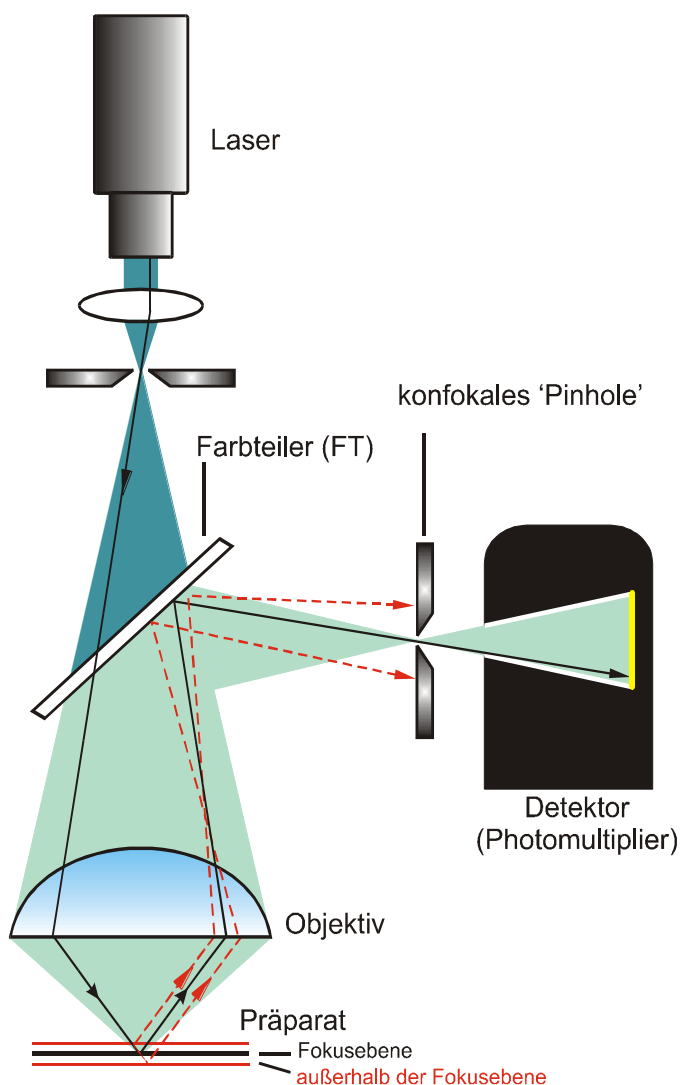


2.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Präparate (Zellkulturen und Hirnschnitte) wurden an einem konfokalen Laserscanmikroskop (LSM 410, Carl Zeiss, Jena) ausgewertet und ein 40x bzw. 100x Ölimmersionsobjektiv verwendet. Für Cy-2 markierte Proben wurden eine Anregung von 488 nm und ein Emissions-Bandpassfilter von 515 - 565 nm, für Cy-5 markierte Proben eine Anregung von 633 nm und ein Emissions-Langpassfilter von 665 nm verwendet. Jeder Bildkanal eines Präparats wurde separat als Graustufenbild aufgenommen (Pinhole 40) und mittels der RGB-Kodierung (Rot-Grün-Blau) dann jedem Kanal eine der drei Farben zugewiesen. Die so entstandenen Farbbilder wurden mit Corel Draw 8.0 weiterbearbeitet und mit einem Tintenstrahldrucker (Epson Stylus Color 600) ausgedruckt.



Übersicht 7: Bei der konfokalen Laserscanmikroskopie (LSM) wird ein Laserstrahl durch einen Farbbeiter, der ab einer festgelegten Wellenlänge das Licht nicht mehr hindurchläßt sondern reflektiert, auf das Präparat gelenkt. Die angeregten Fluorochrome emittieren dann Licht einer höheren Wellenlänge, das vom Farbbeiter in Richtung Detektor (Photomultiplier, eine Art hochentwickelter Photodiode) reflektiert wird. Die für die konfokale Mikroskopie entscheidene Rolle des ‚Pinholes‘, besteht darin, die in der Übersicht rot gezeichneten Strahlengänge herauszufiltern. So ist es möglich, virtuelle optische Schnitte in der z-Ebene eines Präparats zu erhalten, da die außerhalb der Fokusebene liegenden Bildinformationen (die jedoch in der konventionellen Mikroskopie immer sichtbar sind) nicht mit abgebildet werden. In der Zeichnung ist die Detektion eines Punktes des mikroskopischen Bildausschnitts schematisch erfaßt. Der Bildausschnitt als Ganzes wird durch punktweises ‚scannen‘ visualisiert, wobei durch Ablenkung des Laserstrahls in der xy-Ebene 1024 x 1024 Bildpunkte einzeln nacheinander angesteuert und detektiert werden.

2.10 Immunhistochemie

Mit einem Gefriermikrotom (Leica Frigocut 2800E, Leica/Jung, Nussloch) erfolgte nach Befestigung der tiefgefrorenen Hirne auf einem Objekthalter (Einbettmedium der Fa. Leica/Jung, Nussloch) die Herstellung der frontalen Kryoschnitte (20 μ M), die sofort in eiskaltes PBS überführt wurden (Objekttemperatur $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, Boxtemperatur $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach zweimaligem Waschen (PBS, je 10 min) wurden die Kryoschnitte für 30 min in der Blocklösung (3 % ZNS in PBS + 0,3 % Triton) inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper (in PBS + 1 % ZNS) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, nach 3 Waschschritten (PBS, je 10 min) die sekundären Antikörper (in PBS, ebenfalls über Nacht), gefolgt von 3 Waschschritten (PBS, je 10 min). Anschließend wurden die Kryoschnitte auf Objektträger aufgezogen, mit einem Tropfen Immunomount bedeckt und ein Deckglas aufgelegt.

Primäre Antikörper

Protein	Spezies	Host	Verdünnung	Firma
iNOS	Ratte	Kaninchen	1 : 1.500	UBI, über Biozol, Echingen
Cu/Zn-SOD	Ratte	Kaninchen	1 : 200	Dr. Asayama, Yamanashi, Japan
Mn-SOD	Ratte	Kaninchen	1 : 200	Dr. Asayama, Yamanashi, Japan
GPx	Ratte	Kaninchen	1 : 100	Dr. Asayama, Yamanashi, Japan
Katalase	Ratte	Kaninchen	1 : 2.000	Rockland, über Biotrend, Köln
CD11b/c	Ratte	Maus	1 : 800	PharMingen, Hamburg
GFAP	Ratte	Maus	1 : 40	Boehringer Mannheim, Mannheim

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Host	Verdünnung	Firma
Cy2-Anti-Rabbit IgG [H+L]	Goat	1 : 400	Dianova, Hamburg
Cy2-Anti-Mouse IgG [H+L]	Goat	1 : 400	Dianova, Hamburg
Cy5-Anti-Rabbit IgG [H+L]	Goat	1 : 400	Dianova, Hamburg
Cy5-Anti-Mouse IgG [H+L]	Goat	1 : 400	Dianova, Hamburg
POD-Anti-Rabbit IgG [H+L]	Goat	1 : 10.000	Dianova, Hamburg
POD-Anti-Mouse IgG	Goat	1 : 1.000	Boehringer Mannheim, Mannheim

2.11 In Vivo - Messungen Freier Radikale

DCF-H-Lösung

Kommerziell erhältliches DCFH-DA (Molecular Probes, über MoBiTec, Göttingen) wurde durch alkalische Hydrolyse zu DCF-H deacetyliert (Cathcart, Schwiers et al. 1984). Zu einer 1 mM DCFH-DA Lösung in Methanol (0,5 ml) wurden 2 ml 0,1 M NaOH gegeben und bei 25 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7,5 ml 0,1 M PB gestoppt. Die Endkonzentration beträgt dann rechnerisch 50 µM DCF-H.

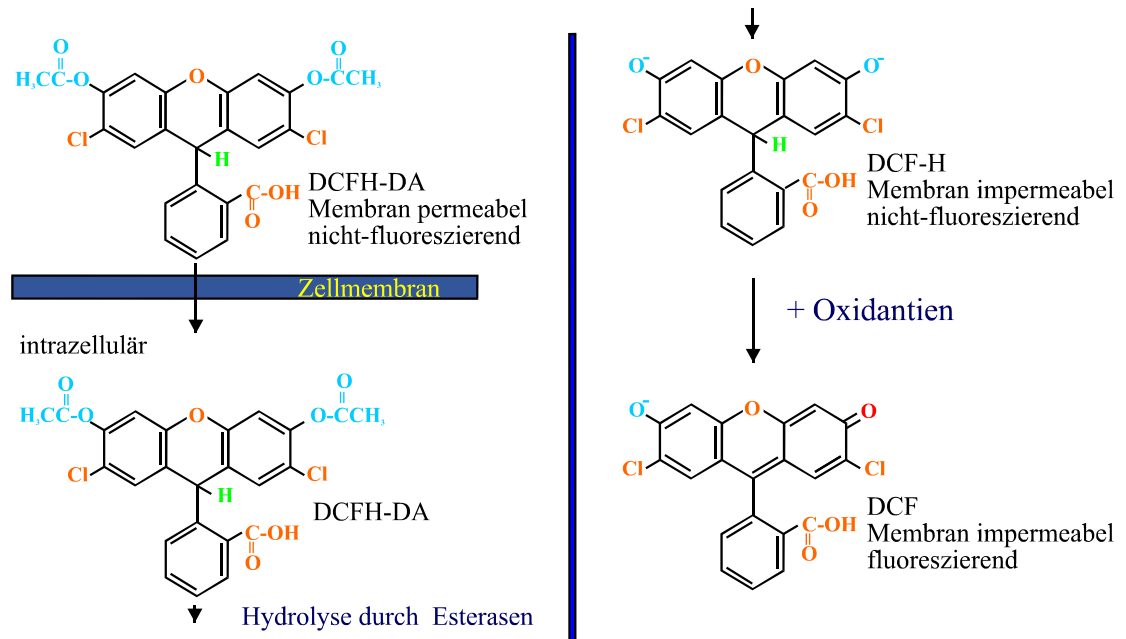
Peroxyinitrit-Lösung

Die Synthese des Peroxyinitrits erfolgte nach der Methode von Beckman et al. (1994) und wurde freundlicherweise von Christoph Riethmüller durchgeführt. Verbleibendes Wasserstoffperoxid wurde durch Zugabe von granulärem Mangan(IV)-oxid entfernt und die Konzentration jeder Charge am Spektrometer Lambda 2 (Perkin Elmer, Weiterstadt) bei 302 nm bestimmt.

Stickoxid-Lösung

Eine gesättigte (2 mM) Stickoxid-Lösung wurde hergestellt, indem gasförmiges Stickoxid durch zuvor mit Argon gespültes Wasser geleitet und anschließend die Ampulle sofort versiegelt wurde. Die Ampulle wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 6 Stunden verwendet.

Auf runden Deckgläsern gewachsene Zellkulturen wurden mit 50 µM DCFH-DA im Überstand (Übersicht 8) für 60 min im Brutschrank beladen. Nach einem Waschschrift mit modifizierter Locke's Lösung wurden die Deckgläser in einer Attofluor-Kammer (Molecular Probes, über MoBiTec, Göttingen) befestigt, mit 500 µl Locke's Lösung bedeckt und die Kammer auf einem beheizten (37 °C) Mikroskopisch montiert. Für zellfreie Versuche wurde dieselbe Kammer mit 500 µl Locke's Lösung verwendet (für Peroxyinitrit Versuche wurde die Pufferkapazität von 20 mM auf 100 mM HEPES erhöht). Die verschiedenen Oxidantien wurden anschließend bei laufender Messung in die Kammer pipettiert.



Übersicht 8: Prinzip der DCFH-DA Oxidation

Die Messungen wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop durchgeführt (Pinhole 100, 40x Ölimmersionsoberktiv). Da DCF-H extrem empfindlich gegenüber einer durch Licht induzierten Oxidation ist, wurde die Laserabschwächung auf 1/300 eingestellt und mit einer Scanzeit von nur 1 s gearbeitet (10 - 60 s Intervalle). Bei einer Anregung mit dem 488 nm Laser und einem Emissions-Langpassfilter (510 LP) wurden die geeigneten Kontrast- und Helligkeitseinstellungen ermittelt. Zeitserien und Einzelbilder wurden mit der gerätespezifischen Software der Firma Carl Zeiss (LSM 3.8) aufgenommen und ausgewertet. Die digitalisierten Daten wurden zur Darstellung und statistischen Analyse mit Sigma Plot weiterbearbeitet.

Zur Stimulation mit dem Phorbolster PMA wurden 100 µl Medium aus der Attofluor-Kammer entnommen, mit 1 µl einer 0,5 mM PMA-Lösung (in DMSO) versetzt und vorsichtig zwischen den Messungen in die Kammer pipettiert. Die verschiedenen Testsubstanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen, in der Regel zusammen mit DCFH-DA, für 1 h inkubiert und anschließend je 5 Ausschnitte pro Kulturschale aufgenommen.

2.13 Fluorometrie

DCF-H (100 µM in PBS) wurde mit Wasserstoffperoxid (1 mM) über einen Zeitraum von 6 h bei 37 °C zu DCF oxidiert. Überschüssiges Wasserstoffperoxid wurde anschließend mittels

granulärem Mangan(IV)-oxid entfernt. Die Fluoreszenz des oxidierten DCF wurde dann am Fluorimeter (LS50-B, Perkin Elmer, Weiterstadt) vor und nach Zugabe reduzierender Substanzen im Abstand von 60 s gemessen (Anregungswellenlänge 488 nm, Slit 5 nm; Emissionswellenlänge 510 nm, Slit 5 nm).

2.14 Statistische Analyse

Die dargestellten Gruppenmittelwerte wurden als arithmetisches Mittel berechnet und jeweils \pm (bzw. +) SEM (Standardabweichung der Mittelwerte, engl.: standard error of the mean) angegeben. Der Gruppenumfang n entsprach der Anzahl der verwendeten Kulturen bzw. Einzelzellen. Bei der Analyse wurden Kulturschalen (bzw. Zellen mehrerer Kulturschalen) zusammen ausgewertet, ohne Rücksicht auf unterschiedliche ‚Kultur-Chargen‘. Zur Überprüfung eines Unterschiedes der Mittelwerte kam der ungepaarte Students t-Test zur Anwendung. Eine statistische Signifikanz wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) angenommen.