

2.3 Zellkultur

Primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen (Schousboe 1980) wurden von 2 - 3 Tage alten Ratten gewonnen und 14 Tage im Brutschank (37 °C, 5 % CO₂) gehalten. Als Medium wurde DMEM (+ 4,5 g/l Glucose) mit 10 % FKS (Gibco, Karlsruhe) verwendet, und die Kulturen (bei einer Zelldichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml) wuchsen auf Poly-D-Lysin-beschichteten runden Deckgläsern (#1, 25 mm Durchmesser) in 35 mm Petrischalen (Nunc, Wiesbaden). Die Kulturen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Keilhoff und Frau Bück zur Verfügung gestellt.

Durch Zugabe von 100 U IFN (Stammlösung 20.000 U/ml) und 4 µg LPS (e. coli, Stammlösung 1,66 mg/ml) pro ml Kulturmedium für 18 h wurden primäre Mikro-/Astroglia-Mischkulturen zur Expression der iNOS angeregt. Einige Kulturen wurden zusätzlich mit den NOS-Inhibitoren L-NAME (1 mM) oder NIL (0,5 mM) behandelt (Moore, Webber et al. 1994). Alle zugegebenen Substanzen wurden in sterilem PBS angesetzt und bei der L-NAME- und NIL-Lösung zusätzlich der pH auf 7,4 eingestellt. Zur Manipulation der intrazellulären GSH-Konzentration wurden die Kulturen (teilweise parallel zur iNOS-Induktion) mit einem spezifischen Hemmstoff der Gamma-Glutamylcysteine-Synthetase behandelt (BSO, 60 µM für 24 h).

Zellkulturen wurden gewaschen, mit Fixans für 15 min fixiert und nach 3 Waschschritten (PBS, je 5 min) mit der Blocklösung (3 % ZNS in PBS + 0,3 % Triton) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper (in PBS + 1 % ZNS) über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach 3 Waschschritten (PBS, je 10 min) die sekundären Antikörper (in PBS) ebenfalls über Nacht inkubiert, gefolgt von 3 Waschschritten (PBS, je 10 min). Die Deckgläser wurden dann kopfüber auf einem Objektträger, auf dem zuvor ein Tropfen Immunomount aufgebracht wurde, montiert.

2.4 LDH-Bestimmung

Der Austritt der LDH (Laktatdehydrogenase) aus den Zellen in den Kulturüberstand (durch beschädigte Zellmembranen) gilt als Maß der Zellschädigung. Aus den untersuchten Zellkulturen wurden 100 µl Medium entnommen und entsprechend der Vorschrift (s. u.)

bearbeitet. Für die Bestimmung der Gesamt-LDH wurden unbehandelte Kontrollkulturen verwendet. Nach Abgiessen des Zellkulturmediums wurde das Material in 100 μ l (50 mM Phosphatpuffer) aufgenommen und entsprechend der Vorschrift (s. u.) bearbeitet. Die LDH-Aktivitätsbestimmung beruht auf der von der LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat in Laktat, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Abnahme des NADH läßt sich spektrometrisch bei 340 nm beobachten (Wahlefeld 1983).

Reaktionsgemisch

- 1,25 g Pyruvat
- 40 mg NADH
- in 10 ml Phosphatpuffer

Reaktion

- 880 μ l Puffer
- 100 μ l Probe
- 20 μ l Reaktionsgemisch
- 10 min E 340 messen

2.5 Intrastriatiale Injektion von LPS/IFN

Für diese Versuche wurden männliche, adulte Wistar-Ratten (Tierzucht Schönwalde, Schönwalde) mit einem Gewicht von 230 - 280 g verwendet. Die Tiere wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzes gehalten und behandelt. Nach Betäubung durch eine intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (525 mg/kg, in physiologischer Kochsalzlösung) wurden die Ratten in einem stereotaktischen Gestell (Stoelting, IL, USA) fixiert. Bregma und Lambda wurden durch Veränderung der Nasenhöhe eingestellt. Ausgehend vom Bregma wurde mit einem Zahnarztbohrer TZ 401 (1,2 mm, MLW Dentalfabrik, Trettfurt) ein Loch in das rechte Os frontale gebohrt (Koordinaten: 1 mm anterior; 2,6 mm lateral). Die Dura mata wurde mit einer Pinzette durchtrennt und die Injektionskanüle (umgebaute Mikrodialysesonde, 11,3 mm, Fa. CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden) nach der Positionierung über der Mitte des Loches vorsichtig 4,8 mm (ab Schädeldecke) abgesenkt. Die Injektion von 2 µl einer sterilen LPS/IFN Lösung (3 µg LPS + 16 U IFN pro µl in PBS) erfolgte durch eine mit der Injektionskanüle durch einen Schlauch verbundene 10 µl Hamiltonspritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), die in eine Mikroinjektionpumpe (CMA-100, Fa. CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden) eingespannt war (Flußrate 1µl/min). Die Kanüle wurde 2 min nach Beendigung der Injektion vorsichtig entfernt, die Hautwunde mit 2 Wundklammern fixiert und dann in den Käfig transferiert, wo sie bis zum Aufwachen beobachtet wurden.

Nach einem Tag Überlebenszeit wurden die Tiere in einer gesättigten Ether-Atmosphäre betäubt, mit Injektionskanülen auf einer Wachsplatte fixiert und nach Öffnung des Thorax das Herz freigelegt. Mit einer Feinschere wurde die linke Herzkammer eingeschnitten und eine Knopfkanüle durch das Herz bis an den Beginn der Aorta ascendens eingeführt und dort fixiert. Durch über einen Schlauch mit der Knopfkanüle verbundene Peristaltikpumpe (Cyclo I, Carl Roth, Karlsruhe) wurden zunächst 50 ml physiologische Kochsalzlösung infundiert (und mit Beginn der Perfusion die rechte Herzkammer aufgeschnitten) und dann 300 ml Fixans (40 ml/min). Anschließend wurde das Hirn vorsichtig herauspräpariert und zur Nachfixierung über Nacht bei 4 °C in der Fixationslösung aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Hirn zur Kryoprotektion in eine 30%ige Sucroslösung (in PBS) überführt und bis zum Absinken (in der Regel 1 bis 2 Tage) bei 4 °C aufbewahrt. Das Hirn wurde dann in einem Metallbehälter plaziert und dieser für 5 min in flüssigen Stickstoff getaucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das schockgefrorene Hirn bei -20 °C gelagert.