls funktionelle Rezeptoren für CCL21 besitzen, wurden akute Hirnschnitte von acht Wochen alten Mäusen des C57/Bl6 Stamms verwendet. Da die Identifizierung von ramifizierten Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt ohne eine Färbung sehr schwierig ist (Abb. 9 A), wurden die akuten Hirnschnitte zunächst mit Tomaten Lektin gefärbt. Dies bewirkt neben einer Zellmembranfärbung der Mikrogliazellen eine Färbung der Blutgefäße, die jedoch anhand ihrer Morphologie von den Mikrogliazellen zu unterscheiden waren (Abb. 9 B und C).



**Abbildung 9: Identifizierung von ramifizierten Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt der Maus.**

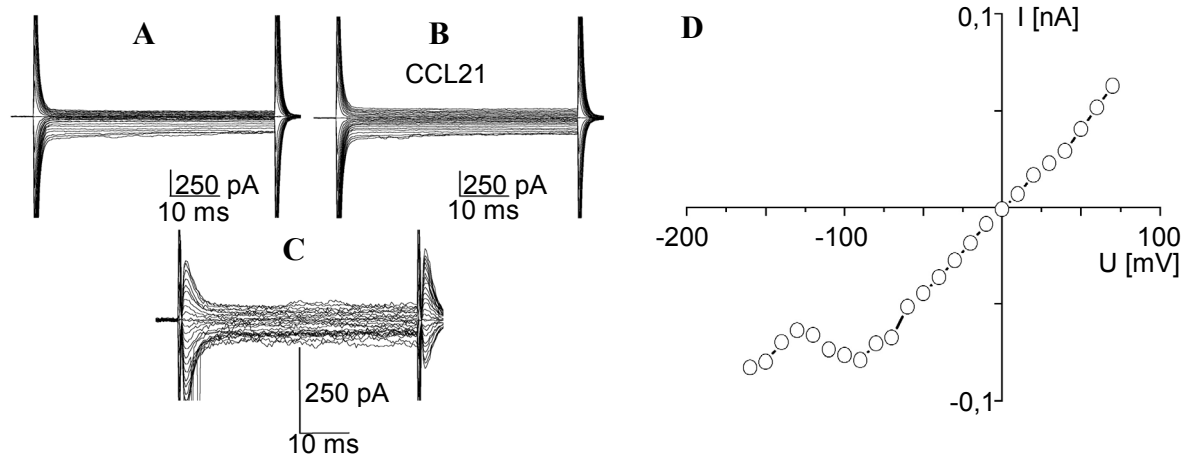
(A) Durchlichtbild vom akuten Hirnschnitt. (B) Tomaten Lektin-positive Mikrogliazelle. Diese Färbung diente zur Identifizierung der Mikrogliazelle, die anschließend elektrophysiologisch untersucht wurde. (C) Dieselbe Mikroglia wie in (B), jedoch wurden mehrere Bilder übereinandergelegt und der Kontrast verstärkt. Die mit Tomaten Lektin gefärbte Mikrogliazelle (Pfeil) befindet sich neben einem Blutgefäß. (D) Elektrophysiologische Messung der in (B) und (C) gezeigten Mikrogliazelle. (E) Eine während der elektrophysiologischen Messung mit Lucifer Gelb gefüllte ramifizierte Mikrogliazelle. Nach Abziehen der Ableitelektrode wurde der Schnitt fixiert. Clemens Boucsein analysierte freundlicherweise diese Zelle am konfokalen Laserscanningsmikroskop (F). Hierzu wurden im Abstand von 400 nm optische Schnitte durch die Zelle aufgenommen, die anschließend übereinander projiziert wurden. Die Balken entsprechen 10 µm.

Die unter Fluoreszenzbeleuchtung als Mikroglia identifizierten Zellen konnten anschließend im Durchlichtbild wiedergefunden und elektrophysiologisch untersucht werden (Abb. 9 D).

Zur morphologischen Identifizierung wurden einige Mikrogliazellen mit einer Lucifer Gelb-haltigen Pipettenlösung gefüllt (Abb. 9 E). Nach Fixierung der Schnitte wurden diese mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskopes dargestellt (Abb. 9 F). In der Projektion der konfokalen Schnittserie kann man das 5 bis 10  $\mu\text{m}$  große Soma und die feinen, bis zu 70  $\mu\text{m}$  langen Ausläufer der Mikrogliazelle erkennen, die mit der Tomaten Lektin Färbung oder einer Antikörper Färbung nicht erkennbar waren. Dies ist durch die hohe Diffusionsgeschwindigkeit und die große Leuchtkraft von Lucifer Gelb möglich.

Für Messungen im akuten Hirnschnitt wurden die gleichen Spannungsprotokolle wie bei kultivierten Mikrogliazellen verwendet. Es konnten aber lediglich Mikrogliazellen erreicht werden, die nicht tiefer als ca. 40  $\mu\text{m}$  im Schnitt lagen. Nachdem eine stabile Formation der Ganzzellkonfiguration hergestellt war, konnten die Zellen auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht und durch ihr charakteristisches Strommuster identifiziert werden. Im akuten Hirnschnitt der Maus besitzen sie, im Gegensatz zu kultivierten Mikrogliazellen, ein ungewöhnlich positives Membranpotential von  $-19,86 \text{ mV} \pm 3,64 \text{ mV}$  ( $n = 12$ ). Daher wurde eine Klemmspannung für die elektrophysiologischen Untersuchungen von  $-20 \text{ mV}$  gewählt. Eine dauerhafte Hyperpolarisation auf  $-70 \text{ mV}$  führte zum Verlust des Abdichtwiderstandes und damit zum Verlust der Ableitung.

Im Schnitt zeigen Mikrogliazellen lediglich einen sehr kleinen einwärts-gleichrichtenden Kaliumstrom (Abb. 10 A). Die Leitfähigkeit im Spannungsbereich +20 mV bis +60 mV betrug  $0,04 \pm 0,01$  nS/pF ( $n=12$ ). Unterhalb von -80 mV erhöht sich die Leitfähigkeit auf  $0,07 \pm 0,01$  nS/pF ( $n=12$ ).



**Abbildung 10: CCL21-induzierter Strom in einer ramifizierten Mikrogliazelle im akuten Hirnschnitt.**

(A) Von einem Haltepotential von -20 mV wurde die Membran nacheinander von -160 mV bis +70 mV mit einem Spannungsintervall von 10 mV für 50 ms geklemmt (Spannungsprotokoll 1). Spannungsaktivierte Kaliumströme, die man in kultivierten Mikrogliazellen findet, sind bei Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt kaum zu erkennen. Nach Applikation von CCL21 kam wie bei kultivierten Maus-Mikrogliazellen ein Strom bei positiven Membranpotentialen hinzu (B). Der resultierende CCL21-induzierte Strom ist in (C) gezeigt. In (D) ist die Strom-Spannungskennlinie des CCL21-induzierten Stroms dargestellt.

Im akuten Hirnschnitt bewirkte eine CCL21 Stimulation in sechs von sieben Mikrogliazellen eine ähnliche Änderung der Membranleitfähigkeit wie in kultivierten Mikrogliazellen (Abb. 10 B, C, D). Der Anstieg in der Membranleitfähigkeit auf  $0,131 \pm 0,06$  nS/pF ( $n=6$ ) war jedoch in einer Messzeit von 90 Minuten nicht reversibel.

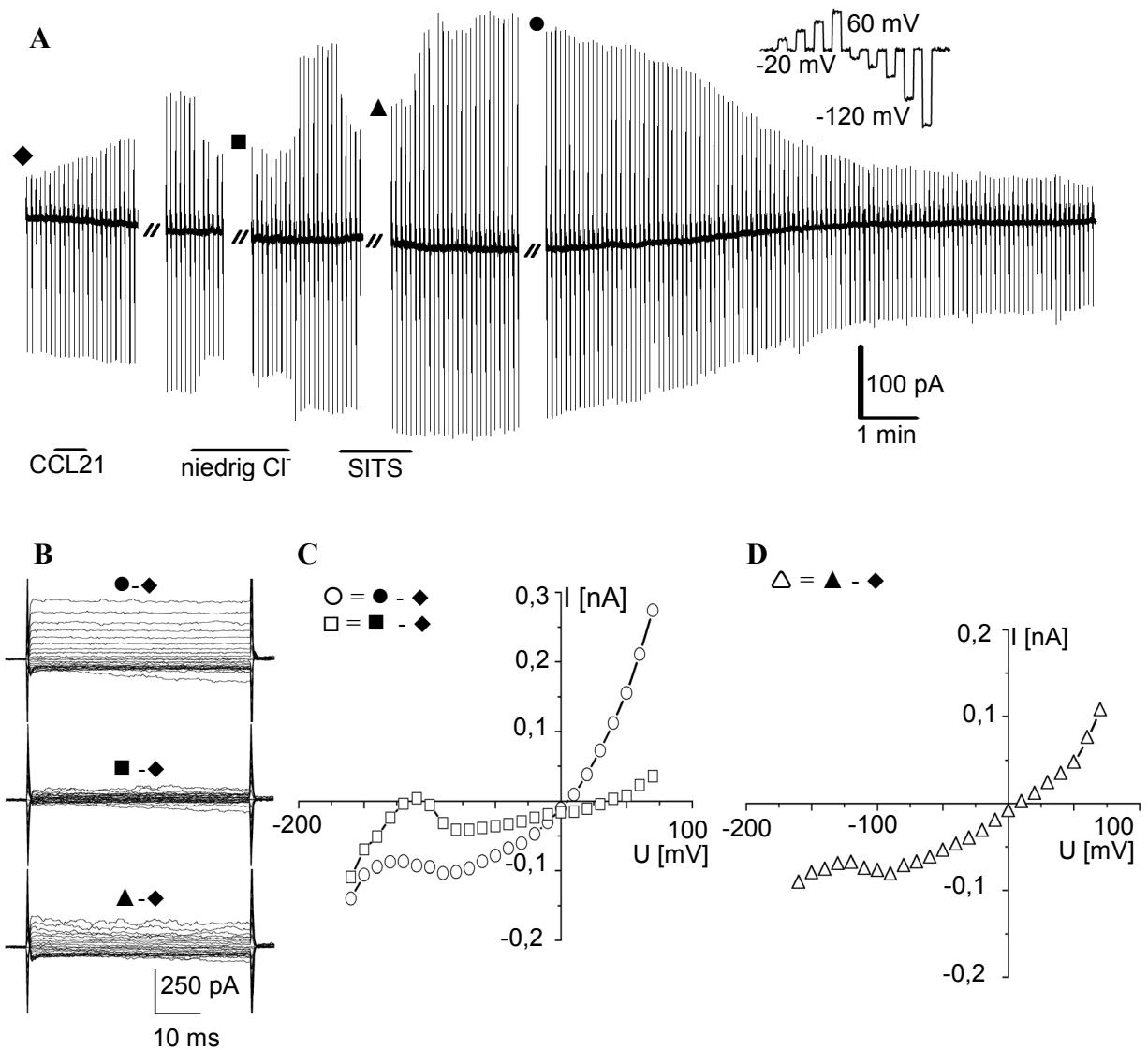
### 3.3 CCL21 bewirkt einen langanhaltenden Chloridstrom

Nachdem ein CCL21-induzierter Strom mit ähnlichen Eigenschaften wie in kultivierten Mikrogliazellen auch in ramifizierten Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt gefunden werden konnte, sollten die Ionen, die zu diesem Strom führen, untersucht werden. Die Untersuchungen wurden an kultivierte Mikrogliazellen durchgeführt, da hier ein Einfluß von umgebenden Zellen ausgeschlossen werden kann. Der Gradient von Chlorid zwischen der intrazellulären Pipettenlösung und der extrazellulären Badlösung wurde geändert, indem die extrazelluläre Chlorid Konzentration von 161,4 mM durch einen äquimolaren Austausch von Chlorid durch Gluconat auf 6 mM reduziert wurde.

Die Mikrogliazellen wurden lokal mit CCL21 stimuliert, wobei CCL21 wie zuvor durch die Badlösung nach der Stimulation ausgewaschen wurde. Während die Membranleitfähigkeit langsam zunahm, wurde für zwei Minuten die Badlösung gegen die Badlösung mit wenig Chlorid ausgetauscht (Abb. 11 A).

In dieser niedrigen Chlorid-Badlösung verringerte sich die CCL21-induzierte Membranleitfähigkeit (Abb. 11 B, Mitte). Dabei wurde hauptsächlich die auswärts gerichtete Membranleitfähigkeit reduziert, die einwärts-gleichrichtende Membranleitfähigkeit blieb nahezu vollständig von der Reduktion extrazellulärem Chlorids unbeeinflusst. Weiterhin wurde die Reduktion der auswärts gerichteten Membranleitfähigkeit durch eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu einem positiveren Potential von +40 mV begleitet (Abb. 11 C). Diese Verschiebung des Umkehrpotentials liegt jedoch im Vergleich niedriger (also negativer) zu dem theoretisch berechneten Chlorid Gleichgewichtspotential, das unter den hier gewählten Bedingungen bei +80 mV lag. Diese Diskrepanz kann entweder durch eine verringerte intrazelluläre Chloridaktivität oder eine Permeabilität für Gluconat erklärt werden.

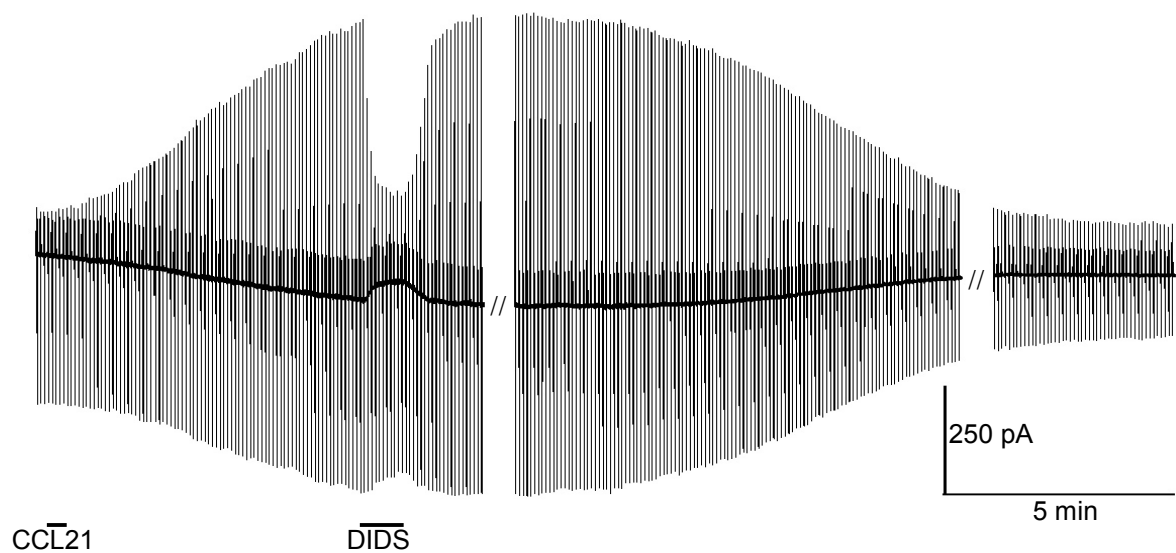




**Abbildung 11: Einfluss der extrazellulären Chloridkonzentration und des Chloridkanalblockers SITS auf den CCL21-induzierten Strom.**

Die experimentellen Spannungsprotokolle sind die gleichen wie in Abbildung 6 und 7. (A) Die Applikation von CCL21 (10  $\mu$ M) für 30 Sekunden, von niedrig Chlorid enthaltender Badlösung (6 mM) für 2 Minuten und von SITS enthaltender Badlösung (500  $\mu$ M) für anderthalb Minuten sind durch die Balken gekennzeichnet. Die extrazelluläre Chloridkonzentration wurde durch eine äquimolare Substitution von Chlorid durch Gluconat von 161,4 nM auf 6 mM reduziert. (B) Serien von Stromspuren (Spannungsprotokoll 2) zeigen die CCL21-induzierten Ströme am Maximum der Stromantwort (oben, ● - ◆), in niedriger Chlorid-Badlösung (Mitte, ■ - ◆) und in der Anwesenheit von SITS (unten, ▲ - ◆). Die korrespondierenden Strom-Spannungskennlinien sind in (C) und (D) dargestellt.

Um die Chlorid Selektivität des CCL21-induzierten Stroms zu bestätigen, wurde der Einfluss der Chloridkanalblocker SITS und DIDS getestet. Beide Blocker wurden jeweils in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM eingesetzt. Nachdem die Membranleitfähigkeitsänderung durch eine Applikation von CCL21 für 30 Sekunden induziert wurde, wurden DIDS und SITS über die Badperfusion appliziert. Beide Chloridkanalblocker reduzierten reversibel den CCL21-induzierten Strom zu  $81 \% \pm 5,78$  für 1 mM SITS (Abb. 11) und zu  $79 \% \pm 4,67$  für 1 mM DIDS (Abb. 12). Die Reduktion war stärker bei positiven Membranpotentialen. Wurden 500  $\mu\text{M}$  SITS oder DIDS eingesetzt, konnte eine geringfügig kleinere Reduktion des CCL21-induzierten Stroms beobachtet werden (nicht dargestellt).



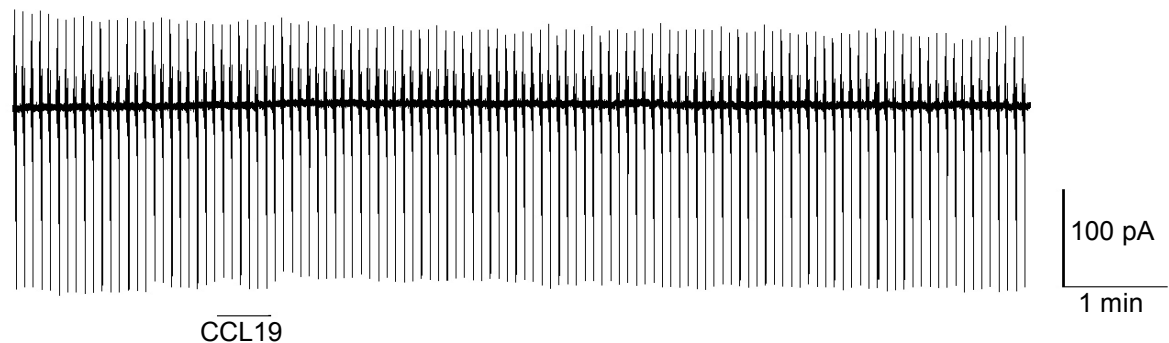
**Abbildung 12: Einfluss der Chloridkanalblocker DIDS auf den CCL21-induzierten Strom.**

Es wurden die gleichen experimentellen Spannungsprotokolle wie in Abbildung 6 und 7 verwendet. Nach Induktion des CCL21-induzierten Stroms wurde für eine Minute DIDS appliziert (1 mM). Dies führte zu einer vergleichbaren Reduktion des CCL21-induzierten Stroms wie nach Applikation von SITS. Das Symbol // steht jeweils für eine Unterbrechung der Messung von einer Minute.

### 3.4 CCL21 und CXCL10 binden an den CXCR3 Rezeptor und nicht an den CCR7 Rezeptor

Anhand von Transfektionsexperimenten, konnte CCL21 als ein Ligand des CCR7 Rezeptors identifiziert werden (Campbell et al., 1998; Willimann et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Zur Identifizierung des CCL21 Rezeptors auf Mikrogliazellen wurde daher der Effekt von einem weiteren CCR7 Liganden, dem Chemokin CCL19 getestet.

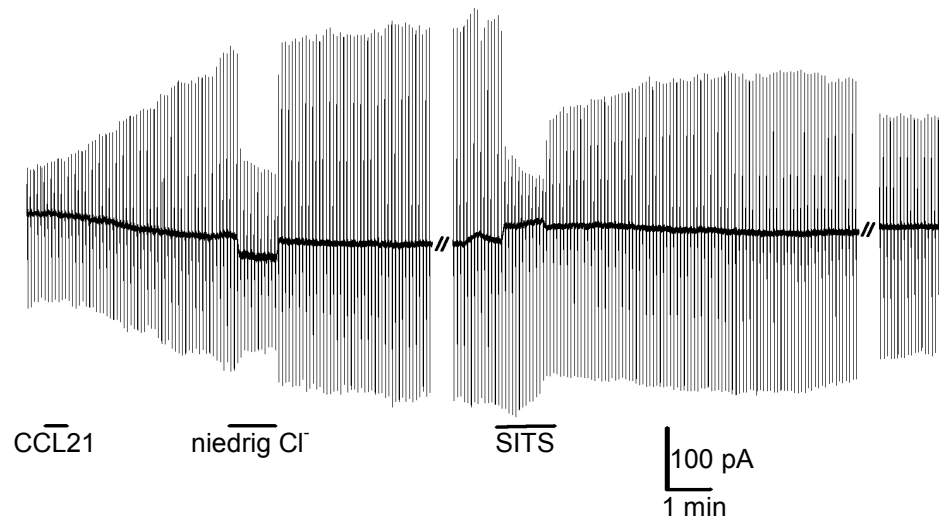
Die Stimulation von kultivierten Mikrogliazellen mit CCL19 verursachte keine Veränderungen der Membranleitfähigkeit (Abb. 13, n = 27).



**Abbildung 13: Das Chemokin CCL19, ein CCR7 Ligand, verursacht keine Veränderungen in der Membranleitfähigkeit bei kultivierten Mikrogliazellen.**

Die verwendeten Spannungsprotokolle sind die gleichen wie in Abbildung 6 und 7. CCL19 (10  $\mu$ M) wurde wie CCL21 lokal für 30 Sekunden appliziert (Balken). In einer Meßzeit von sieben Minuten konnten keine Spannungsveränderungen bei Mikrogliazellen beobachtet werden.

Dies deutet darauf hin, daß CCL21 an einen anderen als den CCR7 Rezeptor auf Mikrogliazellen bindet. Bisher wurde jedoch noch keine Wirkung von CCL19 auf intrinsische Gehirnzellen beschrieben, sondern lediglich auf infiltrierende Zellen wie aktivierte T Zellen während einer experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE; Alt et al., 2002). Möglich wäre, daß CCL19 keine elektrophysiologischen Veränderung in Mikrogliazellen bewirkt, wodurch sich aus diesem Resultat nicht ableiten läßt, daß CCL21 nicht an mikrogliale CCR7 binden kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Effekt von CCL21 auf Membranströme bei kultivierten Mikrogliazellen von Mäusen untersucht, in denen der CCR7 Locus durch „Gene-Targeting“ zerstört worden war. In den von CCR7 Knockout Mäusen stammenden Mikrogliazellen verursachte CCL21 aber einen ähnlichen Anstieg in der Leitfähigkeit wie in den genetisch nicht veränderten Zellen zuvor (Abb. 14; n = 17).

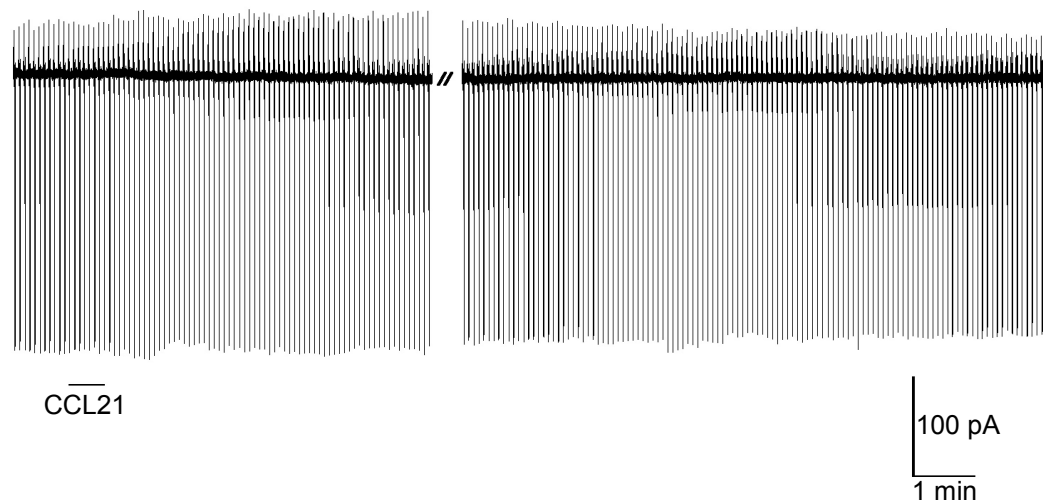


**Abbildung 14: Stimulation von kultivierten Mikrogliazellen aus CCR7 Knockout Mäusen mit CCL21 verursacht eine langanhaltende Stromänderung mit den gleichen Eigenschaften wie bei genetisch nicht veränderten Zellen.**

Kultivierte Mikrogliazellen aus CCR7 Knockout Mäusen wurden lokal für 30 Sekunden mit CCL21 (10  $\mu$ M) stimuliert. Der CCL21-induzierte Strom konnte wie in genetisch nicht veränderten Zellen durch Wechseln der Badlösung zu einer Badlösung mit niedriger Chloridkonzentration (niedrig Cl<sup>-</sup>) oder einer SITS enthaltenden Badlösung reduziert werden. Die Stimulationen mit CCL21, der Austausch der Badlösung mit einer Badlösung, die eine niedrigere Chloridkonzentration enthielt oder die Applikation des Chloridkanalblockers SITS sind durch die Balken gekennzeichnet. Das Symbol // bedeutet eine Unterbrechung der Messung für sieben Minuten.

Dieses Ergebnis zeigt, daß auf Mikrogliazellen CCR7 nicht der Rezeptor für CCL21 darstellt, und es bestätigt den 2001 beschriebenen Befund, daß Mikrogliazellen kein CCR7 exprimieren (Biber et al., 2001). Biber und Mitarbeiter konnten jedoch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 feststellen. In der Literatur ist beschrieben, daß in CXCR3 transfizierten Mauszellen eine Bindung von CCL21 gefunden werden konnte (Soto et al., 1998). Daher wurde untersucht, ob CCL21 in Mikrogliazellen, die von CXCR3 Knockout Mäusen stammen, eine ähnliche Reaktion hervorruft wie in den kultivierten genetisch nicht veränderten Zellen.

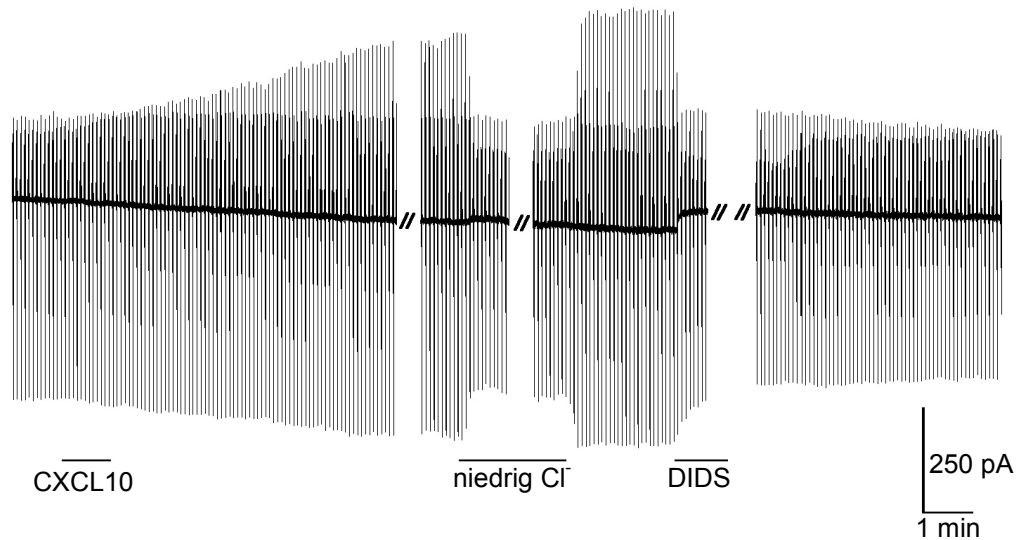
In Mikrogliazellen von CXCR3 defizienten Mäusen löste CCL21 keine Veränderung der Membranleitfähigkeit aus (Abb. 15; n = 21). Dieses Ergebnis zeigt, daß auf Mikrogliazellen CXCR3 einen Rezeptor für CCL21 darstellt.



**Abbildung 15: Stimulation von kultivierten Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen mit CCL21 verursacht keine Leitfähigkeitsänderung.**

Kultivierte Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen wurden lokal für 30 Sekunden mit CCL21 (10  $\mu$ M) stimuliert. In 21 von 21 Zellen konnte nach Stimulation mit CCL21 keine Änderung der Leitfähigkeit festgestellt werden. Das Symbol //--// bedeutet eine Unterbrechung der Messung für sieben Minuten.

Um die Expression von CXCR3 in Mikrogliazellen zu bestätigen, wurde die Wirkung von CXCL10 auf Mikrogliazellen untersucht. CXCL10 ist ein Ligand für CXCR3, der an diesen Rezeptor mit hoher Affinität bindet (Soto et al., 1998). CXCL10 wurde wie CCL21 lokal über eine Stimulationspipette für 30 Sekunden appliziert. CXCL10 löste wie CCL21 in kultivierten Mikrogliazellen einen langanhaltenden Strom aus (Abb. 16, n = 11).



**Abbildung 16: Stimulation von kultivierten Mikrogliazellen mit CXCL10 verursacht eine langanhaltende Stromänderung mit den gleichen Eigenschaften wie nach Stimulation mit CCL21.**

Kultivierte Mikrogliazellen aus genetisch nicht veränderten Mäusen wurden lokal für 30 Sekunden mit dem Chemokin CXCL10 (10  $\mu$ M) stimuliert. Der CXCL10-induzierte Strom konnte wie der CCL21-induzierte Strom durch Wechseln der Badlösung zu einer Badlösung mit niedriger Chloridkonzentration (niedrig Cl<sup>-</sup>) oder einer DIDS (1 mM) enthaltenden Badlösung reduziert werden. Die Stimulationen mit CCL21, der Austausch der Badlösung mit einer Badlösung, die eine niedrigere Chloridkonzentration enthielt oder die Applikation des Chloridkanalblockers SITS sind durch die Balken gekennzeichnet. Das Symbol // steht für eine Unterbrechung der Messung von einer Minute, das Symbol /// von acht Minuten.

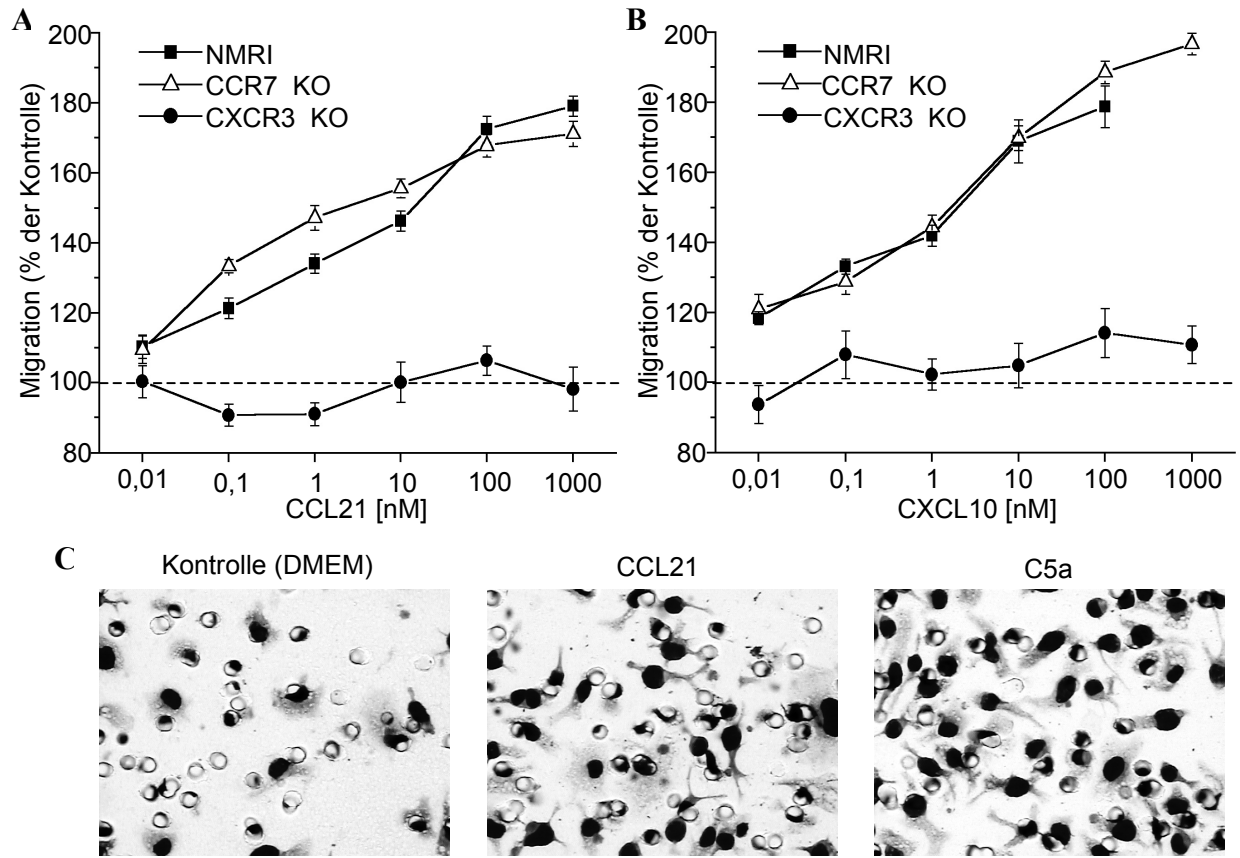
Der CXCL10-induzierte Strom besaß alle Eigenschaften des CCL21-induzierten Stroms. Das Umkehrpotential des CXCL10-induzierten Stroms lag ebenfalls um 0 mV in der normalen Badlösung. Eine Verringerung der extrazellulären Konzentration von Chlorid bewirkte eine vergleichbare Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Potentialen wie CCL21 und führte zu einer Reduktion der CXCL10-induzierten Stromamplitude. Weiterhin konnte der CXCL10-induzierte Strom ebenfalls mit den Chloridkanalblockern SITS und DIDS reversibel geblockt werden. Aus CCR7 Knockout Mäusen gewonnene Mikrogliazellen zeigten ebenfalls nach CXCL10 Applikation eine langanhaltende Chloridleitfähigkeit (n = 9, nicht dargestellt), jedoch konnte keine Veränderung in der Membranleitfähigkeit der Mikrogliazellen von CXCR3 Knockout Mäusen gefunden werden (n = 17, nicht dargestellt).

### 3.5 CCL21 induziert eine chemotaktische Reaktion in Mikrogliazellen, die über den CXCR3-Rezeptor-3 vermittelt wird

Chemokine führen in kultivierten Zellen des peripheren Immunsystems und des Gehirns zur Migration (Asensio & Campbell, 1999; Maghazachi, 1999; Mennicken et al., 1999). Daher wurden CCL21 und CXCL10 auf das Potential eine Migration der Mikrogliazellen in einem Mikrochemotaxistest auszulösen, untersucht (siehe Methodenteil 2.5). Weiterhin sollte das mit Hilfe der Elektrophysiologie gefundene Ergebnis, daß CCL21 an den CXCR3-Rezeptor-3 und nicht an den CCR7-Rezeptor-7 bindet, in diesem Test bestätigt werden.

In den Mikrochemotaxis-Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen von CCL21 und CXCL10 verwendet (Abb. 17). Beide Chemokine induzieren in einem Konzentrationsbereich von 0,1 nM bis 1 µM einen signifikanten Anstieg ( $P < 0,01$ ) in der Migration kultivierter Mikrogliazellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 17, NMRI, geschlossene Vierecke). CCL21 und CXCL10 in einer Konzentration von 100 nM bewirkten im Vergleich zu unstimulierten Zellen (= 100 %) einen Anstieg der Zahl der infiltrierenden Zellen auf  $175 \% \pm 2,1$  (vier unabhängige Versuche) und  $157 \% \pm 9,3$  ( $n = 5$ ).

Die chemotaktische Migration von kultivierten Mikrogliazellen von CCR7 Knockout Mäusen in Antwort auf CCL21 und CXCL10 war vergleichbar mit der Migration von Wildtyp Mikrogliazellen. Bei 100 nM CCL21 und 100 nM CXCL10 betrug die Zunahme der Migration im Vergleich zu unstimulierten Mikrogliazellen  $165 \% \pm 10,0$  für CCL21 ( $n = 7$ , offene Dreiecke) und  $163 \% \pm 11,7$  für CXCL10 ( $n = 6$ , Abb. 17, offene Dreiecke). Im Gegensatz dazu bewirkten bei Mikrogliazellen, die von CXCR3 Knockout Mäusen gewonnen wurden, beide Chemokine keine signifikante Zunahme in der Zahl der durch den Filter wandernden Zellen ( $n = 5$ , Abb. 17, gefüllte Kreise). Beide Chemokine waren also nicht in der Lage, eine chemotaktische Migration von Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen zu bewirken. Das generelle chemotaktische Verhalten war bei diesen CXCR3 defizienten Mikrogliazellen jedoch nicht beeinträchtigt, da eine normale Migration in Antwort auf C5a (100 nM) nachgewiesen werden konnte (Abb. 17). Diese Ergebnisse bestätigen, daß CCL21 an den CXCR3 und nicht an den CCR7 Rezeptor bindet. Sie belegen ferner, daß die Chemokine CCL21 und CXCL10 im ZNS an der Regulation der mikroglialen Migration beteiligt sind.



**Abbildung 17: Aktivierung des CXC-Rezeptor-3 durch CCL21 und CXCL10 führt zu einer Wanderung von kultivierten Mikrogliazellen der Maus.**

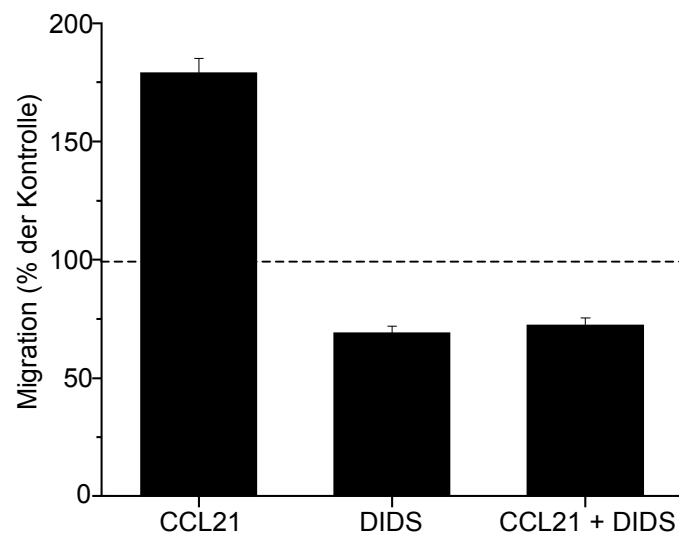
In einem Mikrochemotaxistest wurden die Chemokine CCL21 (A) und CXCL10 (B) auf ihr Potential getestet, eine Migration in kultivierten Mikrogliazellen aus NMRI Mäusen (■), CCR7 (△) oder CXCR3 (●) Knockout Mäusen auszulösen. Beide Chemokine induzierten ab einer Konzentration von 0,1 nM eine chemotaktische Wirkung auf kultivierte NMRI und CCR7 Knockout Mikrogliazellen. In CXCR3 Knockout Mikrogliazellen konnte bei den verschiedenen Konzentrationen der Chemokine keine Migration im Vergleich zur spontanen Migration (Migration der Mikroglia auf DMEM-Medium) festgestellt werden. Die Experimente wurden in dreifach Ansätzen durchgeführt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 bis 7 Experimenten dar. Die mittlere Wanderung wurde prozentual auf die Migration der Zellen in DMEM normiert (spontane Migration)

In den unteren Bildern (C) sind beispielhaft die gewanderten und angefärbten Zellen auf den Polycarbonatfiltern nach Stimulation mit DMEM, CCL21 und C5a dargestellt.



### 3.6 Die Migration von Mikrogliazellen wird durch den Chloridkanalblocker DIDS reduziert

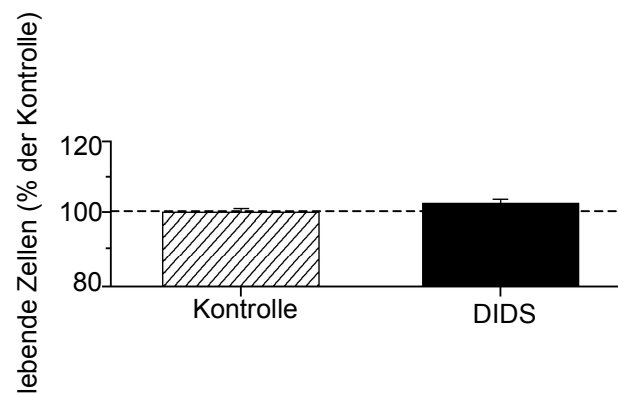
CCL21 induziert in Mikrogliazellen eine Chloridleitfähigkeit und eine chemotaktische Reaktion. Um eine mögliche Interaktion zwischen der Chloridleitfähigkeit und der Chemotaxis zu untersuchen, wurde der Einfluss des Chloridkanalblockers DIDS im Mikrochemotaxisassay getestet. DIDS wurde dabei in derselben Konzentration eingesetzt, in der es auch den CCL21-induzierten Chloridstrom blockierte. Die CCL21-induzierte Migration von Mikrogliazellen konnte durch Zugabe von 1 mM DIDS unterdrückt werden (Abb. 18, n = 3). Die spontane Migration von Mikrogliazellen, die man im Medium allein beobachtete, wurde allerdings durch DIDS Zugabe ebenfalls reduziert.



**Abbildung 18: Die durch CCL21-induzierte Migration der Mikroglia wird durch den Chloridkanalblocker DIDS reduziert.**

Migration von Mikrogliazellen in der Gegenwart von CCL21 (100 nM), CCL21 und DIDS (1 mM) und DIDS allein. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Experimenten dar. Die mittlere Wanderung wurde prozentual auf die Migration der Zellen in DMEM (spontane Migration) normiert.

In den Chemotaxisexperimenten wurde DIDS in einer sehr hohen Konzentration (1 mM) eingesetzt. Um einen toxischen Effekt von DIDS auf die Mikroglia auszuschließen, was ebenfalls die reduzierte Migration erklären könnte, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Dazu wurden Mikrogliazellen auf Deckgläschen kultiviert und für den gleichen Zeitraum wie im Chemotaxisassay mit DIDS stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Trypanblau Färbung durchgeführt (siehe Material und Methoden 2.6). Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Durch Auszählung der gefärbten (toten) und ungefärbten (lebenden) Zellen, konnte die Beeinflussung von DIDS auf die Vitalität untersucht werden. Die Behandlung von Mikrogliazellen mit 1 mM DIDS beeinflusste nicht die Vitalität dieser Zellen (Abb. 19, n = 3).



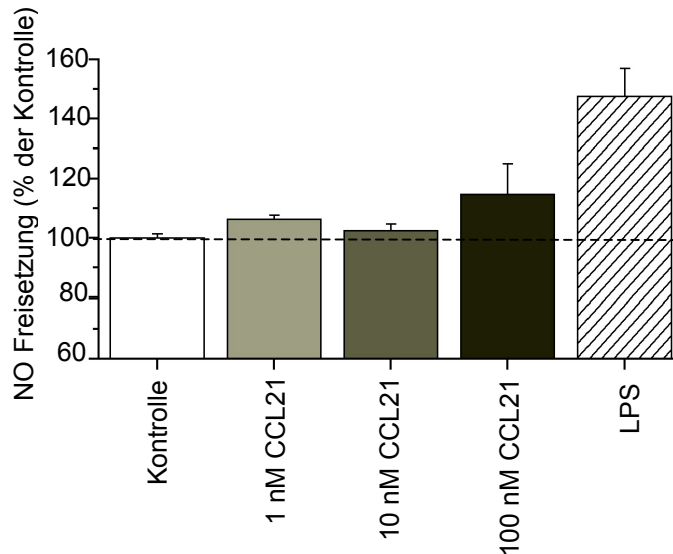
**Abbildung 19: DIDS wirkt nicht zelltoxisch auf kultivierte Mikrogliazellen.**

Die Zellen wurden wie für einen Chemotaxistest gewonnen, ausplattiert und mit 1 mM DIDS behandelt. Zwei Stunden nach Inkubation mit DIDS wurde Trypanblau hinzugefügt und die gefärbten (toten) und ungefärbten (lebende) Zellen gezählt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte von drei Experimenten  $\pm$  SEM dar.

### 3.7 CCL21 stimuliert keine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)

Chemokine werden im Verlauf einer EAE oder MS, der Alzheimer Erkrankung oder der HIV-assoziierten Demenz produziert (Minagar et al., 2002). Bei diesen pathologischen Prozessen werden Mikrogliazellen aktiviert. Es sollte untersucht werden, ob das Chemokin CCL21 zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen führt. Ein möglicher Parameter, der eine Aktivierung anzeigt, ist die Bildung von NO.

24 Stunden nach Stimulation mit CCL21 wurde der Gehalt von Nitrat (Reaktionsprodukt von NO) der Kulturüberstände bestimmt.



**Abbildung 20: CCL21 bewirkt keine Freisetzung von NO in Mikrogliazellen.**

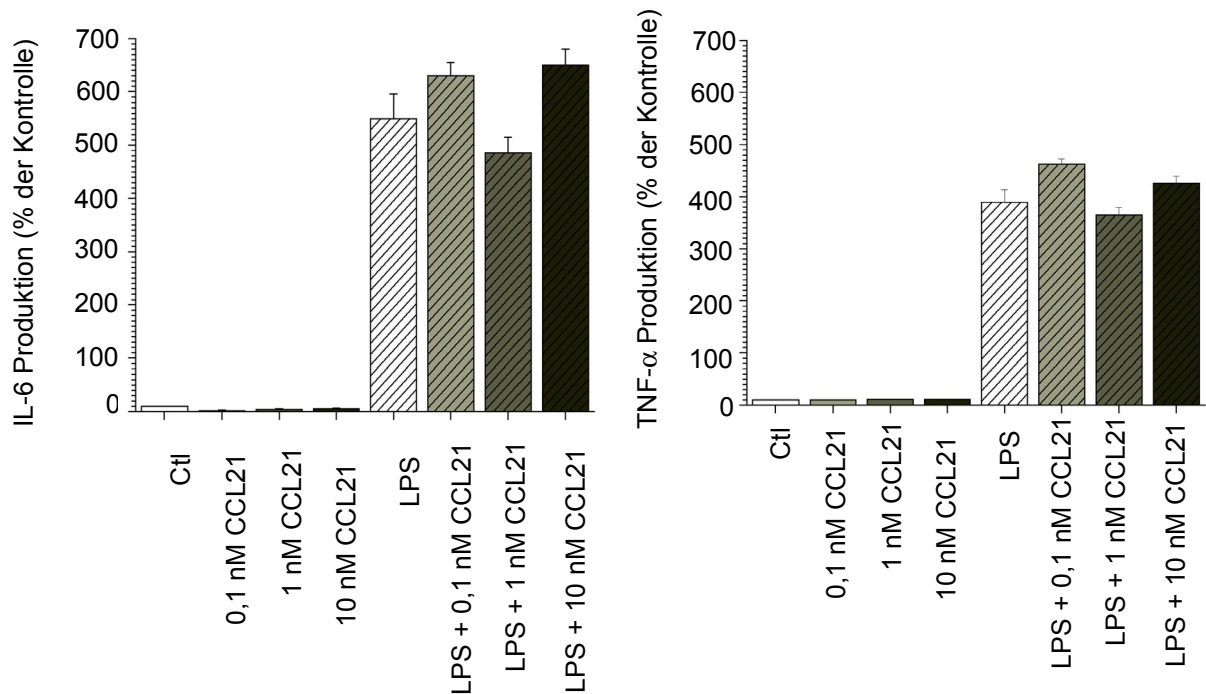
Die Zellen wurden für 24 Stunden mit CCL21 in einer 24 Well Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde der NO Gehalt der Überstände der Zellen bestimmt. CCL21 führte in diesem Zeitraum nicht zu einer signifikant vermehrten Freisetzung von NO. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Experimenten dar.

CCL21 bewirkte keine Freisetzung von den Reaktionsprodukten von NO (Abb. 20). LPS hingegen stimulierte die Freisetzung von NO, wie bereits mehrfach beschrieben (Corradin et al., 1993; Merrill et al., 1993). CCL21 führte in Mikrogliazellen daher nicht zu einer Aktivierung dieser Zellen im Sinne einer Ausschüttung von NO.

### 3.8 CCL21 induziert keine Ausschüttung von Zytokinen von Mikrogliazellen

Die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen stellt einen weiteren Parameter in der Aktivierung von Mikrogliazellen dar (Prinz et al., 1999; Hanisch et al., 2001). Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Stimulation von Mikrogliazellen mit dem Chemokin CCL21 zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  oder IL-6 führt. Mikrogliazellen wurden 24 Stunden mit CCL21 inkubiert und anschließend der Überstand auf Freisetzung der oben genannten Zytokine untersucht (siehe Material und Methoden 2.8). Als Positivkontrolle dienten Überstände von Mikrogliazellen, die mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden.

Die Stimulation der Mikrogliazellen mit CCL21 für 24 Stunden bewirkte keine erhöhte Zytokin-Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Mikrogliazellen (Abb. 21). LPS hingegen induzierte die Freisetzung der beiden untersuchten Faktoren.



**Abbildung 21: CCL21 induziert keine Sekretion von TNF- $\alpha$  oder IL-6 in kultivierten Mikrogliazellen.**

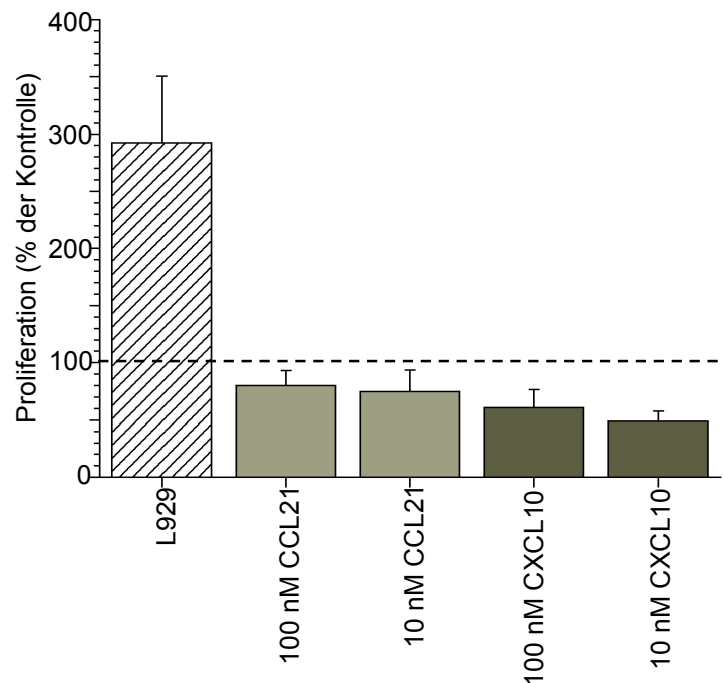
Der Gehalt von Zytokinen und Chemokinen im Überstand von kultivierten Mikrogliazellen nach 24 Stunden Inkubation mit CCL21 wurden mit Hilfe spezifischer ELISAs ermittelt. Für TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden 18 Werte in 3 unabhängigen Versuchen bestimmt. Die dargestellten Werte stellen die prozentualen Mittelwerte (nicht stimulierte Zellen = 100 %)  $\pm$  SEM dar.

Zusammengefaßt führt CCL21 also nicht zu einer erhöhten sekretorischen Aktivität der Mikroglia, das heißt in diesem Sinne finden sich keine Hinweise auf eine Mikroglia-Aktivierung durch CCL21.

### 3.9 CCL21 und CXCL10 bewirkt keine Zellteilung von Mikrogliazellen

Neben der Migration oder der Sekretion von Zytokinen oder NO zeigen aktivierte Mikrogliazellen eine erhöhte Proliferation (Raivich et al., 1994). Daher wurde mit Hilfe eines BrdU ELISAs untersucht, ob CCL21 Einfluß auf die Zellteilung von kultivierten Mikrogliazellen besitzt. Da primär kultivierte Mikrogliazellen nur eine geringe Proliferationsrate aufweisen, wurden diese für 48 Stunden mit CCL21 und CXCL10 stimuliert. Nach 30 Stunden wurde BrdU hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurde die Mikroglia mit dem Überstand der Fibroblasten Zelllinie L929 inkubiert, welcher Mikroglia-proliferations-fördernde Zytokine enthält. Es konnte keine Stimulation der

Proliferation von primären kultivierten Mikrogliazellen nach CCL21 oder CXCL10 gefunden werden (Abb. 22).



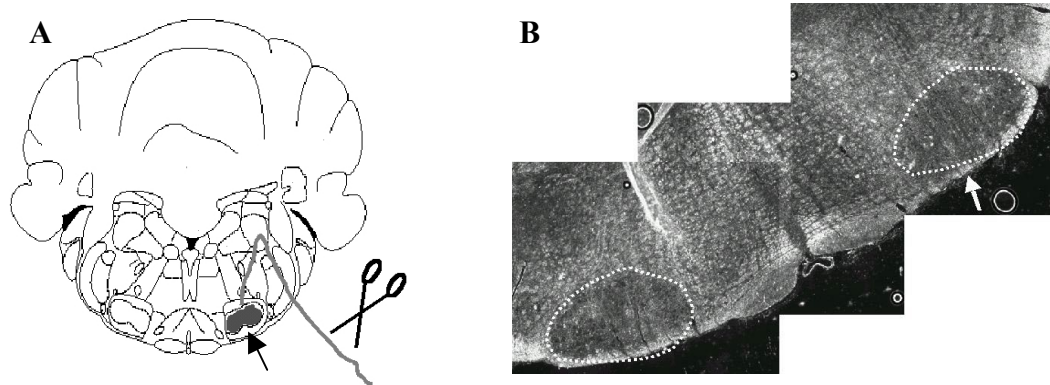
**Abbildung 22: CCL21 führt nicht zu einer vermehrten Proliferation von kultivierten Mikrogliazellen.**

Die Proliferation von kultivierten Mikrogliazellen 48 Stunden nach Inkubation mit CCL21 wurden mit Hilfe spezifischer ELISAs ermittelt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte von drei Experimenten und  $\pm$  SEM dar.

### **3.10 Nach einer Fazialisläsion findet man keine Unterschiede in der Morphologie und Proliferation von Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen im Vergleich zum Wildtyp**

Das Modell der Fazialisläsion wurde verwendet, um mögliche Unterschiede im Aktivierungsmuster der Mikroglia unter pathologischen Bedingungen zwischen Wildtyp (C57/Bl6 Stamm) und CXCR3 Knockout Mäusen festzustellen. Frühere Arbeiten zeigten, daß das Durchtrennen des Nervus facialis in Ratten zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen im Nucleus nervi facialis führt (Raivich et al., 1994; Kreutzberg, 1996). Dies geschieht ohne signifikante Infiltration von Blutzellen. Mikrogliazellen werden aufgrund der Fazialisläsion schnell aktiviert, was durch morphologische und elektrophysiologischen Veränderungen, Zellteilung und der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet ist (Raivich et al., 1994; Boucsein et al., 2001).

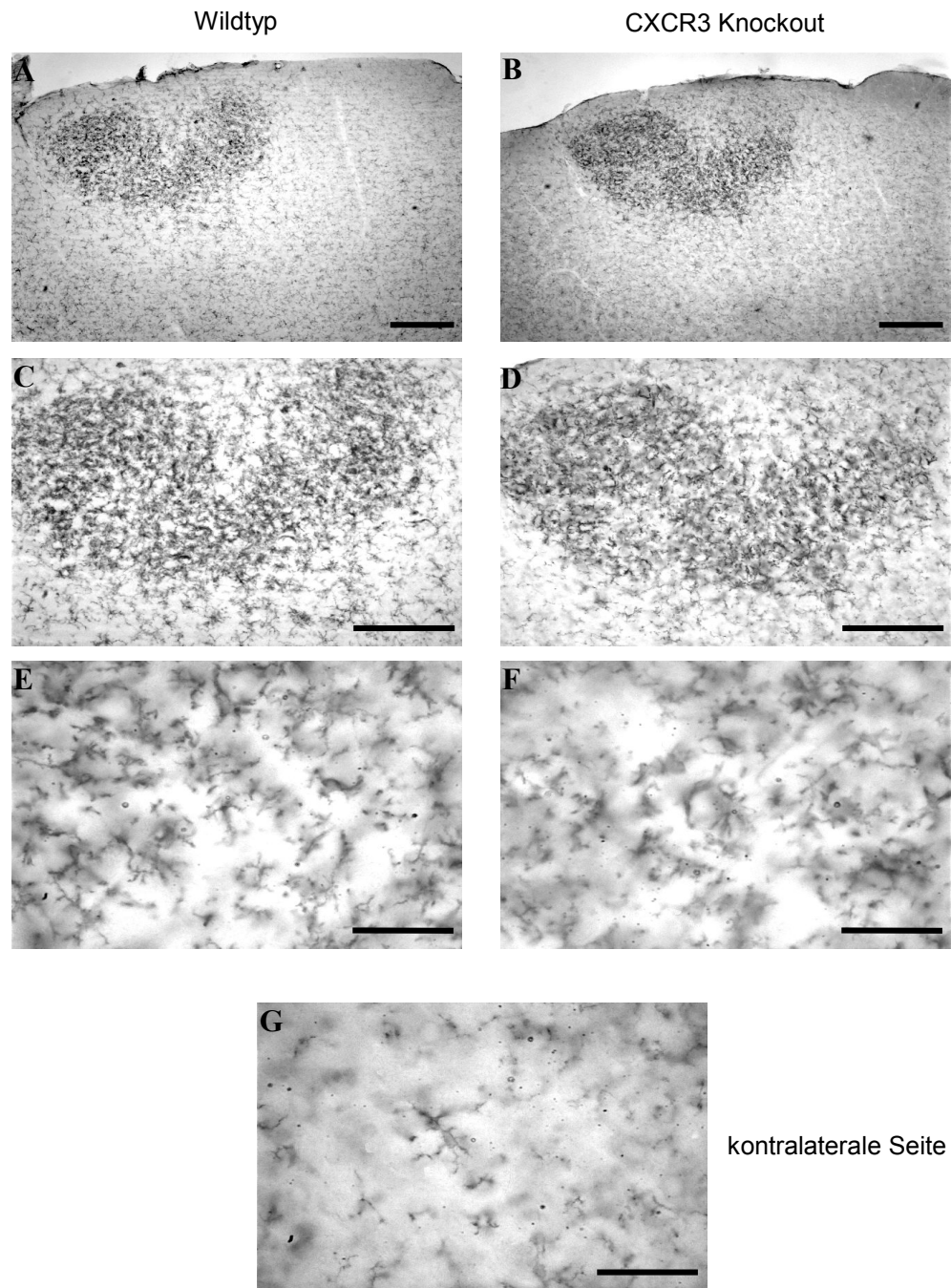
An dem anästhesierten Tier wurde der rechte Fazialisnerv auf Höhe des Foramen stylomastoideum durchtrennt, während der kontralaterale Nerv intakt blieb (Abb. 23). Nach der Perfusionsfixierung wurden coronale Gefrierschnitte des Gehirns angefertigt (Abb. 23), und immunhistochemische Färbungen gegen den mikroglialen Oberflächenmarker Mac1 (CD11b) sowie gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Ki-67 wird in allen aktiven Abschnitten des Zellzyklus exprimiert (Gerdes et al., 1984).



**Abbildung 23: Schema der Fazialisläsion und des Nucleus nervi facialis.**

In (A) sind der Verlauf des Nervus facialis und die Lage seines Ursprungsgebietes, den Nucleus nervi facialis dargestellt (Pfeil). (B) zeigt einen Horizontalschnitt durch das Stammhirn einer adulten Maus in Höhe des Nucleus nervi facialis (umrandet).

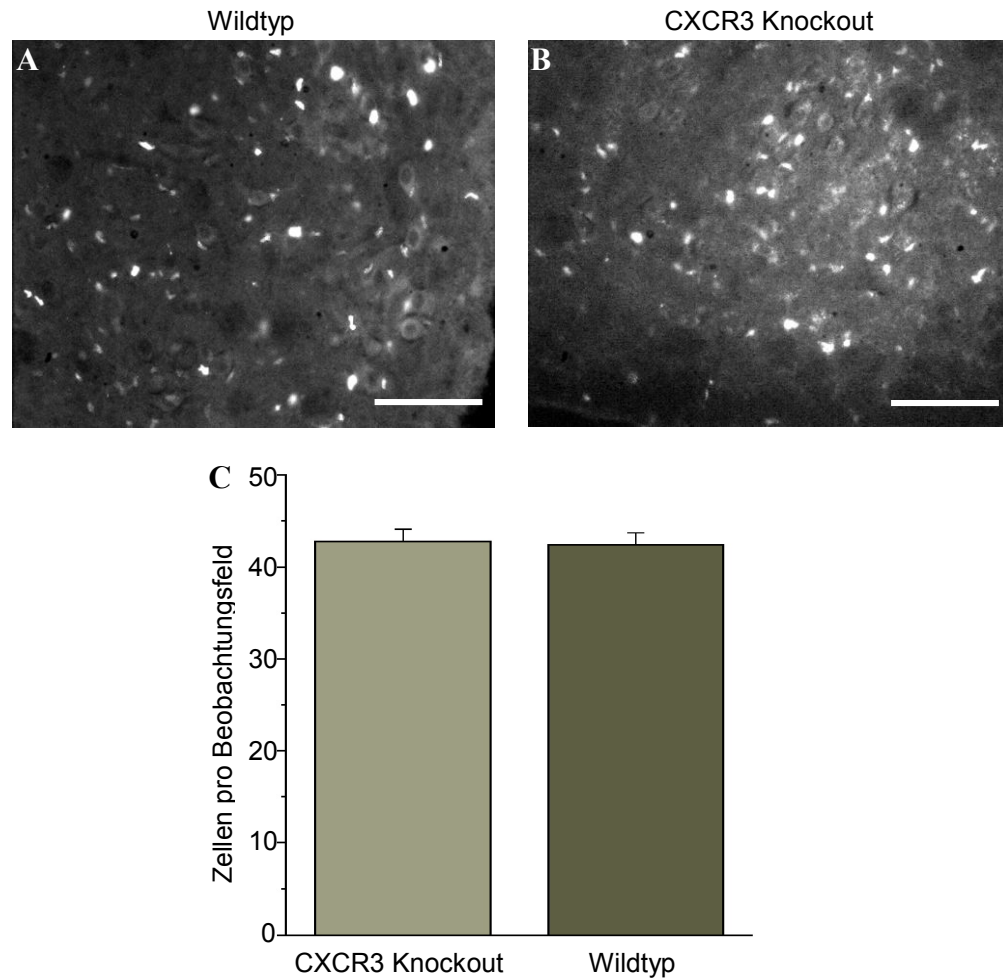
In Abbildung 24 sind Mac-1 gefärbte Schnitte von Wildtyp (links) und CXCR3 Knockout (rechts) Mäusen dargestellt. Es konnten keine Unterschiede in der Morphologie von Mikrogliazellen zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Tieren festgestellt werden. Unterschiede in der Zahl der Mikrogliazellen in den CXCR3 Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen fielen nicht auf. Um mögliche geringe Unterschieden in der mikroglialen Proliferation in Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen zu detektieren, wurden drei Tage nach Läsion immunocytochemische Färbungen mit Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt.



**Abbildung 24: Immunzytochemische Mac-1 Färbungen 3 Tage nach einer Läsion des rechten Nervus facialis.**

In (A) bis (F) sind coronale Schnitte durch die Nucleus nervi facialis Region von Wildtyp Mäusen (A, C und E) und CXCR3 Knockout Mäusen (B, D und F) nach immunocytochemischer Markierung der Mikrogliazellen mit Mac-1 Antikörper dargestellt. Diese Schnitte wurden drei Tage nach der Läsion des rechten Nervus facialis hergestellt. In Abbildung (G) ist eine unlädierte kontralaterale Seite abgebildet. Unterschiede in der Dichte und Morphologie von Mikrogliazellen nach einer Läsion zwischen den CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen konnten nicht gefunden werden. Die Balken in A und B entsprechen 250 µm, in C und D 200 µm und in E, F und G 50 µm.

Nach Quantifizieren der Ki-67-markierten Zellen in Schnittserien durch axotomierte Fazialiskerne konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Wildtyp Mäusen (Abb. 25 A und C) und CXCR3 Knockout Mäusen (Abb. 25 B und C) festgestellt werden.



**Abbildung 25: Immunzytochemische Ki-67 Färbungen drei Tage nach einer Fazialisläsion.**

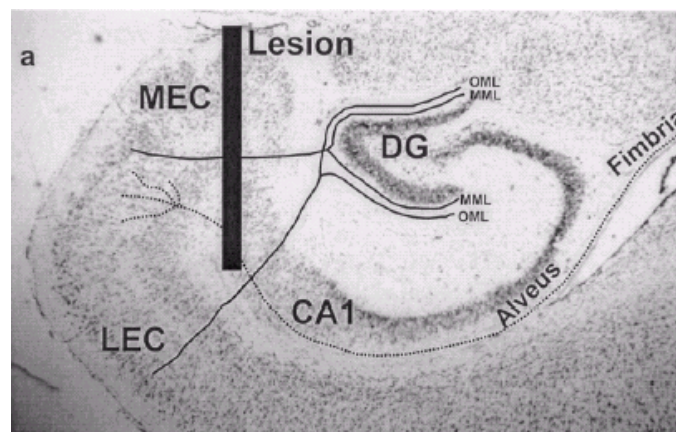
Drei Tage nach einer Fazialisläsion sind keine Unterschiede in der Zahl der Ki-67 immunofluoreszenten Zellen im Nucleus nervi facialis in Wildtyp Mäusen (A) im Vergleich zu CXCR3 Knockout Mäusen (B) sichtbar. Der Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ . Die Beobachtung wurde durch Auszählung von fluoreszierenden Zellkernen überprüft und wird in (C) als Anzahl positiver Zellen pro Beobachtungsfeld dargestellt. Die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) wurden mindestens aus jeweils neun Schnitten pro Tier und Versuchsgruppe ( $n = 3$ ) ermittelt.



### 3.11 Untersuchungen an CXCR3 Knockout Mäusen nach Läsion des entorhinalen Kortex (ECL)

Ein gut etabliertes *in vivo* System zur Untersuchung von Veränderungen nach einer Läsion im Gehirn stellt die ECL dar. Isokortikale Informationen erreichen die hippocampale Formation über den entorhinalen Kortex. Dessen Projektionen in den Gyrus dentatus und ins Ammonshorn bilden als Tractus perforans die Hauptafferenz des Hippocampus (Ramón y Cayal, 1901; Steward, 1976; Witter et al., 1989; Braak & Braak, 1993). Der entorhinale Kortex wird im Verlauf der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer früh befallen (Braak und Braak, 1990; Van Hoesen et al., 1991; Ohm et al., 1995). Dabei kommt es zum Sterben von entorhinalen Neuronen.

Eine solche Diskonnektion des Hippocampus vom entorhinalen Kortex kann tierexperimentell durch eine stereotaktische Läsion des entorhinalen Kortex nachgeahmt werden (Lynch et al., 1975; Frotscher et al., 1997). Die ECL führt zur anterograden Degeneration im Terminationsgebiet des Tractus perforans, daß heißt 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 (Abb. 26).



**Abbildung 26: Läsion des entorhinalen Kortex.**

Der entorhinale Kortex (EC) ist mit dem Hippocampus über den Tractus perforans verbunden. Neurone des medialen entorhinalen Kortex (MEC) projizieren zur mittleren Molekularschicht (MML) des Gyrus dentatus (DG); Neurone des lateralen entorhinalen Kortex (LEC) zur äußeren Molekularschicht („outer molecular layer“ = OML) (Linien). Afferente Nerven erreichen den entorhinalen Kortex über der Fimbria, dem Alveus, der anterioren sowie posterioren Kommissur (Punkte) (aus: Bechmann et al., 2001).

Die anterograde Degeneration von Axonen nach ECL führt zu einer Veränderung der Morphologie sowie der Anzahl von Gliazellen im Gyrus dentatus. Mikrogliazellen

verlieren ihre typische Ramifikation und nehmen die Gestalt ovaler, sogenannter amoeboider Zellen an (Gall et al., 1979; Gehrman et al., 1991; Jensen et al., 1994; Bechmann und Nitsch, 1997). Man nimmt an, daß es nach eine ECL zu einer Migration von Mikrogliazellen in die Molekularschichten kommt, da die Dichte von Mikrogliazellen im Degenerationsgebiet ansteigt, während sie in der Umgebung abnimmt (Bechmann & Nitsch, 2000). Astrozyten hingegen hypertrophieren und reagieren im Vergleich zur Mikroglia erst später auf eine ECL (Gall et al., 1979; Gehrman et al., 1991; Jensen et al., 1994). Die funktionelle Relevanz dieser glialen Veränderungen ist jedoch noch weitgehend unklar. Es ist vor allem unbekannt, ob die Gliareaktionen nach ECL zur Schädigung beitragen oder ob ihnen eine reparative Funktion zukommt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell dazu verwendet, den Einfluss des CXCR3 Rezeptors auf die Aktivierung und im Speziellen auf das Migrationsverhalten von Mikrogliazellen zu untersuchen. Dafür wurden die CXCR3 Knockout Tiere den Wildtyp Tieren gegenübergestellt.

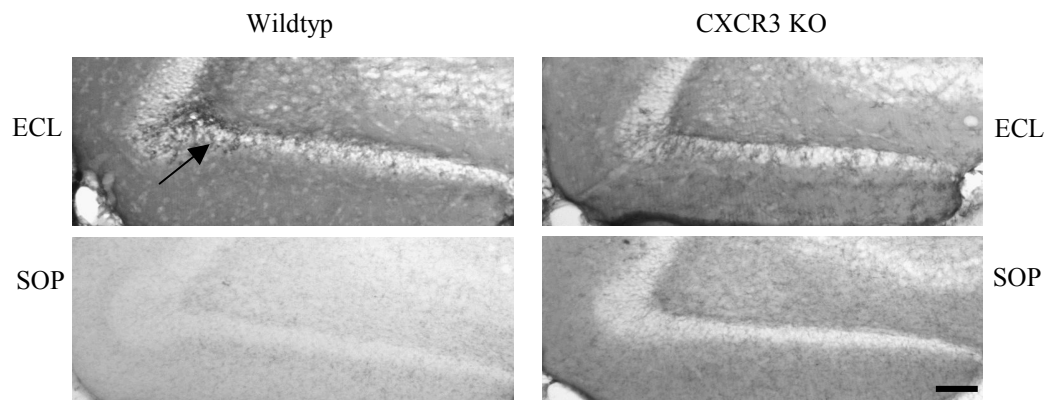
### **3.11.1 In CXCR3 Knockout Tieren führt eine ECL zu einer reduzierten Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu Wildtyp Tieren**

Mögliche Unterschiede in der Aktivierung von Mikrogliazellen in den CXCR3 Knockout Tieren wurden anderthalb, drei und acht Tage nach ECL sowie nach Scheinoperationen (SOP) in CXCR3 Knockout und Wildtyp Tieren mit Hilfe immunozytochemischer Färbungen und der ABC-DAB-Technik untersucht (Abb. 26, 27 und 28). Nach Perfusionsfixierung und Entnahme der Gehirne wurden 50 µm dicke Horizontalschnitte mit dem Vibratom angefertigt und Immunomarkierungen des Oberflächenmolekül Mac-1, welches auf Makrophagen/Mikrogliazellen vorkommt, durchgeführt.

Bei der SOP werden alle operativen Schritte von der Narkose des Tieres bis zur Öffnung der Schädeldecke exakt wie bei einer ECL durchgeführt, jedoch wird die eigentliche Läsion des entorhinalen Kortex ausgelassen. Dadurch stellt man sicher, daß die gefundenen Ergebnisse ausschließlich auf die Läsion des entorhinalen Kortex zurückzuführen sind und nicht durch zum Beispiel das Öffnen der Schädeldecke bedingt wird. Die interne Kontrolle, das heißt der unlädierte Hippocampus im Tier, wurde ebenfalls immer untersucht. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, daß Verbindungen zwischen den Hippocampi bestehen, die bei einer Läsion ebenfalls zu Veränderungen auf der unlädierten Seite führen können (Krug et al., 2001).

Bereits anderthalb Tage nach ECL stieg die Mac-1 Immunreaktivität im Hippocampus in Wildtyp ( $n = 4$ ) und CXCR3 Knockout Mäusen ( $n = 4$ ) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (nicht dargestellt) oder zu scheinoperierten Mäusen ( $n = 3$ ) an (Abb. 27). In scheinoperierten Mäusen (SOP, Abb. 27 untere Reihe) oder in der unlädierten kontralateralen Hemisphäre (nicht dargestellt) lagen die Mac-1-positiven Zellen ohne starke Überlappungen nebeneinander vor. Die Färbung mit ausschließlich dem Zweitantikörper führte in allen Schnitten zu keiner Färbung (nicht gezeigt).

Sowohl im Wildtyp wie auch im CXCR3 Knockout Tier trat anderthalb Tage nach ECL eine Transformation der Mikroglia von einer stark verzweigten Gestalt, wie sie in den scheinoperierten Tieren auftritt, zu einer weniger stark verzweigten bis ovalen, ameboiden Morphologie (Abb. 27). In Wildtyp Tieren konnte jedoch im Vergleich zu CXCR3 Knockout Mäusen eine stärkere Anhäufung von Mikrogliazellen im Degenerationsgebiet der Axonterminalen in der mittleren und äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus gefunden werden (Abb. 27, Pfeil). Personen, denen die Zuordnung der Schnitte zu den beiden Gruppen unbekannt waren, konnten zwischen CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen unterscheiden.



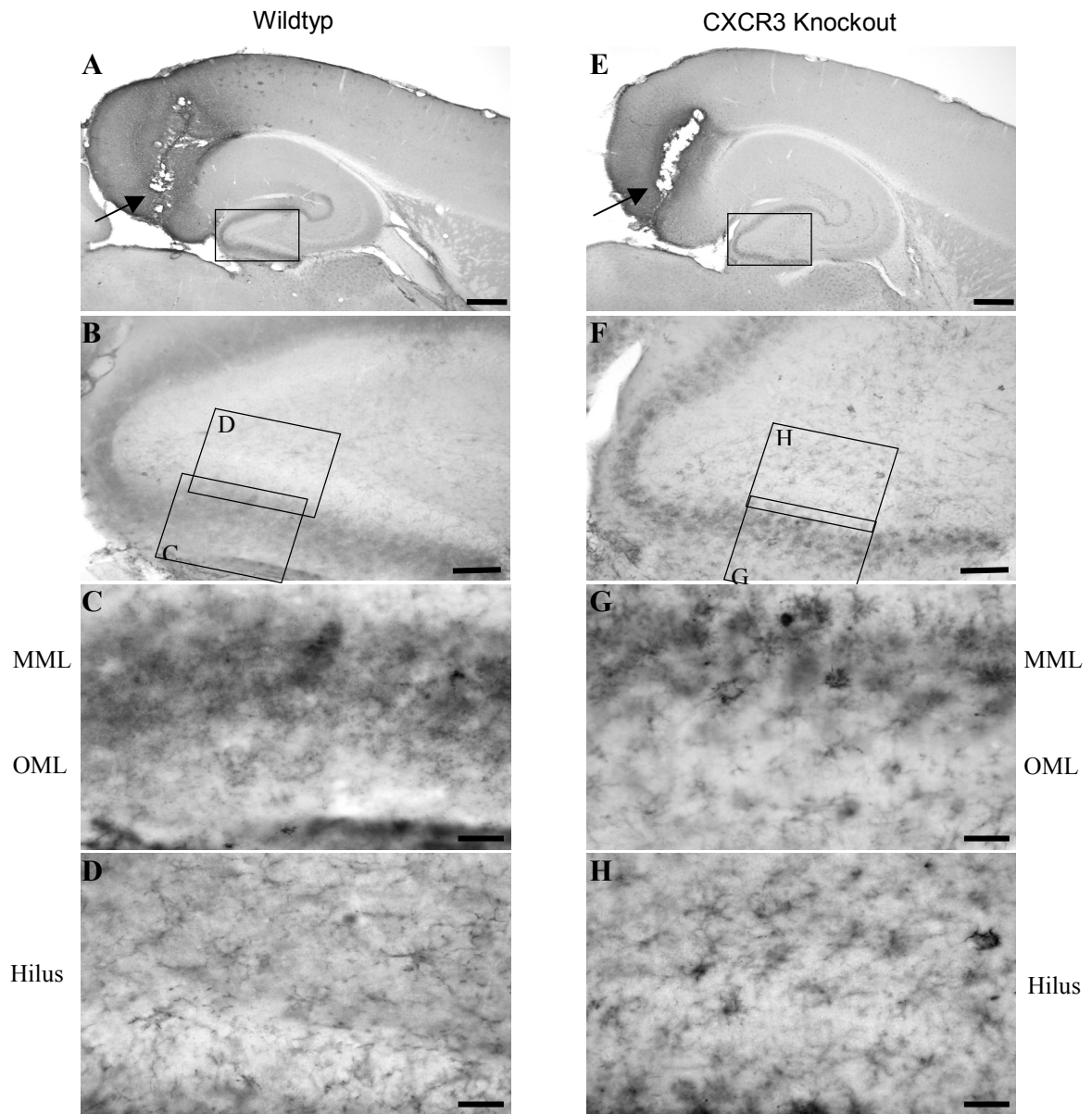
**Abbildung. 27: Immunzytochemische Färbung der Mikroglia anderthalb Tage nach ECL.**

Dargestellt sind Horizontalschnitte von Wildtypen (links) und CXCR3 Knockout Tieren (rechts) anderthalb Tage nach SOP (untere Reihe) und ECL (obere Reihe). Die Mikrogliazellen sind mit einem spezifischen Antikörper Mac-1 markiert und durch eine DAB Färbung geschwärzt. Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen sind bereits in Hinsicht auf die Intensität der Färbung unterscheidbar. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm.

Dieser Unterschied in der Verteilung der Mikroglia im Gyrus dentatus zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen verstärkte sich drei Tage nach ECL (Abb. 28). In allen Horizontalschnitten von Wildtyp Tieren ( $n = 10$ ) konnte in der äußeren und mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus ein dichtes Band von Mac-1-positiven

Mikrogliazellen/Makrophagen detektiert werden (Abb. 28, links). In der Detailvergrößerung der Molekularschicht (Abb. 28 C, links) kann man erkennen, daß die Mac-1-positiven Mikrogliazellen eine ovale Makrophagen-ähnliche Morphologie mit kurzen oder überhaupt keinen Zellfortsätzen besaßen. Im Hilus des Gyrus dentatus und in der Körnerzellschicht (Abb. 28 D) konnten im Vergleich zu der unlädierten Seite des Hippocampus (nicht dargestellt), die als eine Kontrolle dient, weniger Mac-1-positive Zellen festgestellt werden. Dies entspricht den bereits zuvor beschriebenen Ergebnissen von Bechmann und Nitsch (2000) und legt nahe, daß Mikrogliazellen aus diesen Gebieten in die OML wandern. Im unlädierten Hippocampus des lädierten Tieres waren Mac-1-1- positive Mikrogliazellen uniform in den verschiedenen Gebieten verteilt und besaßen eine ramifizierte Morphologie, das heißt, die Zellen besaßen dünne, verzweigte Fortsätze (nicht dargestellt).

In CXCR3 Knockout Mäusen konnte ebenfalls drei Tage nach der Läsion ein Anstieg in der Mac-1 Immunoreaktivität festgestellt werden (Abb. 28 E und F, rechts). Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen traten Mac-1-positive Zellen in allen CXCR3 Knockout Mäusen (n = 8) lediglich in der MML auf, während die OML kaum Mac-1-positive Zellen aufwies (Abb. 28 G, rechts). Aufgrund ihrer separaten Verteilung konnten in der MML des Gyrus dentatus einzelne Mac-1-positive Zellen identifiziert werden (Abb. 28 G). Diese gefärbten Mikrogliazellen zeigten eine Vergrößerung des Zellkörpers und eine Reduzierung der Ramifizierung der distalen Verzweigungen im Vergleich zu Mikrogliazellen der unlädierten kontralateralen Seite (nicht gezeigt) oder Mikrogliazellen im Hilus des Gyrus dentatus (Abb. 28 H). Andererseits besaßen die Mikrogliazellen in CXCR3 Knockout Mäusen nicht die morphologischen Eigenschaften von voll aktivierten Mikrogliazellen, wie in den Wildtyp Mäusen (Abb. 28 C). In der OML der CXCR3 Knockout Mäuse waren schwach angefärbte, ramifizierte Mikrogliazellen detektierbar, welche in den Wildtyp Tieren kaum zu finden waren. Im Hilus von CXCR3 Knockout Mäusen (Abb. 28 H) konnten mehr Mikrogliazellen identifiziert werden als in Wildtyp Mäusen (Abb. 28 D).

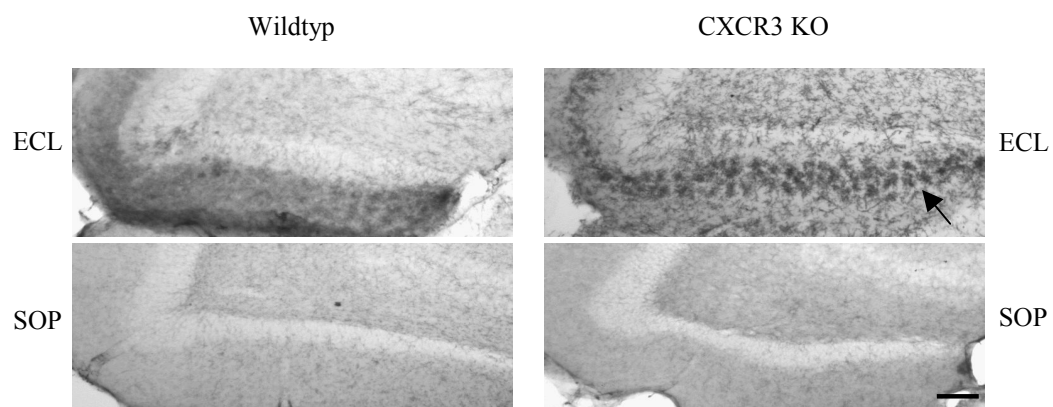


**Abbildung 28: Immunzytochemische Färbung der Mikroglia mit Mac-1 Antikörper drei Tage nach ECL.**

Die Übersichtsbilder (A, E) zeigen horizontale Vibratomschnitte durch das Gehirn einer adulten Wildtyp (links) und einer CXCR3 Knockout Maus (rechts) in Höhe des Hippocampus drei Tage nach einer ECL (Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$ ). Die Mikrogliazellen sind mit einem spezifischen Antikörper Mac-1 markiert und durch eine DAB Färbung geschwärzt. Deutlich kann man die Läsion im entorhinalen Kortex (Pfeile) erkennen. (B) und (F) stellen die Hippocampi in einer höheren Vergrößerung dar, die in (A) und (E) durch Kästen markiert sind (Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). Zur weiteren Ausschnittsvergrößerung der äußeren und mittleren Molekularschicht (C und G) und des Gyrus dentatus (D und H) vom Wildtyp und CXCR3 Knockout Maus wurden Projektionen von vier Einzelbildern unterschiedlicher Färbungsebenen dargestellt (Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ ). In Wildtyp Mäusen können sowohl in der MML wie auch in der OML Mac-1 gefärbte Mikrogliazellen gefunden werden. In CXCR3 Knockout Mäusen hingegen findet man Mikroglia lediglich in der MML und nicht in der OML, die eine verzweigtere Morphologie aufweisen, als die Mikrogliazellen in Wildtyp Tieren.

Anhand der beschriebenen Unterschiede in der Mikrogliaaktivierung in Wildtyp versus CXCR3 Knockout Mäusen konnten die beiden Gruppen eindeutig von Personen unterschieden werden, denen nicht bekannt war, welcher Schnitt zu welcher Gruppe gehörte.

In scheinoperierten Wildtyp oder CXCR3 Knockout Mäusen konnte keine Aktivierung von Mikrogliazellen festgestellt werden (Abb. 29 untere Reihe). Personen, denen die Zuordnung der Schnitte zu den beiden Gruppen unbekannt waren, konnten nicht zwischen scheinoperierten CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen unterscheiden.



**Abbildung 29: Immunzytochemische Färbung der Mikroglia anderthalb drei Tage nach ECL.**

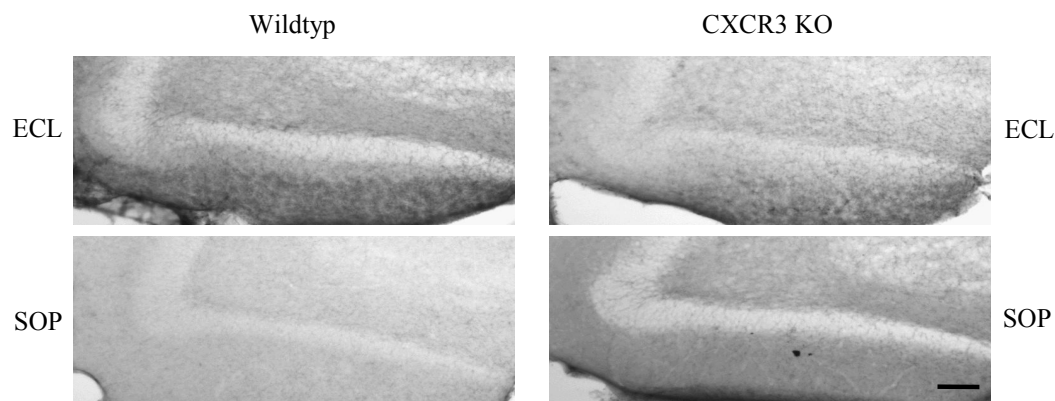
Dargestellt sind Horizontalschnitte von Wildtypen (links) und CXCR3 Knockout Tieren (rechts) drei Tage nach einer entorhinalen ECL und darunter nach einer SOP. Die Mikrogliazellen sind mit einem spezifischen Antikörper Mac-1 markiert und durch eine DAB Färbung geschwärzt. Deutlich ist die schon in Abbildung 28 erläuterte Akkumulation der Mikrogliazellen in der äußeren und mittleren Molekularschicht in Wildtyp Tieren nach einer ECL erkennbar. In CXCR3 Knockout Tieren befinden sich Mikrogliazellen mit einer stärkeren Expression von Mac-1 nur in der MML (Pfeil). In scheinoperierten Tieren kann eine solche Akkumulation nicht gefunden werden. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm.

Acht Tage nach einer Läsion konnte in CXCR3 Knockout Mäusen (n = 8) eine ähnliche Morphologie und Verteilung der Mikroglia wie in Wildtyp Mäusen (n = 7) festgestellt werden (Abb. 30). Die eindeutige Identifizierung von einzelnen Mikrogliazellen in CXCR3 Knockout Mäusen, wie drei Tage nach Läsion beobachtet, war nicht mehr möglich. „Verblindete“ Personen konnten nicht mehr zwischen den beiden Tiergruppen unterscheiden.

Die Mac-1 Immunreaktivität in der mittleren und äußeren Molekularschicht war im Vergleich zu drei Tagen (Abb. 29) nach Läsion deutlich in Wildtyp und CXCR3 Knockout Tieren reduziert, jedoch im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen (n = 4) weiterhin erhöht (Abb. 30).

In beiden Tiergruppen konnte nach einer SOP keine veränderte Morphologie oder Verteilung der Mikrogliazellen im Vergleich zu anderthalb oder drei Tagen scheinoperierten Tieren beobachtet werden. SOP Tiere beider Tiergruppen zeigten also keine zeitabhängig stärkere Expression von Mac-1 im Hippocampus. Es war nicht möglich, zwischen CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen nach SOP zu unterscheiden.

In Hippocampi der SOP Tiere konnte jedoch im Vergleich zu der kontralateralen, unlädierten Seite (nicht dargestellt) ein Anstieg in der Mac-1 Immunfärbung festgestellt werden, die jedoch wie bereits oben erläutert, im Vergleich zu lädierten Tieren wesentlich schwächer war.



**Abbildung 30: Immunzytochemische Färbung der Mikroglia acht Tage nach ECL.**

Acht Tage nach Läsion (obere Reihe) ist kein Unterschied in der Morphologie und Verteilung der Mikrogliazellen zwischen Wildtyp (links) und CXCR3 Knockout Tieren (rechts) erkennbar. In beiden Tiergruppen findet man aktivierte Mikrogliazellen in der äußeren und mittleren Molekularschicht. In scheinoperierten Mäusen (SOP, untere Reihe) beider Tiergruppen kann keine Akkumulation von Mikrogliazellen in eine bestimmte Region der Molekularschicht beobachtet werden. Der Balken entspricht einer Länge von 100µm.

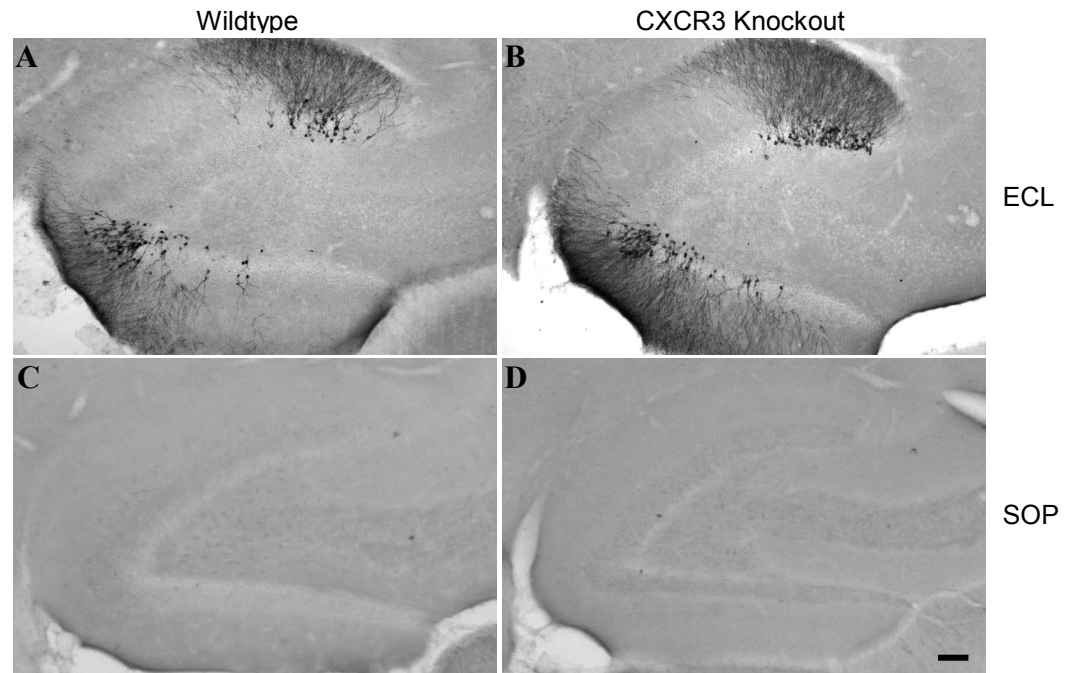
### **3.11.2 Der Apoptoseprozeß der Neurone des Tractus perforans wird nicht beeinflusst durch den CXCR3-Rezeptor-3**

Es ist bekannt, daß die ECL nach anderthalb Tagen zum Zelltod von Körnerzellen im denervierten Gyrus dentatus führt (Kovac et al., eingereicht). Der Zelltod kann durch Antiserum gegen aktivierte Caspase-3, einem in dem Apoptoseprozess induzierten Enzym, dargestellt werden. Kovac und Mitarbeiter wiesen nach, daß die Caspase-3-positiven Zellen anderthalb Tage nach einer ECL eine Kondensation des Chromatins und einen fragmentierten Zellkern, morphologische Kriterien für einen programmierten Zelltod aufweisen.

Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Morphologie von Mikrogliazellen in Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen drei Tage nach ECL wurde untersucht, ob der durch die Läsion induzierte Apoptoseprozess durch das Fehlen des CXCR3-Rezeptors-3 beeinflusst wird.

Anderthalb Tage nach einer Läsion wurden Schnitte von den Gehirnen von Wildtyp (n = 3) und CXCR3 Knockout Mäusen (n = 3) angefertigt und mit Antikörper gegen Caspase-3 gefärbt (Abb. 31). Wie beschrieben, findet man nach ECL Caspase-3 gefärbte Zellen im Gyrus dentatus (Abb. 31). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Anhäufung von apoptischen Zellen in Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen festgestellt werden (Abb. 31 A und B). Auch die Betrachtung der Morphologie der apoptischen Neurone brachte keine Unterschiede beim Vergleich von CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen hervor. Der Apoptoseprozess wird also nicht durch den Rezeptor CXCR3 beeinflusst. Nach SOP findet man weder in Mäusen des Wildtyps (n = 3) noch in CXCR3 Knockout Mäusen (n = 3) Caspase-3-positive Zellen im Hippocampus (Abb. 31 C und D).



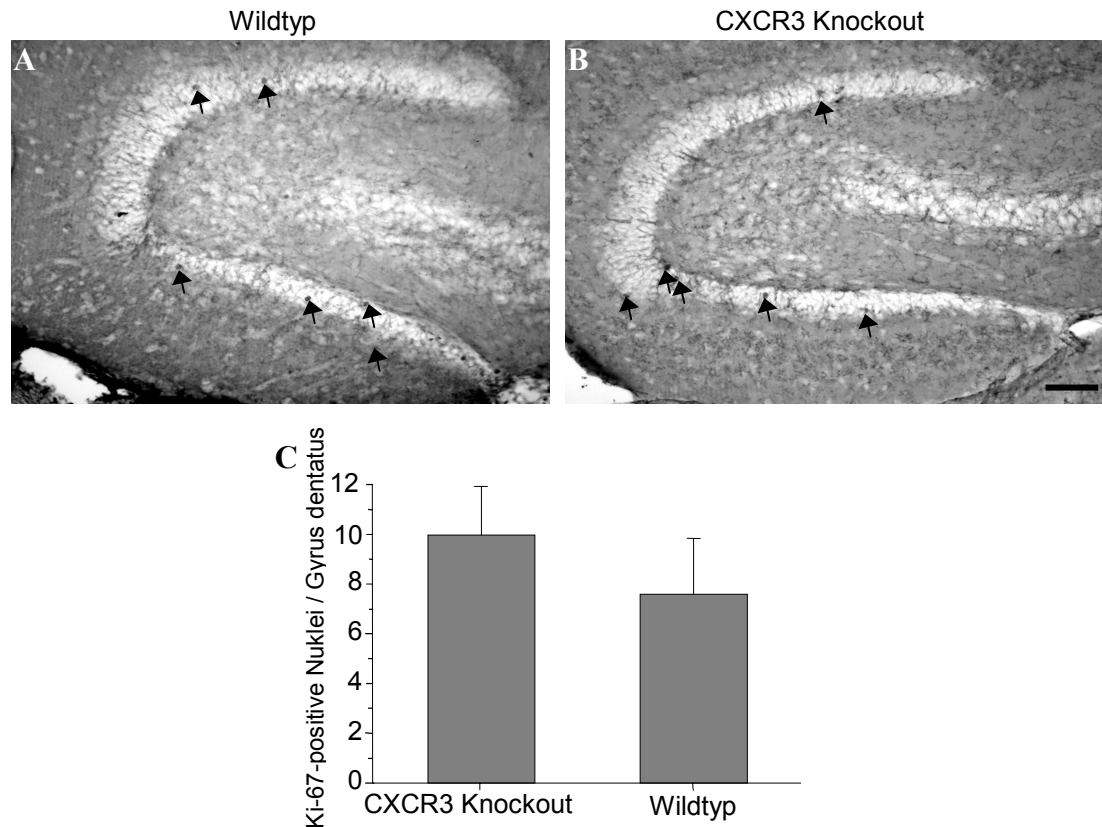


**Abbildung 31: Immunzytochemische Caspase-3 Färbungen anderthalb Tage nach ECL.**

Exemplarisch dargestellt ist der Gyrus dentatus von einer Wildtyp (A) und CXCR3 Knockout Maus (B) anderthalb Tage nach ECL (10-fache Vergrößerung). Die apoptotischen Neurone wurden mit Antikörper gegen Caspase-3 markiert und durch eine DAB Färbung geschwärzt. In Abbildung (C) und (D) sind Schnitte von scheinoperierten Tieren dargestellt. Zwischen den CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen konnten keine Unterschiede bezüglich Lokalisation, Menge und Morphologie apoptotischer Neurone gefunden werden. Der Balken entspricht 100 µm.

### **3.11.3 Die Proliferation drei Tage nach ECL ist nicht verändert in CXCR3 Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren**

In der Literatur ist beschrieben, daß etwa drei Tage nach ECL eine Proliferation von Mikrogliazellen im Gyrus dentatus stattfindet (Hailer et al., 1999). Um zu prüfen, ob die unter 3.11.1 beschriebenen Unterschiede in der Verteilung von Mikrogliazellen nach ECL zwischen Wildtyp und Knockout Tieren auf Unterschiede im Proliferationsverhalten dieser Zellen zurückzuführen sind, wurden drei Tage nach ECL Färbungen mit Ki67 Antikörper durchgeführt (Abb. 32). Die höchste Dichte an Ki-67-positiven Zellen konnten in der Körnerzellschicht und in den Molekularschichten des Gyrus dentatus gefunden werden. Jedoch ergaben sich nach Auszählung der Ki-67-positiven Zellen im Gyrus dentatus keine Unterschiede zwischen den Wildtyp (n = 3) und CXCR3 Knockout Mäusen (n = 3) (Abb. 32 C).



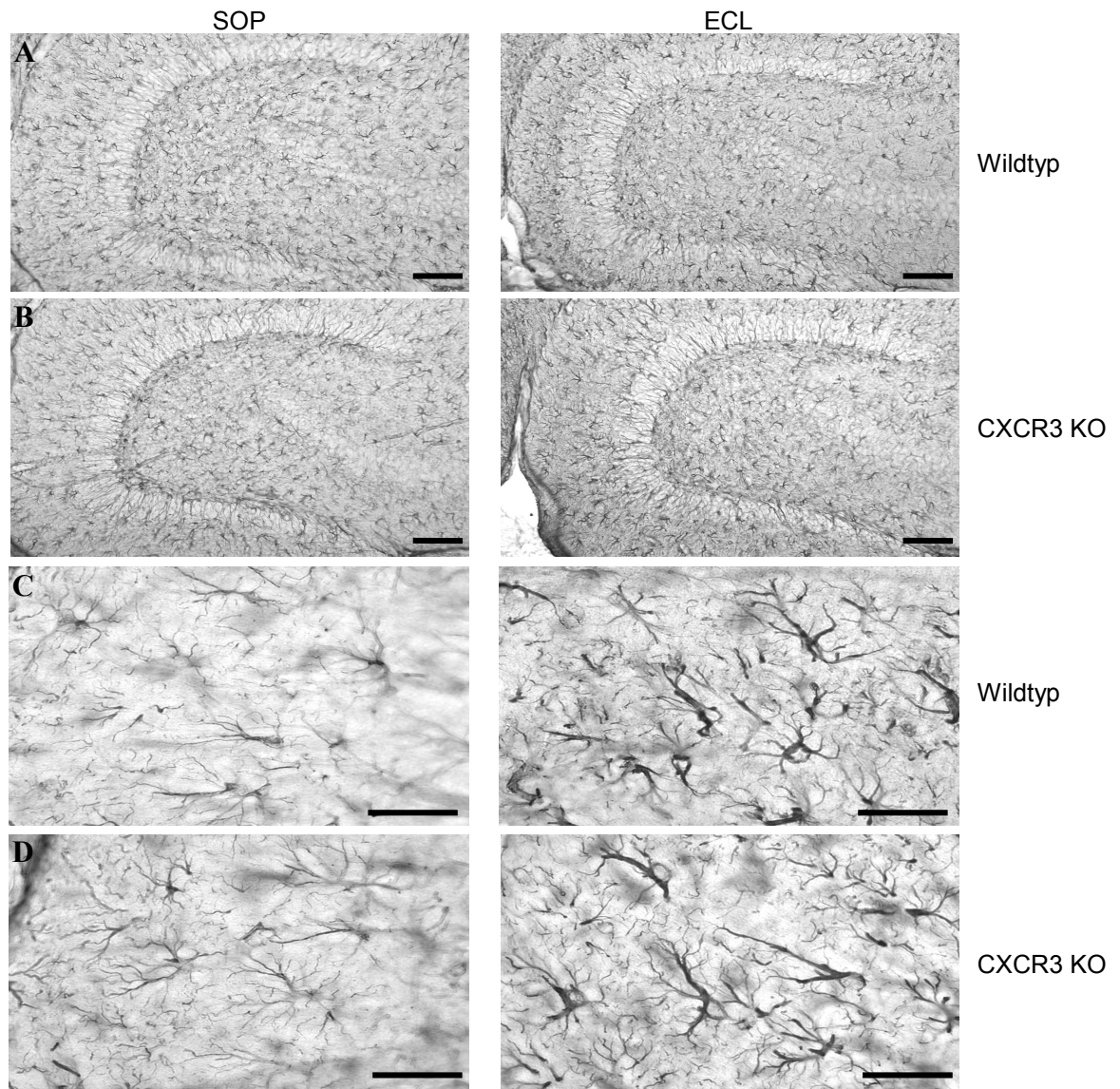
**Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von proliferierenden Zellen mit Ki-67 Antikörper drei Tage nach ECL.**

Beim Vergleich von Wildtyp (A) und CXCR3 Knockout Mäusen (B) ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Zahl der proliferierenden Zellen. Die Pfeile markieren einige dieser Ki-67-positiven Zellkerne. Der Balken entspricht 100  $\mu$ m. Das Quantifizieren der positiven Nuclei in Serienschnitten von jeweils drei Tieren (C) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen.

### 3.11.4 Die Aktivierung von Astrozyten ist in CXCR3 Knockout Mäusen nicht verändert

Um herauszufinden, ob CXCR3 auch die läsionsinduzierte Astrozytenaktivierung beeinflusst, wurden die Astrozyten acht Tage nach ECL mit Antikörper gegen GFAP, einem astrozytenspezifischen Intermediärfilamentprotein, angefärbt. Die sogenannte reaktive „Gliose“ von Astrozyten ist in der OML drei Tage nach Läsion beobachtet worden, und erreichte vier bis sieben Tage nach Läsion einen Höhepunkt (Rose et al., 1976; Gage et al., 1988; Gehrman et al., 1991; Poirier et al., 1991; Jensen et al., 1994). Somit erfolgt die Aktivierung der Astrozyten zeitlich später als die der Mikrogliazellen. Astrozyten zeigen eine deutlich verstärkte immunzytochemische Anfärbung mit GFAP, was sich auch auf der Ebene der Expression von GFAP mRNA zeigen lässt (Poirier et al.,

1991). Eine Migration von Astrozyten in das Denervationsgebiet, wie es sich bei Mikrogliazellen aus der Umverteilung von dem Hilus nach der Molekularschicht ergab, konnte nicht beobachtet werden (Bechmann & Nitsch, 2000).



**Abbildung 33: Immuncytochemische Färbung von Astrozyten mit Antikörper gegen GFAP acht Tage nach ECL.**

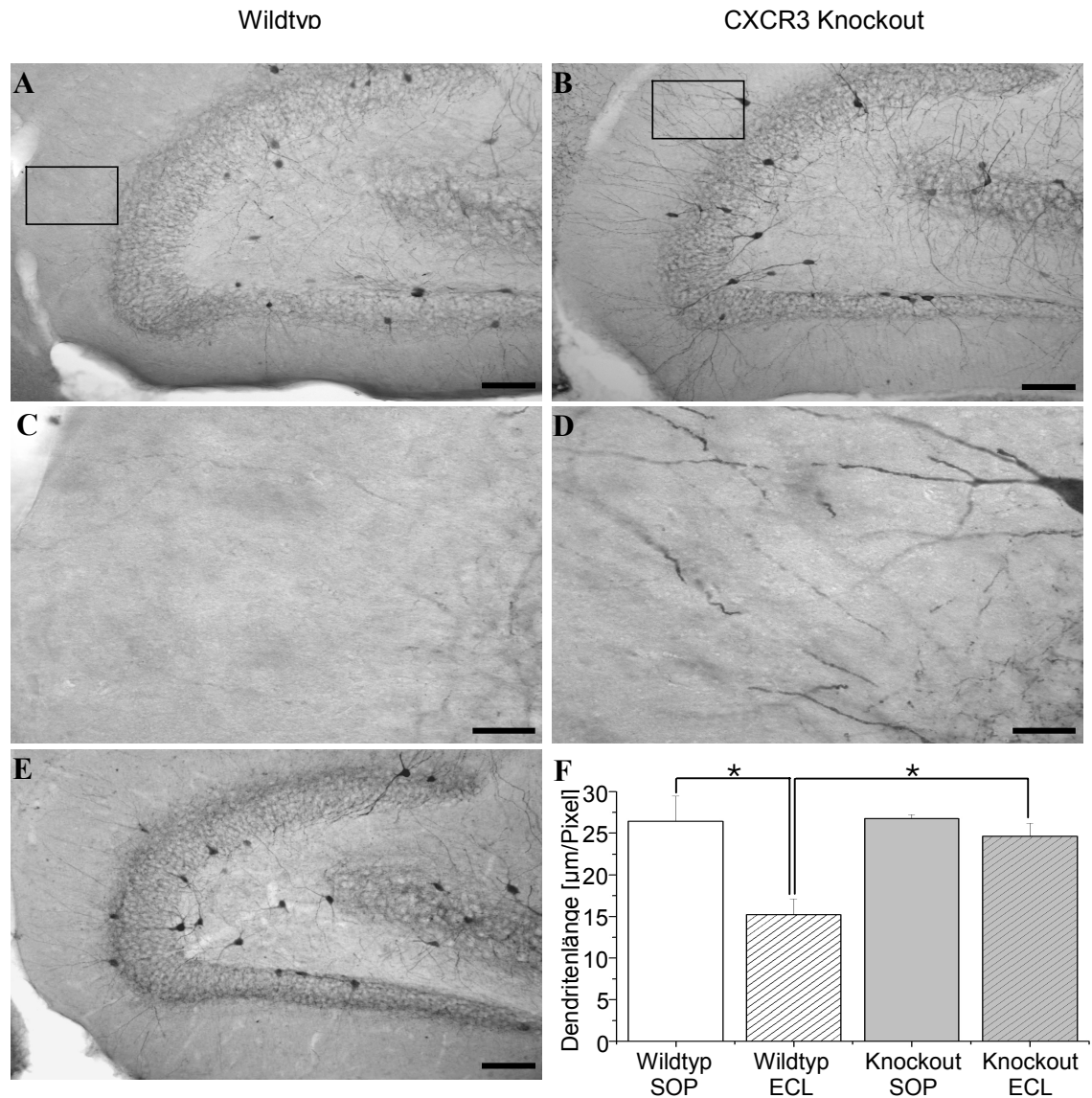
Horizontalschnitte acht Tage nach ECL (rechts) oder SOP (links) von Wildtyp Mäusen (A) und CXCR3 Knockout Mäusen (B). Die Balken entsprechen 100 µm. Astrozyten wurden mit dem GFAP Antikörper markiert. Im Vergleich zu scheinoperierten Tieren kann eine Zunahme der Astrozytenzahl in der OML (C und D), sowie eine Zunahme im Volumen des Zellkörpers festgestellt werden. Die Balken entsprechen 50 µm. Unterschiede zwischen den CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen in den Merkmalen der Aktivierung von Astrozyten konnten nicht gefunden werden.

Acht Tage nach ECL zeigten Astrozyten in den Wildtyp ( $n = 7$ ) wie auch in CXCR3 Knockout Mäusen ( $n = 6$ ) eine vergleichbare Morphologie. Die Astrozyten exprimierten in beiden Fällen stärker GFAP als nach einer SOP. Im Vergleich zu scheinoperierten Tieren kann eine Vergrößerung des Zellkörpers und eine Verdickung der Fortsätze festgestellt werden. Es konnten jedoch keine Unterschiede in dem Muster der Färbung bei Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen gefunden werden.

### **3.11.5 Das Zurückziehen der GABAergen Neurone ist bei CXCR3 Knockout Mäusen reduziert**

Acht bis zehn Tage nach ECL kommt es zum Verlust einer Subpopulation von GABAergen Dendriten des Gyrus dentatus (Nitsch & Frotscher, 1991). Die Neurone können spezifisch mit Antikörper gegen das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin gefärbt werden. Dieser Verlust macht sich vor allem darin bemerkbar, daß die Dichte dieser Parvalbumin-positiven Axone neun Tage nach der Läsion in der äußeren und mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus im Vergleich zu der unlädierten Kontrollseite stark abnimmt. In nicht operierten Tieren reichen die langen und verzweigten Dendriten zur OML des Gyrus dentatus sowie zum Stiatum lacunosum-moleculare (Kosaka et al., 1987; Sloviter, 1989; Nitsch et al., 1990, Gulyas et al., 1993). In diesen Gebieten besitzen die GABAergen Interneurone synaptischen Kontakt zu den entorhinalen Fasern (Ruth et al., 1982; Zipp et al., 1989). Durch die ECL wird also der distale Bereich der Dendriten der Parvalbumin-positiven GABAergen Neurone deinnerviert.

Um zu prüfen, ob das Fehlen des CXCR3 eine Auswirkung auf den Verlust Parvalbumin-positiver Dendriten hat, wurden acht Tage nach ECL oder SOP immunhistochemische Markierungen mit Antikörper gegen Parvalbumin durchgeführt. Der Verlust GABAerger Neurone im Gyrus dentatus konnte im Wildtyp ( $n = 8$ ) beobachtet werden (Abb. 34 A und C). Im Vergleich zu scheinoperierten Tieren ( $n = 3$ ; Abb. 34 E) kann man auf der lädierten Seite eindeutig sehen, daß die Dichte der Axone im Gyrus dentatus reduziert ist, beziehungsweise einige Areale vollständig frei von Dendriten sind. Nach „verblindeter“ Ausmessung der gesamten Dendritenlänge konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den scheinoperierten und lädierten Wildtyp Tieren gefunden werden (Abb. 34 F). In lädierten Wildtyp Tieren betrug die auf die analysierte Fläche bezogene mittlere Dendritenlänge der Molekularschicht  $15,21 \pm 1,91$  [ $\mu\text{m}$  / Pixel] im Vergleich zu  $24,61 \pm 3,06$  [ $\mu\text{m}$  / Pixel] bei scheinoperierten Wildtyp Mäusen.



**Abbildung 34: Immunzytochemische Parvalbumin Färbungen zur Darstellung GABAerger Neurone acht Tage nach ECL.**

Die GABAergen Neurone in Wildtyp (A, n = 8) und CXCR3 Knockout Mäusen (B, n = 8) wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Parvalbumin markiert und durch eine DAB Färbung geschwärzt. Die Balken entsprechen 100 µm. (C) und (D) stellen stärkere Vergrößerungen der in (A) und (B) markierten Bereiche dar (die Balken entsprechen 20 µm). In den CXCR3 Knockout Mäusen (B und D) ist deutlich zu erkennen, daß acht Tage nach der Läsion GABAerge Neurone im Gyrus dentatus zu finden sind. In Wildtyp Mäusen (A und C) ist diese Fläche nahezu frei von GABAergen Axonen, die jedoch in scheinoperierten Mäusen (n = 3) zu finden sind (E, der Balken entspricht 100 µm). Die Vermessung der Dendritenlänge (F) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen scheinoperierten Wildtyp Mäusen (WT SOP) und lädierten Wildtyp Mäusen (WT ECL), sowie zwischen lädierten Wildtyp Mäusen und lädierten CXCR3 Knockout Mäusen (KO ECL) (\* = p < 0,01). Zwischen scheinoperierten (n = 8) und lädierten CXCR3 Knockout Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Im Gegensatz dazu konnte in CXCR3 Knockout Mäusen (n = 8, Abb. 34 B und D) acht Tage nach einer Läsion kein signifikanter Unterschied in der Axonendichte im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen (n = 3) festgestellt werden (Abb. 34 F). Im Hilus des Hippocampus und oberhalb der CA1-CA3 Region befanden sich Parvalbumin-positive Neurone, wobei die Axone aus dem Hilus über die innere zur mittleren und äußeren Molekularschicht des Hippocampus ziehen (Abb. 34 B).

Zwischen lädierten Wildtyp und lädierten CXCR3 Knockout Mäusen konnte hingegen ein signifikanter Unterschied in der berechneten Länge der Dendriten festgestellt werden (Abb. 34 F;  $p < 0,01$ ). Die Durchschnittliche Dendritenlänge in der Molekularschicht bei CXCR3 Knockout Tieren betrug  $24,63 \pm 1,58$  [ $\mu\text{m}$  / Pixel] im Vergleich zu  $15,21 \pm 1,91$  [ $\mu\text{m}$  / Pixel] bei Wildtyp Tieren. Zwischen lädierten CXCR3 Knockout Tieren und scheinoperierten CXCR3 Knockout Tieren ( $26,73 \pm 0,49$   $\mu\text{m}$  / Pixel) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ebenfalls nicht signifikant war der Unterschied in der Dendritenlänge zwischen scheinoperierten Knockout und Wildtyp Tieren. Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß es in CXCR3 Knockout Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen nach ECL nicht zu einer signifikanten Reorganisation der Dendriten Parvalbumin-positiver Zellen kommt.