

## 2. Spezieller Teil

### 2.1 Material und Methoden

#### 2.1.1 Die Tiere

**Wir erhielten in Paraffin eingebettete Mäusegehirne von der Arbeitsgruppe AG PD Dr. Berthold Hoher, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt für Nephrologie, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité-Mitte unter der Leitung von Prof. Hans-H. Neumayer. Für die Versuche wurden Mäuse vom NMRI-Stamm verwendet.**

#### Herstellung der transgenen Tiere:

Human Endothelin-1 transgene Tiere wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Theuring, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Charite, Humboldt Universität Berlin etabliert und in der AG PD Dr. Hoher charakterisiert.

Eine humangenomische Lambdaphagenbibliothek, hergestellt mit DNA aus peripheren Blutlymphozyten, wurde mit Hilfe einer humanen ET-1 cDNA (wie bei Bloch et al. 1989 beschrieben) durchsucht. Ein dabei gewonnener 16- kD Klon, der das gesamte ET-1 Gen und angrenzend ~ 8-kD 5' und ~ 1,5-kD 3' Sequenzen enthielt, wurde in pGEM 3 subkloniert und für die Mikroinjektion verwendet.

Bei der Mikroinjektion wurden Einzellembrs von befruchteten, weiblichen NMRI Mäusen entnommen. In diese wurden die linearen humanen ET-1 DNA-Fragmente injiziert. Die so entstandenen transgenen Eizellen wurden in Eileiter von pseudoschwangeren NMRI Mäusen übertragen. Die transgenen Mäuse wurden mit Hilfe von Southern-blot-Analysen und PCR identifiziert. Für die PCR verwendete man DNA aus Schwanzbiopsien und einen für humanes ET-1 spezifischen Primer.

Mit Hilfe von Northern-blot-Analysen und in situ Hybridisierung wurde die Expression des Transgens in Gehirn, Nieren und Lungen nachgewiesen, auch in Herz, Leber, Milz, Speicheldrüsen und Hoden konnte eine Transgenexpression auf niedrigerem Niveau gezeigt werden (Hoher et al. 1997b).

Es wurden drei unabhängige transgene Linien generiert (Linie 238,260 und 856). Die Tiere, die in dieser Studie verwendet wurden, sind heterozygote Mäuse der Linie 856. Aufgrund der geringen Anzahl homozygoter transgener Mäuse war eine statistische Auswertung dieser Tiere nicht möglich. Es wurden bei diesen Tieren jedoch keine zusätzlichen phänotypischen, toxischen oder funktionellen Veränderungen festgestellt (Hoher et al. 1997b).

#### Aufzucht:

Alle Tierexperimente wurden entsprechend der lokalen Richtlinien für Haltung und Gebrauch von Labortieren durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung 90335/95). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Standardmäusenahrung und Leitungswasser, und die Temperatur (20°C), die Luftfeuchtigkeit (64%) und der Tag-Nacht-Rhythmus (Lichtperiode von 6.00 bis 18.00 Uhr) wurden kontrolliert und konstant gehalten. Nach zwei und sechs Wochen kamen die Tiere für 24 Stunden in einen Stoffwechsellkäfig, wo ihnen Blut abgenommen wurde und der Urin gesammelt wurde zur Bestimmung von Kalium, Natrium, Protein, Harnstoff und Kreatinin sowie deren Ausscheidung.

Die Tiere wurden je nach Behandlung in 6 verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Mit L-Name (ein NO-Synthase-Antagonist) behandelte, transgene Tiere

Gruppe 2: Mit L-Name und LU 224 (ein kombinierter ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R-Antagonist) behandelte, transgene Tiere

Gruppe 3: Unbehandelte, transgene Tiere

Gruppe 4: Mit L-Name behandelte Kontrolltiere

Gruppe 5: Mit L-Name und LU 224 behandelte Kontrolltiere

Gruppe 6: Unbehandelte Kontrolltiere

Die Behandlung mit L-Name erfolgte mit 100mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Trinkwasser für einen Zeitraum von 6 Wochen. In der Literatur ist schon mehrfach der Zusammenhang des NO-Systems mit dem Endothelinsystem beschrieben worden. NO hemmt die Endothelinexpression (Kuchan et Frangos 1993), ET-1 induziert über den ET<sub>B</sub>R die NO-Synthase und führt so zu einer negativen Rückkopplung (Yanagisawa et al. 1988). Bei den ET-1 transgenen Mäusen führt eine intravenöse Bolusinjektion von L-Name zu einem signifikant höherem Blutdruckanstieg als bei den entsprechenden Kontrolltieren (Hochoer et al. 2004), was für eine gegenregulatorisch erhöhte NO-Synthese in den transgenen Tieren spricht. Es lassen sich zudem eine erhöhte Anzahl an NO-Metaboliten im Urin der transgenen Tiere nachweisen (Hochoer et al. 2004). Aus diesem Grund erhielt ein Teil der Versuchstiere L-Name, um die Auswirkungen einer Hemmung dieser Gegenregulation zu untersuchen.

Die Behandlung mit LU 224, ein Racemat von LU 302, erfolgte mit 50mg/kg Körpergewicht ebenfalls über 6 Wochen. Der ETR-Blocker wurde gegeben, um herauszufinden, ob die möglicherweise vorhandenen Organschäden und Blutdruckveränderungen aufgrund der Hemmung der gegenregulatorischen NO-Synthese über eine Aktivierung der ET-Rezeptoren erfolgen. Wäre das zutreffend, so müssten diese Organveränderungen bei den Tieren, die mit L-Name und LU 224 behandelt wurden, nicht zu finden sein.

#### Organentnahme und Fixierung:

Für die Organentnahme wurden die 3 Monate alten Tiere mit 16 mg/kg Körpergewicht Rompun und 80 mg/kg Körpergewicht Ketanest i.p. narkotisiert, nachdem sie zuvor gewogen wurden. Ihnen wurden anschließend zunächst Blut durch Punktion des Herzens entnommen und die Nieren präpariert und entnommen. Dann wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Es wurden außer den Nieren noch das Herz, das Gehirn, die Lunge und das distale Colon entnommen.

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Organe mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und in Formalin 4% fixiert. Die Formalinlösung wurde nach 24 und 48 Stunden erneuert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte in einer Histokinette automatisch:

1. Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-80-96-96-100-100-100% Ethanol) für je eine Stunde.
2. Entfernung des Ethanol durch Xylol für 12 Stunden mit 2-maliger Erneuerung der Xylol-Lösung nach jeweils 4 Stunden.
3. Lagerung in geschmolzenem Paraffin bei 56°C für 2x1 Stunde.

Nach 12 Stunden wurden die paraffinierten Organe in Tissue Tek Unikassetten mit 56°C heißem Paraffin übergossen. Nach Erkalten des Paraffins sind die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom schneidbar.

### 2.1.2 Endotheligenmarkierung mit LacZ

Die Genmarkierung mit LacZ dient der Erkennung der Lokalisation sowie der Ausprägung der Endotheligenexpression. Zu diesem Zweck wurde hinter die Promotorregion des Endothelgens (8kb) im Bereich des ersten Exons das bakterielle  $\beta$ -Galaktosidasegen (=LacZ-Gen) eingefügt. Das Transgen wurde anschließend wie oben beschrieben in Einzelembryos von Mäusen des MNRI-Stamms mikroinjiziert. Die Lokalisation des LacZ-Gens im Bereich von Exon 1 führt zu einem Kettenabbruch bei der Synthese des transgenen Endothelins, so dass bei diesen Tieren keine erhöhte Endothelin-1-Expression vorliegt.

Die LacZ-Tiere wurden als zusätzliche Gruppe 7 behandelt, da sie zwar vom ET-1-Spiegel den Kontrolltieren entsprechen müssten, aber nicht so viele Untersuchungen während der Aufzucht mit ihnen durchgeführt wurden und die Organentnahme erst im Alter von 10 Monaten erfolgte.

Um die Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens sichtbar zu machen, wurden die Gehirne mit 5-bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (=Bluo-Gal) gefärbt, was zu einer Bildung von intrazellulären blauen Präzipitaten führt. Dabei wurden die Präparate entsprechend der Methode von Slowinski et al. (2002) behandelt:

1. Vorfixierung in PBS (1,9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 154 mM NaCl) gemischt mit 1% Formalin, 0,2% Glutaraldehyd und 0,02% Nonidet P40 für eine Stunde bei 4°C.
2. 2maliges Waschen in PBS.
3. Färbung in PBS mit 3,1 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 3,1 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,05 M Bluo-Gal bei 31°C für 24 Stunden.
4. 2maliges Waschen in PBS.
5. Fixierung in PBS mit 4% Formalin und Einbettung in Paraffin.

Die so behandelten Gehirne erhielten wir von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hocher.

Sie wurden zunächst am Mikrotom geschnitten und anschließend mit Kernechtrot gegengefärbt.

Die nachfolgend beschriebenen Färbungen und Auswertungen wurden von mir am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin durchgeführt.

### 2.1.3 GFAP-Immunhistochemie mit der ABC-Methode

#### Prinzip:

Es handelt sich um eine immunhistochemische Darstellung des Sauren Gliafaserproteins mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Komplexes.

Zunächst werden die Bindungsstellen des Sauren Gliafaserproteins mit dem Primärantikörper (DAKO Rabbit Anti-Cow GFAP) markiert. Dann wird der mit Biotin markierte Brückenantikörper dazugegeben, welcher an den Primärantikörper bindet. Biotin hat eine sehr hohe Affinität zu Avidin, einem Glykoprotein von 68kDa mit vier Bindungsstellen für Biotin. Ein Komplex aus Avidin, Biotin und einer an Biotin gekoppelten Meerrettichperoxidase wird nun auf die Objektträger gegeben und heftet sich mit noch freien Bindungsstellen des Avidins an das Biotin des Brückenantikörpers.

Die Peroxidase reagiert anschließend mit dem zugefügten Farbstoff DAB (3,3 Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid). Das Reaktionsprodukt ist braun.

Vorgehen:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für zweimal 5 Minuten, anschließend in Alkohol mit absteigender Konzentration (100-100-96-80-70%).
2. Blockieren der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 200ml Methanol und 3ml Wasserstoffperoxid für 30 Minuten unter dem Abzug.
3. Zweimaliges Spülen in TBS (Tris-HCl-Pufferlösung).  
(Trishydroxymethylaminomethan mit 25%iger Salzsäure auf pH = 7,4 einstellen; 100ml Tris-Stammlösung mit 100ml NaCl-Stammlösung und 800ml Aqua dest. mischen und anschließend 0,406g MgCl<sub>2</sub>, 0,324g MnCl<sub>2</sub> und 0,222g CaCl<sub>2</sub> hinzufügen)
4. Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen durch 20-minütige Inkubation mit 200µl Ziegennormalserum (Vectastain ABC-Kit gelb) verdünnt in 5ml Tris-HCL-Puffer bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer.
5. Abgießen des Normalserums und anschließendes Inkubieren der Präparate mit 1:500 (in TBS) verdünntem Primärantikörper (Rabbit Anti-Cow GFAP) bei 4°C über Nacht.
6. Abgießen und zweimal 5 Minuten in TBS auf dem Schüttler spülen.
7. 10µl Anti-Kaninchen-IgG-Brückenantikörper (Vectastain ABC-Kit blau) mit 2ml TBS verdünnen, auf die Präparate geben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Abgießen und mit TBS zweimal 5 Minuten auf dem Schüttler spülen.
9. Inkubieren mit dem Avidin-Biotin-Komplex (5ml TBS mit 50µl Avidin und 50µl Biotin, mit Peroxidase gekoppelt) für 45 Minuten bei Raumtemperatur.
10. Abgießen und zweimal 5 Minuten mit TBS auf dem Schüttler spülen.
11. Zur Entwicklung eine DAB-Tablette (3,3 Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid) auftauen, unter dem Abzug in 15ml 0,1 molarer Tris-HCL lösen (lichtgeschützt) und 12µl Wasserstoffperoxid hinzufügen. Die Flüssigkeit mit einer 5ml Spritze durch einen Mikrofiter auf die Präparate tropfen und 2 bis 3 Minuten inkubieren, bis die erwünschte Braunfärbung erreicht ist.
12. Zurückschütten des DABs in dasselbe Gefäß und Neutralisation mit Natriumhypochlorid.
13. Schnitte für 15 Minuten in Aqua dest. (mehrmals wechseln) auf dem Schüttler spülen.
14. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 Minute.
15. Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten.
16. Dehydrieren der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70-80-96-100-100%).
17. 2-mal für je 5 Minuten in Xylol schwenken.
18. Eindecken.

2.1.4 Mikroglialektin histochemie mit Tomato LektinPrinzip:

Lektine sind eine Gruppe von Proteinen und Glykoproteinen, die durch eine hohe Affinität zu Zuckern oder Zuckersequenzen von bestimmten Glykoproteinen gekennzeichnet sind. Ihre Aufgabe ist die Zellinteraktion und Zellerkennung durch die Verbindung von membranständigen Lektinen mit den korrespondierenden Glykoproteinen der angrenzenden Zelle.

Tomato Lektin wird aus der Tomatenpflanze *Lycopersicon esculentum* gewonnen. Es bindet spezifisch an Poly-N-acetyl Laktosamine im Zytoplasma und der Plasmamembran von Mikrogliazellen. Dabei werden amoeboiden Mikrogliazellen etwas stärker angefärbt als ramifizierte, was wahrscheinlich auf einem Nachlassen der phagozytischen Aktivität und damit der Anzahl an zytoplasmatischen Granula und Lysosomen beruht.

Die Plasmamembran und das Zytoplasma von Endothelzellen und Ependym werden ebenfalls von Tomato Lektin gefärbt, und auch granuläre Strukturen im Zytoplasma von Neuronen werden gelegentlich markiert (Acarin et al., 1994).

Auch bei dieser Färbung kann man den Avidin-Biotin-Komplex zur Signalverstärkung verwenden. Bei der Lektinhistologie wird allerdings anstelle eines Primär- und eines Brückenantikörpers ein biotinyliertes Lektin verwendet.

#### Vorgehen:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für zweimal 5 Minuten, anschließend in Alkohol mit absteigender Konzentration (100-100-96-80-70%).
2. Spülen in TBS für 10 Minuten auf dem Schüttler.
3. Trypsinierung (1mg Trypsin / ml TBS) für 10 Minuten in der Feuchtkammer bei 37°C, um ein evtl. erfolgte Maskierung der Gewebsantigene durch übermäßige Aldehydvernetzung bei Überfixation des Gewebes mit Formalin rückgängig zu machen.
4. Zweimaliges Spülen in TBS auf dem Schüttler (2x 5 Minuten).
5. Blockieren der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 200ml Methanol und 3ml Wasserstoffperoxid für 20 Minuten unter dem Abzug.
6. Zweimaliges Spülen in TBS auf dem Schüttler (2x 5 Minuten).
7. Das verdünnte Tomato Lektin (1:100 mit TBS und 50µl Triton X-100 [vermindert hydrophobe Interaktionen zwischen Lektin und Gewebe und unspezifische Hintergrundreaktionen] gemischt) auf die Schnitte geben und für 90 Minuten in der Feuchtkammer bei 37°C inkubieren.
8. Abgießen und zweimal 5 Minuten in TBS auf dem Schüttler spülen.
9. Inkubieren mit Avidin-Biotin-Komplex (5ml TBS mit 5µl Avidin und 5µl Biotin) für 45 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur.
10. Abgießen und zweimal 5 Minuten in TBS auf dem Schüttler spülen.
11. Zur Entwicklung eine DAB-Tablette (3,3 Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid) auftauen, unter dem Abzug in 15ml 0,1 molarer Tris-HCL lösen (lichtgeschützt) und 12µl Wasserstoffperoxid hinzufügen. Die Flüssigkeit mit einer 5ml Spritze durch einen Mikrofilter auf die Präparate tropfen und 2 bis 3 Minuten inkubieren, bis die erwünschte Braunfärbung erreicht ist.
12. Das verwendete DAB in dasselbe Gefäß zurückgießen und mit Natriumhypochlorid neutralisieren.
13. Spülen der Schnitte für 15 Minuten in Aqua dest. (Wasser mehrmals wechseln).
14. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für eine Minute.
15. Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten.
16. Dehydrieren der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70-80-96-100-100%).
17. Zweimal fünf Minuten in Xylol schwenken.
18. Eindecken.

### 2.1.5 Das Bildauswertungssystem Quantimet 570 von Leica

Zur quantitativen Auswertung der GFAP- und Tomato Lektin-gefärbten Schnitte wurde das Bildanalyzesystem Quantimet 570 von der Firma Leica verwendet.

#### Das Analysesystem besteht aus folgenden Komponenten:

- ein Lichtmikroskop vom Typ Olympus BH2
- eine Farbvideokamera vom Typ JVC-KY-F-30
- einem zentralen Rechner mit dazugehörigem Softwarepaket (Leica Quantimet), der das analoge Kamerabild in ein Digitalbild umwandelt und analysiert
- ein parallel geschalteter zweiter Rechner mit Monitor, der die Ergebnisse anzeigt und über den der Zentralrechner gesteuert wird
- ein weiterer Monitor, welcher das gerade bearbeitete Kamerabild zeigt
- ein Color-Video-Copy-Processor von Mitsubishi zum Ausdrucken der aufgenommenen Kamerabilder

#### Das Messprinzip:

Ein von der Farbvideokamera aufgenommenes analoges Bild eines Präparates wird von dem Quantimet in ein digitales Bild umgewandelt und gespeichert. Der auszumessende Farbton (Brauntöne des 3,3-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid) wird markiert, von dem Rechner digitalisiert und anschließend vermessen. Die Eichung des Geräts mit einer externen Skalierung ermöglicht die quantitative Messung der markierten Fläche in  $\mu\text{m}^2$ .

#### Bearbeitungsschritte durch das Quantimet:

Der vorher eingestellte Ausschnitt des Präparats wird von der Videokamera aufgenommen und die Wellenlänge und Intensität des einfallenden Lichtes in analoge, elektrische Signale umgewandelt. Dies geschieht, indem die Kamera das Bild in 625 waagrechte Linien einteilt und beim Abtasten die Signale in elektrische Impulse transformiert. Die nach dem RGB (rot-gelb-blau) Schema geordneten Signale werden vom zentralen Rechner mittels einer Kristalluhr in gleichlange Intervalle („Pixels“ = Picture Elements) unterteilt. Die waagrechte Länge jedes Pixels entspricht dabei genau dem vertikalen Abstand der abgetasteten Linien, so dass das ursprüngliche Bild daraufhin in quadratische Pixels eingeteilt ist. Diese Pixel werden anschließend von einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert, wobei das kontinuierliche analoge Signal in 256 Abstufungen unterteilt wird. Der Computer speichert dabei das Farbbild in den Grundfarben Rot, Gelb und Blau jeweils separat.

Nach der digitalen Speicherung wird das Bild in einen binären Modus umgewandelt, was die morphometrische Auswertung ermöglicht. Für die Auswertung wird der zu messende Farbton (in diesem Fall die durch DAB entstandenen Brauntöne) interaktiv mit Hilfe des Mauszeigers auf dem Image Display angeklickt. Der Rechner speichert die digitalen Codes der angeklickten Farbe und markiert alle entsprechenden Pixel mit einer Signalfarbe. Das so entstandene binäre Bild (markierte Pixels gelten als positiv, nicht markierte als negativ) wird gespeichert. Man kann insgesamt 3 verschiedene Stellen im Präparat (oder 3mal dieselbe Stelle) auf diese Weise markieren, dann werden die markierten und gespeicherten Flächen vermessen. Es werden dabei verschiedene Ergebnisse errechnet, wobei das für die statistische Auswertung verwendete Ergebnis das Verhältnis von markierten Pixels zu nicht markierten Pixels angibt (Area fraction), also den Anteil der markierten Fläche an der Gesamtfläche des gemessenen Präparatausschnitts.

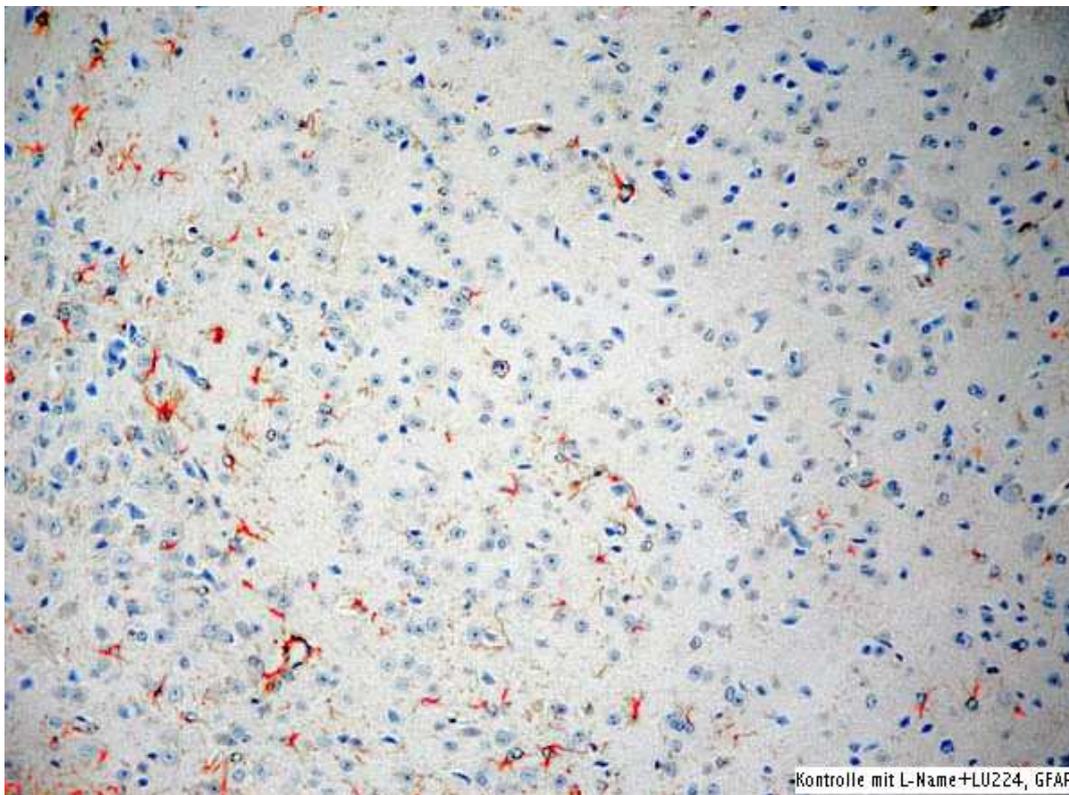
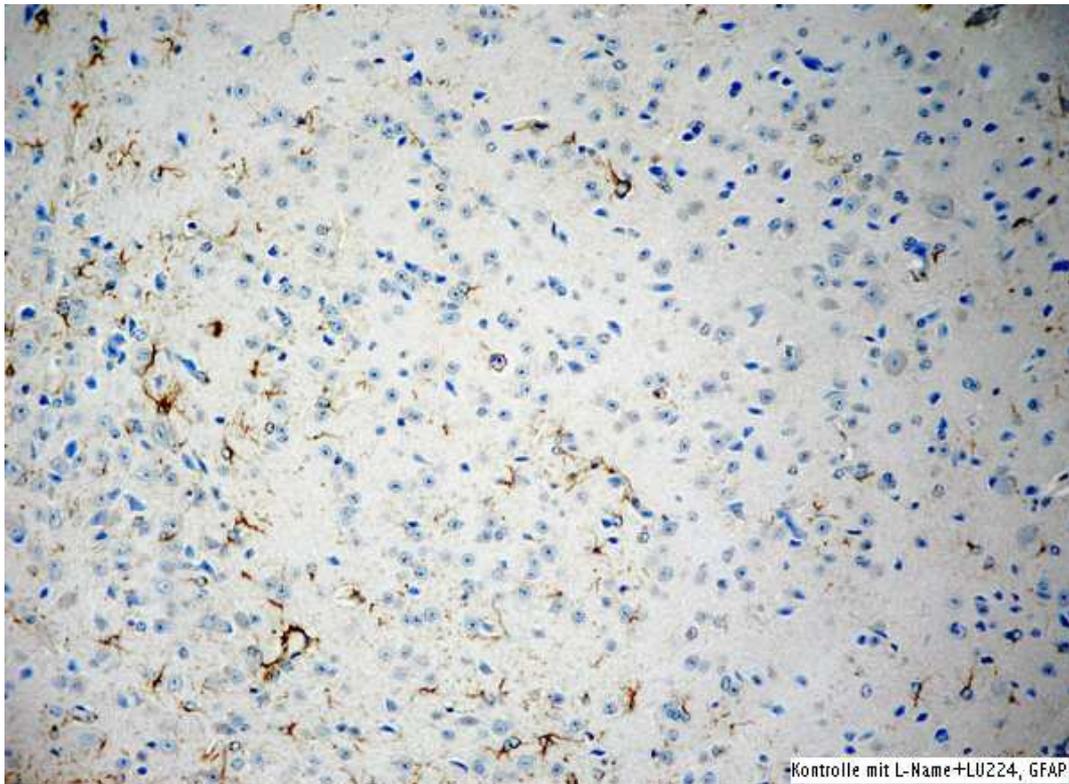


Abb.9 Darstellung eines Ausschnitts aus dem Hypothalamus eines Kontrolltiers, das mit L-Name und LU224 behandelt wurde bei einer Vergrößerung von 1:200. Das erste Bild zeigt das normale Ergebnis der immunhistochemischen GFAP-Markierung, das zweite Bild zeigt denselben Ausschnitt nach der binären Markierung durch das Quantimet.

### Durchführung der Messungen:

Zunächst wurde die Beschriftung der Schnitte abgeklebt und die Präparate zufällig durchnummeriert. Dies geschah um zu verhindern, dass bei der Auswahl der zu markierenden Fläche unbewusst eine Gruppe (z.B. die transgenen Tiere) mehr markiert würde als die anderen, entsprechend des zu erwartenden Ergebnisses.

In der Literatur wird der Hypothalamus als eines der Hirngebiete mit hoher Expression von Endothelin beschreiben (Lee et al. 1990, Kurama et al. 1996). Deshalb, und wegen des Vorhandenseins von LacZ positiven Neuronen in diesem Gebiet, wählten wir den Hypothalamus für die durchzuführenden Messungen als neuronreichen Hirnbereich. Als zweite Messstelle wählten wir das Striatum, da es auf den meisten Präparaten angeschnitten war und ein faserreiches Hirngebiet darstellt, in dem ebenfalls eine Expression von ET nachgewiesen wurde (Lee et al. 1990, Giaid et al. 1991).

Die Messungen erfolgten bei einer Vergrößerung von 1:200, wobei vor jeder Speicherung der Bildeinstellung die Helligkeitseinstellung an der Kamera kontrolliert wurde. Von jedem Tier wurden zunächst die Schnitte mit Tomato-Lektin-Markierung vermessen (erst das Striatum, dann der Hypothalamus), anschließend die mit GFAP-Markierung. Insgesamt wurde also jedes Tier 4mal ausgemessen. Es kam jedoch auch gelegentlich vor, dass einzelne Schnitte wegen einer falschen Schnittebene nicht auszuwerten waren. Diese wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Bei einigen Tieren gab es auch Präparate, bei denen das Striatum oder der Hypothalamus zweimal angeschnitten waren. Diese Präparate wurden beide vermessen und anschließend der Mittelwert aus beiden Messergebnissen berechnet und für die Auswertung verwendet.

Bei den Messungen wurde der zu markierende Farbton für jedes Bild neu eingestellt, so dass eine möglichst genaue Anpassung an die jeweilige Farbtintensität stattfinden konnte. So konnte die Zahl der falsch positiv und falsch negativ markierten Strukturen möglichst gering gehalten werden.

Jede Messung erfolgte nach dem oben beschriebenen Prinzip.

### 2.1.6 Statistische Auswertung

Nach Abschluss der Messungen waren vier Datensätze mit Messwerten vorhanden:

1. Striatum mit GFAP-Färbung
2. Striatum mit Tomato Lektin-Färbung
3. Hypothalamus mit GFAP-Färbung
4. Hypothalamus mit Tomato Lektin-Färbung

In jedem Datensatz wurden die Messwerte anschließend in die 7 Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Messwerte der mit L-Name behandelten, transgenen Tiere

Gruppe 2: Messwerte der mit L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tiere

Gruppe 3: Messwerte der unbehandelten, transgenen Tiere

Gruppe 4: Messwerte der mit L-Name behandelten Kontrolltiere

Gruppe 5: Messwerte der mit L-Name und LU224 behandelten Kontrolltiere

Gruppe 6: Messwerte der unbehandelten Kontrolltiere

Gruppe 7: Messwerte der LacZ-Tiere

Aufgrund der geringen Fallzahl der einzelnen Gruppen entschieden wir uns, den U-Test nach Mann-Whitney zu verwenden, der bei kleinen Gruppen im Vergleich zum t-Test genauere Ergebnisse erzielt.

Als 0-Hypothese wurde angenommen, dass kein Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen besteht. Die Gegenhypothese war dementsprechend ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Als weiteres Ziel wurde der Einfluss der Behandlung mit L-Name und L-Name + LU224 untersucht. Als 0-Hypothese wurde hierbei angenommen, dass die Behandlung keine Auswirkungen hat.

Verglichen wurden dafür in den entsprechenden Schnittebenen (Striatum bzw. Hypothalamus) und bei der jeweiligen Färbung (entweder GFAP oder Tomato Lektin):

- die transgenen, unbehandelten Tiere mit den unbehandelten Kontrolltieren
- die mit L-Name behandelten, transgenen Tiere im Vergleich zu den L-Name behandelten Kontrollen
- die mit L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tiere im Vergleich zu den mit L-Name und LU224 behandelten Kontrolltieren
- die unbehandelten, transgenen Tiere mit den L-Name behandelten, transgenen Tieren
- die L-Name behandelten, transgenen Tiere mit den L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tieren
- die unbehandelten Kontrolltiere mit den L-Name behandelten Kontrolltieren
- die L-Name behandelten Kontrolltiere mit den L-Name und LU224 behandelten Kontrolltieren

Die mit LacZ markierten Tiere wurden genetisch den unbehandelten Kontrollen gleichgestellt, weil bei diesen Tieren Endothelin-1 nicht zusätzlich exprimiert wurde, da das vorgeschaltete LacZ-Gen eine Expression verhinderte (siehe Erläuterungen zur LacZ-Technik).

Diese Tiere wurden allerdings während der Aufzucht etwas anders behandelt als die Kontrolltiere, z.B. wurden nicht so oft Messungen an ihnen durchgeführt, so dass sie weniger Stressfaktoren ausgesetzt waren. Aus diesem Grund wurden sie bei der Auswertung der Ergebnisse nicht mit den unbehandelten Kontrollen zusammen berechnet, sondern als eigenständige Gruppe behandelt. Sie wurden zunächst mit den unbehandelten Kontrolltieren verglichen, um die Auswirkungen der unterschiedlichen Aufzucht beurteilen zu können, anschließend fand der Vergleich mit den unbehandelten, transgenen Tieren statt.

Beim Vergleich der Körper- und Gehirngewichte wurden ebenfalls die oben beschriebenen Gruppen verglichen. Ein Vergleich mit den LacZ-Tieren erfolgte dabei nicht.

Für alle Messungen galt ein Signifikanzniveau von 5%, das heißt ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde die 0-Hypothese verworfen. Da an den Messdaten mehrere unterschiedliche Berechnungen stattfanden, wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Vergleicht man bei einem Datensatz mehrere Untergruppen, führt also mehrere Berechnungen durch, so steigt die Wahrscheinlichkeit einen signifikanten Unterschied bei einem oder mehreren der Vergleiche zu finden mit der Anzahl der Berechnungen. Bei jeder einzelnen Berechnung ist die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Ordnung 5%. Bei mehreren Berechnungen steigt also die Wahrscheinlichkeit, bei wenigstens einer Berechnung einen solchen Fehler gemacht zu haben, also die 0-Hypothese verworfen zu haben, obwohl sie eigentlich zutrifft. Um diese Tatsache zu berücksichtigen, wird bei der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau durch die Anzahl der

durchgeführten Tests geteilt. In unserem Fall heißt das, dass nur noch Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05/7$ , also von  $p < 0,007$ , als signifikant gewertet wurden. Die Gruppe der LacZ-Tiere und der Vergleich mit den unbehandelten, transgenen Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren wurde nicht mit in dieses Korrekturverfahren einbezogen, da diese Berechnungen zusätzlich erfolgten und nicht direkt Teil des Versuchs waren. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS.

## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Körper- und Gehirngewichte

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde vor der Anästhesie ermittelt. Nach der Dekapitation wurden die einzelnen Organe entnommen und gewogen. Verglichen wurden die bereits in dem Abschnitt "statistische Auswertung" beschriebenen Gruppen 3 und 6, 1 und 4, 2 und 5, 1 und 3, 1 und 2, 4 und 6 sowie 4 und 5.

Im Vergleich der Körpergewichte der einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test zeigten sich ein signifikant höheres Körpergewicht der unbehandelten, transgenen Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ( $p=0,029$ ). Die unbehandelten, transgenen Tiere hatten ebenfalls ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zu den L-Name behandelten, transgenen Tiere ( $p=0,002$ ). Die L-Name behandelten, transgenen Tiere hatten wiederum ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den transgenen Tieren, die mit L-Name und LU224 behandelt wurden ( $p=0,004$ ). Auch bei den Kontrolltieren waren die L-Name behandelten Tiere signifikant leichter im Vergleich zu den L-Name und LU224 behandelten Tieren ( $p=0,022$ ). Bei den anderen Vergleichen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Führt man eine Bonferroni-Korrektur durch, so verändert sich das Signifikanzniveau auf  $p<0,007$ . Zwischen den transgenen Tieren und den Kontrolltieren, sowie zwischen den L-Name behandelten und L-Name mit LU224 behandelten Kontrolltieren besteht also kein signifikanter Unterschied, während die unbehandelten, transgenen Tiere und die L-Name mit LU224 behandelten, transgenen Tiere weiterhin signifikant schwerer sind als die nur mit L-Name behandelten, transgenen Tiere.

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	35,6	36,4923	3,3869
Gruppe 2	43,9	42,2000	4,6941
Gruppe 3	41,4	41,7100	2,6388
Gruppe 4	38,9	38,2615	3,3001
Gruppe 5	41,1	40,7769	3,5433
Gruppe 6	38,9	37,7000	4,0775

Tab.1 Ergebnisse der statistischen Berechnung der Körpergewichte

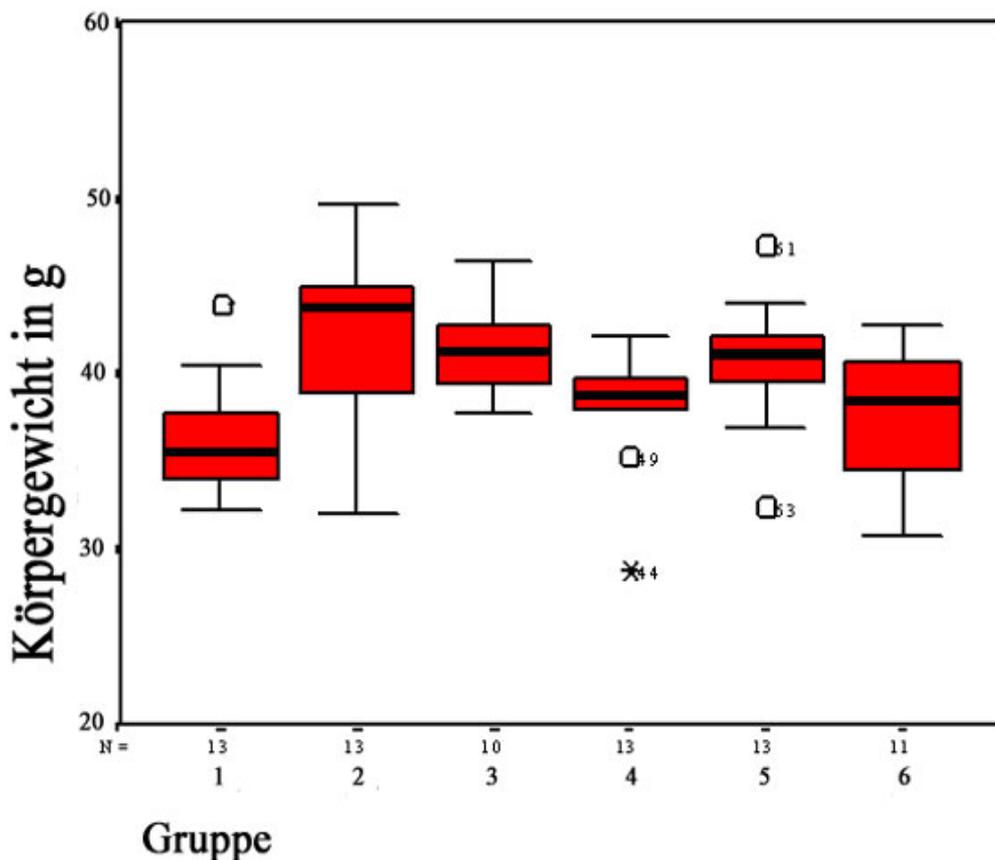


Abb.10 Boxplots zur Darstellung der Verteilung des Körpergewichts in Gramm der Gruppen 1 bis 6. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.

Vergleicht man die Gruppen bezüglich der absoluten Gehirngewichte, zeigt sich vor der Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten, transgenen Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren ( $p=0,02$ ). Die Gehirngewichte der transgenen Tiere sind dabei geringer. Durch das veränderte Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Korrektur ist dieser Unterschied allerdings nicht mehr als signifikant zu werten. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant.

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	0,44	0,4992	0,09853
Gruppe 2	0,48	0,4754	0,04648
Gruppe 3	0,445	0,4480	0,05493
Gruppe 4	0,5	0,4969	0,03924
Gruppe 5	0,53	0,4923	0,1126
Gruppe 6	0,51	0,5073	0,04735

Tab.2 Ergebnisse der statistischen Berechnung der absoluten Gehirngewichte

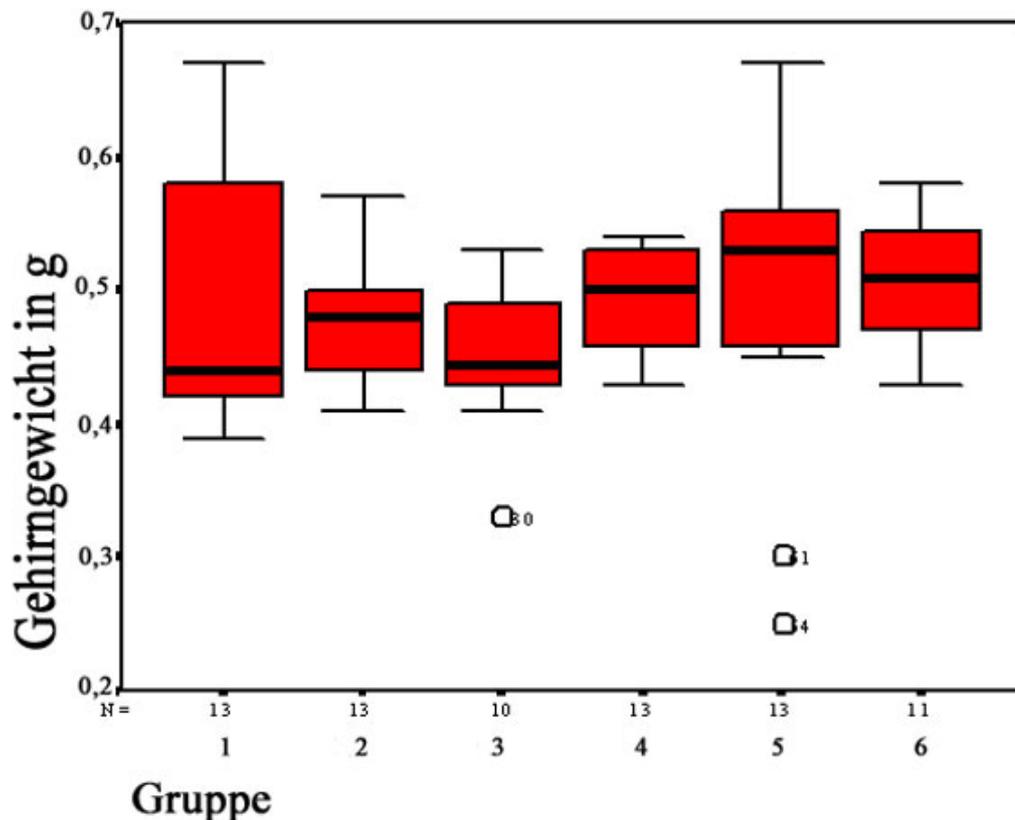


Abb.11 Boxplots zur Darstellung der Verteilung des Gehirngewichts in Gramm der Gruppen 1 bis 6. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.

Verwendet man zur Berechnung das auf das Körpergewicht bezogene relative Gehirngewicht, so zeigt sich im Mann-Whitney U-Test wieder ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten, transgenen Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren, wobei die transgenen Tiere die geringeren relativen Gehirngewichte zeigen ( $p=0,004$ ). Dieser Unterschied ist auch nach der Durchführung einer Bonferroni-Korrektur signifikant. Beim Vergleich der L-Name behandelten, transgenen Tiere mit den unbehandelten, transgenen Tieren zeigt sich ein signifikant niedrigeres relatives Gehirngewicht bei den unbehandelten Tieren ( $p=0,02$ ), was jedoch auch nur vor der Bonferroni-Korrektur als signifikant zu werten ist. Die anderen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	1,24	1,3869	0,3375
Gruppe 2	1,12	1,1400	0,1695
Gruppe 3	1,08	1,0780	0,1458
Gruppe 4	1,26	1,3131	0,1988
Gruppe 5	1,31	1,2177	0,2863
Gruppe 6	1,35	1,3527	0,2078

Tab.3 Ergebnisse der statistischen Berechnung der relativen Gehirngewichte

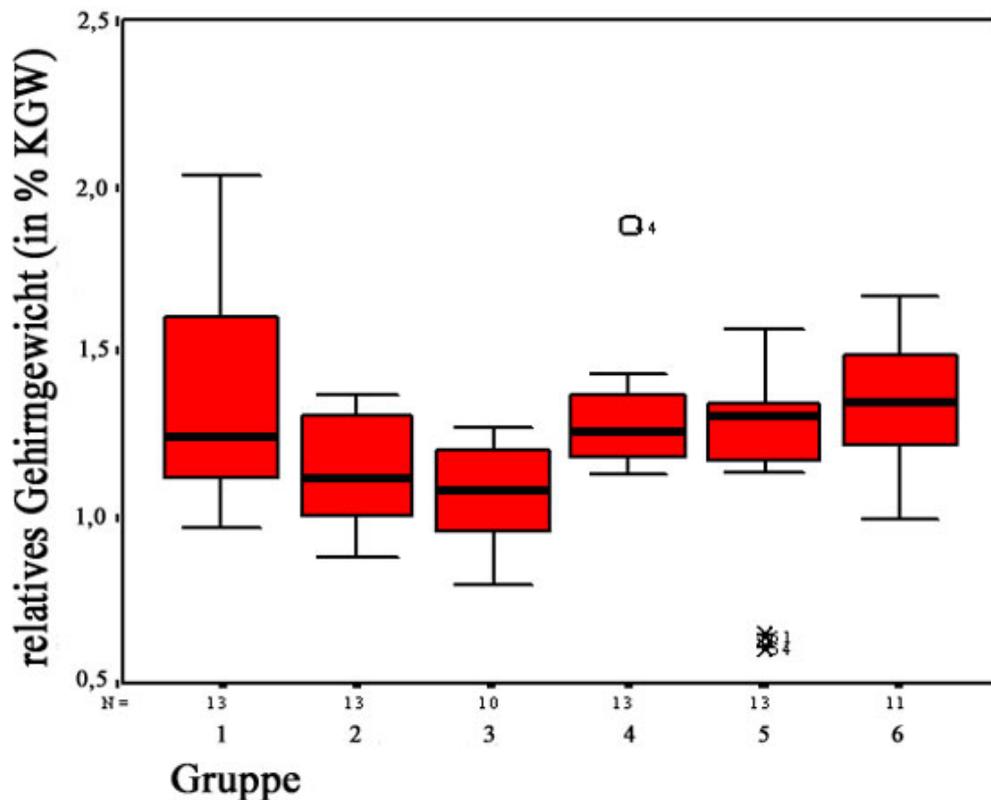


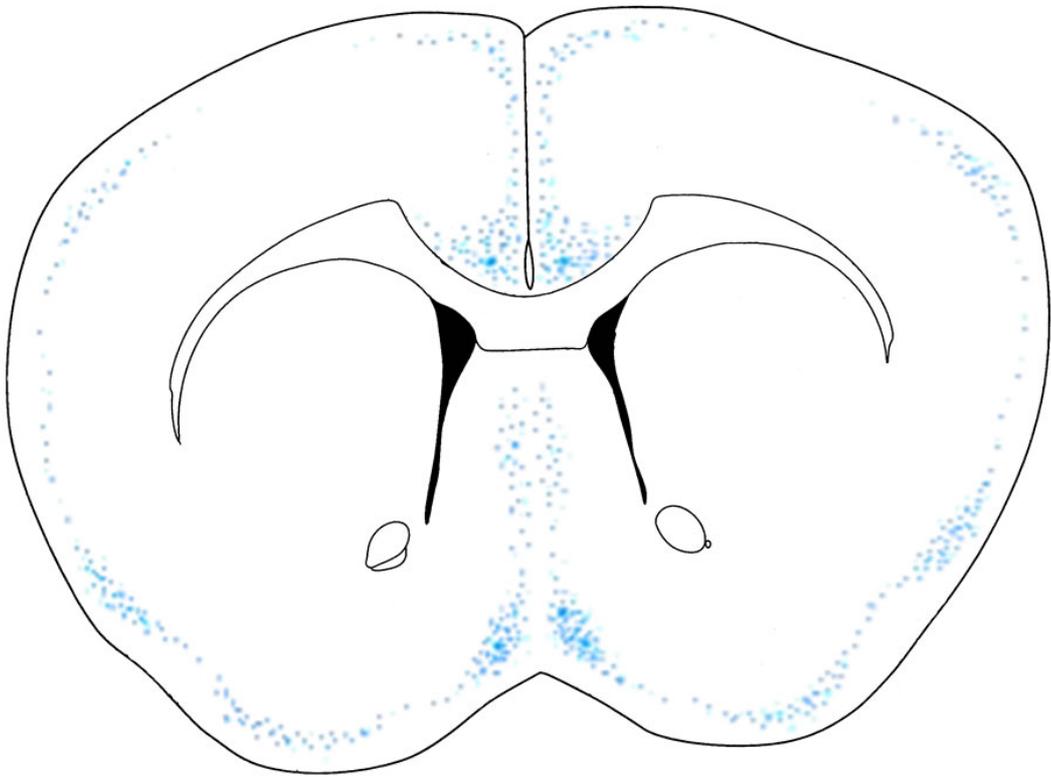
Abb.12 Boxplots zur Darstellung der Verteilung des relativen Gehirngewichts in Prozent des Körpergewichts der Gruppen 1 bis 6. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.

### 2.2.2 Nachweis der Endothelinexpression mit LacZ

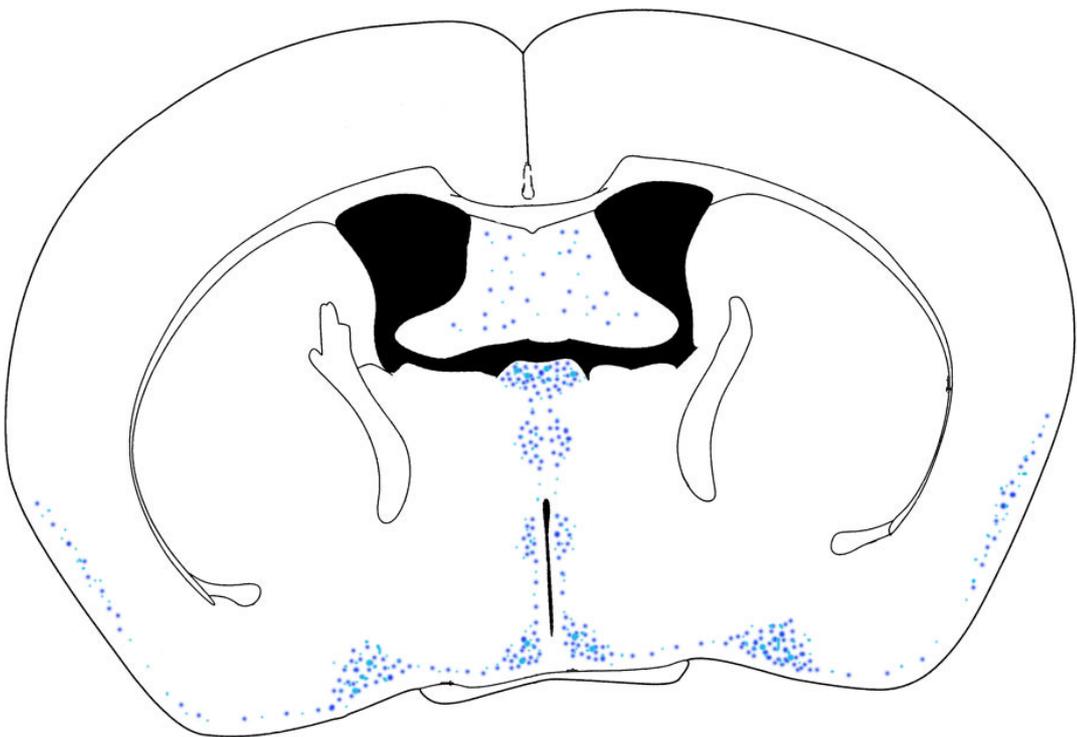
Die charakteristische Blaufärbung der Zellen die das LacZ-/Endotheligen exprimieren, konnte besonders häufig im Bereich des peripheren Hirnstamms, des piriformen Kortex und der Kerngebiete des Hypothalamus nachgewiesen werden. Aber auch in den Kerngebieten des Cerebellums, im Thalamus und in Rindenschichten des frontalen Kortex war eine Blaufärbung zu finden. In seltenen Fällen waren auch der parietale Kortex, Teile der Basalganglien, der Bereich der Commissura anterior und ein Kerngebiet im Hippocampusbereich, welches dem Corpus amygdaloideum entsprechen könnte, markiert.

Nicht alle Tiere zeigten eine gleichverteilte oder gleich ausgeprägte Markierung. Bei einigen konnte fast keine Blaufärbung nachgewiesen werden. Auffällig war, dass sich in weiter Innen gelegenen Gehirnregionen, wie z.B. dem Striatum oder zentralen Hirnstammgebieten, keine Markierung fand.

a)



b)



c)

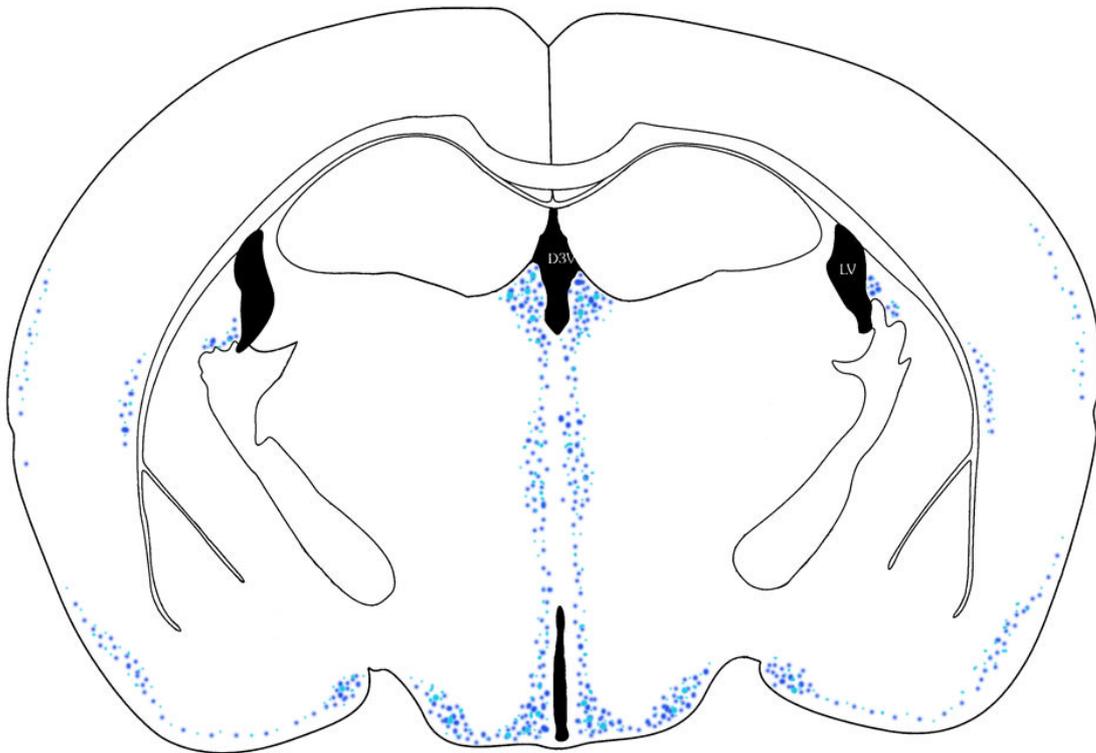
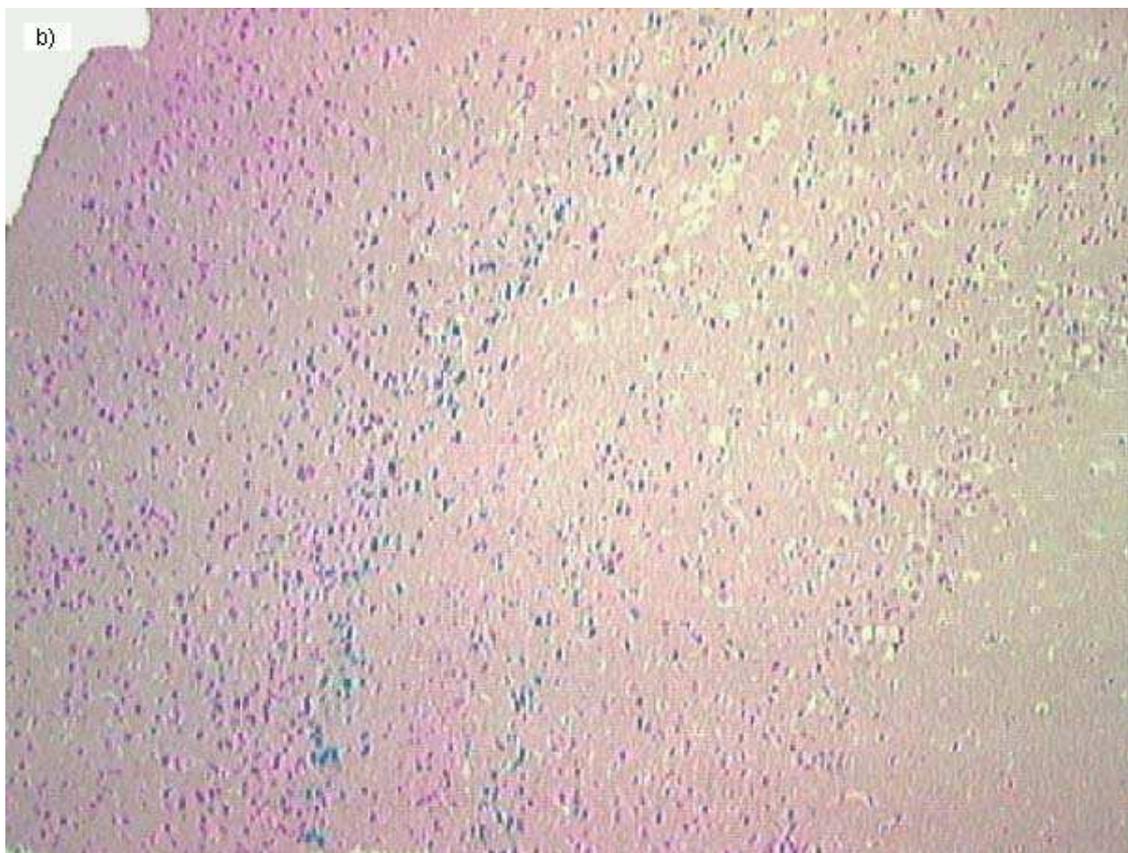
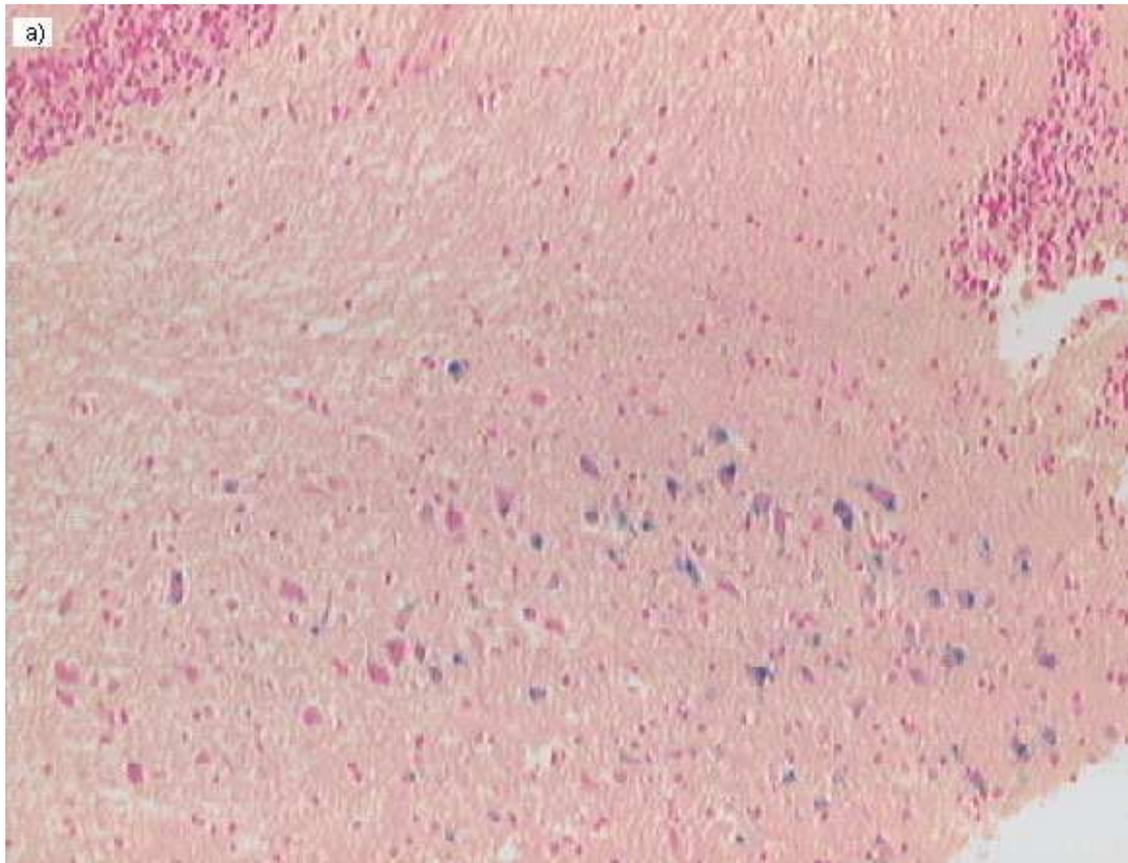


Abb.13 Schematische Darstellung der Verteilung der LacZ-Markierung. Zur besseren Anschauung werden beide Hemisphären dargestellt, obwohl wir aufgrund einer bei Organentnahme erfolgten Teilung entlang des Hemisphärenspalts nur eine Hemisphäre in Frontalschnitten untersucht haben und von der anderen Hälfte Sagittalschnitte untersucht wurden.

- a) Die Schnittebene entspricht Figur 15 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).
- b) Die Schnittebene entspricht Figur 22 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).
- c) Die Schnittebene entspricht Figur 31 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).



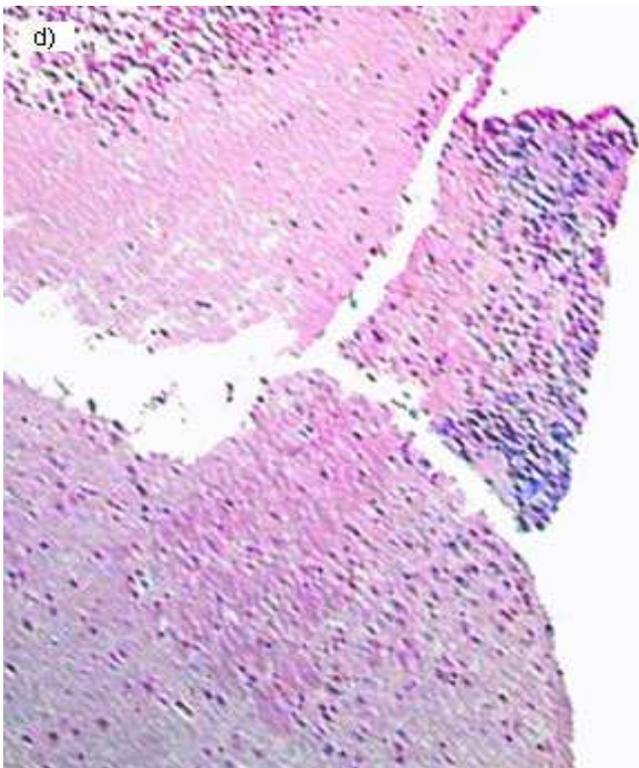
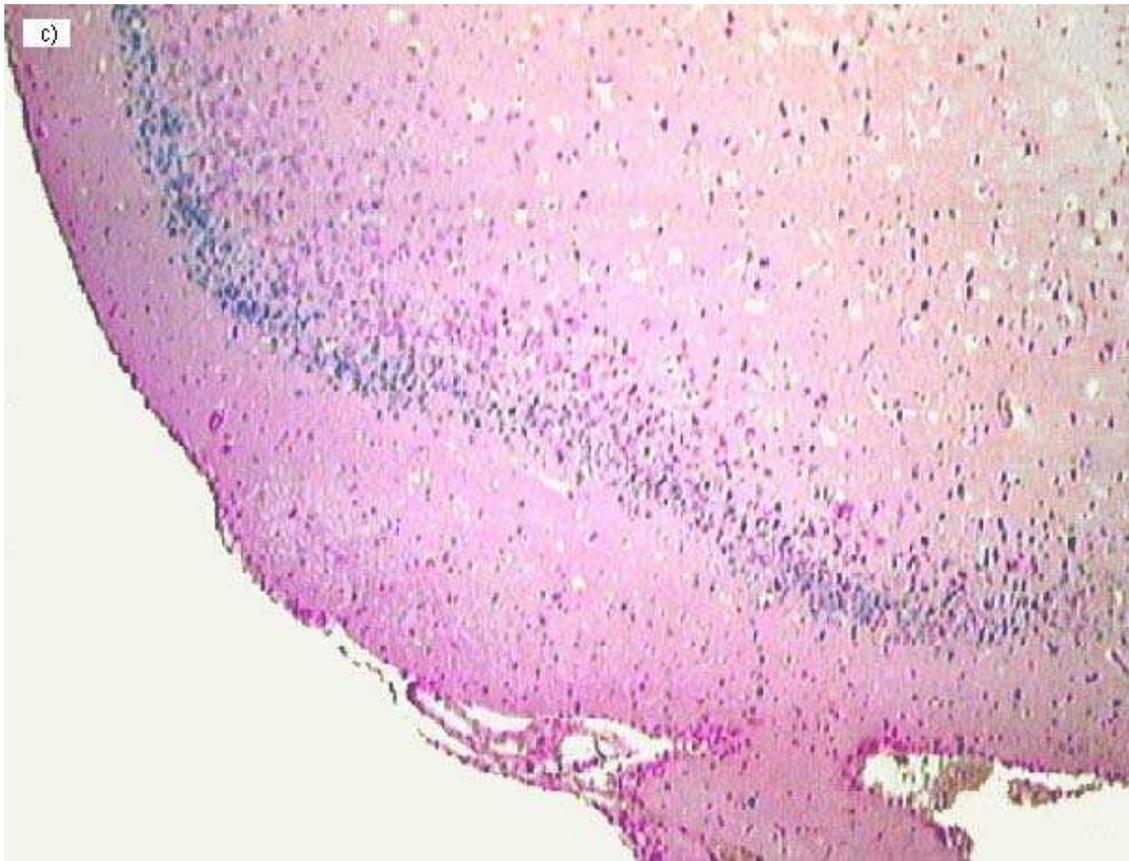


Abb.14 Bluo-Gal mit Kernechtrot

- a) Markierung eines Kerngebiets im Cerebellum
- b) Markierung im Bereich des frontalen Kortex
- c) Markierung im Bereich des piriformen Kortex
- d) Markierung der Habenula Kerne neben dem 3. Ventrikel unterhalb des Hippocampus

Etwa die Hälfte der LacZ-Tiere (12/22) wurde mit über einen Zeitraum von 6 Wochen mit L-Name behandelt. Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollen bezüglich der markierten Regionen und der Ausprägung der Markierung festgestellt werden.

Bei Doppelfärbung mit GFAP oder Tomato Lektin fiel auf, dass ausschließlich neuronale Zellen mit Bluo-Gal markiert wurden. Astrozyten oder Mikrogliazellen zeigten keine Blaufärbung. Interessanterweise ließ sich keine Markierung von Endothelzellen feststellen.

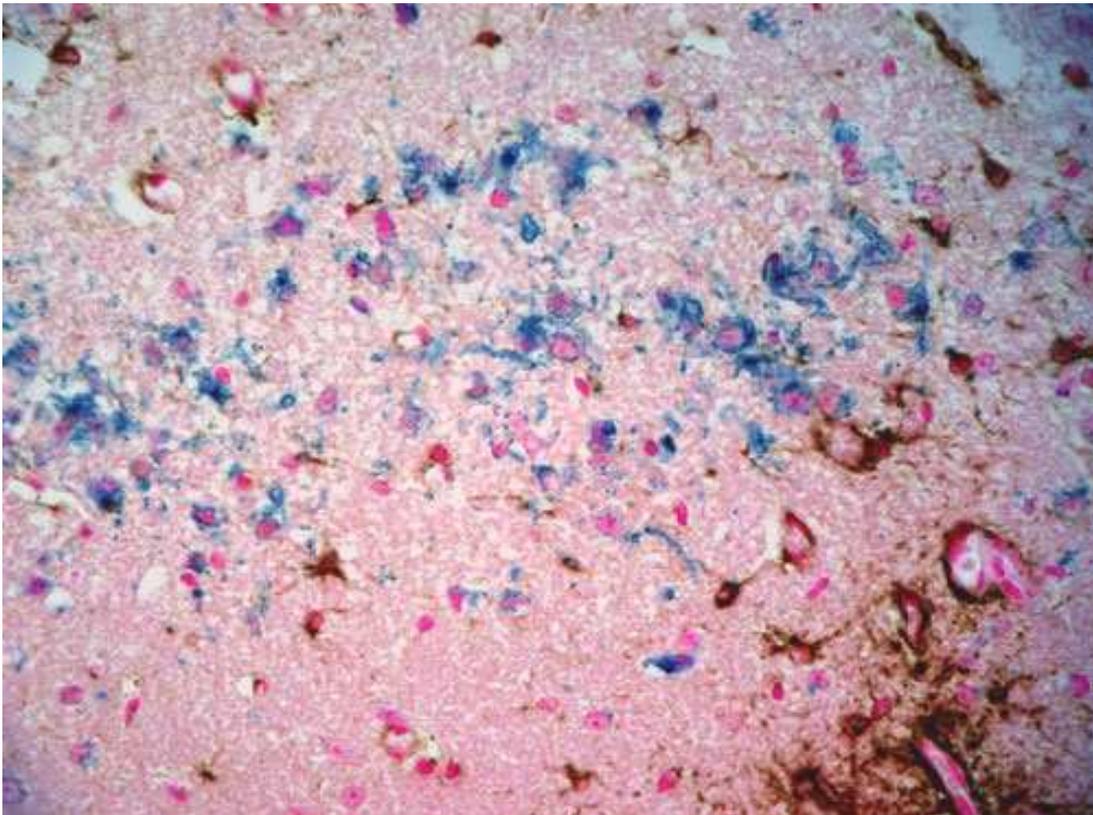


Abb.15 GFAP-Immunhistochemie der LacZ-Tiere mit Kernechtrot-Gegenfärbung. Das Bild zeigt einen Ausschnitt aus dem Bereich der pontinen Nuclei bei einer Vergrößerung von 40x10x1.

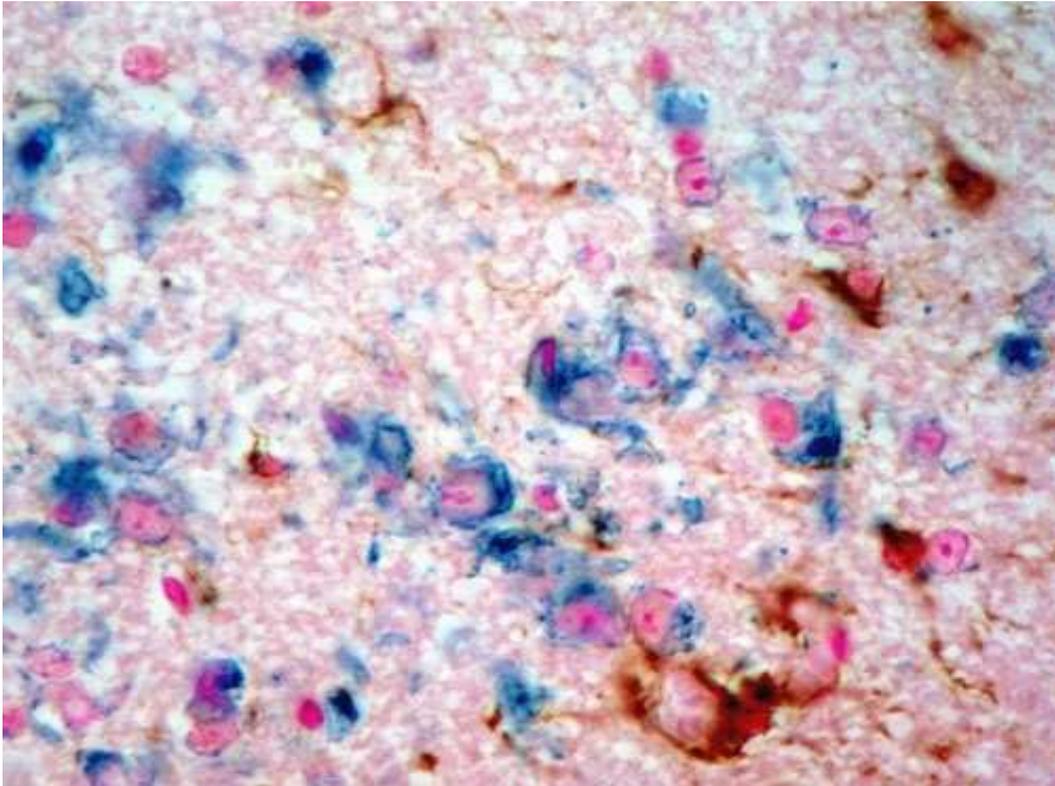
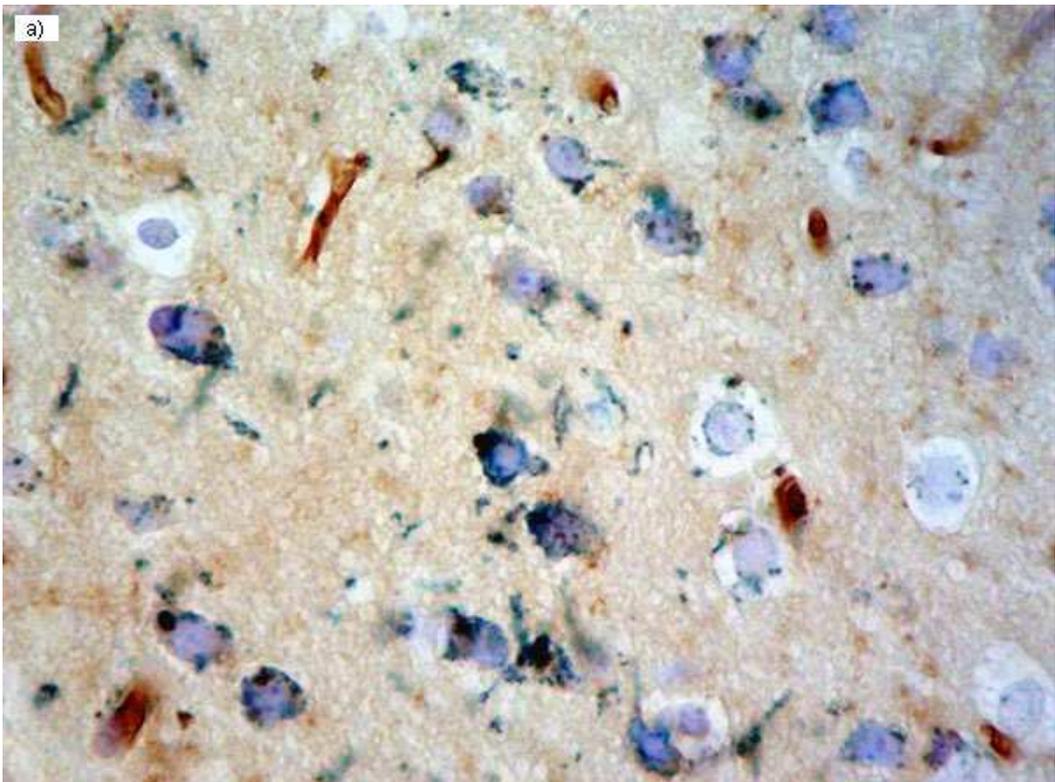


Abb.16 GFAP-Immunhistochemie der LacZ-Tiere mit Kernechtrot-Gegenfärbung. Derselbe Ausschnitt wie in Abb.15 bei einer Vergrößerung von 40x10x2. Es fällt auf, dass die GFAP-markierten Astrozyten, ebenso wie die angeschnittenen Gefäße, in beiden Bildern keine Blaufärbung zeigen.



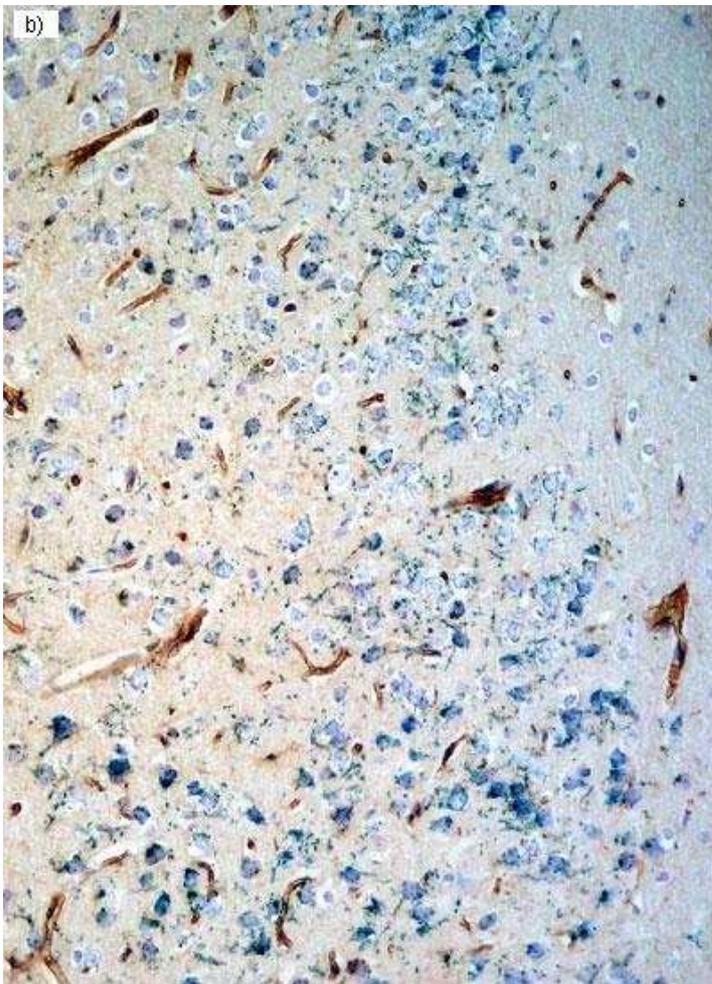


Abb.17 Mikroglia-Lektin histochemie mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. Die Bilder zeigen einen Bereich des piriformen Kortex im Sagittalschnitt.

a) Vergrößerung 40x10x2

b) Vergrößerung 20x10x1

Auch hierbei sind die blau markierten Zellen nicht gleichzeitig braun markiert, also keine Mikroglia oder Gefäße.

### 2.2.3 Auswertung der GFAP-Immunhistochemie mit dem Quantimet

Die GFAP-markierten Präparate wurden zur Auswertung mit Hilfe des Quantimet vermessen. Die gewonnenen Daten wurden dann bezüglich der Area fraction (das Verhältnis der markierten Pixel zur Gesamtzahl der Pixel des zum messenden Präparatausschnitts) verglichen.

Im Gebiet des Hypothalamus zeigten sich beim U-Test nach Mann-Whitney bei keiner der untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede. Verglichen wurden wieder die Gruppen 3 und 6, 1 und 4, 2 und 5, 1 und 3, 1 und 2, 4 und 6 sowie 4 und 5.

Vergleicht man jedoch die Gruppe 3 mit der Gruppe 7 (LacZ-Tiere) so findet man im einen signifikant-niedrigeren GFAP-Gehalt bei den LacZ-Tieren ( $p=0,015$ ). Vergleicht man die Kontrolltiere (Gruppe 6) mit Gruppe 7, so lässt sich kein signifikanter Unterschied ermitteln, obwohl auch hier eine Tendenz zu einem niedrigerem GFAP-Gehalt bei den LacZ-Tieren zu sehen ist ( $p=0,154$ ). Eine Bonferroni-Korrektur wurde für den Vergleich mit Gruppe 7 nicht durchgeführt, da die LacZ-Tiere während der Aufzucht anders behandelt wurden, ein anderes Alter hatten und nicht direkt mit dem eigentlichen Versuch zusammenhängen. Der Vergleich erfolgte nur zur Gewinnung zusätzlicher Informationen.

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	1,00E-03	1,46E-03	2,49E-04
Gruppe 2	2,00E-03	2,16E-03	5,03E-04
Gruppe 3	1,00E-03	1,72E-03	6,86E-04
Gruppe 4	9,61E-04	1,27E-03	1,93E-04
Gruppe 5	2,00E-03	2,20E-03	5,59E-04
Gruppe 6	1,00E-03	1,60E-03	5,33E-04
Gruppe 7	4,14E-04	6,02E-04	1,22E-04

Tab.4 Ergebnisse der statistischen Berechnung der Area fraction im Bereich des Hypothalamus bei GFAP-Markierung

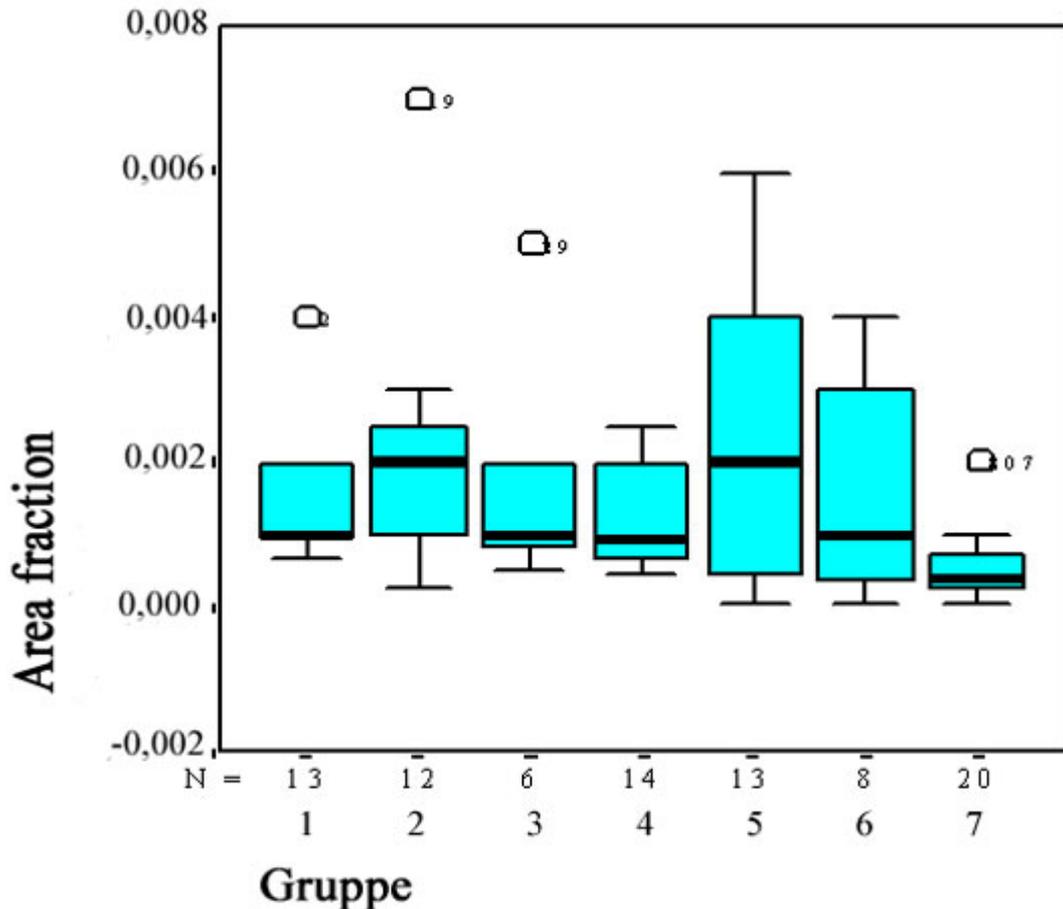
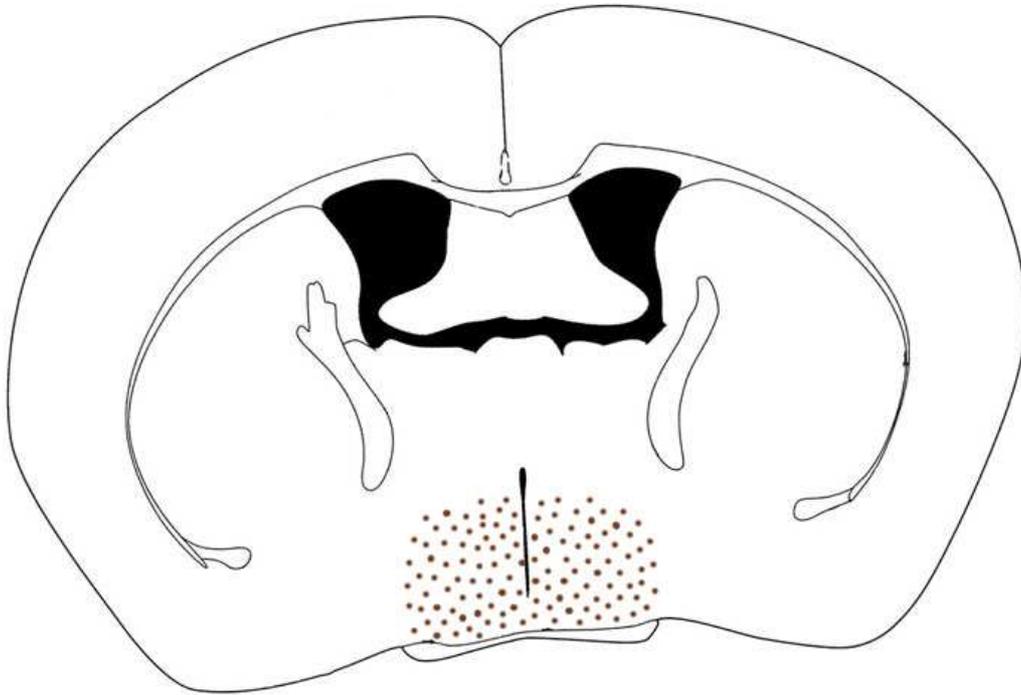


Abb.18 Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Area fraction im Bereich des Hypothalamus der Gruppen 1 bis 7 bei GFAP-Markierung. Die Area fraction gibt den Anteil positiv markierter Pixel an der Gesamtzahl der Pixel des ausgemessenen Präparatausschnitts an. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.

a)



b)

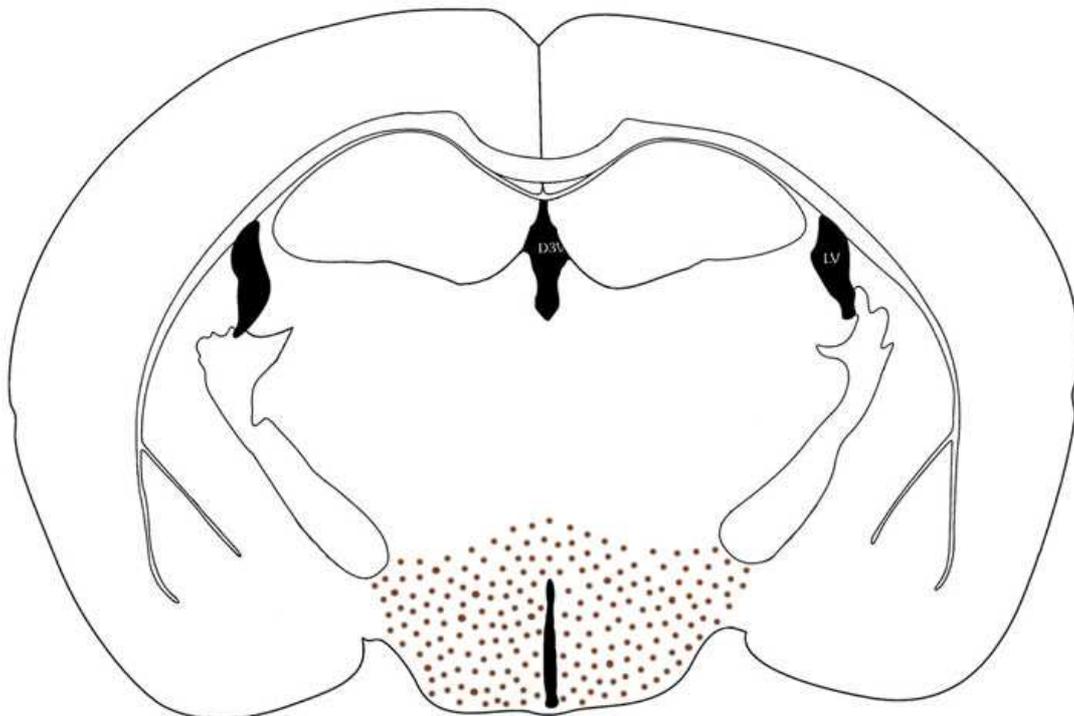
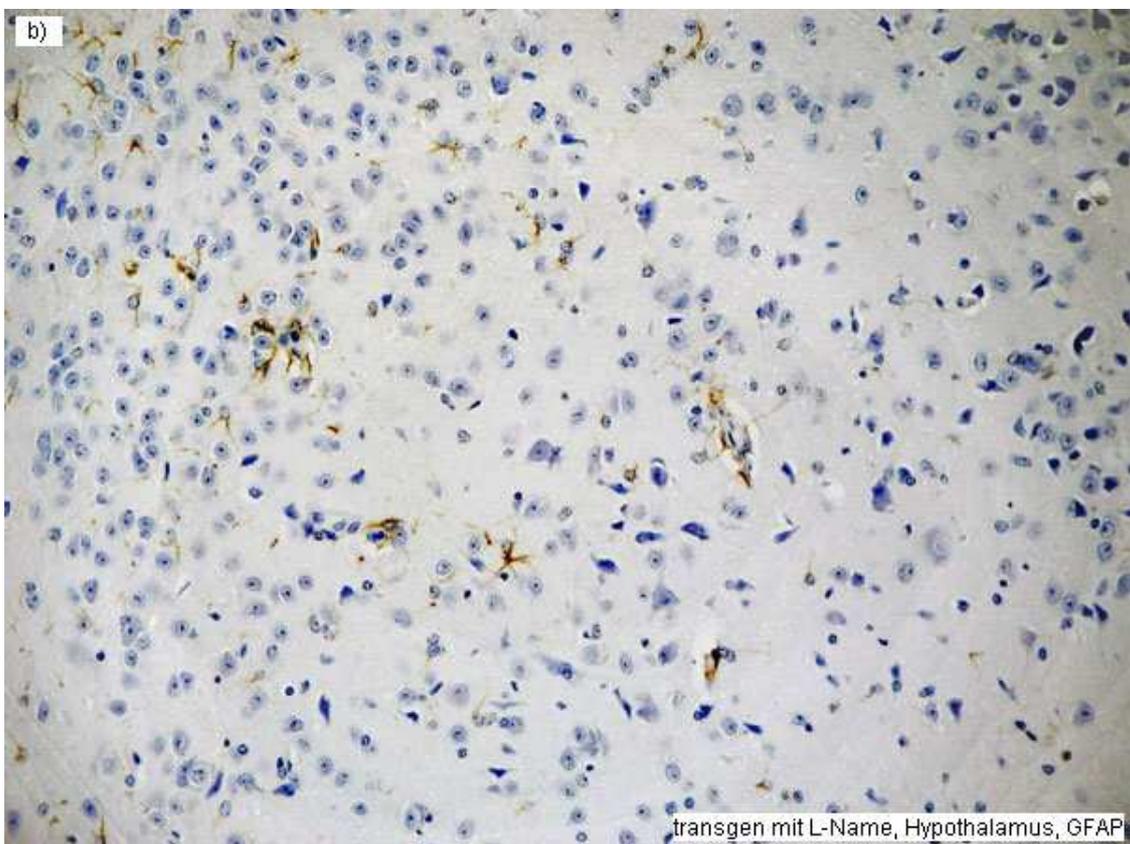
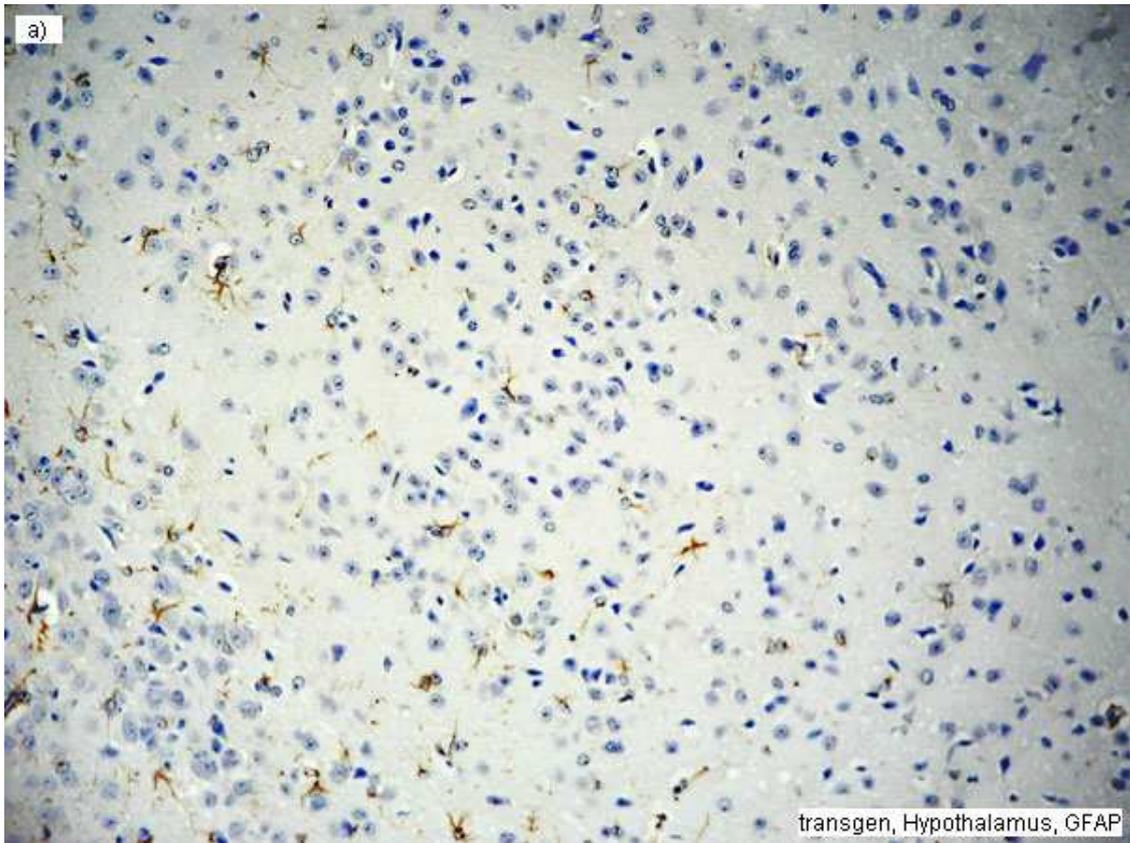
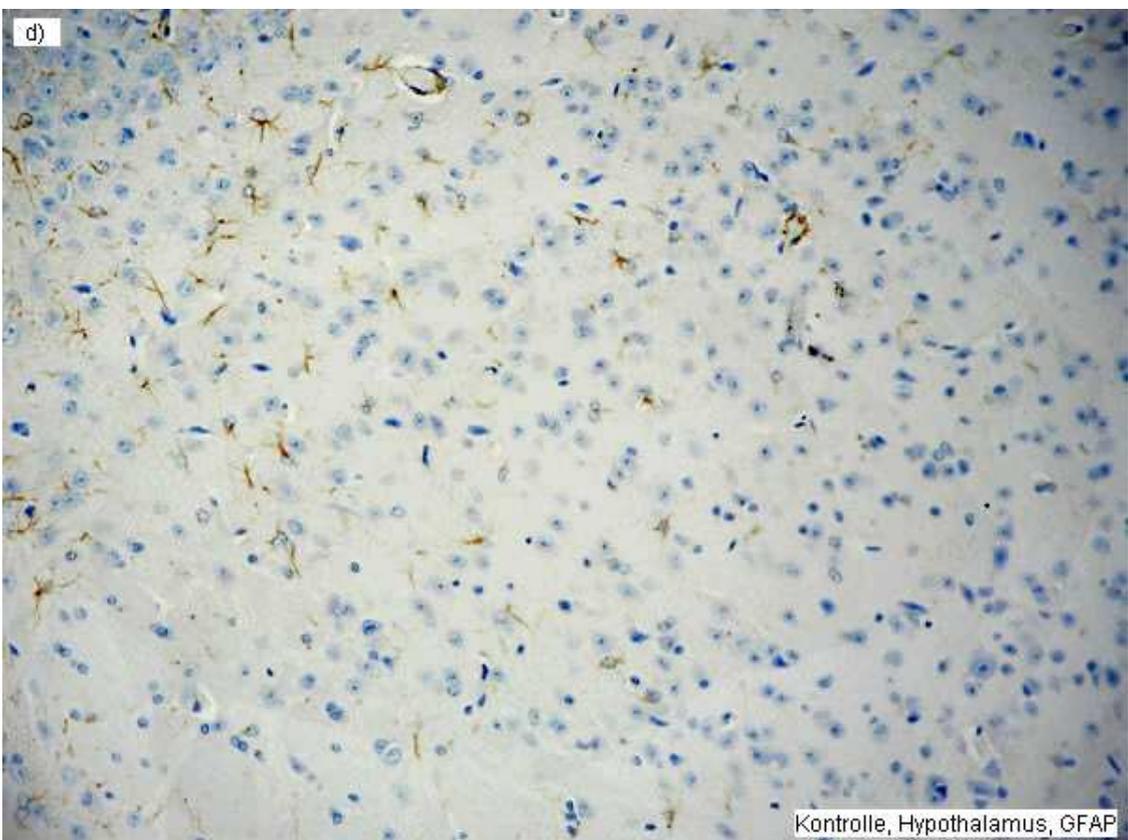
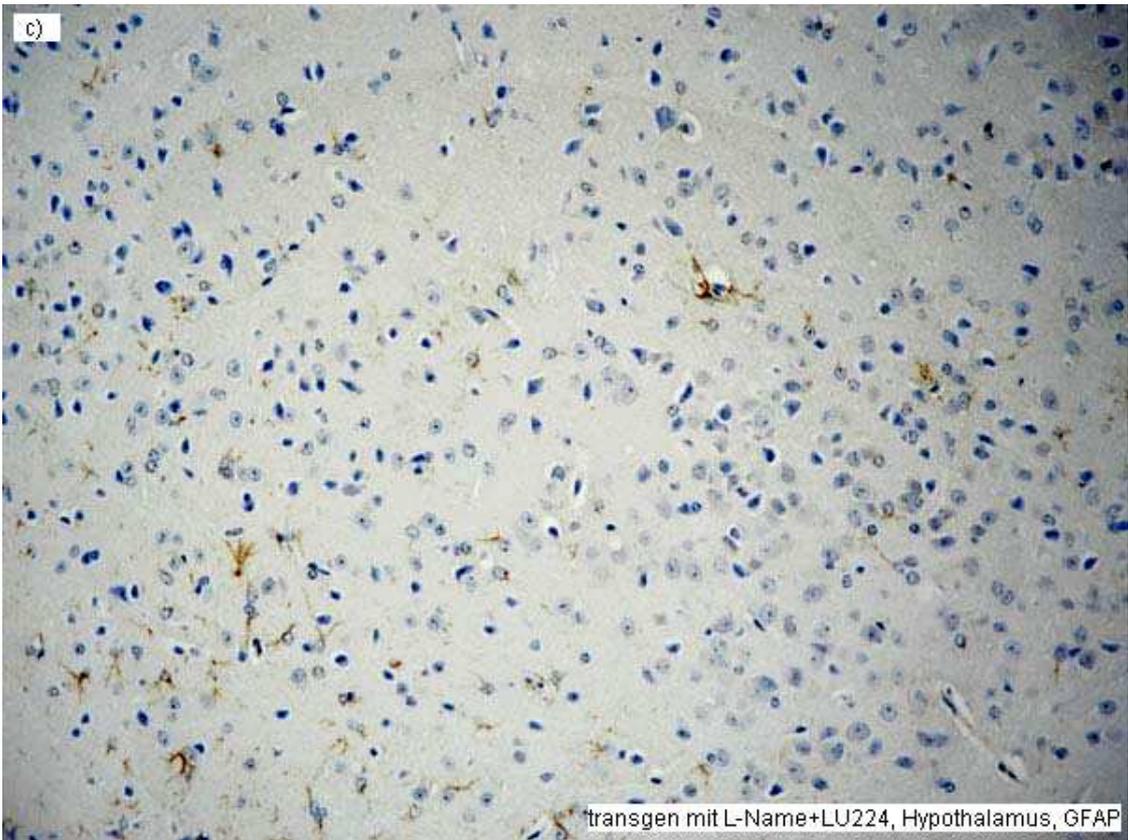
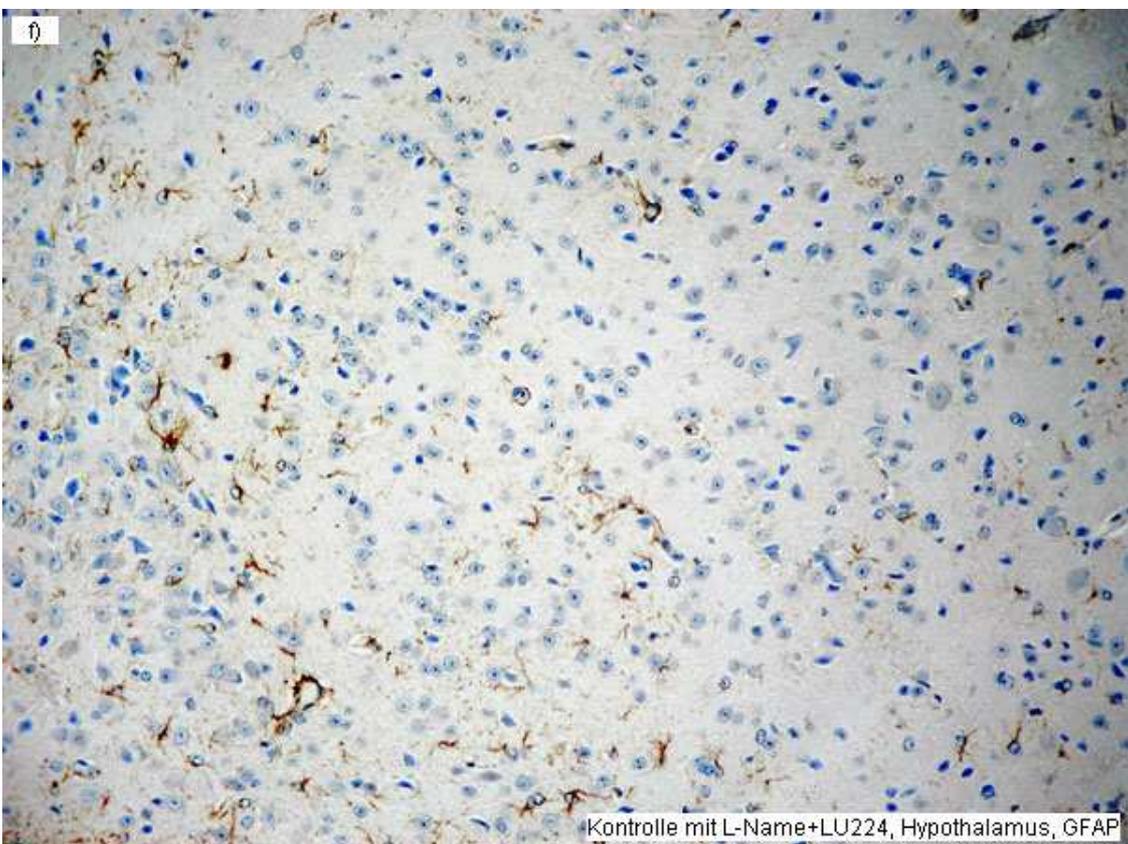
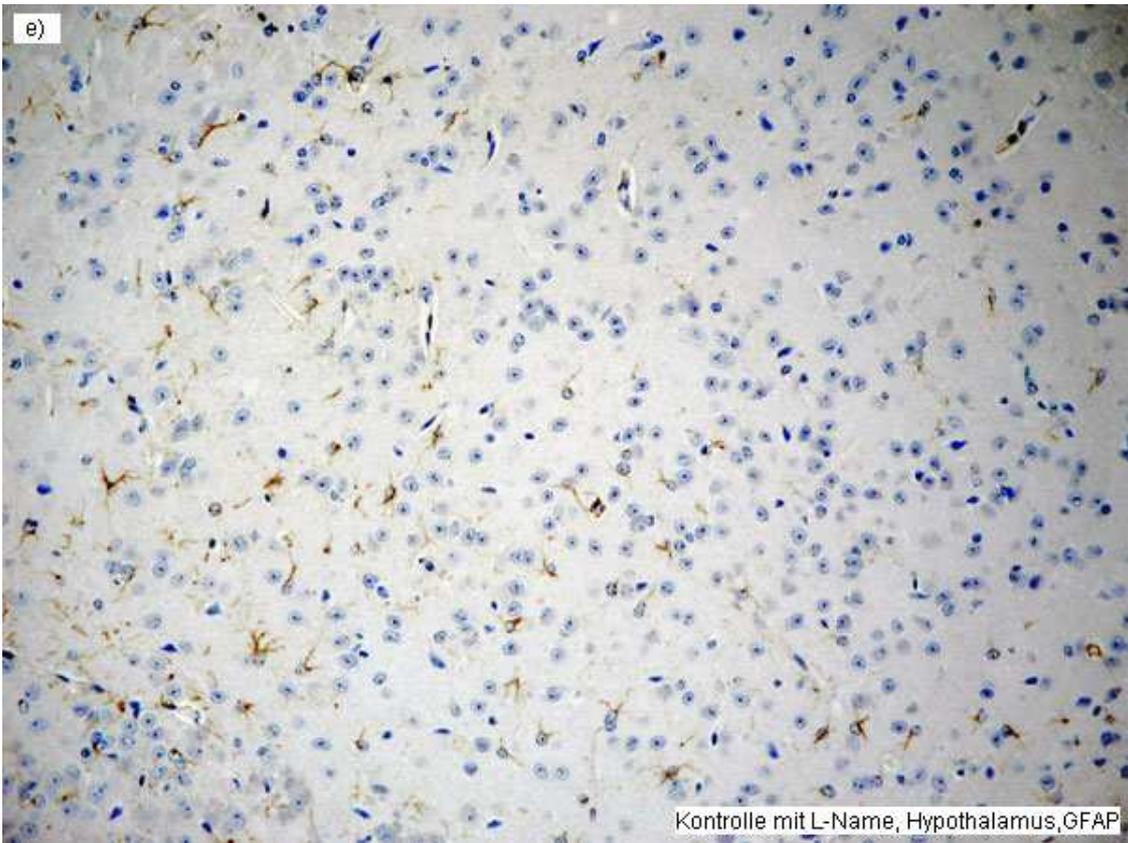


Abb.19 Schematische Darstellung des ausgemessenen Bereichs im Hypothalamus.

- a) Die Schnittebene entspricht Figur 22 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).
- b) Die Schnittebene entspricht Figur 31 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).







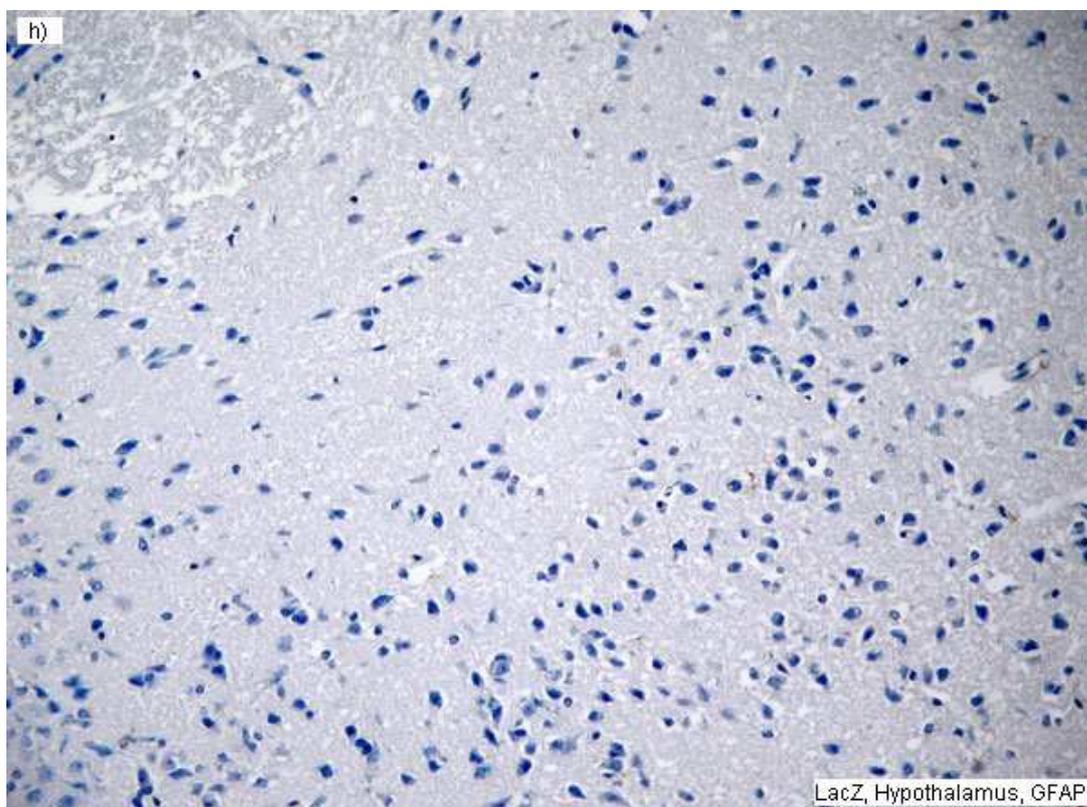
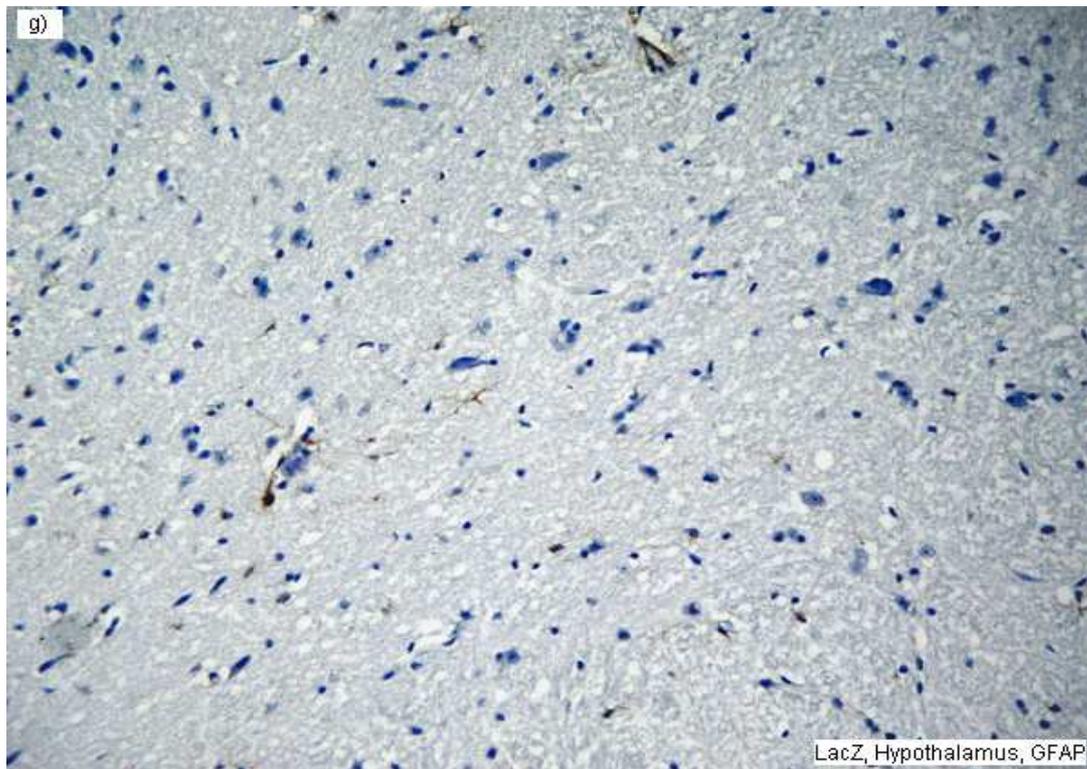


Abb.20 Die Bilder a) - h) zeigen Ausschnitte aus dem Hypothalamus der einzelnen Gruppen mit GFAP-Markierung bei der im Quantimet vermessenen Vergrößerung von 20x10. Bei den LacZ-Tieren (g+h) fällt die deutlich geringere Anzahl positiver Astrozyten im Vergleich zu allen anderen Gruppen (a-f) auf.

Bei der Auswertung der GFAP-Färbung im Bereich des Striatums wurden ebenfalls die oben beschriebenen Gruppen miteinander verglichen. Im Mann-Whitney U-Test zeigte sich ein signifikant geringerer GFAP-Gehalt bei Gruppe 3 im Vergleich zu Gruppe 1 ( $p=0,012$ ). Dieser Unterschied ist jedoch nur vor der Bonferroni-Korrektur signifikant.

Beim Vergleich der Gruppen 3 und 7 sowie 6 und 7 konnte im Mann-Whitney U-Test ein signifikant geringerer GFAP-Gehalt bei der LacZ-Gruppe (7) ermittelt werden (3 und 7:  $p=0,010$ ; 6 und 7:  $p=0,009$ ).

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	9,30E-04	1,01E-03	1,30E-04
Gruppe 2	1,00E-03	1,47E-03	4,35E-04
Gruppe 3	5,28E-04	6,61E-04	1,84E-04
Gruppe 4	8,12E-04	1,57E-03	5,22E-04
Gruppe 5	8,62E-04	1,03E-03	2,40E-04
Gruppe 6	6,35E-04	7,86E-04	2,02E-04
Gruppe 7	1,34E-04	4,94E-04	2,88E-04

Tab.5 Ergebnisse der statistischen Berechnung der Area fraction im Bereich des Striatums bei GFAP-Markierung

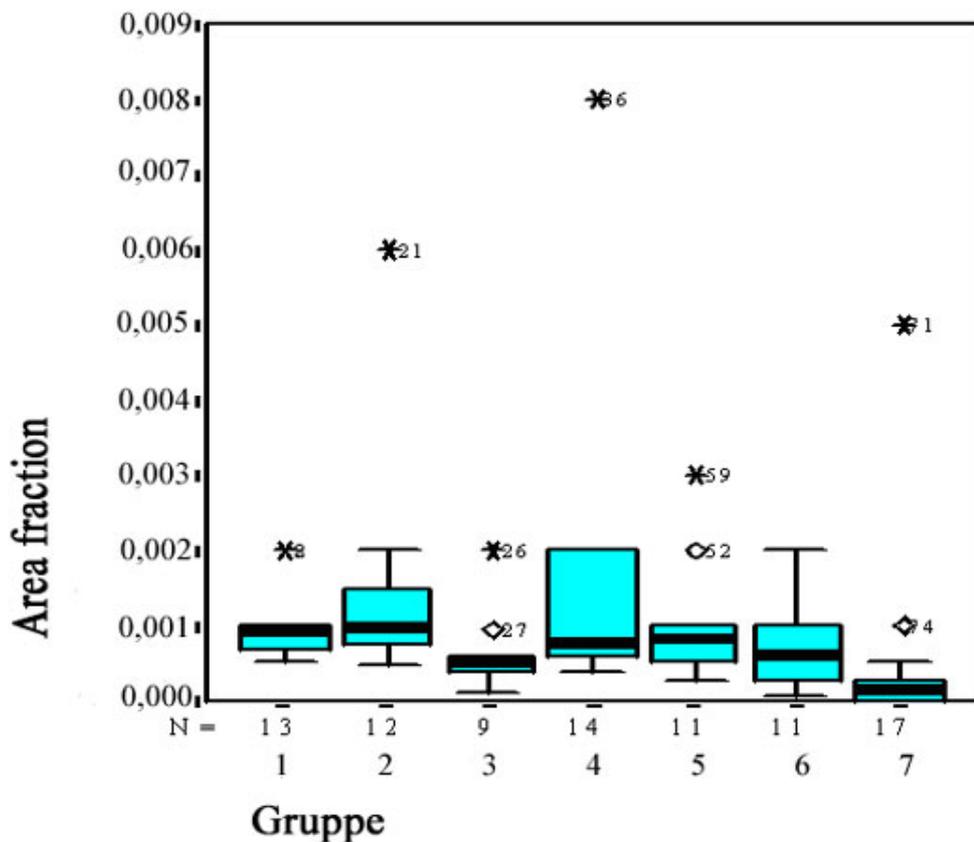
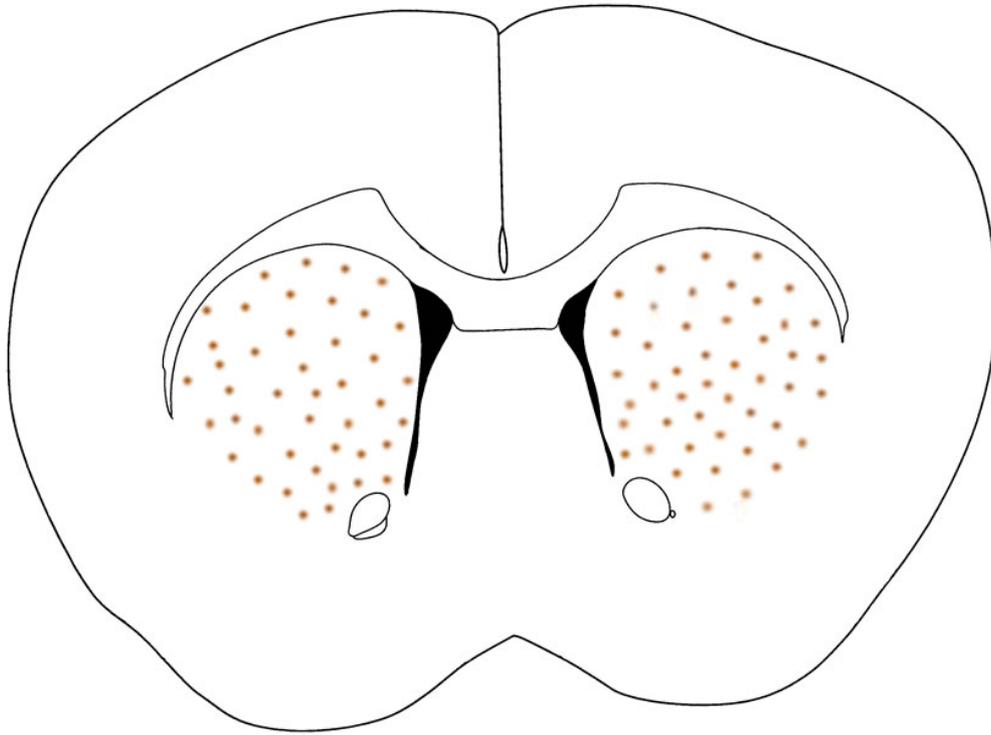
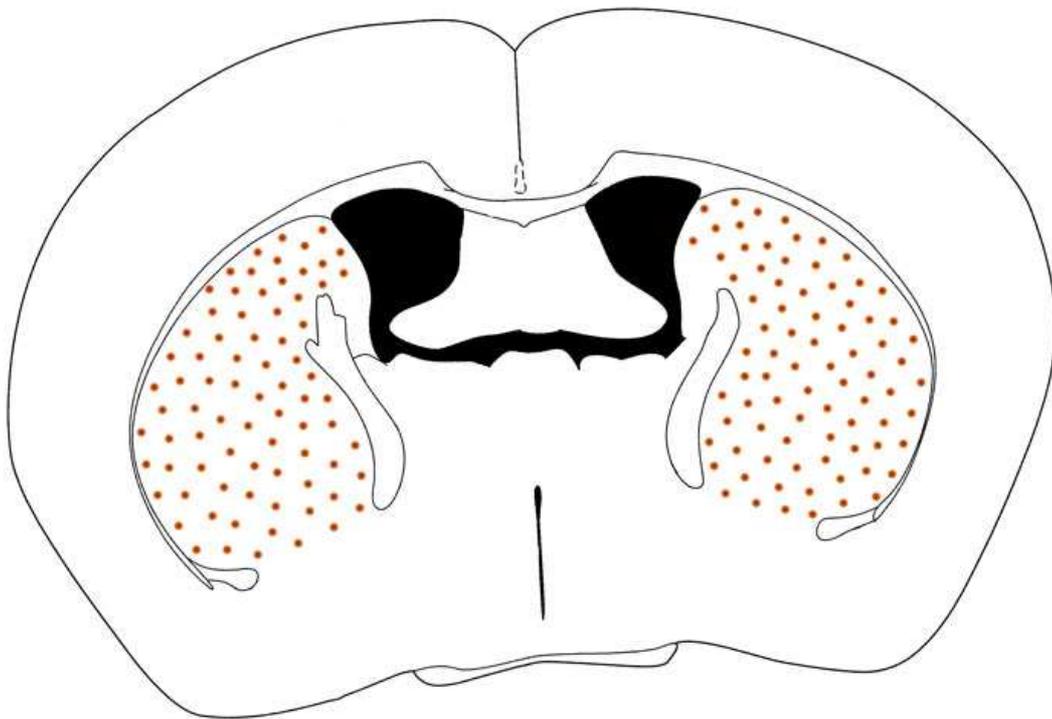


Abb.21 Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Area fraction im Bereich des Striatums der Gruppen 1 bis 7 bei GFAP-Markierung. Die Area fraction gibt den Anteil positiv markierter Pixel an der Gesamtzahl der Pixel des ausgemessenen Präparatausschnitts an. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.

a)



b)



c)

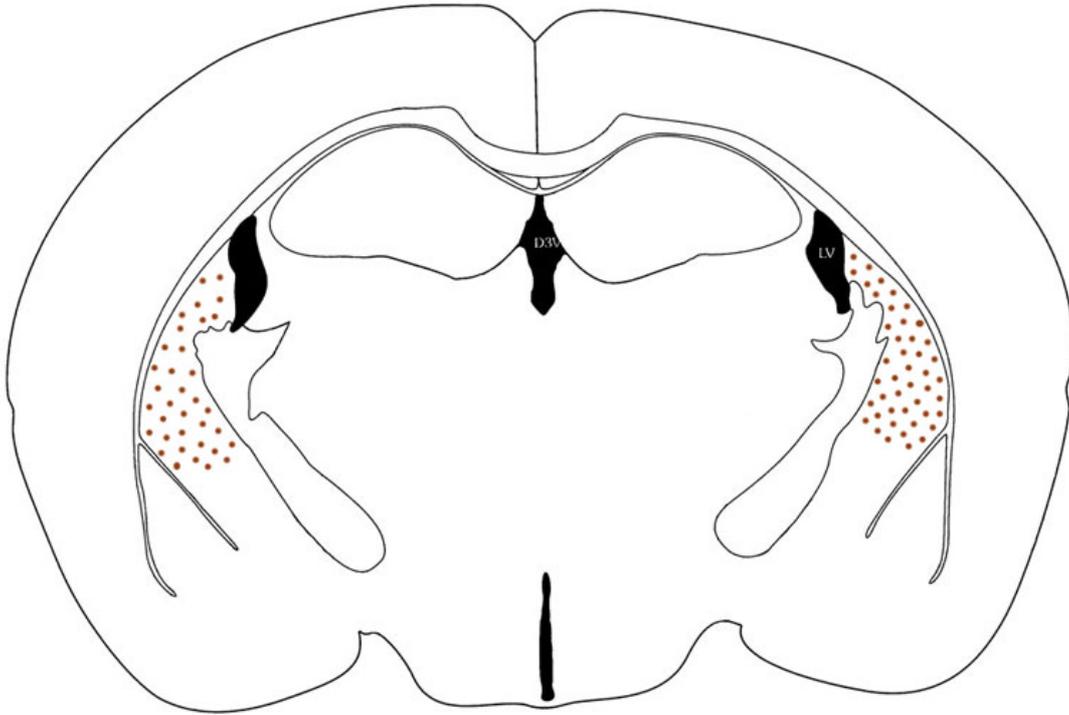
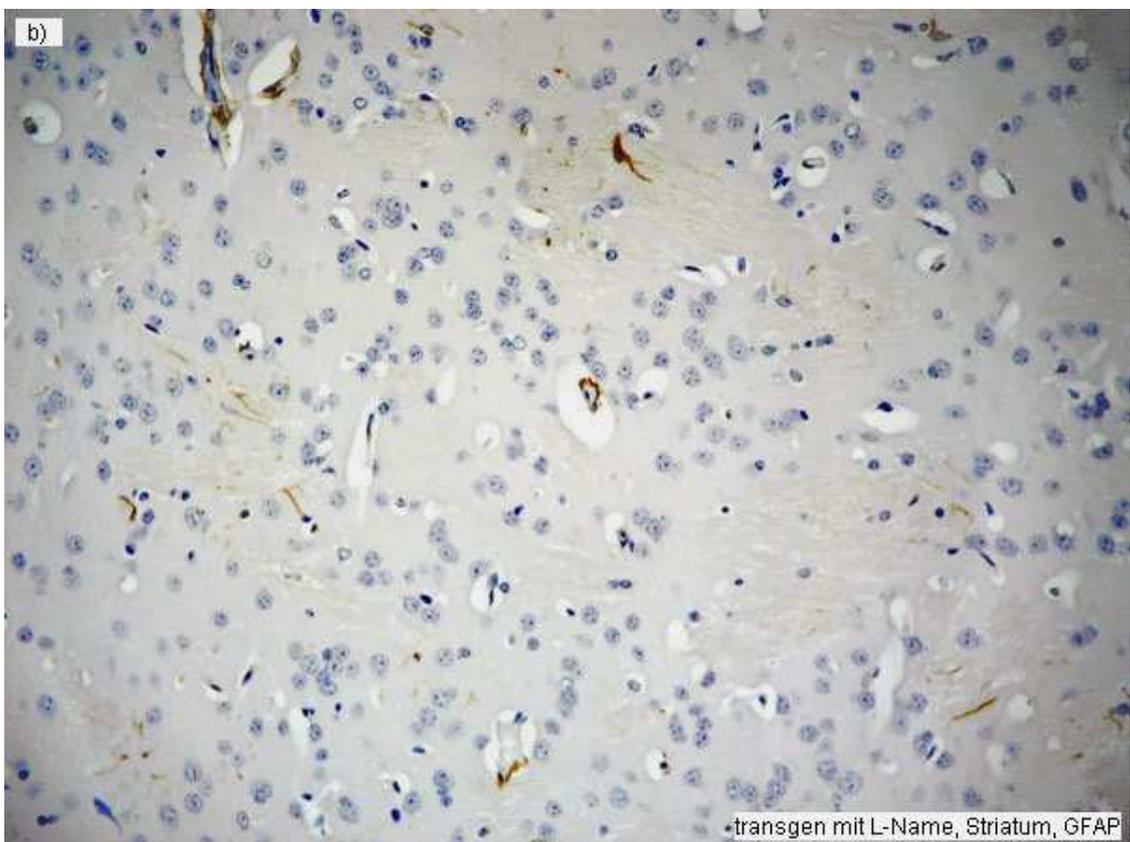
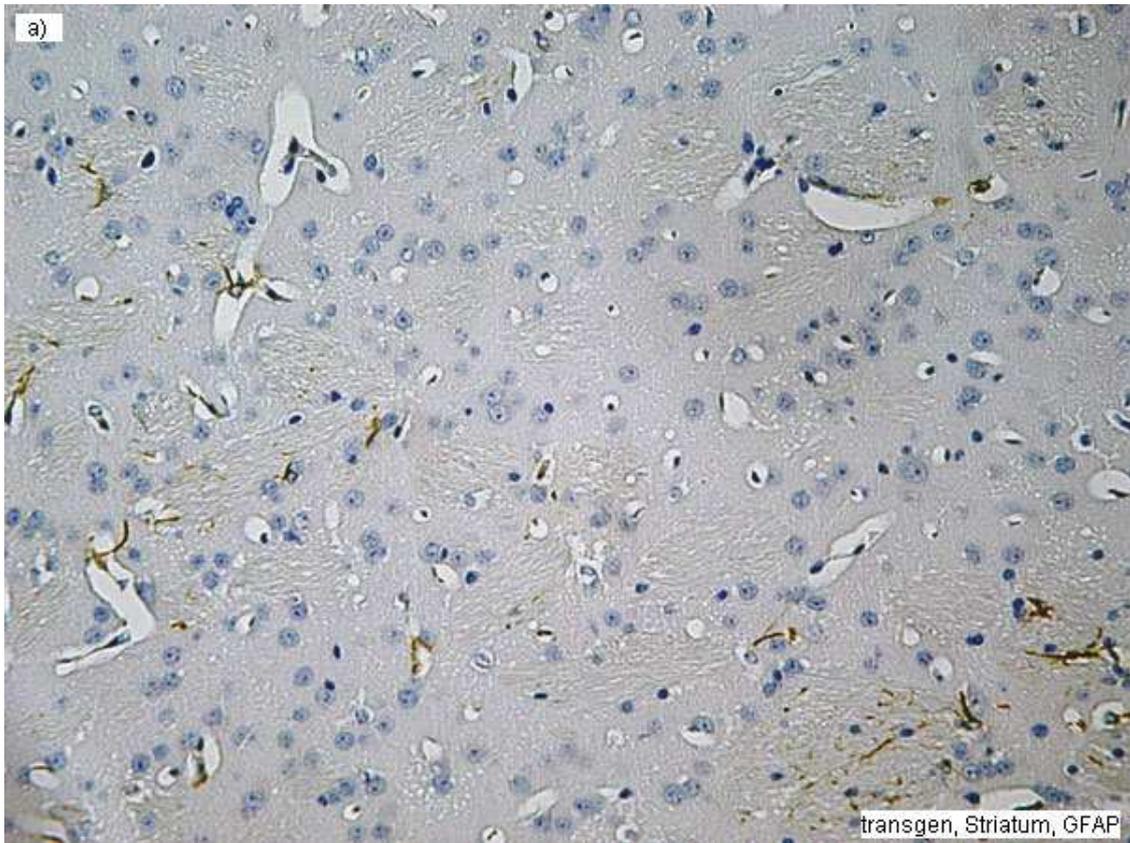
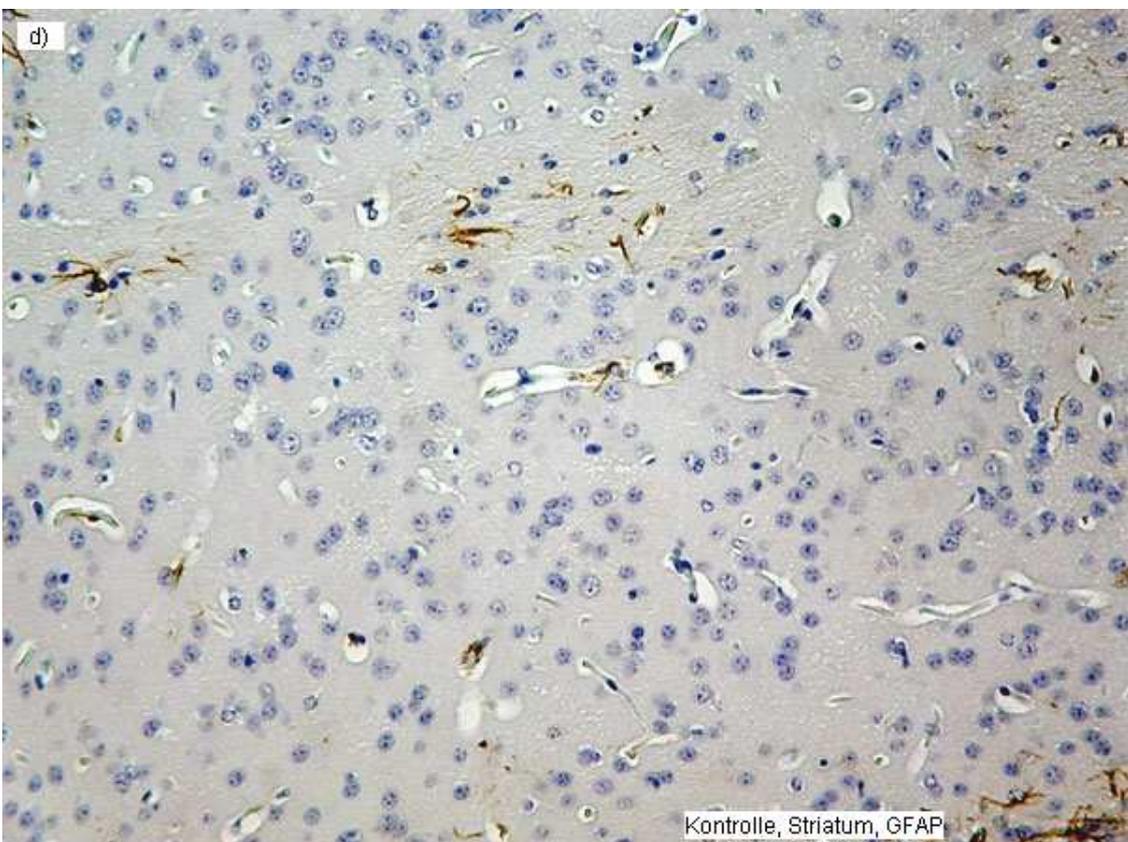
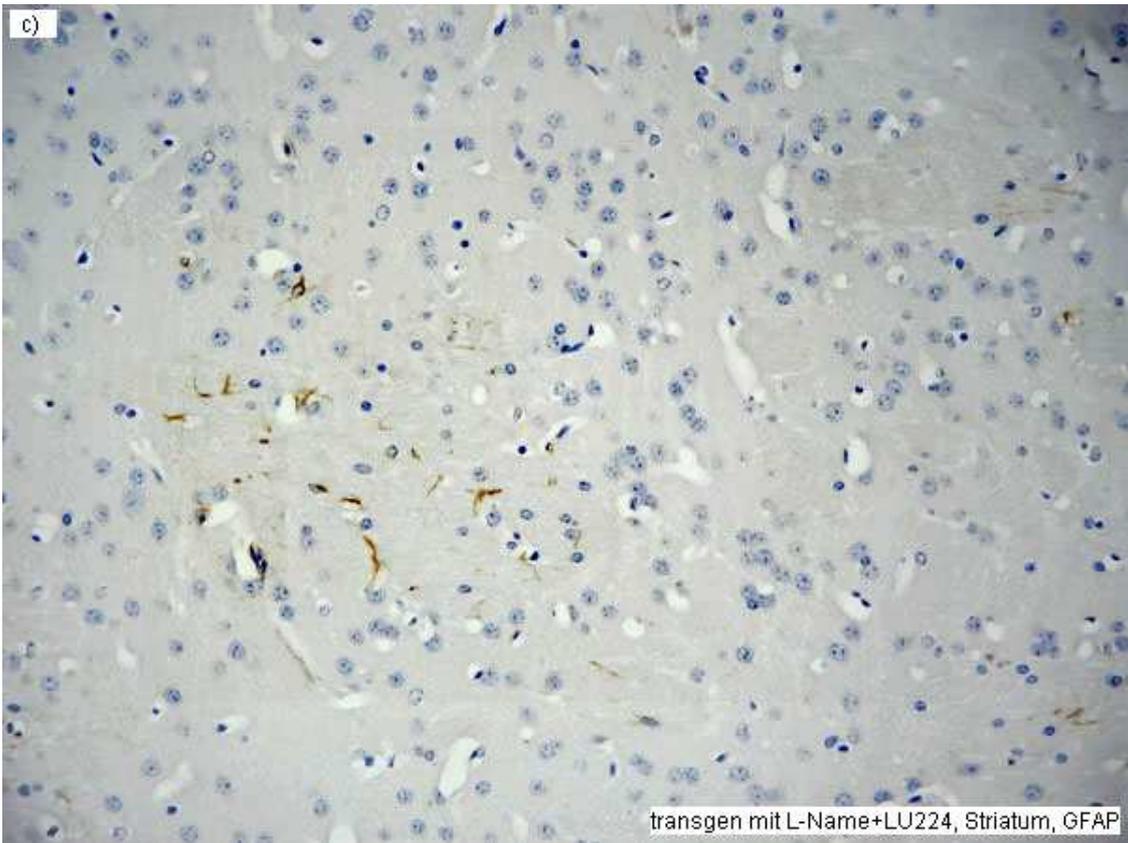
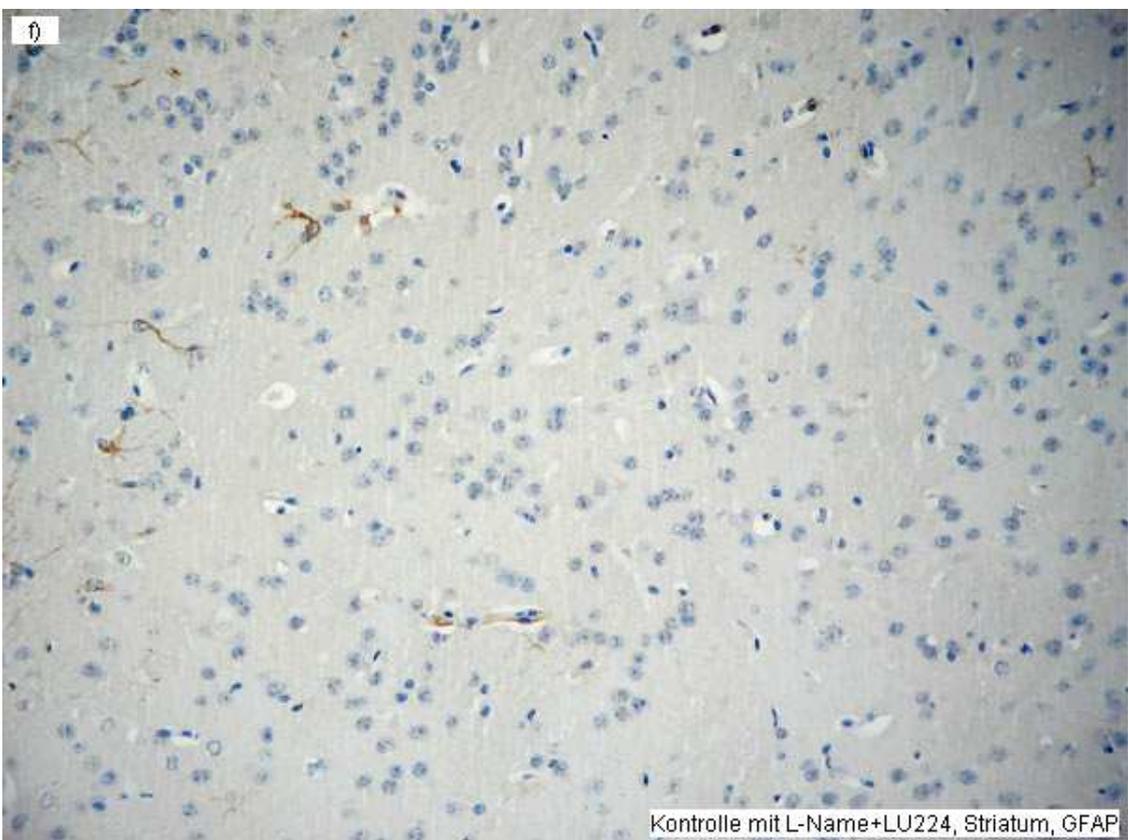
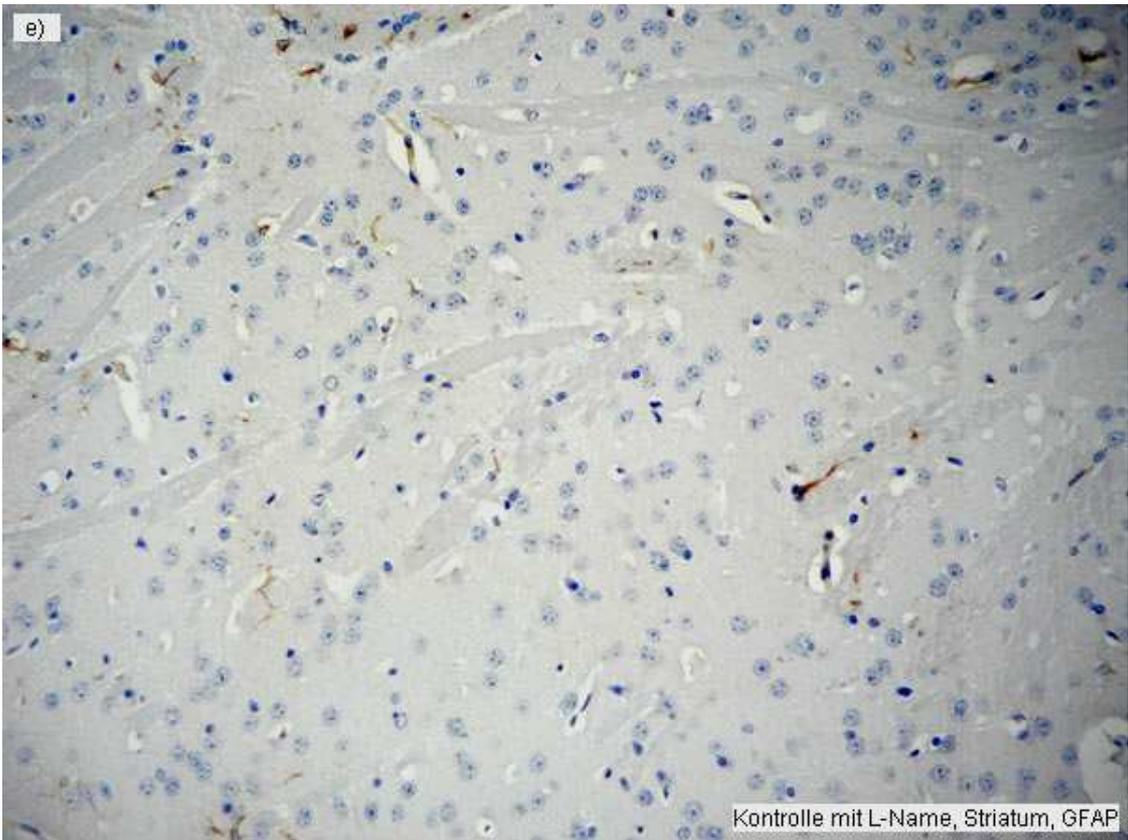


Abb.22 Schematische Darstellung der ausgemessenen Areale im Bereich des Striatums.

- a) Die Schnittebene entspricht Figur 15 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).
- b) Die Schnittebene entspricht Figur 22 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).
- c) Die Schnittebene entspricht Figur 31 im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos et Watson (1986).







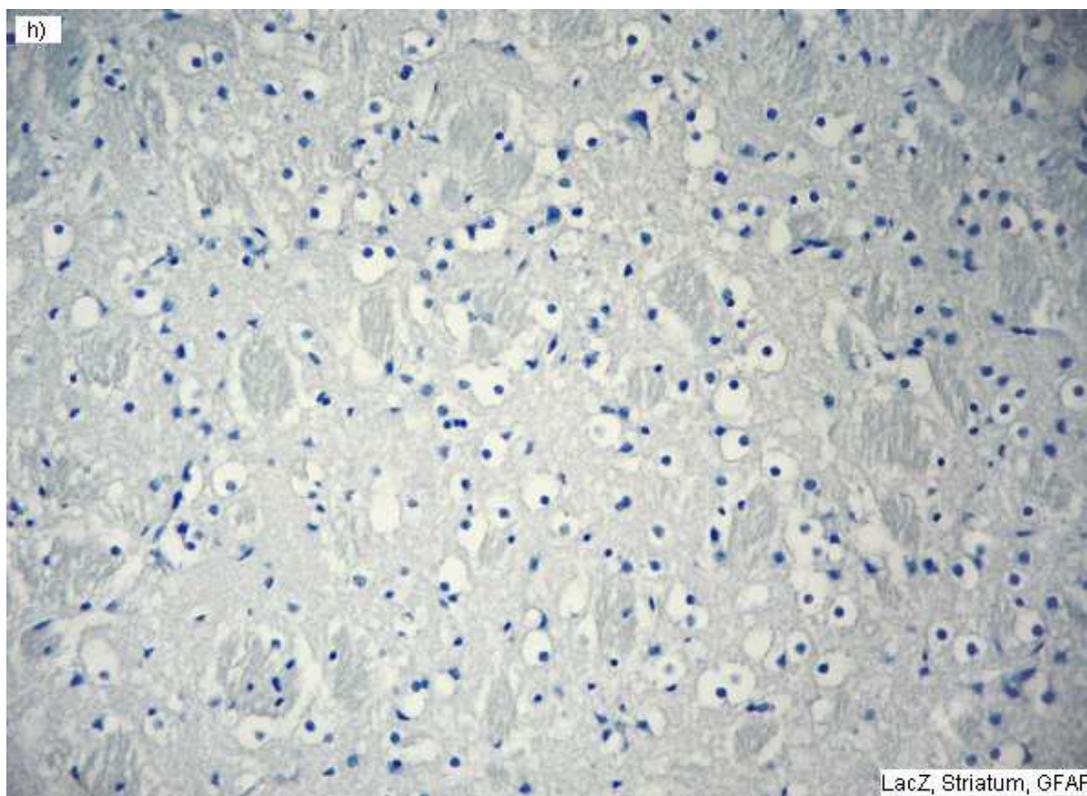
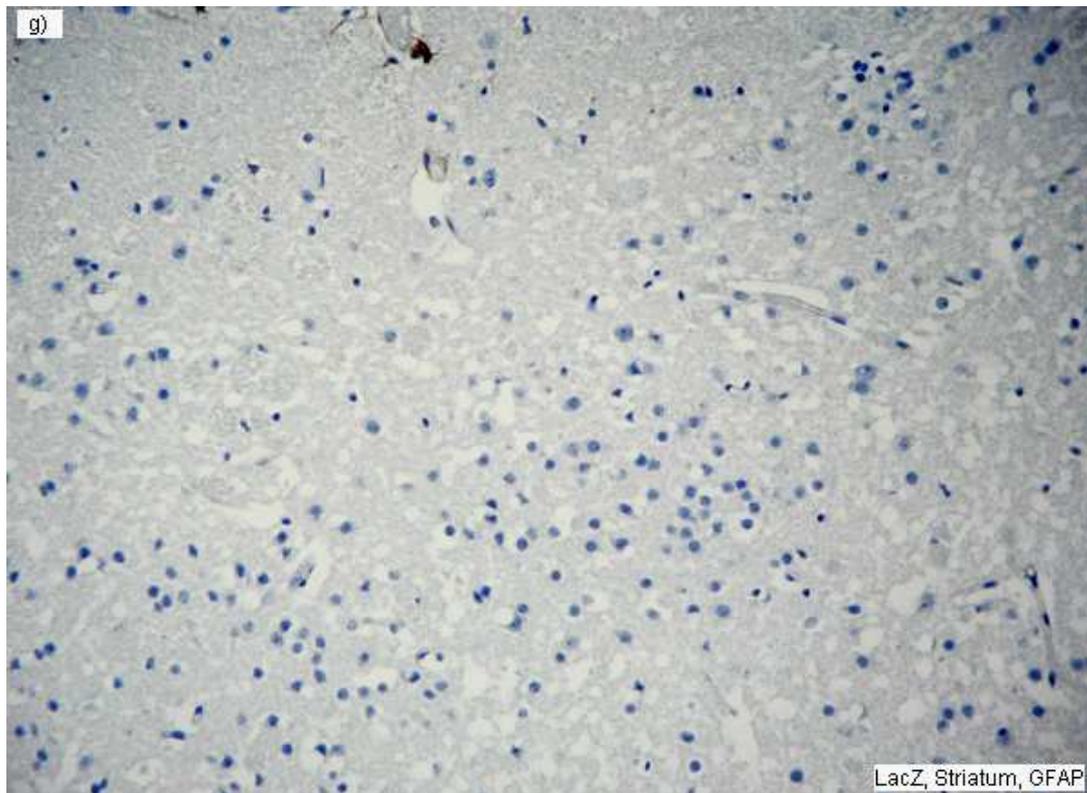


Abb.23 Die Bilder a) - h) zeigen Ausschnitte aus dem Striatum der einzelnen Gruppen mit GFAP-Markierung bei der im Quantimet vermessenen Vergrößerung von 20x10. Bei den LacZ-Tieren (g+h) fällt die deutlich geringere Anzahl positiver Astrozyten im Vergleich zu allen anderen Gruppen (a-f) auf.

### 2.2.4 Auswertung der Mikroglialektin histochemie mit dem Quantimet

Die erhobenen Messdaten wurden wieder bezüglich der bereits bei der Auswertung der GFAP-Färbung erwähnten Gruppen verglichen.

Im Hypothalamus ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Erst beim Vergleich der Gruppen 3 und 7 bzw. 6 und 7 zeigte sich im Mann-Whitney U-Test eine signifikant niedrigere Tomato Lektin-Markierung der Gruppen 3 ( $p=0,002$ ) und 6 ( $p=0,012$ ). Auch hier wurde beim Vergleich mit Gruppe 7 aus oben genannten Gründen keine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	4,25E-03	4,39E-03	4,75E-04
Gruppe 2	4,00E-03	3,88E-03	3,26E-04
Gruppe 3	3,50 E-03	3,83E-03	6,01E-04
Gruppe 4	5,00E-03	5,34E-03	8,13E-04
Gruppe 5	3,50E-03	4,13E-03	7,74E-04
Gruppe 6	4,50E-03	4,70E-03	7,61E-04
Gruppe 7	7,00E-03	1,25E-02	5,49E-03

Tab.6 Ergebnisse der statistischen Berechnung der Area fraction im Bereich des Hypothalamus bei Tomato Lektin-Markierung

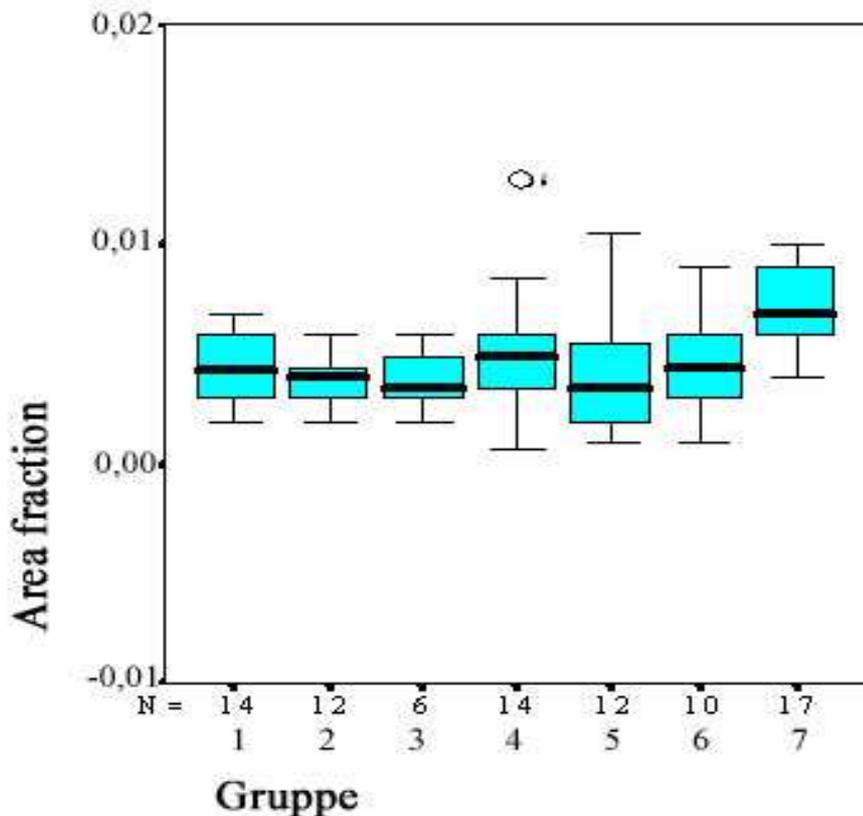
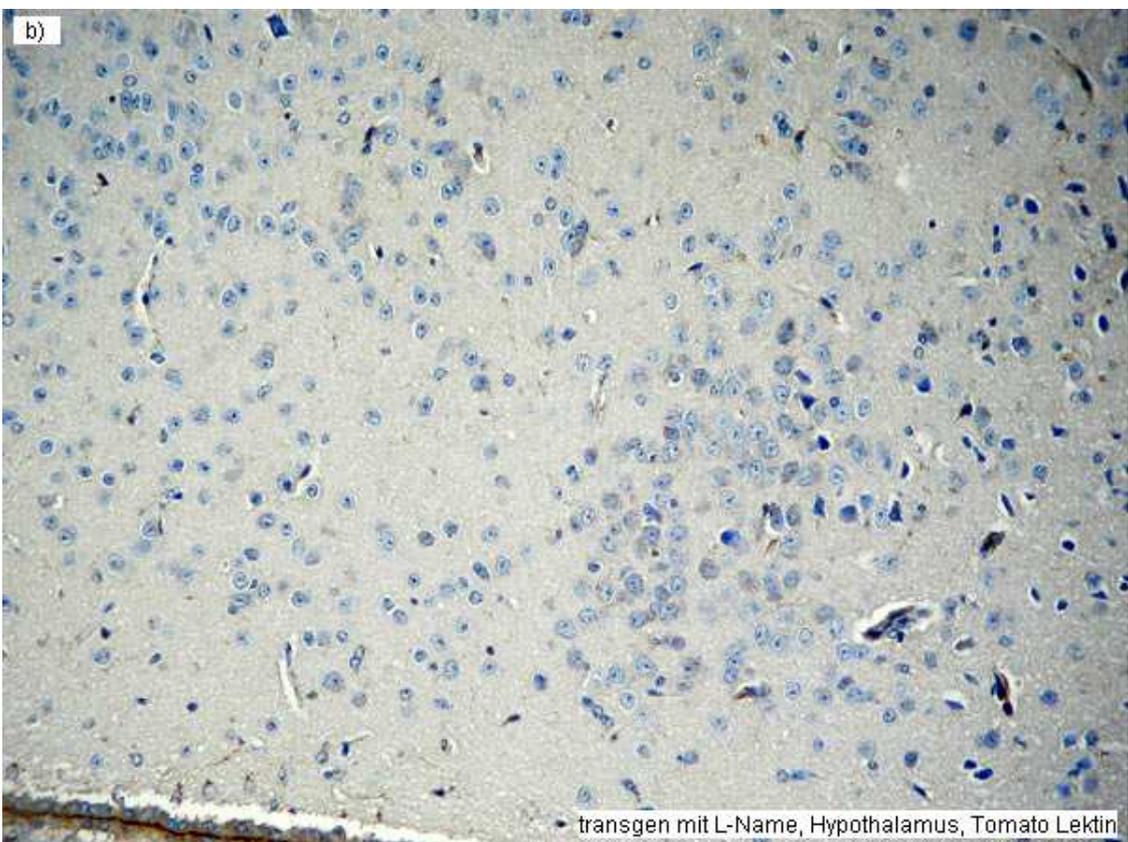
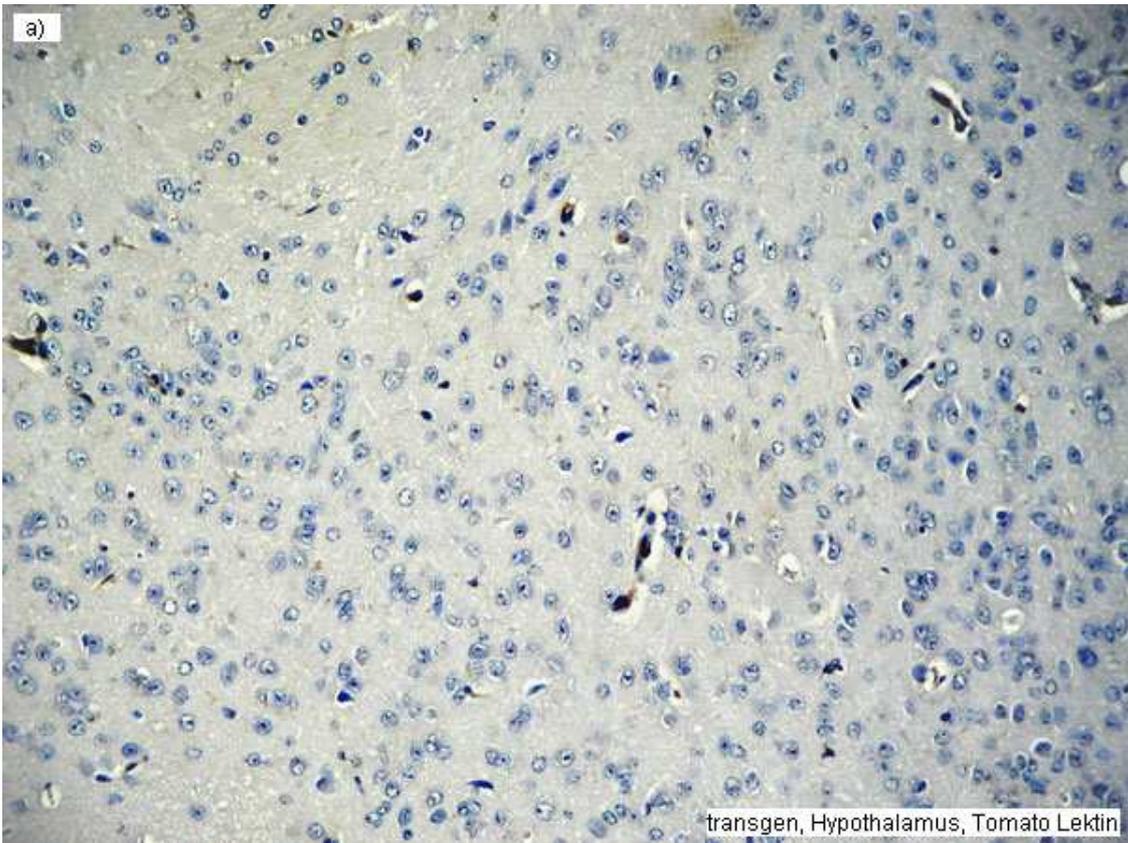
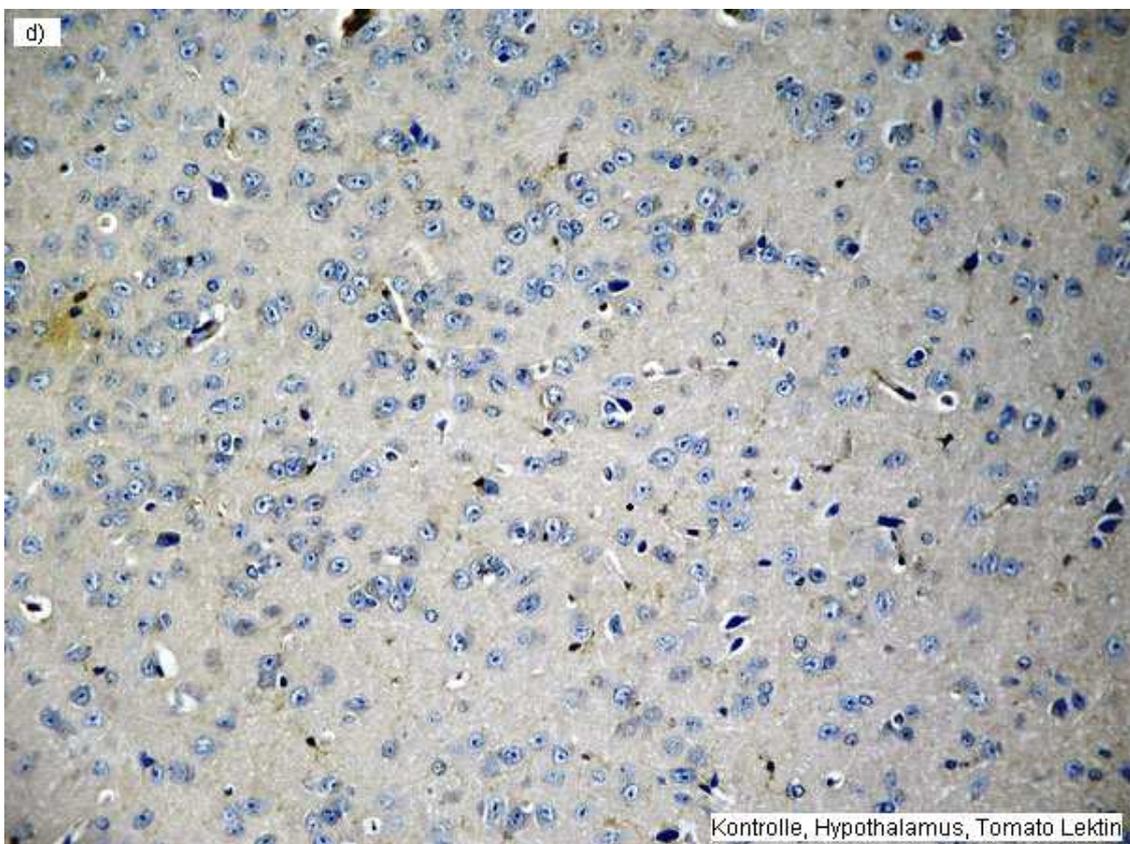
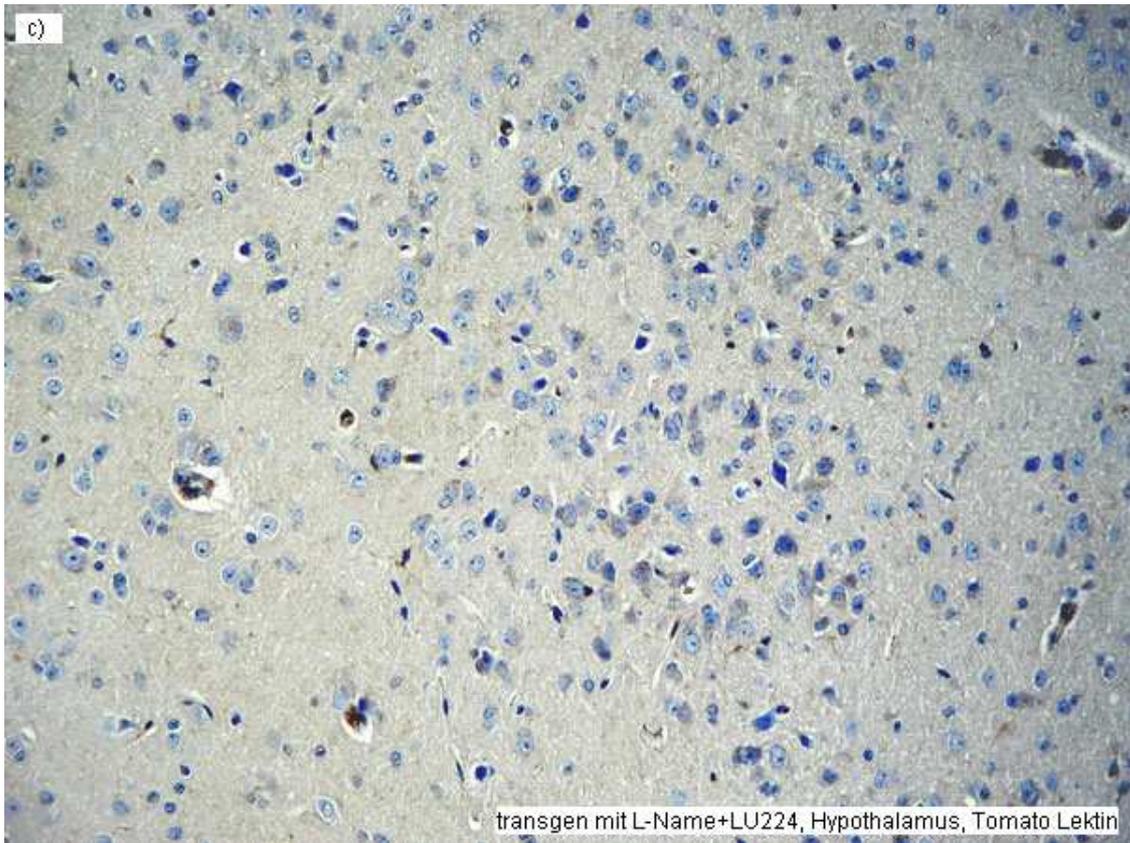
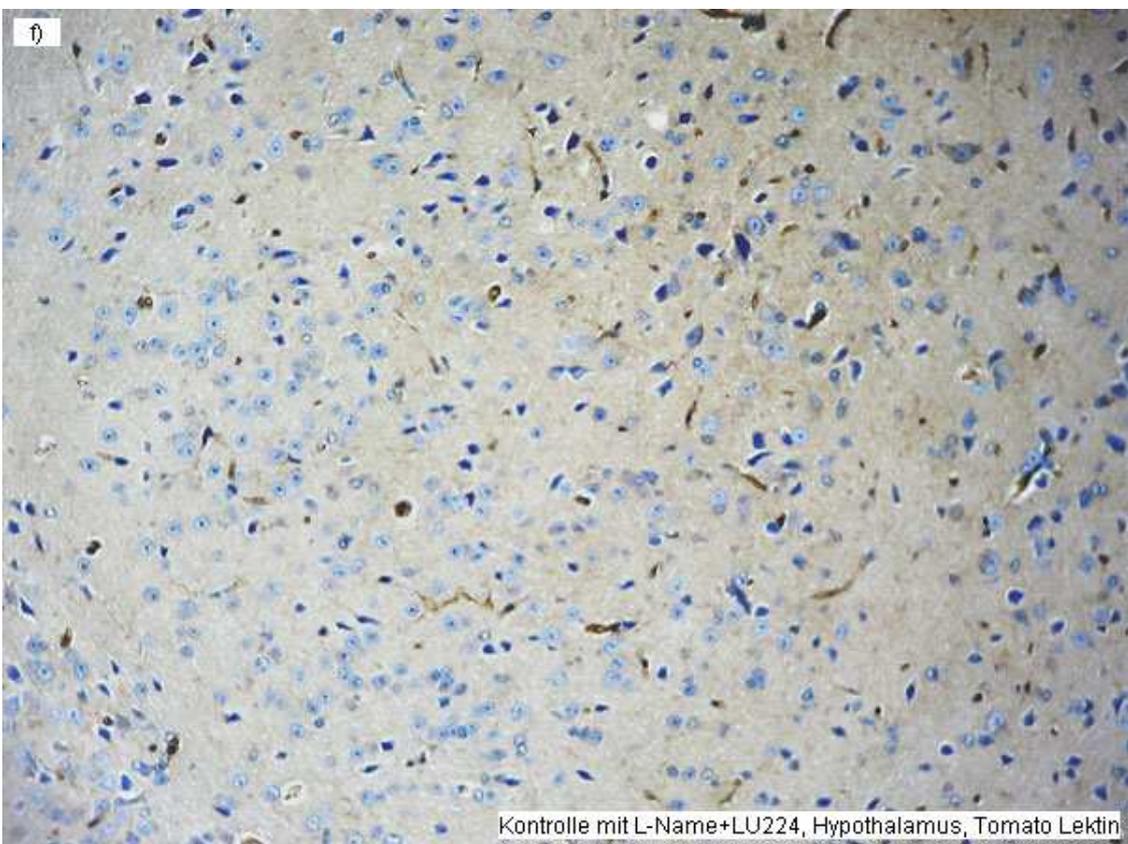
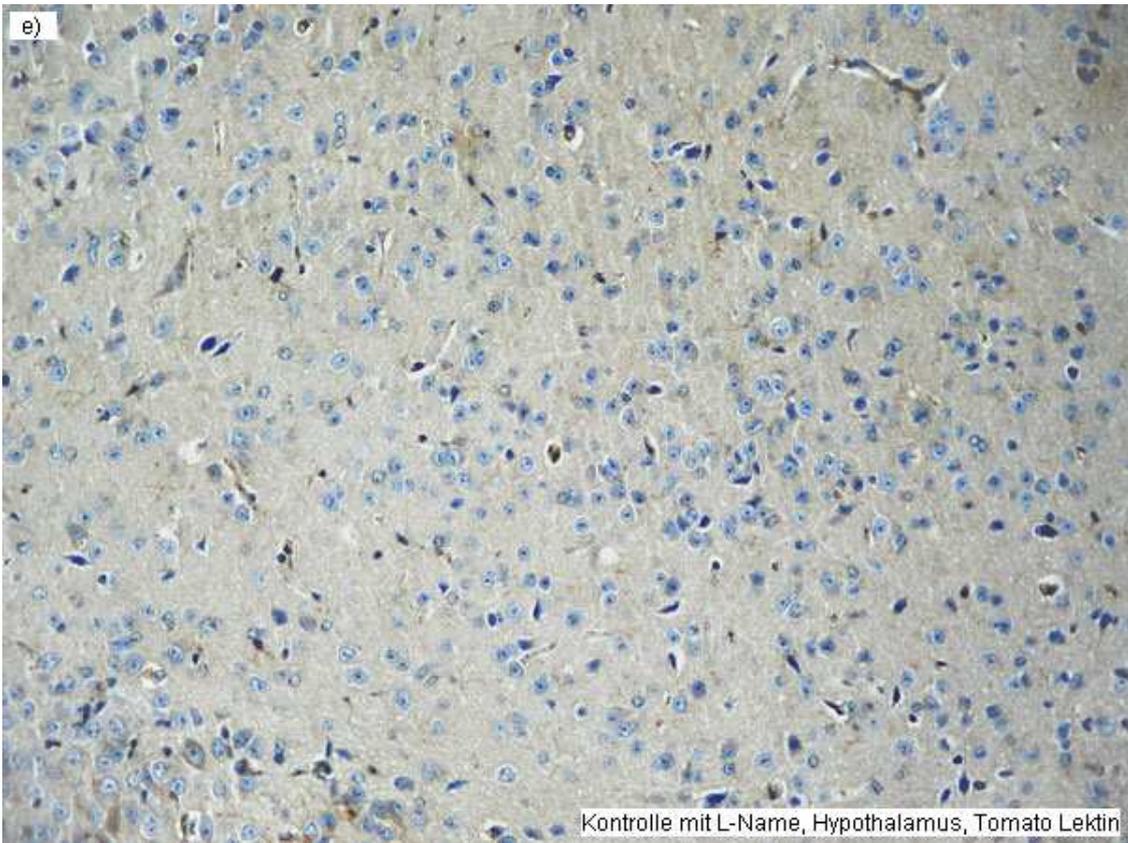


Abb.24 Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Area fraction im Bereich des Hypothalamus der Gruppen 1 bis 7 bei Tomato Lektin-Markierung. Die Area fraction gibt den Anteil positiv markierter Pixel an der Gesamtzahl der Pixel des ausgemessenen Präparatausschnitts an. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer. Ein Ausreißer eines LacZ-Tiers wurde aufgrund des Extremwertes von 0,1 nicht dargestellt.







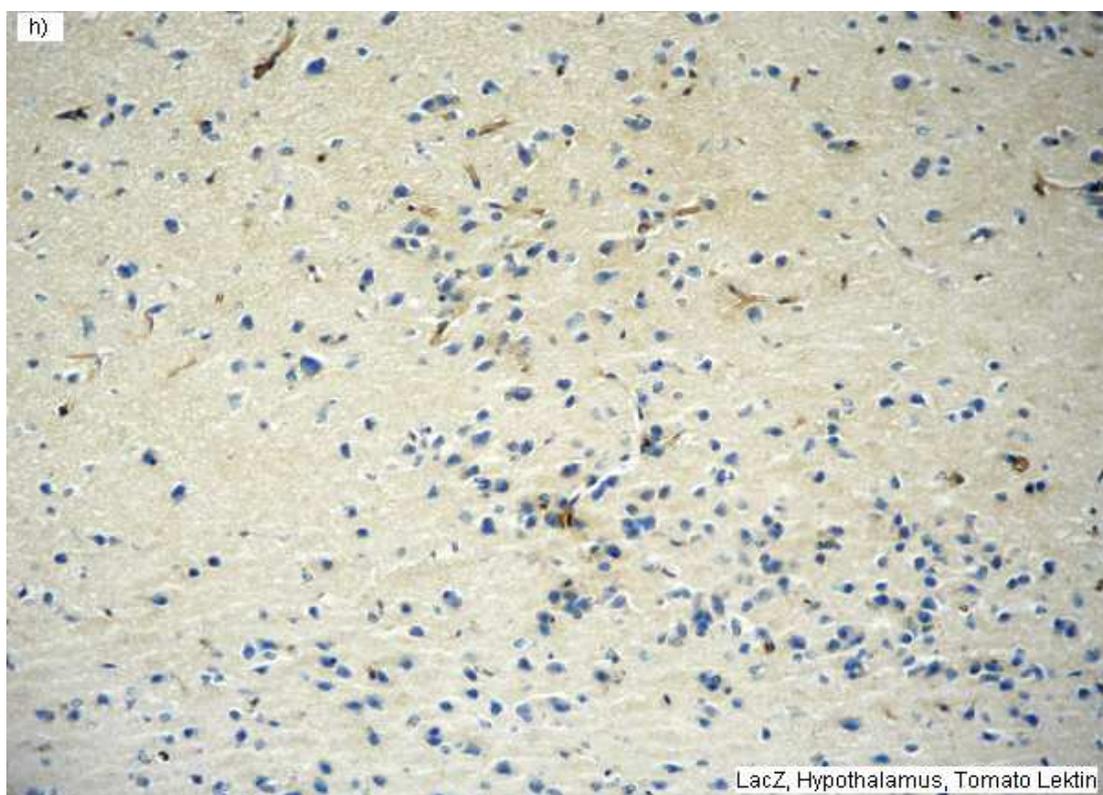
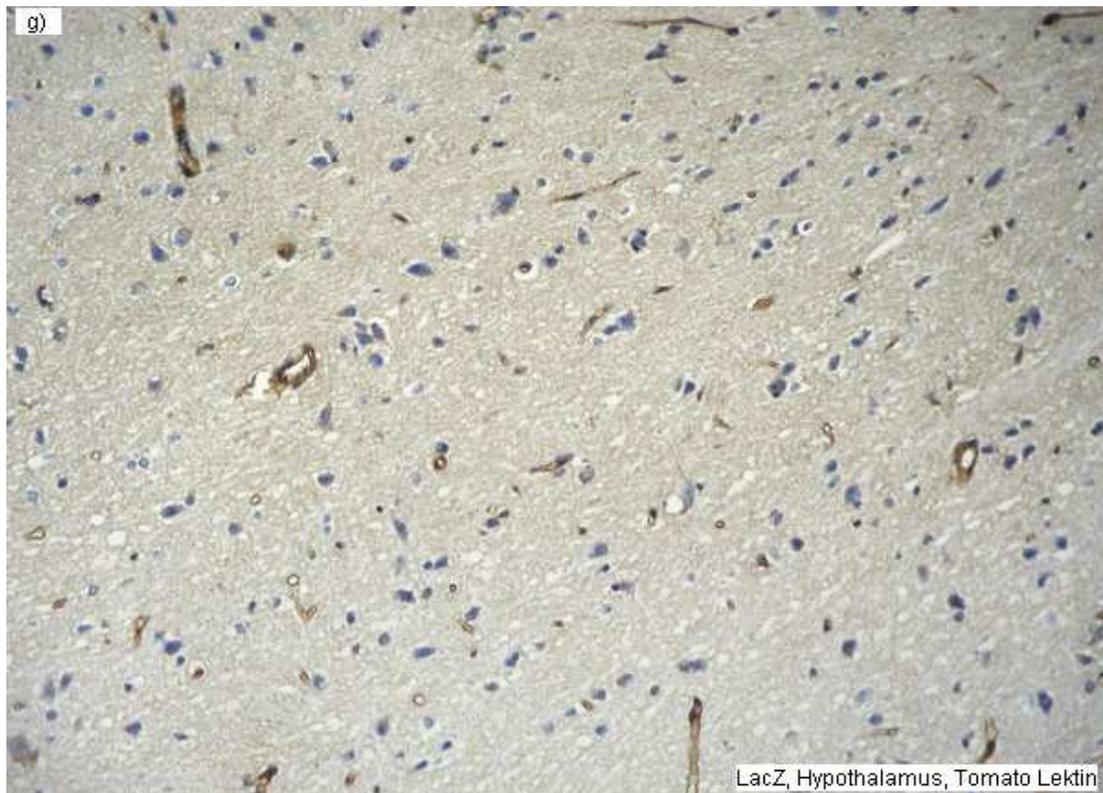


Abb.25 Die Bilder a) - h) zeigen Ausschnitte aus dem Hypothalamus der einzelnen Gruppen mit Tomato Lektin-Markierung bei der im Quantimet vermessenen Vergrößerung von 20x10. Bei den LacZ-Tieren (g+h) fällt die deutlich höhere Anzahl angeschnittener Gefäße im Vergleich zu allen anderen Gruppen (a-f) auf.

Im Bereich des Striatums zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied beim Mann-Whitney U-Test.

Erst beim Vergleich der Gruppen 3 bzw. 6 mit der Gruppe 7 konnte eine signifikant höhere Tomato Lektin-Anfärbung der Gruppe 7 nachgewiesen werden (3 und 7:  $p=0,002$ ; 6 und 7:  $p=0,000$ ).

	Median	Arithmetischer Mittelwert	Standardabweichung
Gruppe 1	7,00E-03	6,86E-03	4,30E-04
Gruppe 2	6,00E-03	5,96E-03	5,01E-04
Gruppe 3	5,00E-03	5,67E-03	9,13E-04
Gruppe 4	6,00E-03	6,53E-03	4,87E-04
Gruppe 5	7,00E-03	6,27E-03	7,02E-04
Gruppe 6	5,00E-03	5,55E-03	6,66E-04
Gruppe 7	1,10E-02	1,07E-02	9,29E-04

Tab.7 Ergebnisse der statistischen Berechnung der Area fraction im Bereich des Striatums bei Tomato Lektin-Markierung

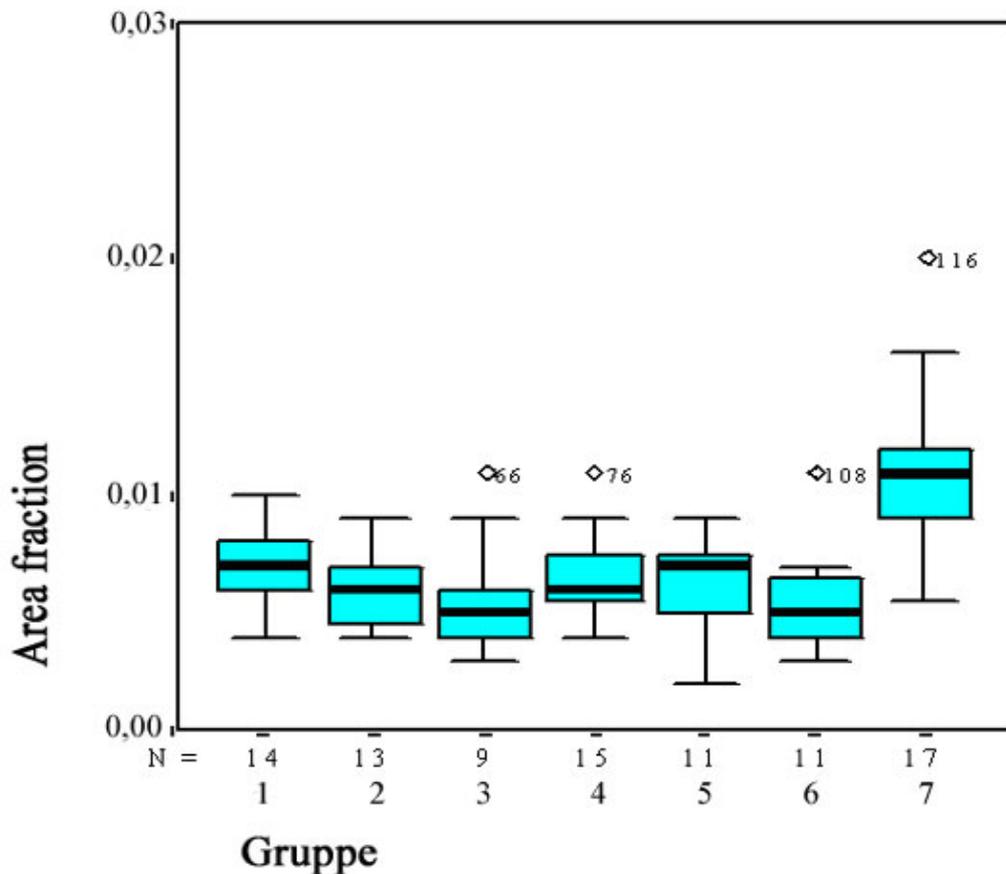
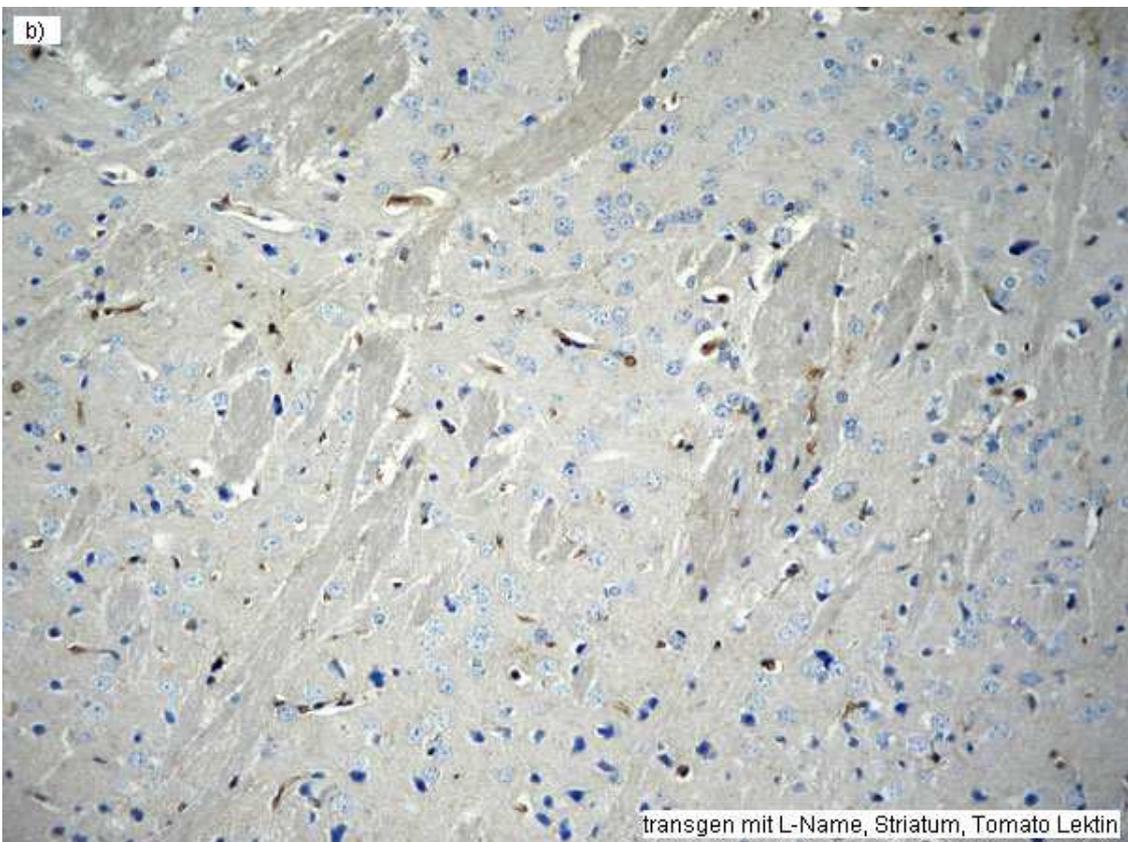
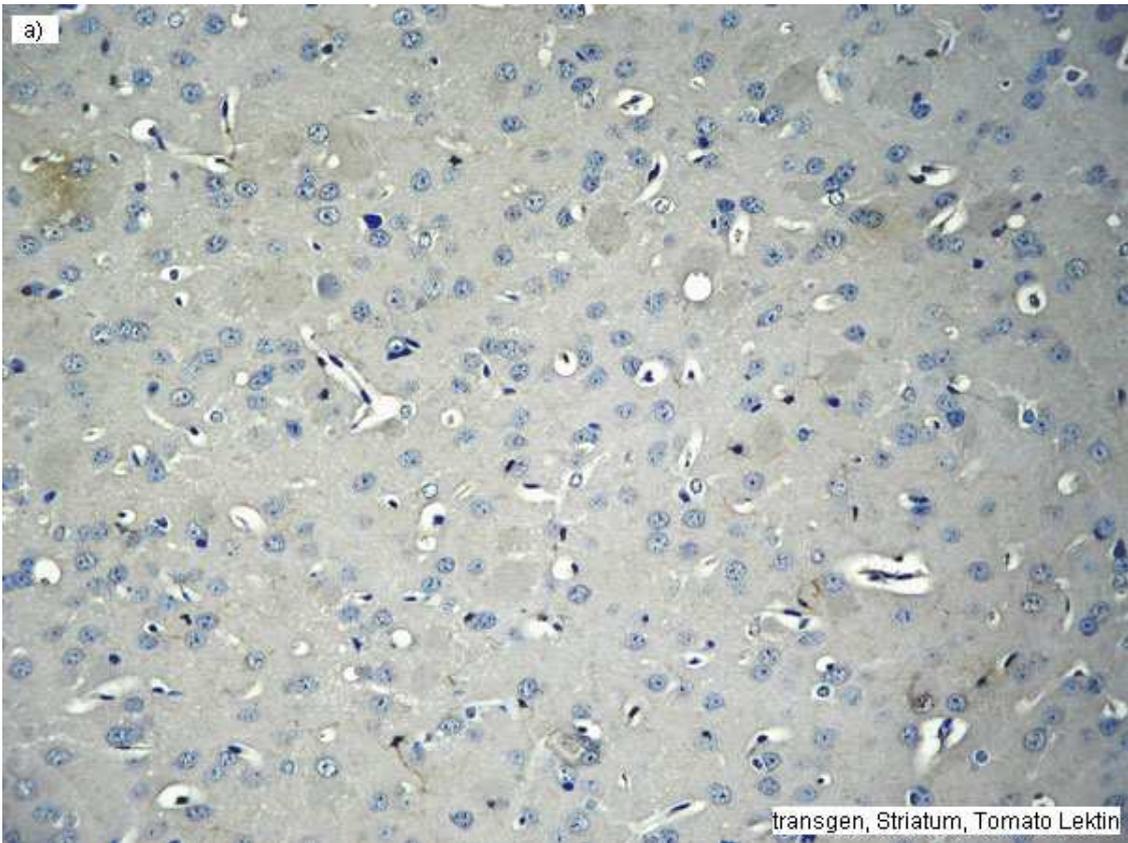
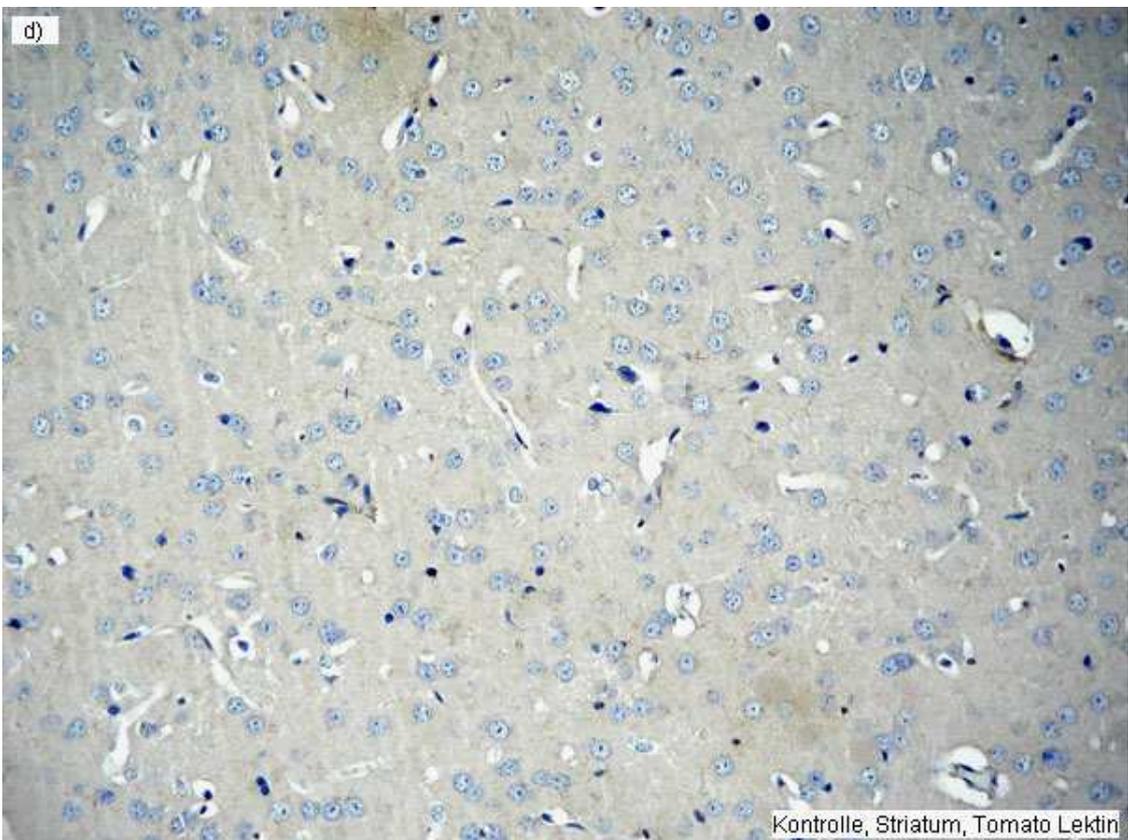
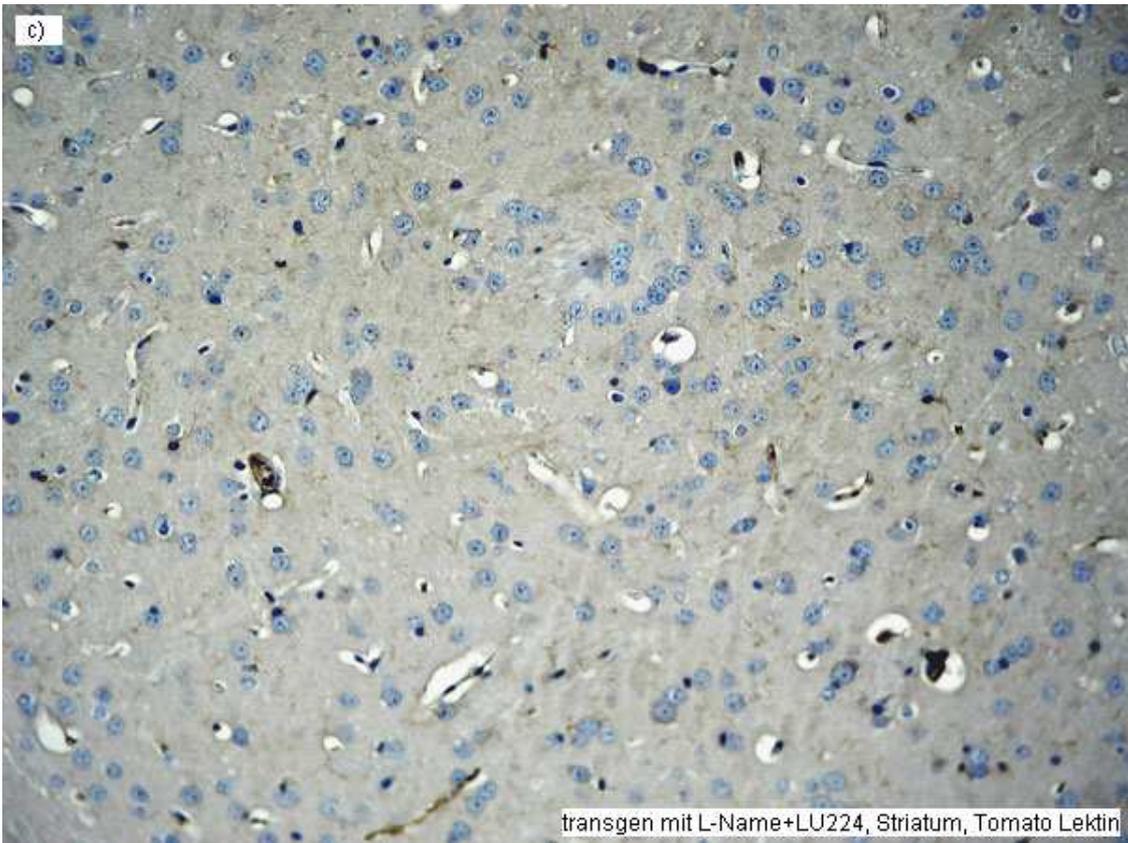
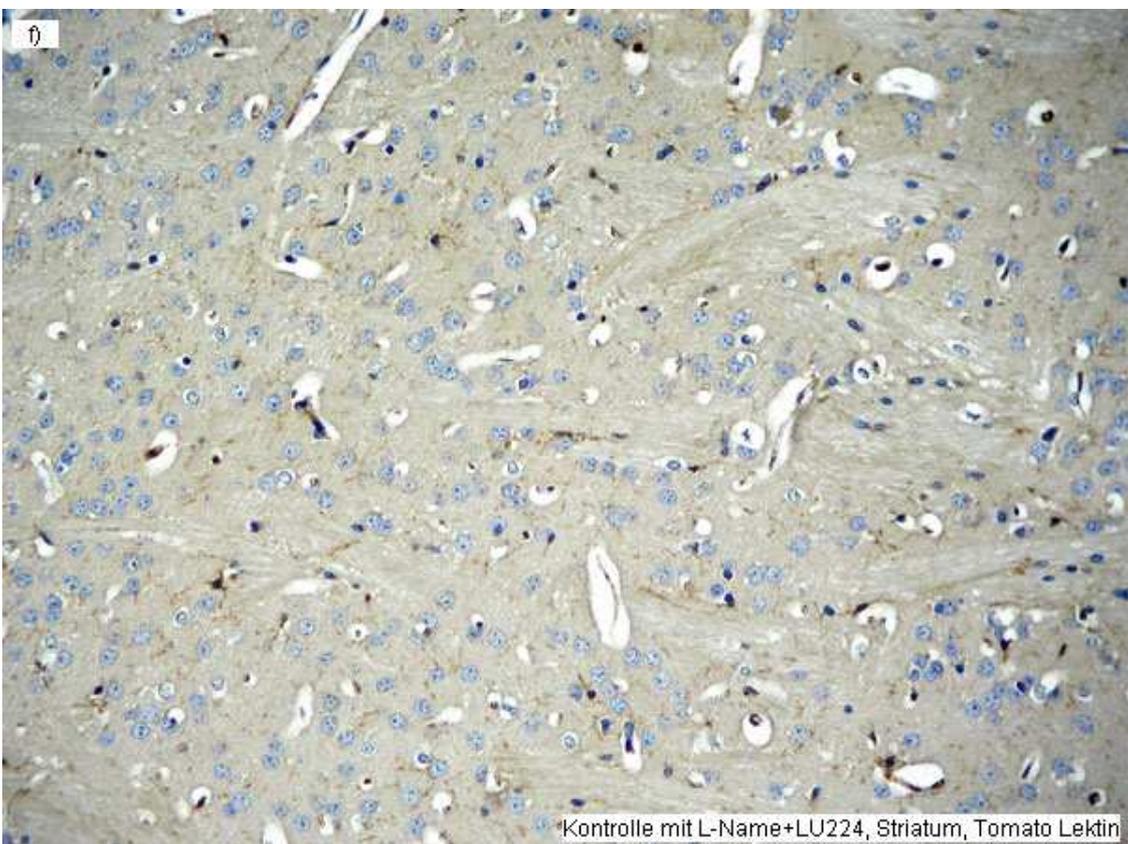
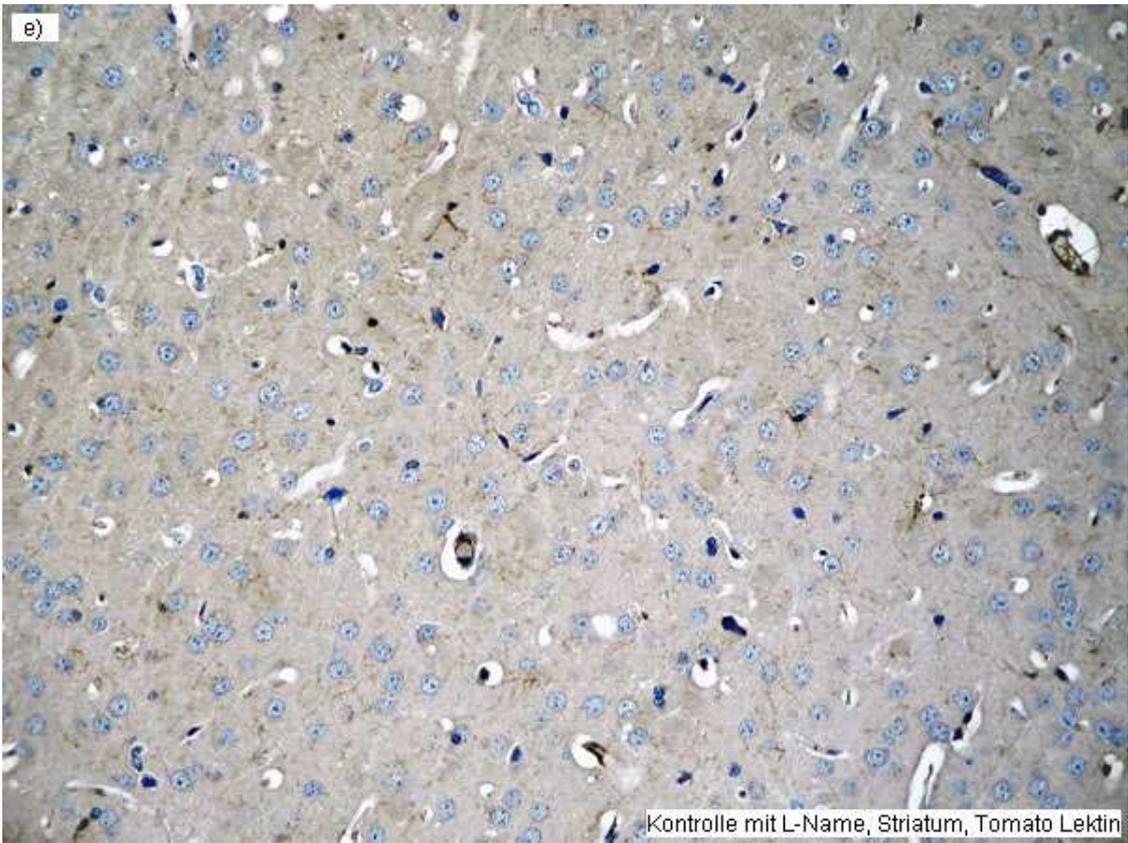


Abb.26 Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Area fraction im Bereich des Striatum der Gruppen 1 bis 7 bei Tomato Lektin-Markierung. Die Area fraction gibt den Anteil positiv markierter Pixel an der Gesamtzahl der Pixel des ausgemessenen Präparatausschnitts an. Die Markierungen zeigen Ausreißer mit der entsprechenden Tiernummer.







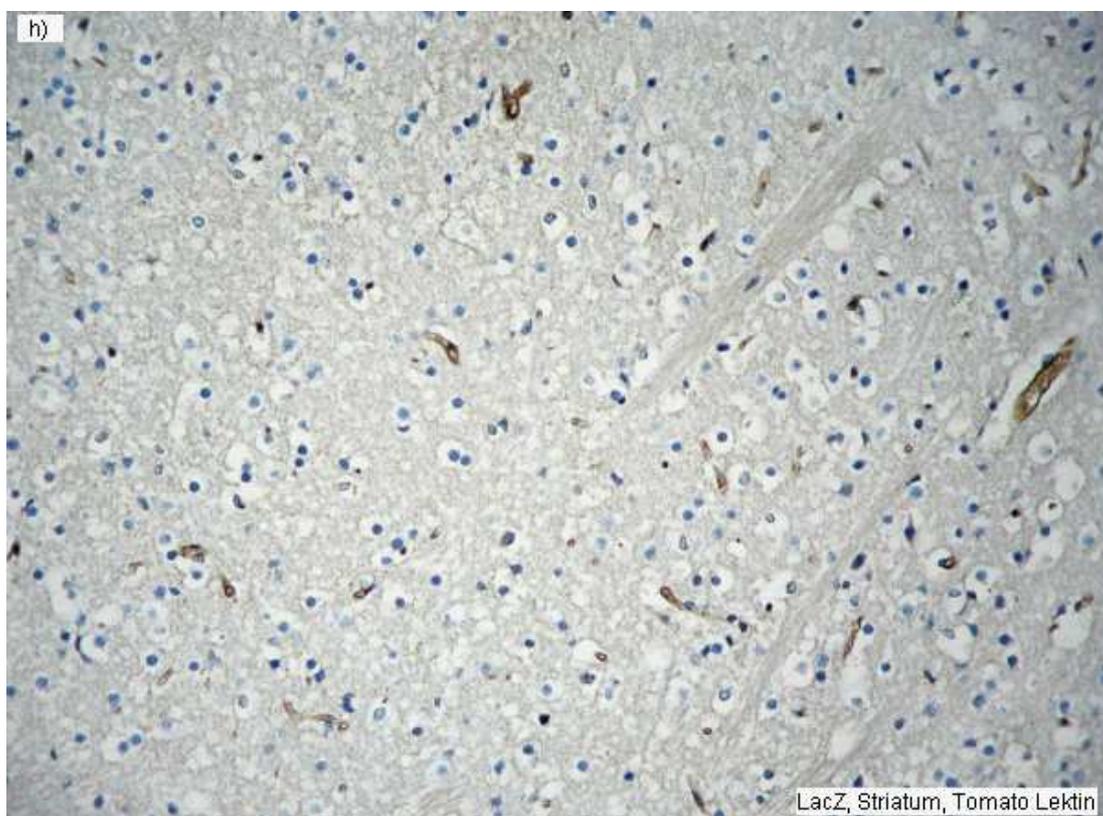
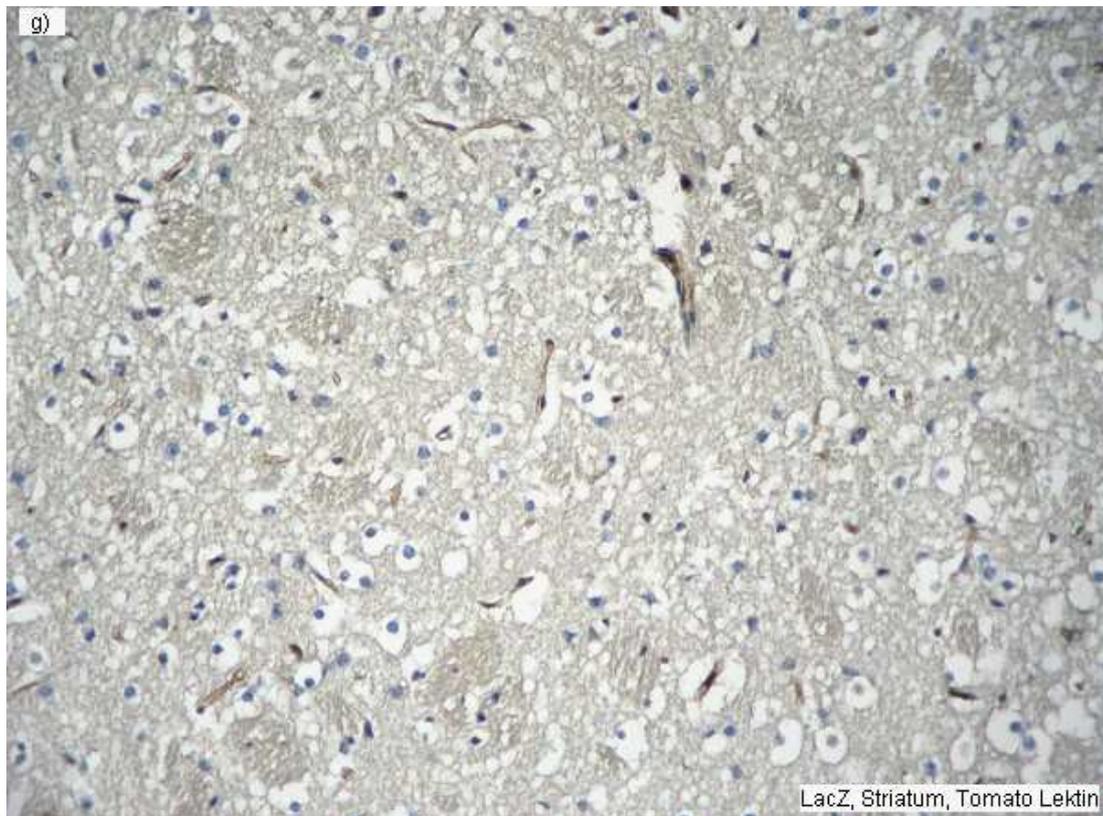
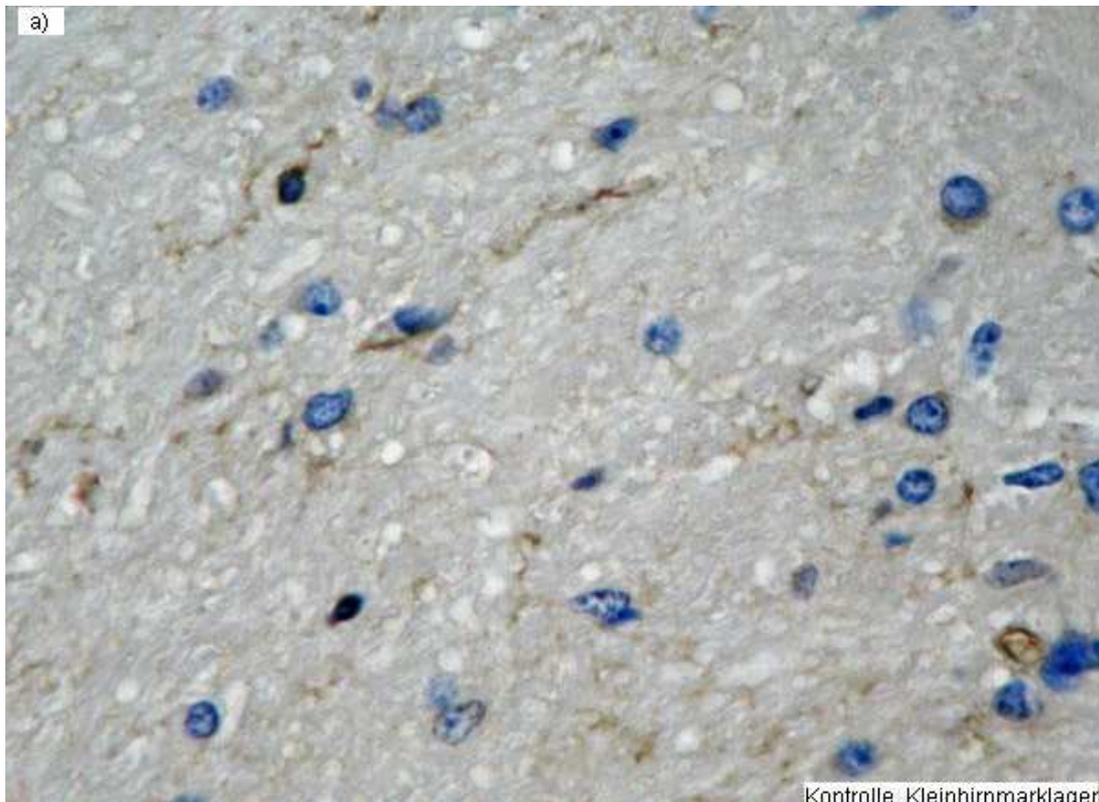


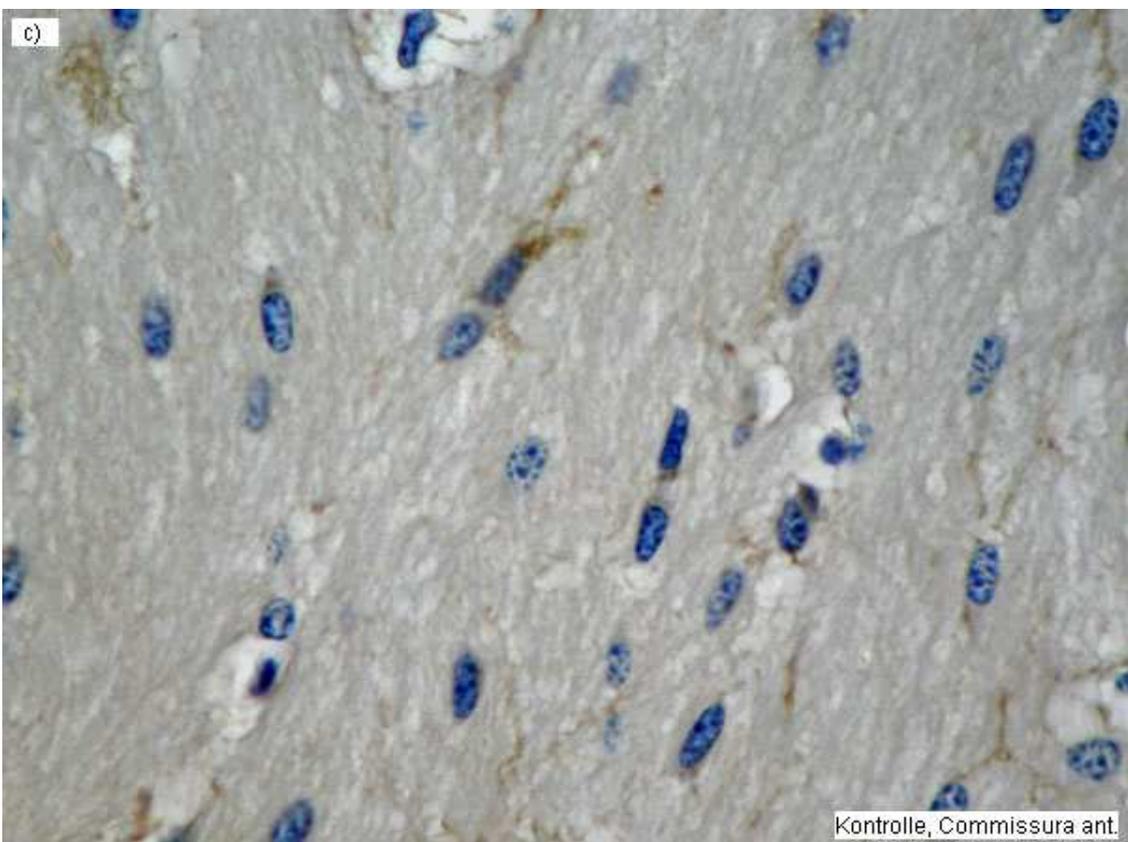
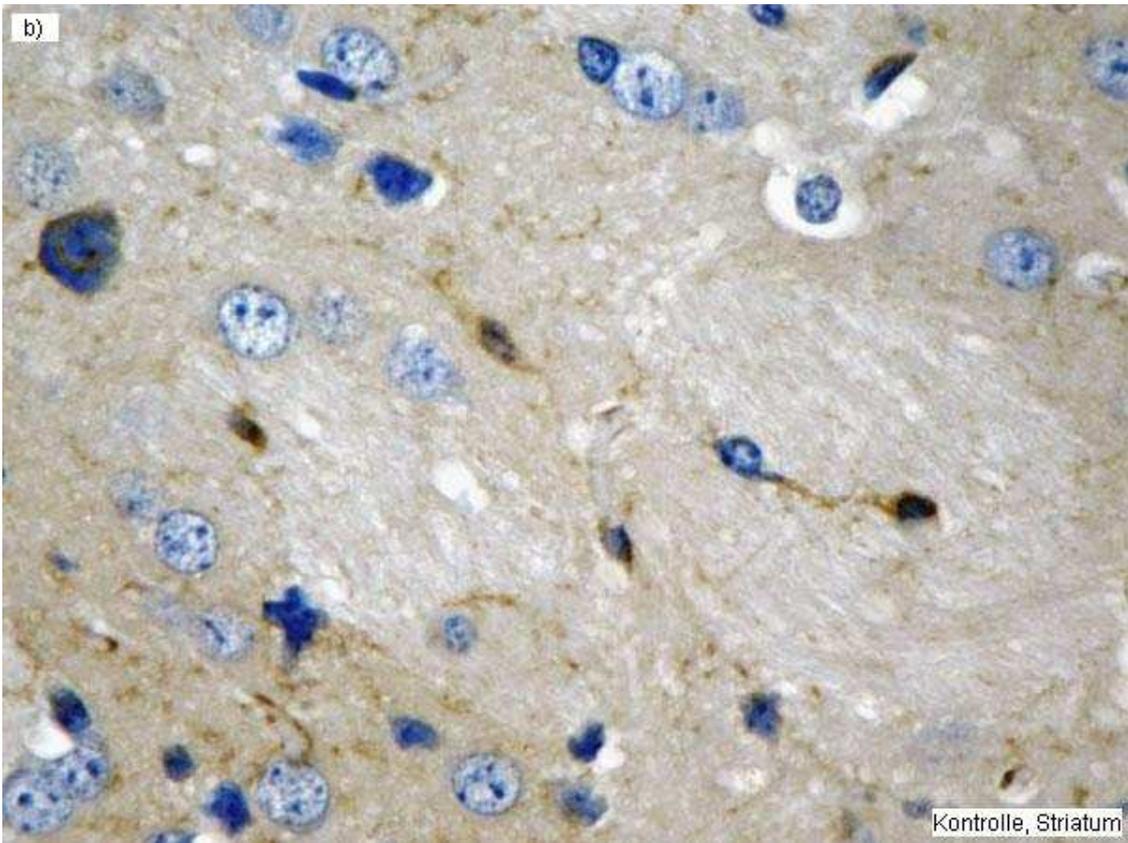
Abb.27 Die Bilder a) - h) zeigen Ausschnitte aus dem Striatum der einzelnen Gruppen mit Tomato Lektin-Markierung bei der im Quantimet vermessenen Vergrößerung von 20x10. Bei den LacZ-Tieren (g und h) fällt auch im Striatum die erhöhte Anzahl angeschnittener Gefäße auf.

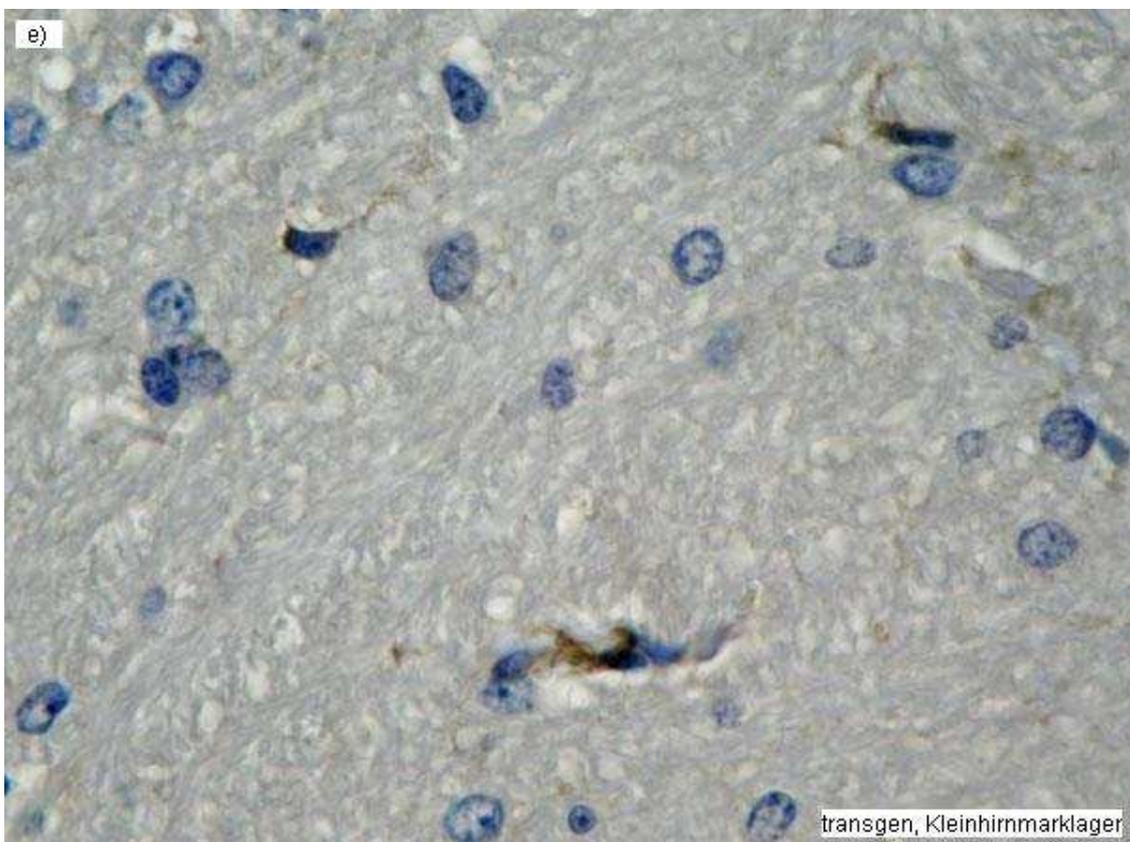
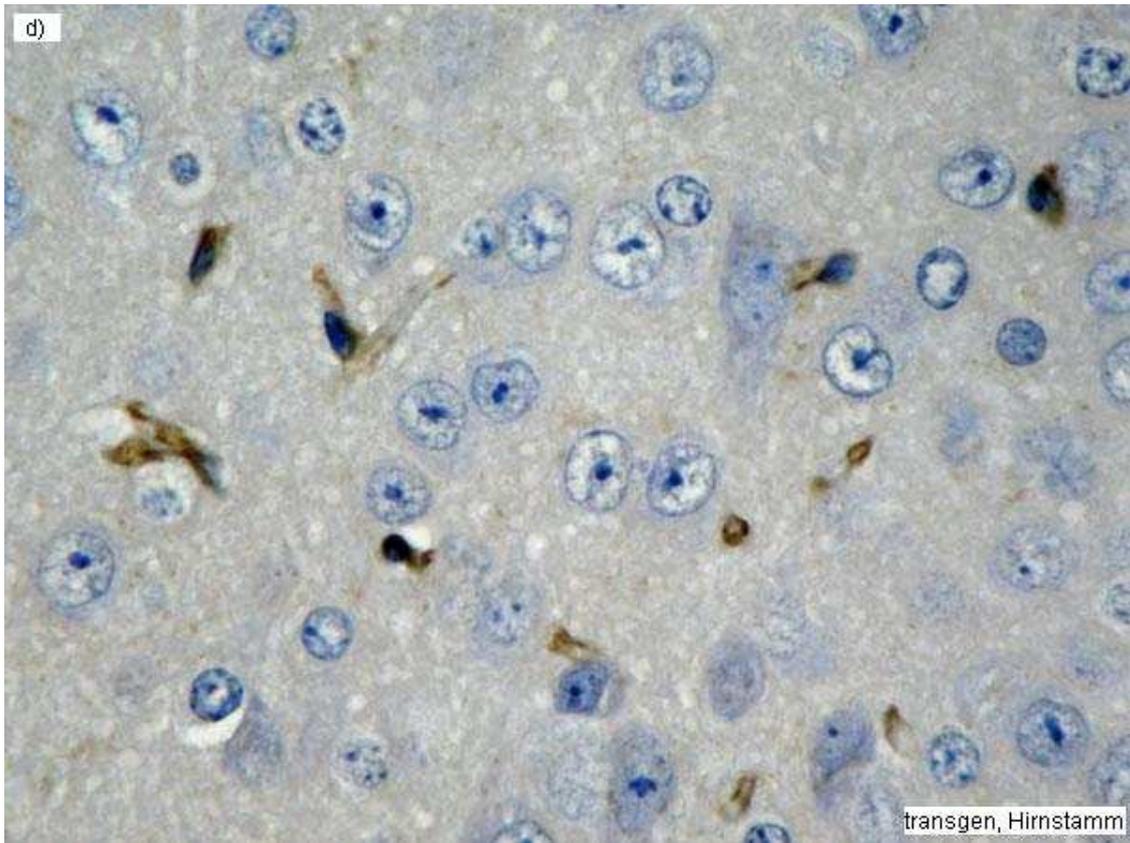
### 2.2.5 Beurteilung der Mikrogliamorphologie

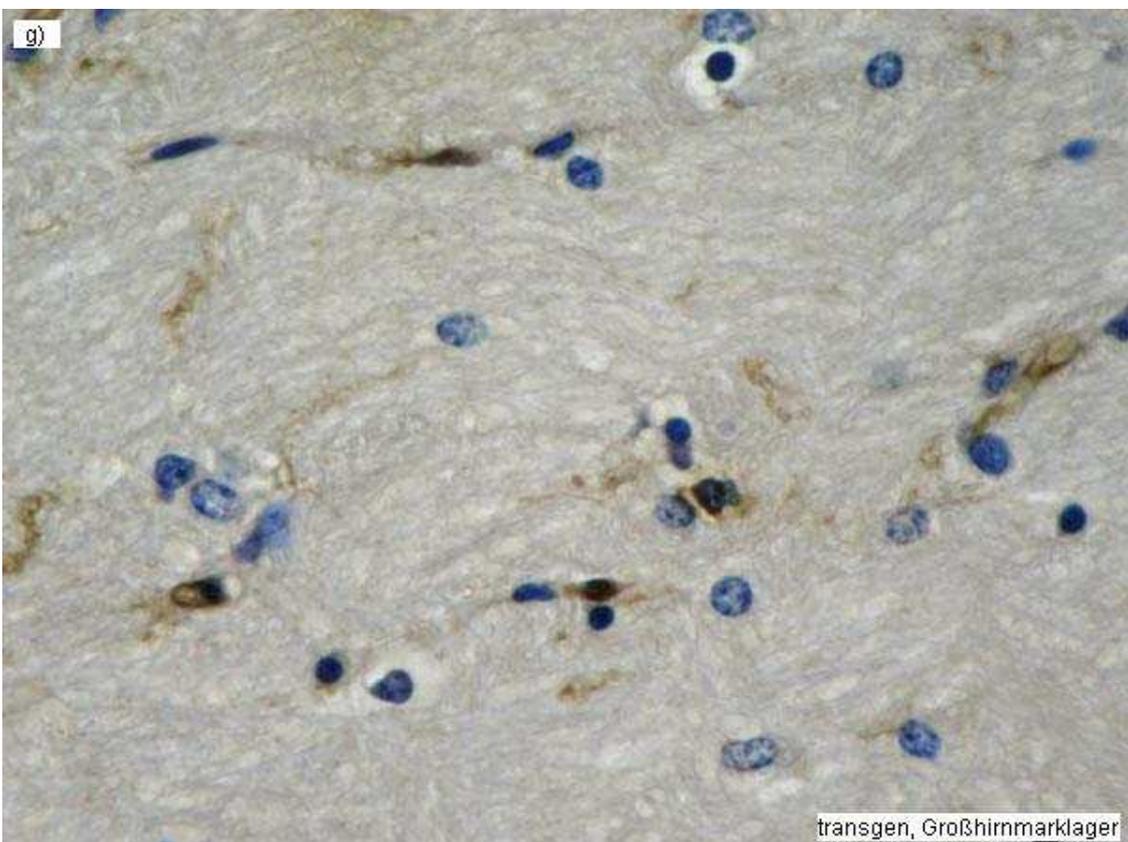
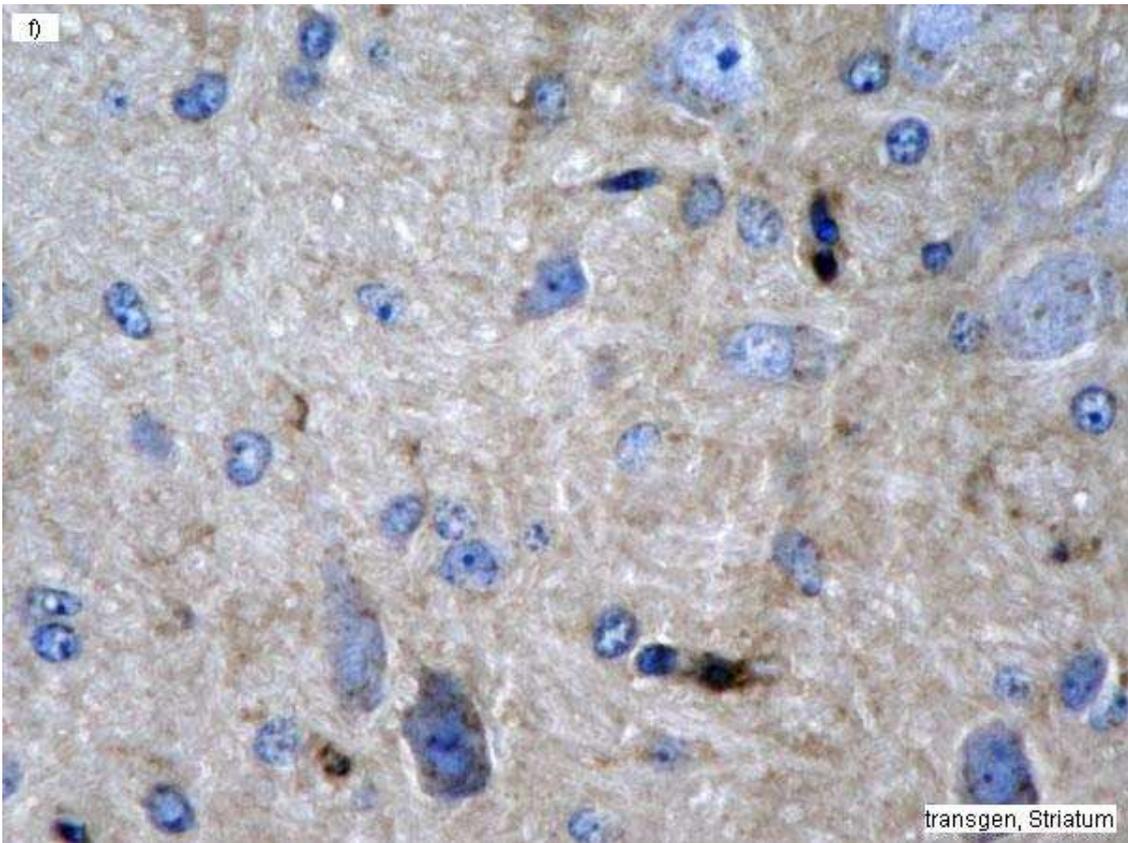
Zur Beurteilung der Mikrogliamorphologie wurden die mit Tomato Lektin gefärbten Präparate der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Die Kontrolltiere zeigten in allen Gehirnbereichen ramifizierte Mikrogliazellen mit fein-verzweigten Fortsätzen in eher geringer Anzahl. Die Behandlung mit L-Name führte bei einigen wenigen Tieren zu einem leichten Rückgang der Verzweigung im Bereich des Hirnstamms, aber auch hier nur bei wenigen Zellen, so dass die Mehrzahl der Mikrogliazellen nicht aktiviert waren. Bei der kombinierten Behandlung mit L-Name und LU224 ließen sich ausschließlich ramifizierte Mikrogliazellen mit feinen, verzweigten Fortsätzen nachweisen. Die Anzahl der Mikrogliazellen war in der Regel gering.

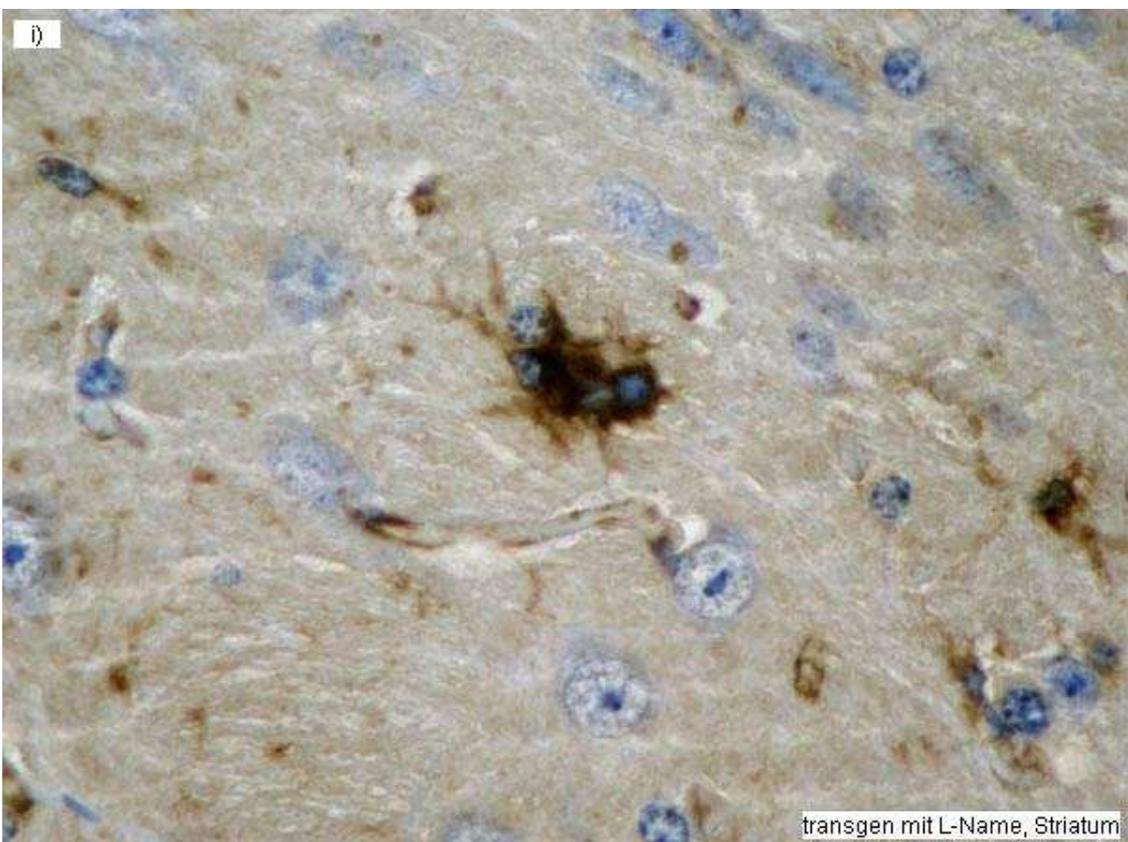
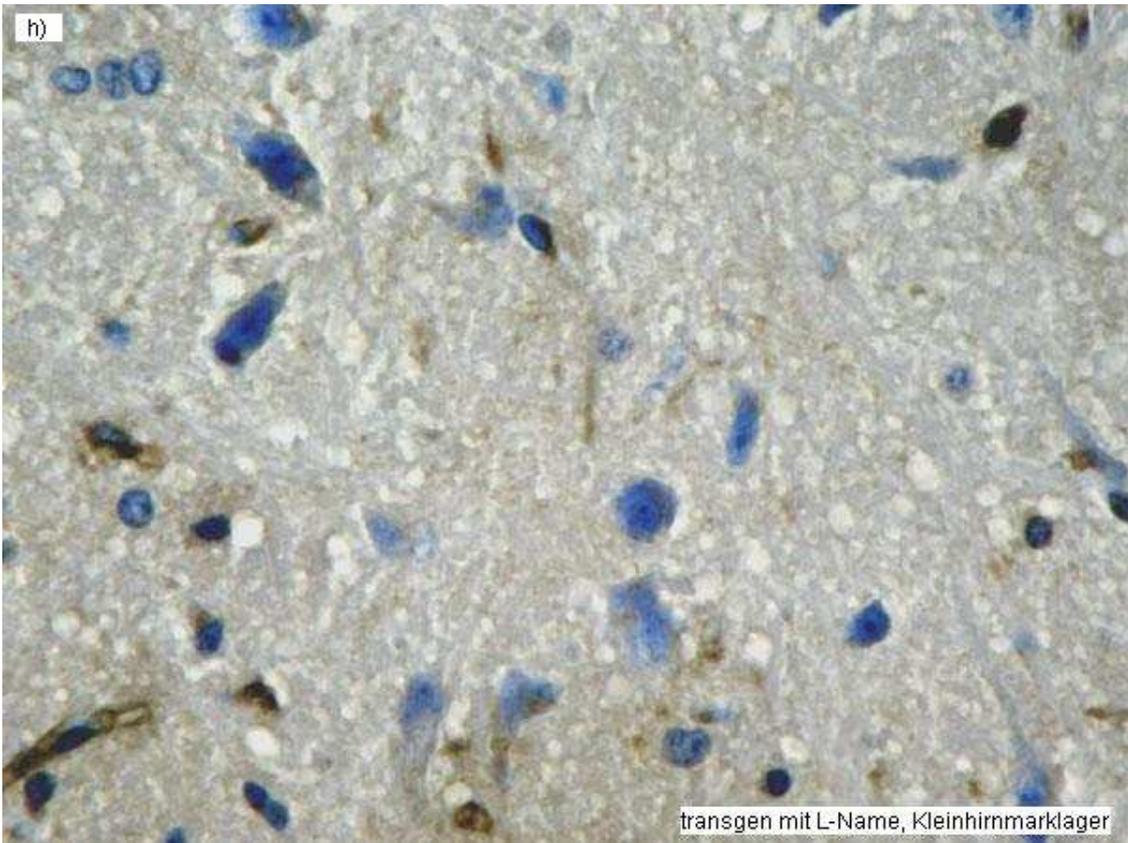
Bei den transgenen Mäusen hatten die Mikrogliazellen einiger Tiere nur fein-verzweigte Fortsätze, andere Tiere zeigten vor allem im Hirnstamm und Kleinhirnmarklager, vereinzelt auch im Hypothalamus, Thalamus, Striatum und Kortex, Mikrogliazellen mit kürzeren, verdickten Fortsätzen. Am deutlichsten war diese Reaktion bei den L-Name behandelten, transgenen Tieren. Zwar waren auch hier in bestimmten Bereichen wie dem Hippocampus hauptsächlich ramifizierte Mikrogliazellen vorhanden, aber insgesamt war die Anzahl der Zellen mit kurzen, verdickten Fortsätzen größer als bei den anderen Gruppen und das Ausmaß der Zellveränderungen deutlicher ausgeprägt. Die Mikrogliazellen der mit L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tiere hatten wiederum feine, dünne, stark verzweigte Fortsätze. Auch die Gesamtzahl der markierten Mikrogliazellen dieser Tiere war eher gering. Bei den LacZ-Tieren ließ sich aufgrund der starken Gefäßmarkierung, der hohen Anzahl von Gefäßanschnitten und der insgesamt ausgeprägten Hintergrundfärbung die Mikrogliamorphologie nur schlecht beurteilen. Es waren nur sehr wenige Mikrogliazellen zu identifizieren, sie hatten aber, soweit beurteilbar, fein-verzweigte Fortsätze und waren nicht aktiviert.

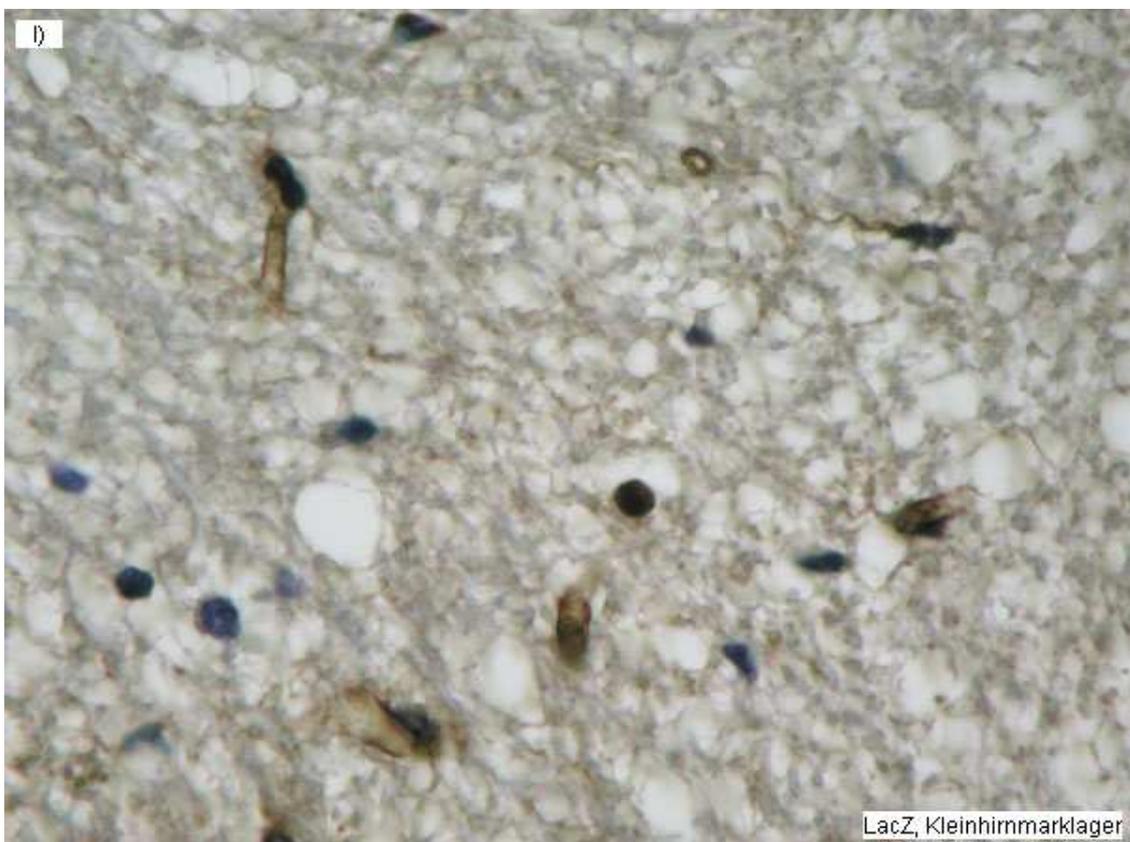
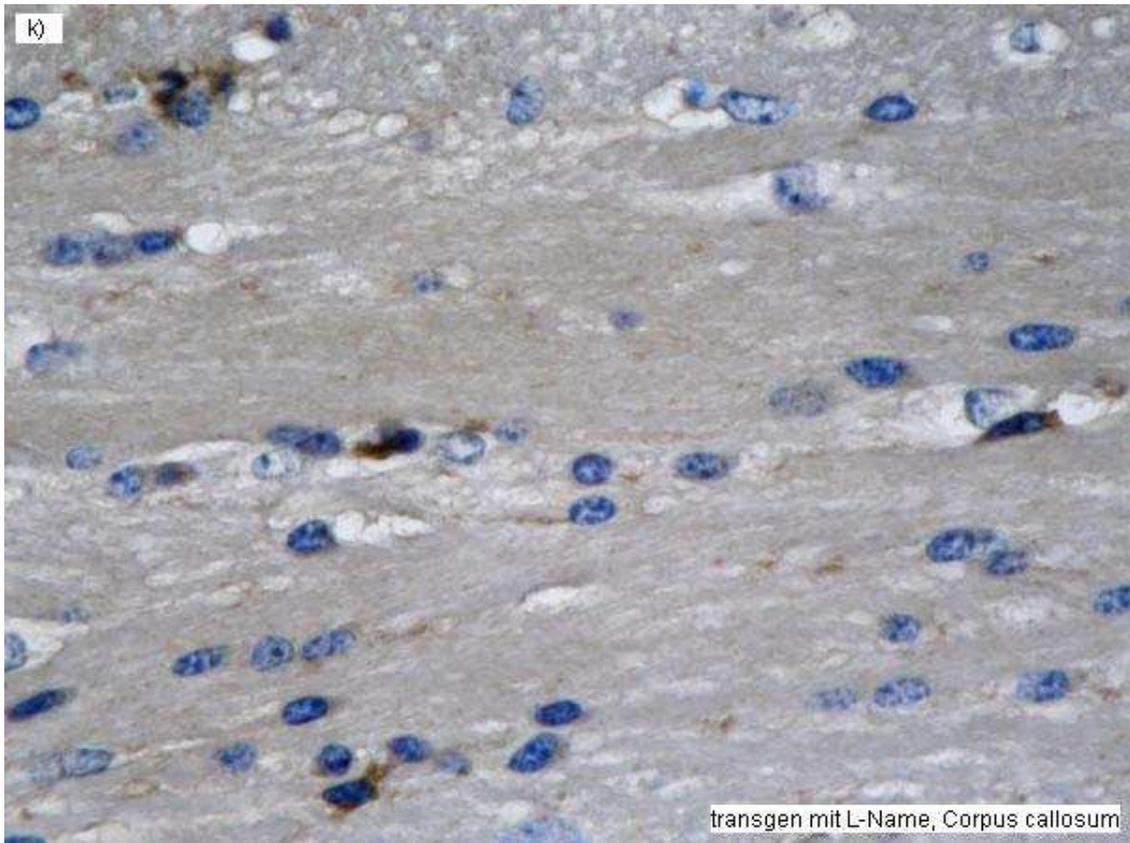












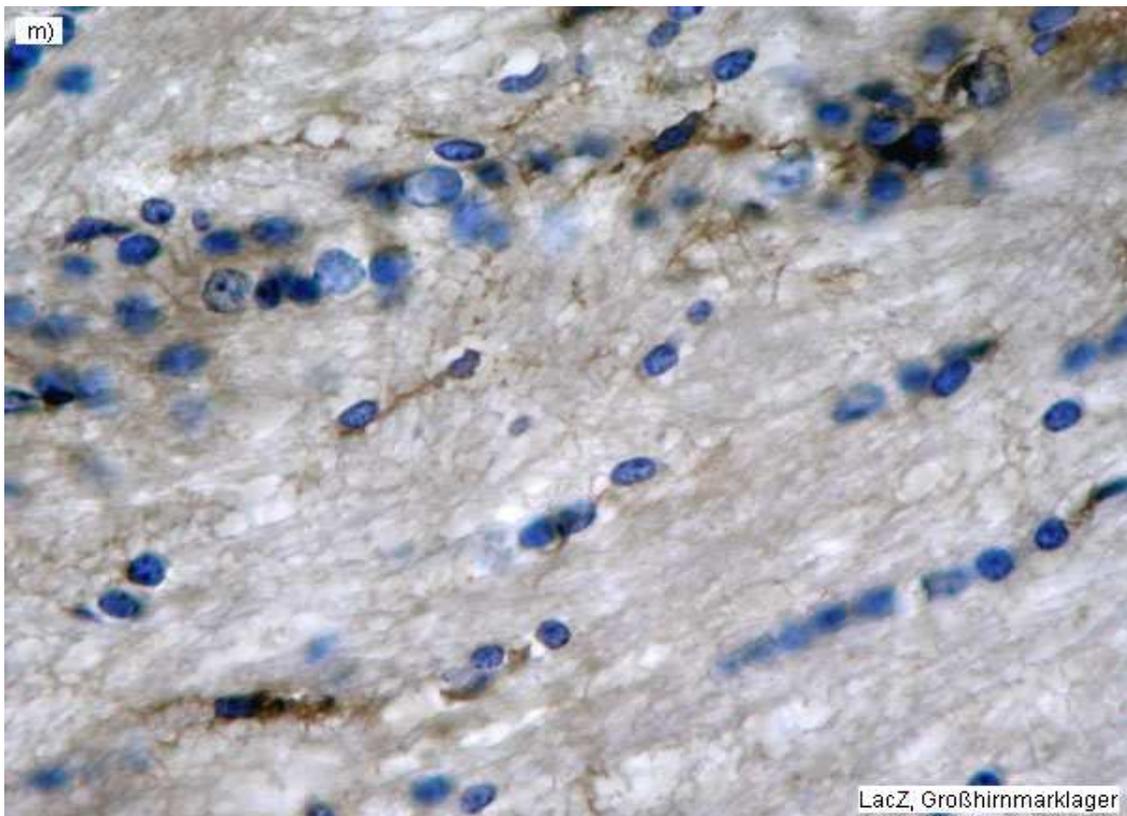


Abb.28 Darstellung der Mikrogliamorphologie mit Tomato Lektin-Markierung bei einer Vergrößerung von 40x10x2. Tomato Lektin markiert neben den Mikrogliazellen auch Gefäße und gelegentlich granuläre Strukturen im Zytoplasma von Neuronen.

- a) Markierte Mikrogliazellen im Kleinhirnmarklager eines Kontrolltiers. Neben Zellen mit feinen Fortsätzen sieht man auch Fortsätze von Zellen, deren Nukleus in einer anderen Schnittebene liegt.
- b) Markierte Mikrogliazellen im Striatum eines Kontrolltiers. Die meisten Zellen haben auch hier feine Fortsätze, vereinzelt kommen auch etwas plumpere Zellen vor.
- c) Markierte, fein-verzweigte Mikrogliazellen in der Commissura anterior des Großhirns eines Kontrolltiers.
- d) Aktivierte Mikrogliazellen im Hirnstamm eines transgenen Tiers.
- e) Markierte Mikrogliazellen im Kleinhirnmarklager eines transgenen Tiers mit kurzen, verdickten Fortsätzen.
- f) Aktivierte Mikrogliazellen im Striatum eines transgenen Tiers. Vereinzelt sind auch Zellen mit etwas feineren Fortsätzen zu sehen.
- g) Aktivierte Mikrogliazellen im Großhirnmarklager eines transgenen Tiers. Auch hier haben einzelne Zellen noch feine Fortsätze.
- h) Im Kleinhirnmarklager dieses mit L-Name behandelten, transgenen Tieres sind deutlich plumpere Mikrogliazellen zu sehen. Die Fortsätze sind nur noch sehr kurz und dick.
- i) Bei diesem mit L-Name behandelten, transgenen Tier sind im Striatum neben einzelnen relativ verzweigten Mikrogliazellen vor allem eine Mikrogliazelle mit deutlichen, dicken Fortsätzen und ein Zellhaufen aus mehreren Mikrogliazellen (ein Zeichen der Aktivierung) auffällig.
- k) Aktivierte Mikrogliazellen im Corpus callosum eines mit L-Name behandelten, transgenen Tiers.
- l) Markierung mehrerer Gefäße und einiger fein-verzweigter Mikrogliazellen im Kleinhirnmarklager eines LacZ-Tiers.
- m) LacZ-Tier mit Mikrogliazellen mit fein-verzweigten Fortsätzen im Großhirnmarklager.