

Aus dem
Lehrstuhl für Neuroanatomie, Anatomische Anstalt
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz

**Morphologische Veränderungen von Mikroglia in der Frühphase
eines Multiple Sklerose Tiermodells**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sophie Maria Hanusch

aus
Kiel

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp
Mitberichterstatter Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
Prof. Dr. Frank Weber

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2025

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	3
II Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Die Multiple Sklerose	7
1.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Multiplen Sklerose	8
1.3 Die Rolle von Mikrogliazellen in der Multiplen Sklerose	9
1.4 Analysen der Mikrogliazellmorphologie: Sholl-Analyse und Ramification Index	10
1.5 Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien und Chemikalien	13
2.2 Antikörper	14
2.3 Lösungen, Puffer und Blockserum	15
2.4 Versuchsaufbau	16
2.5 Versuchstiere	16
2.5.1 Fütterung	16
2.6 Transkardiale Perfusion und Präparation	17
2.6.1 Durchführung transkardiale Perfusion	17
2.6.2 Paraffineinbettung und Schneiden der Gehirne	18
2.7 Immunhistochemische Färbung	20
2.7.1 Durchführung Färbungen	21
2.8 Auswahl der Mikrogliazellen	24
2.9 Rekonstruktion der Mikrogliazellen in Neurolucida 360	26
2.9.1 Methodische Durchführung	26
2.9.2 Analyse in Neurolucida Explorer	45
2.10 Rekonstruktion der Mikrogliazellen in ImageJ	50
2.10.1 Methodische Durchführung	51
2.10.2 Analyse in ImageJ	54
2.11 Statistische Auswertung	56
3. Ergebnisse	57
3.1 Sholl-Analyse	59

3.2 Neuron Summary	62
3.3 Ramification Index	65
4. Diskussion und Ausblick	67
5. Zusammenfassung	75
III Abbildungsverzeichnis	78
IV Tabellenverzeichnis	79
V Literaturverzeichnis	80
VI Eidesstattliche Versicherung	85
VII Danksagung	86

II Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
%	Prozent
° C	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	Corpus callosum
cm ²	Quadratcentimeter
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ED	Enzephalomyelitis disseminata
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
et al.	et alia
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm
HIER	heat induced epitope retrieval
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase)
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
ms	Millisekunde
m ³	Kubikmeter
n	Number (Anzahl)
PBS	Phosphatpufferlösung
pH	Potenzial des Wasserstoffs
PPMS	primär-progrediente MS (engl. primary-progressive MS)
RI	Ramification Index
ROI	region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS)

SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
sog.	sogenannt
SPMS	sekundär-progrediente MS (engl. secondary-progressive MS)
USA	United States of America
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer
μm^3	Kubikmikrometer

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist die häufigste Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit über zwei Millionen Betroffenen weltweit [1]. Sie ist eine Erkrankung des jungen Erwachsenen und betrifft Frauen doppelt bis dreimal so häufig wie Männer [1]. Erste Symptome äußern sich in Schwindel, Erschöpfung, Sehstörungen sowie sensiblen und motorischen Ausfällen der Extremitäten mit Fortschreiten in gravierendere Symptome wie Ataxie, Paraparesen, Spasmen der Extremitäten und kognitive Defizite [2]. Klinisch unterscheidet man zwei Formen der MS: die primär progrediente MS (PPMS), bei der es ab Symptombeginn zu einem kontinuierlichen Verlauf und Akkumulation der neurologischen Ausfälle kommt, sowie die schubförmige MS (RRMS), bei der sich die Symptome teilweise zurückbilden und die sich im Verlauf bei zunehmend bleibenden neurologischen Defiziten in die sogenannte sekundär progrediente Form (SPMS) entwickelt [3].

Während eines akuten Schubes bei der MS kommt es zu fokalen Läsionen in der weißen Substanz des ZNS, welche durch Demyelinisierung, den Untergang von Axonen und der Einwanderung von Zellen des peripheren Immunsystems gekennzeichnet sind [4]. Eine verlangsamte Weiterleitung von Aktionspotenzialen nach Demyelinisierung der Axone resultiert in einer eingeschränkten neuronalen Funktion der betroffenen Bereiche mit Auftreten von neurologischen Symptomen bei MS-Erkrankten [4]. Durch die fokalen inflammatorischen Läsionen im ZNS kommt es zusätzlich zu ödematösen Veränderungen in diesen Bereichen [4]. Es kommt zu einer prinzipiell reversiblen Kompression von Nervenbahnen, was wiederum die verminderte Weiterleitung von Aktionspotenzialen der Axone verstärkt [4]. Der Untergang von Axonen im Rahmen eines akuten Schubes führt zu irreversiblen klinischen Ausfällen. Akute Axonschäden müssen aber nicht zu einem Untergang führen. Experimente haben gezeigt, dass sich Axone von akuten Schäden erholen können [5]. All diese Faktoren spielen eine Rolle im Hinblick auf die teils vollständige Rückbildung von klinischen Symptomen nach akuten Schüben bei MS.

Histopathologische Untersuchungen der betroffenen weißen Substanz haben gezeigt, dass auch die Bereiche um die eigentlichen, akuten, inflammatorischen Läsionen von Veränderung betroffen sind [4]. Es kommt durch die genannten Mechanismen u.a. zu Mikrogliazellaktivierung, Fibrosen der Gefäße sowie perivaskulären Ansammlungen von Immunzellen und Schäden der Blut-Hirn-Schranke [4]. Entsprechend ist der von einer Demyelinisierung betroffene Bereich der weißen Substanz deutlich größer und diffuser, als die eigentliche akute Läsion [6]. Die diffusen Schäden der eine Läsion umgebenden Hirnareale korreliert gleichzeitig mit einer diffusen kortikalen Demyelinisierung [6]. Die fortschreitende, diffuse Neurodegeneration der weißen und grauen Substanz des ZNS bestimmt den klinischen Verlauf der MS mit bleibenden und im Verlauf der Erkrankung zunehmenden neurologischen Ausfällen im Sinne eines letztendlich progredienten klinischen Krankheitsverlaufs [7].

1.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Multiplen Sklerose

In der Wissenschaft werden unterschiedliche Tiermodelle genutzt, um die verschiedenen Komponenten der MS zu untersuchen.

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (engl.: experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) ist das am häufigsten zur Untersuchung der MS herangezogene Tiermodell und wird seit über 90 Jahren in diesem Bereich angewendet [8]. Mit diesem Modell wird die inflammatorische Komponente mit hieraus resultierender Demyelinisierung und Axonverlust in der weißen Substanz des Gehirns imitiert. Versuchstiere erhalten eine Injektion mit Proteinen, welche in den tiereigenen Myelinscheiden zu finden sind. Sie lösen in den Versuchstieren eine Autoimmunreaktion aus. Es kommt zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten, die in das ZNS einwandern und letztendlich zu einem, insbesondere axonalen, Untergang vor allem im Rückenmark, dem Kleinhirn und dem Nervus opticus führen [4].

Das Cuprizone-Modell als toxisches Tiermodell ermöglicht es, primär demyelinisierende Schäden des ZNS ohne T-Zell-Aktivierung zu betrachten [9]. Cuprizone (engl.: oxalic acid bis(cyclohexylidene hydrazide)) ist ein Kupfer-Chelatbildner. Er wurde in den 1950er Jahren erstbeschrieben und fand als toxischer Stoff in den 1960er Jahren erste Anwendung in

Experimenten [10, 11]. Die Demyelinisierung im Cuprizone-Modell entsteht durch die Degeneration von Oligodendrozyten selbst, nicht durch den primären Untergang ihrer Myelinscheiden [12]. Wenngleich der genaue Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, geht man davon aus, dass Cuprizone in Mitochondrien Enzyme der Atmungskette inhibiert [4]. Die betroffenen Oligodendrozyten gehen unter, was eine lokale Mikrogliazellaktivierung und anschließende Einwanderung von T-Zellen sowie ödematöse Veränderungen bewirkt [4, 13, 14]. Diese Reaktion auf das Cuprizone-Toxin ist nach zwei Tagen der Zufütterung bereits nachweisbar [15]. Betroffen von der Demyelinisierung sind typischerweise Regionen der weißen Substanz, unter anderem das Corpus callosum (CC), als auch Regionen in der grauen Substanz [4, 16, 17]. Insgesamt wird Cuprizone zwischen fünf und zwölf Wochen zugefüttert, um die Pathophysiologie der akuten und chronischen Demyelinisierung zu untersuchen [12]. Wird die Zugabe nach vier bis fünf Wochen beendet, kann nach der akuten Demyelinisierungsphase auch eine Remyelinisierung der betroffenen Hirnregionen festgestellt und untersucht werden [18].

1.3 Die Rolle von Mikrogliazellen in der Multiplen Sklerose

Mikrogliazellen wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts von Pio del Rio-Hortega entdeckt und erstbeschrieben [2]. Sie sind die Immunabwehrzellen des ZNS und die ersten Zellen, die auf feinste Veränderungen in der zentralnervösen Umgebung wie z.B. Pathogene, Stress, Verletzungen oder andere Schäden reagieren [2]. Diese Faktoren lösen eine Mikrogliazellaktivierung aus [19]. Hierbei kommt es zu morphologischen Veränderungen dieser Zellen, die immunhistochemisch sichtbar gemacht und quantifiziert werden können. Dies erfolgt oft über die histochemische Färbung des sogenannten ionisierten calciumbindenden Adaptermolekül IBA-1 (engl.: ionized calcium binding adapter molecule 1), das ausschließlich von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert wird [20]. Vollständig aktivierte Mikrogliazellen sind dann in der Lage, durch das Hirngewebe zu wandern [19]. Nach Torres-Platas et al. [19] können vier morphologische Typen von Mikrogliazellen unterschieden werden. Die verzweigte (engl.: ramified) Mikrogliazelle befindet sich im ruhenden Zustand und stellt sich mit einem kleinen Zellkörper (Soma) und mehreren, stark verzweigten Fortsätzen dar, mit denen sie ihre Umgebung prüft. Die gerüstete (engl.: primed) Mikrogliazelle weist ähnlich viele, aber insbesondere distal weniger stark verzweigte

Fortsätze auf. Reaktive (engl.: reactive) und amöboide (engl.: amoeboid) Mikrogliazellen sind an einem amöbenartigen Zellkörper zu erkennen. Die reaktive Mikrogliazelle hat kurze Fortsätze, die aber länger als der Zellkörperdurchmesser sind. Amöboide Mikrogliazellen weisen entweder keine Fortsätze mehr auf oder maximal zwei unverzweigte kurze, die die Länge des Zellkörperdurchmessers nicht überschreiten (Abbildung 1).

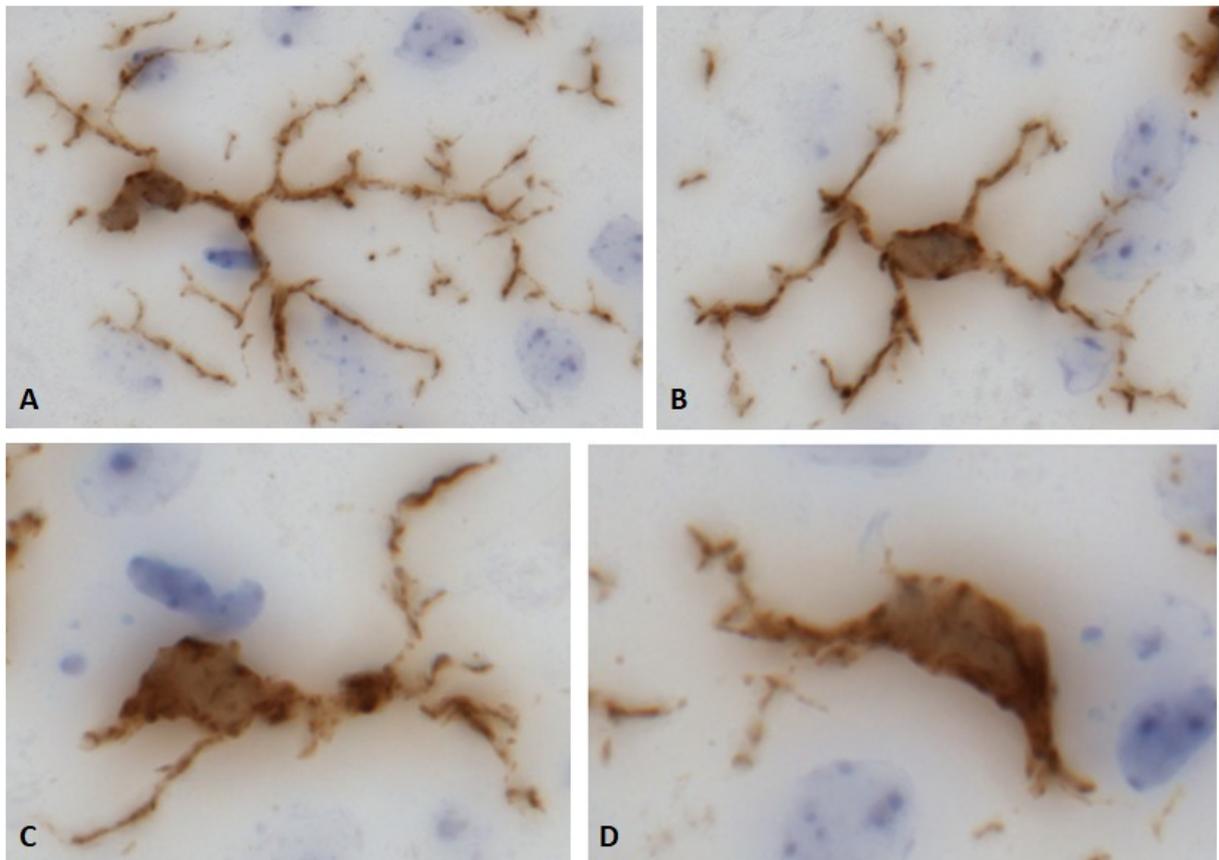


Abbildung 1: IBA1-immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Mikrogliazellen (5 μm Schnittdicke) verschiedener Aktivierungsstadien; **A:** verzweigt; **B:** gerüstet; **C:** reaktiv; **D:** amöboid

1.4 Analysen der Mikrogliazellmorphologie: Sholl-Analyse und Ramification Index

Die Morphologie der verschiedenen Zellen im ZNS zeigt eine große Diversität sowie eine große Varianz innerhalb dieser Zelltypen, je nach Spezies, Entwicklung und Aktivierung [21]. Eine häufig verwendete und etablierte Möglichkeit der Analyse von Zellmorphologien ist die Sholl-Analyse, die von Donald Sholl 1953 entwickelt wurde [22]. Sie dient der Quantifizierung der Komplexität von Dendriten einer Zelle und kann damit zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen einer Zelle durch verschiedene Pathologien herangezogen

werden [21]. In der Sholl-Analyse werden ausgehend vom Zentrum des Zellkörpers konzentrische Kreise bzw. Sphären mit zunehmendem Radius über eine Zelle gelegt [21]. Die Kreise bzw. Sphären haben einen gleich groß gewählten Abstand zueinander. Innerhalb dieser Abstände können dann die darin liegenden Dendritenabschnitte nach verschiedenen Parametern ausgewertet werden. Insbesondere wird die Anzahl gezählt, mit welcher Häufigkeit Dendriten einen Kreis bzw. eine Sphäre kreuzen, sog. „Intersections“ [21]. Die Sholl-Analyse ist damit eine gute Möglichkeit, komplexe dreidimensionale Zellmorphologien durch eine eindimensionale Ansicht einer Zelle zu quantifizieren [21].

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung von Mikrogliazellmorphologien ist der sogenannte Ramification Index (RI) [23]. Hierbei wird im zweidimensionalen Raum die maximale Projektionsfläche durch die Zellfläche bei exakter Umrandung der Zelle geteilt [23]. Die maximale Projektionsfläche ist die Fläche, die entsteht, wenn man alle maximal vom Zellkörper entfernten (prominentesten) Punkte um die Zelle polygonal miteinander verbindet [23]. Wie Becker et al. [23] zeigen konnten, haben verzweigte (engl. „ramified“) Mikrogliazellen eine große maximale Projektionsfläche bei im Vergleich dazu geringer Zellfläche. Im Gegensatz dazu haben aktivierte Mikrogliazellen eine kleine maximale Projektionsfläche bei kleiner Zellfläche, also einen RI gegen 1 [23]. Der Ramification Index ist also ein gutes Instrument zur Quantifizierung der Morphologie von Mikrogliazellen in verschiedenen Aktivierungsstadien.

1.5 Fragestellung

Die morphologischen und damit auch funktionellen Stadien der Mikrogliazellen sind teilweise untersucht. Es wurden bisher die vier oben beschriebenen morphologischen Mikrogliazelltypen klassifiziert. Es erfolgte aber noch keine Quantifizierung der Mikrogliazellmorphologie im Demyelinisierungsmodell der MS. Das Toxin Cuprizone führt zu einem Untergang von Neuronen, wodurch Mikrogliazellen aktiviert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass Mikrogliazellen nach einer einwöchigen Cuprizone-Behandlung ihre Morphologie ändern. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Mikrogliazellen im Kortex von mit Cuprizone behandelten Mäusen eine veränderte Morphologie aufweisen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, diese morphologischen Veränderungen von Mikrogliazellen in der Frühform einer Demyelinisierung zu quantifizieren. Hierzu werden zwei

Computerprogramme verwendet: das ImageJ-Programm, das zur Auswertung von Zellmorphologien im zweidimensionalen Raum bereits genutzt wird sowie einem neueren Programm, dem Neurolucida 360, das eine Quantifizierung von Zellmorphologien im dreidimensionalen Raum ermöglicht. In dieser Arbeit sollen diese beiden Programme ebenfalls gegenübergestellt und anhand der Ergebnisse bewertet werden. Im Rahmen dessen soll diese wissenschaftliche Arbeit der Etablierung eines Neurolucida 360-Protokolls zur Quantifizierung von Zellmorphologien dienen, das in zukünftigen morphologischen Untersuchungen verschiedenster neuronaler Zellen genutzt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck	101042
Chloralhydrat	Sigma	15307
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Sigma	C-9012
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat	Dako	K3468
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	6559
DPX mounting media	Sigma	44581
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck	1.08421
EnVision+ System- HRP Labelled Polymer (Anti-Rabbit)	Dako	K4003
Ethanol 100 %	Merck	1.00983
Formaldehyd 37 %	Roth	P733.2
Hämatoxylin	Sigma	H3136
Natriumiodat	Merck	106525
Natriumdihydrogenphosphat- Monophosphat	Merck	1.06346
Natriumlauge	Merck	1.09137

Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin	VWR	107158.9025
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco-Pulver	Biochrom/Merck	L182-50
Salzsäure	Roth/Merck	K025.1/1.09057
Tris (PUFFERAN®)	Roth	4855.2
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Roth	8070.4
Xylol	VWR	30 28975.325
Zitronensäure	Roth	X863.2
Zitronensäure-Monohydrat	Merck	1.00244

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

2.2 Antikörper

Antikörper	Art	Firma	Bestellnummer
Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1)	polyklonal; Wirt: Hase	Wako	019-19741
Anti-Hase IgG (Goat Anti Rabbit)	Wirt: Ziege	Vector	BA 1000

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

2.3 Lösungen, Puffer und Blockserum

Lösungen, Puffer, Blockserum	Zusammensetzung
PBS-Puffer (Fertiglösung)	47,75 g PBS-Pulver 5 l destilliertes Wasser Ziel-pH-Wert 7,4
Citratpuffer	10,5 g Zitronensäure 5 l destilliertes Wasser Ziel-pH-Wert 6,0
Tris/EDTA-Puffer	6,05 g Tris (PUFFERAN®) 1,85 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat 5 l destilliertes Wasser Ziel-pH-Wert 9,0
Blockserum	2,5 ml normales Ziegen Serum 47,5 ml PBS Verdünnung 1:20
H ₂ O ₂ (0,3 %)	1 ml H ₂ O ₂ (30 %) 99 ml PBS Verdünnung 1:100
DAB-Komplex	20 µl DAB-Stock 980 µl DAB-Substrat Verdünnung 1:50
Hämatoxylin-Lösung	1 g Hämatoxylin 1 l destilliertes Wasser 200 mg Natriumiodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure-Monohydrat

Tabelle 3: Allgemeine Lösungen

2.4 Versuchsaufbau

Es wurden zehn Versuchstiere von der Firma Janvier verwendet. Fünf Mäuse wurden als Kontrolltiere verwendet und erhielten normales Futter. Fünf Mäuse erhielten für sieben Tage das Toxin Cuprizone zu ihrem regulären Futter. Nach Ende der Behandlung wurden die Mäuse tierschutzkonform getötet und transkardial perfundiert.

2.5 Versuchstiere

Es wurden männliche Versuchstiere verwendet. Die ca. 25 g schweren Mäuse vom Wildtyp wurden bei der Firma Janvier bestellt und gehörten zu dem Stamm C57/BL/6J. Die Mäuse wurden zufällig auf die Kontroll- und Cuprizone-Gruppe verteilt. Jede Gruppe à fünf Mäuse wurde in Käfigen Typ II BlueLine (435 cm²) mit individueller Ventilation gehalten. Es erfolgte täglich eine Kontrolle und alle zwei Tage ein Wechsel der Käfige. Die Raumtemperatur lag bei 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 50 ± 5 % g/m³. Die Käfige waren mit einem Überdruck-Belüftungssystem mit zirkulierender Raumluft mit 60 – 80 Luftwechseln pro Stunde ausgestattet. Die Beleuchtung erfolgte mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 13 Stunden Tag, 11 Stunden Nacht.

Die Haltung und Versorgung der Mäuse in den Einrichtungen des Max-von-Pettenkofer-Instituts (Pettenkoferstr. 11, 80336 München) wurden nach den standardisierten Laborbedingungen entsprechend der Federation of European Laboratory Animal Science Association's Organisation (FELASA Organisation) durchgeführt. Im Umgang mit den Tieren wurde sich an die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes gehalten.

2.5.1 Fütterung

Fünf Mäuse wurden als Kontrolltiere verwendet und bekamen standardisiertes Mehlfutter. Das Futter wurde auf dem Dachgitter des Käfigs in eine Vertiefung gefüllt. Dort wurde auch die Trinkflasche mit Wasser für die Mäuse angebracht. Die Mäuse der Behandlungsgruppe wurden für eine Woche täglich mit dem Toxin Cuprizone gefüttert. Für diesen Käfig mit drei

Mäusen wurde täglich 100 - 150 g Futteransatz vorbereitet. Es wurde standardisiertes Mehlfutter mit einem Cuprizone-Anteil von 0,25 % angesetzt und in einem Rührgerät für eine Minute vermischt. Der Futteransatz wurde auf zwei Petrischalen verteilt und im Käfig auf dem Boden platziert. Eine Trinkflasche mit Wasser wurde am Dachgitter des Käfigs befestigt. Da das Cuprizone als Kupferchelator physikalisch instabil ist, wurde das Futter jeden Tag direkt vor der Fütterung vorbereitet. Futter und Wasser standen den Versuchstieren unbegrenzt zur Verfügung (mindestens 20 g pro Maus pro Tag).

2.6 Transkardiale Perfusion und Präparation

Nach täglicher Fütterung mit Cuprizone für sieben Tage wurden die verwendeten Mäuse am achten Tag tierschutzkonform getötet, transkardial perfundiert und ihre Gehirne präpariert.

Für die transkardiale Perfusion wurden pro Maus 200 ml Perfusionslösung angesetzt. 150 ml wurden für die Perfusion jedes Versuchstieres und 50 ml für die Postfixation des Gewebes verwendet. Die Lösung wurde eine Stunde vor Beginn der Perfusion angesetzt. Damit wurde sichergestellt, dass der zuvor eingestellte pH-Wert aufgrund von Zerfallsprodukten zum Zeitpunkt der Perfusion nicht abweicht. Zum Töten der Tiere wurde Chloralhydrat verwendet. Pro Tier wurden 0,5 ml der Narkoselösung vorbereitet. Nach der Perfusion wurden die Schädel der Mäuse vorpräpariert und für 24 Stunden postfixiert.

2.6.1 Durchführung transkardiale Perfusion

Für einen Liter Perfusionslösung wurden 100 ml Formaldehyd (37 %), 900 ml bidestilliertes Wasser, 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) abgefüllt und abgewogen. Sie wurden in einen Behälter gegeben und mit einem Magnetrührer vermischt, bis alle Bestandteile gelöst waren. Mit einer pH-Sonde wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und mit Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Die Perfusionslösung (Formaldehyd 3,7 %) wurde durch einen Trichter mit Papierfilter in eine Glasflasche gefüllt und auf Eis gelagert.

Jedem Versuchstier wurden mit einer Injektionsnadel 0,5 ml Narkoselösung in den Bauch injiziert. Nach Wirkungseintritt wurde die Maus auf eine Wachsplatte gelegt und ihre Reflexe getestet. Wenn der Tod durch Ausbleiben von Reflexen festgestellt werden konnte, wurde die Maus auf die Wachsplatte gepinnt und präpariert. Die Bauchhaut wurde mit einer Schere bis zum Hals entfernt. Das Abdomen wurde eröffnet und die Muskeln sowie der vordere knöcherne Brustkorb entfernt. Am Herzen wurde der rechte Vorhof mit einer spitzen Schere eröffnet, um einen Abfluss zu schaffen. In den linken Ventrikel wurde eine Nadel gelegt, über die die Maus mit einer Spritze perfundiert wurde. Die Versuchstiere wurden mit 20 ml kaltem PBS gespült. Anschließend wurden sie mit zwei Spritzen je 50 ml Perfusionslösung perfundiert.

Nach der Perfusion wurde der Kopf des Versuchstieres am tiefen Hals abgetrennt und der restliche Körper verworfen. Die Ohren wurden abgetrennt. Die Schädelhaut und Schädelkalotte wurden von dorsal mit einer spitzen Schere mittig aufgeschnitten. Beide Schädelhälften wurden von innen nach außen aufgeklappt, sodass das Gehirn frei lag. Die Präparate wurden in 50 ml Perfusionslösung in einem Falcon Tube gelegt und über Nacht bei 4 °C postfixiert.

Am Tag nach der Perfusion sollte die weitere Präparation und Einbettung der Gehirne erfolgen. Das Gehirn wurde aus den noch umgebenden Schädelteilen gelöst. Dazu wurden die Hälften der Schädelkalotte mit einer Pinzette vollständig entfernt. Das Gehirn wurde an der Grenze zwischen Bulbus olfactorius und Großhirn mit einem Spatel durchtrennt. Es wurde seitlich mit dem Spatel um das Gehirn herum gefahren, um es vollständig von der Schädelbasis zu lösen. Es wurde nun mit der Einbettung der Gehirne begonnen.

2.6.2 Paraffineinbettung und Schneiden der Gehirne

Nach der Postfixation und der weiteren Präparation wurden die Gehirne in PBS zwischengelagert. Das Gewebe darf im Laufe der Einbettung nie austrocknen. Zu Beginn der Paraffineinbettung wurden die Präparate aus dem PBS entnommen und in jeweils eine Einbettkassette gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Kassetten keine Luftblasen enthalten. Die befüllten Einbettkassetten wurden für ca. 5 Stunden in fließendem

Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Präparate in Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen (50 %, 70 %, 96 %, 100 %), Xylol und geschmolzenem Paraffin fixiert. Bis auf die Fixierungsschritte in Paraffin erfolgten alle Arbeitsschritte auf einem Horizontalschüttler in einem ausreichend großen Gefäß. Wenn nötig, kann das Gewebe in 50 %-igem Ethanol bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

	Tag	Dauer	Bemerkungen
Leitungswasser, fließend	2	5h (mindestens 12h)	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
50 % Ethanol	2 – 3	Über Nacht	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
70 % Ethanol – 1	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
70 % Ethanol – 2	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
96 % Ethanol – 1	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
96 % Ethanol – 2	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
96 % Ethanol – 3	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
100 % Ethanol – 1	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
100% Ethanol – 2	3	60 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
100 % Ethanol – 3	3	60 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
Xylol – 1	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
Xylol – 2	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
Xylol – 3	3	40 Minuten	Raumtemperatur, Horizontalschüttler
Paraffin – 1	3	60 Minuten	
Paraffin – 2	3	60 Minuten	
Paraffin – 3	3 – 6	Mindestens 48h	

Tabelle 4: Arbeitsschritte der Paraffineinbettung

Nach Durchlaufen der in der Tabelle beschriebenen Arbeitsschritte wurde das Gewebe aus dem Paraffin ausgebettet und in neue Einbettkassetten gegeben. Diese wurden mit geschmolzenem Paraffin gefüllt und zum Aushärten auf eine Kälteplatte gelegt. Die fertigen Blöcke wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Abschluss des Einbettens der Präparate wurden diese geschnitten. Sie wurden dazu in ein Schlittenmikrotom (Leica SM200 R, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) gespannt. Durch zwei Stellschrauben wurden die Paraffinblöcke im Gerät befestigt. Die Blöcke wurden so eingespannt, dass die Blockfläche und die Klinge des Mikrotoms parallel zueinander standen. An einem Drehregler wurde die gewünschte Schnittdicke von 5 µm eingestellt. Die Blöcke wurden wiederholt über die Klinge des Mikrotoms bewegt, bis die Blockfläche komplett angeschnitten wurde. Nun wurden die vollständigen Schnitte aufgefangen und auf Objektträger aufgezogen. Dazu wurde ein Stück Seidenpapier in einem 48 °C warmen Wasserbad (Leica HI1210 Wasserbad, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) angefeuchtet und auf die Blockoberfläche gelegt. Das Seidenpapier sollte dieselbe Fläche wie der Paraffinblock haben. Die Klinge des Mikrotoms wurde über den Paraffinblock gezogen. Das Seidenpapier wurde mit dem daran haftenden Schnitt abgehoben und in das 48 °C warme Wasserbad gelegt. Nachdem der Schnitt sich im Wasser von dem Seidenpapier gelöst hatte, wurde er mit einer Nadel aufgenommen und auf einen Objektträger (SuperFrost Plus, VWR International, Darmstadt, Deutschland) gebracht. Pro Objektträger wurden immer zwei Schnitte aufgezogen. Sie wurden zum Abtropfen schräg gestellt. Für eine bessere Haftung am Objektträger wurden sie 3 – 4 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie in einem Wärmeschrank bei 48 °C über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte verwendet oder bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Region of interest (ROI) lag im septo-diencephalen Gehirn in Region 265 nach Sidman Mouse Atlas (Nissl-Färbung) [24].

2.7 Immunhistochemische Färbung

Für die Darstellung des mikrogliazellspezifischen, calciumbindenden Proteins IBA1 wurde die Methode der indirekten Immunhistochemie verwendet. Hierbei wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert. Um bei der Formalinfixierung entstandene sog. „cross-links“ zwischen den Antigenen des Gewebes zu lösen, wurden die Schnitte in Citratpuffer gekocht (HIER-Methode: „heat induced Epitope retrieval“). Die Zahl der Antigenbindungsstellen wurde so optimiert. Es wurde Blockserum (5 % Normales Ziegen Serum) auf das Gewebe gegeben, um falsch positive Ergebnisse durch starke unspezifische Bindungen des Primärantikörpers im Mausgewebe zu vermeiden. So wurde

eine spezifische Bindung des Primärantikörpers an das gesuchte Antigen gewährleistet. Es wurde Normales Serum aus dem Tier verwendet, aus dem der Sekundärantikörper stammt, sodass einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an Komponenten der Proteinlösung vorgebeugt wurde. Der Primärantikörper (IBA1) wurde auf das Gewebe gegeben. Die Schnitte wurden in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gespült. Dieser Schritt eliminiert die unspezifische Enzymaktivität der gewebeeigenen Peroxidase und verhindert eine unspezifische Färbung. Es kann so aber auch durch eine Modifizierung von Epitopen der Antigene zu einer reduzierten Antigen-Antikörper-Bindung und damit einer Abschwächung der Färbung kommen. Der Sekundärantikörper (Anti-Hase IgG) wurde auf das Gewebe gegeben. Er muss gegen die Immunglobuline des Tiers gerichtet sein, in dem der Primärantikörper hergestellt wurde, sodass er diesen spezifisch bindet. Durch die Bindung von mehreren Sekundärantikörpern an einen Primärantikörper wird eine Verstärkung der Färbung erreicht. In dieser Arbeit wurde das EnVision+ System verwendet, das bereits fertige Komplexe aus Sekundärantikörper und HRP-Komplex (HRP: „horseradish peroxidase“ = Meerrettich-Peroxidase) enthält. Durch die Bindung von mehreren Komplexen pro Sekundärantikörper wurde zusätzlich eine Verstärkung der Färbung erreicht. Es wurde kein Avidin-Biotin-Komplex verwendet, da bestimmte Gewebe eine endogene Avidin-Biotin-Enzymaktivität aufweisen. Eine unspezifische Färbung kann so reduziert bzw. verhindert werden. Zur Visualisierung des HRP-Komplexes wurde DAB-Komplex (3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat-Chromogen) auf die Schnitte gegeben. Die DAB-Komplexe reagieren mit der Meerrettich-Peroxidase, was in einer braunen Ausfällung resultiert.

2.7.1 Durchführung Färbungen

Alle Schnitte wurden nach dem gleichen Protokoll gefärbt, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Es wurden zehn Objektträger á zwei Schnitte gefärbt. Zehn Schnitte waren von Mäusen aus der Kontrollgruppe ohne Behandlung. Zehn Schnitte waren von Mäusen, die eine Woche Cuprizone zu ihrem Futter erhalten hatten. Es wurde mit der Entparaffinierung begonnen. Dazu wurden die Schnitte in einem Plastikhalter dreimal in Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Chemikalien	Dauer
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Xylol III	5 min
Xylol/Ethanol 50/50 %	5 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 50 %	3 min
Destilliertes Wasser	3 min

Tabelle 5: Arbeitsschritte der Entparaffinierung und Rehydrierung

Die rehydrierten Schnitte wurden in ein Gefäß mit Tris/EDTA gegeben. Die freien Kammern im Halter wurden mit leeren Objektträgern aufgefüllt. Die Schnitte wurden in eine Mikrowelle gestellt und das Tris/EDTA für ca. zwei Minuten auf höchster Stufe zum Kochen gebracht. Die Schnitte wurden weitere zehn Minuten auf niedriger Stufe gekocht. Das Gefäß wurde anschließend für 20 – 30 Minuten mit kaltem Leitungswasser umspült, bis das Tris/EDTA Raumtemperatur erreicht hatte. Die Schnitte wurden dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gespült. Dazu wurde eine Standkuvette mit PBS befüllt. Die Schnitte wurden hinein- und das Gefäß auf einen Schüttler (IKA VXR basic Vibrax[®], IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) gestellt. Nach fünf Minuten wurde das PBS abgegossen und die Standkuvette mit neuem PBS befüllt. Für das Blocken wurden die Schnitte in einen Inkubationskasten gelegt. Auf jeden Schnitt wurden 50 µl vorgefertigte Blockinglösung (5 % Normales Ziegenserum in PBS) pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur (26 °C) in den Inkubator gestellt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper IBA1. Der Primärantikörper wurde mit einem Vortex durchmischt und zentrifugiert. Er wurde in einer Verdünnung 1 : 4000 (1 µl Primärantikörper : 3999 µl 5 % Normales Ziegenserum in PBS) angemischt. Die Objektträger wurden vorsichtig um die Schnitte herum mit einem Papiertuch abgetupft. Jeweils 100 µl des verdünnten Primärantikörpers wurden auf jeden Schnitt pipettiert. Auf jeden Schnitt wurde ein zugeschnittenes Blättchen Parafilm gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung über den ganzen Schnitt zu gewährleisten. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in einer Standkuvette auf einem Schüttler dreimal in PBS für jeweils fünf Minuten gespült. Für den Peroxidaseblock wurde die Standkuvette mit den Schnitten

mit einer Lösung aus 0,3 % H₂O₂ in PBS in einer Verdünnung von 1 : 100 (1 ml H₂O₂ 30 % : 99 ml PBS) befüllt, mit einem Karton abgedeckt und für 30 Minuten auf dem Schüttler belassen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gespült. Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Dazu wurde die vorgefertigte EnVision+ Lösung verwendet. Die Schnitte wurden in einen Inkubationskasten gelegt. Die EnVision+ Lösung wurde auf dem Vortex gemischt und jeder Schnitt mit jeweils zwei Tropfen (ca. 50 µl) bedeckt. Auf jeden Schnitt wurde ein zugeschnittenes Blättchen Parafilm gelegt, um eine vollständige und gleichmäßige Bedeckung der Schnitte mit der Lösung zu gewährleisten. Die Schnitte wurden für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Schnitte in eine Standkuvette auf einen Schüttler gestellt und dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gespült. Im nächsten Schritt erfolgte die Visualisierung. Dazu wurde eine DAB-Lösung in der Verdünnung 1 : 50 (20 Schnitte; 40 µl DAB-Stock : 1960 µl Substrat) angemischt. Jeder Schnitt wurde mit 100 µl DAB-Lösung bedeckt. Alle Arbeitsschritte der Visualisierung wurden unter einem Abzug durchgeführt. Die Schnitte wurden in einen Plastikhalter gestellt, für einige Sekunden in ein Gefäß mit Leitungswasser und anschließend fünf Minuten in destilliertes Wasser gestellt. Es erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun. Die Schnitte wurden für 30 Sekunden in Hämalaun gegeben, kurz in destilliertem Wasser gespült, fünf Minuten in Leitungswasser gebläut und drei Minuten erneut in destilliertes Wasser gestellt. Anschließend erfolgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

Chemikalien	Dauer
Ethanol 50 %	3 min
Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Xylol/Ethanol 50/50 %	5 min
Xylol I	5 min
Xylol II	10 min
Xylol III	10 min

Tabelle 6: Arbeitsschritte der Dehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe

Die Schnitte wurden unter einem Abzug mit DPX und einem Deckgläschen bedeckt. Es sollten keine Luftblasen im DPX zwischen Schnitt und Deckgläschen verbleiben. Um das DPX

in einem solchen Fall zu lösen, wurde der Objektträger für ca. zehn Minuten in einen Behälter mit Xylol gestellt, das Deckgläschen anschließend mit einer Pinzette abgelöst und der Schnitt neu eingedeckelt. Nach 20 Minuten wurden die Deckgläschen mit Gewichten beschwert und damit über Nacht zum vollständigen Trocknen belassen.

2.8 Auswahl der Mikrogliazellen

Die histologischen Schnitte wurden mit dem Confocal-DSU-Mikroskop (Olympus BX51WI, mit BX-DSU und SOLA LED Lampe, OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland) vollständig eingescannt. Alle ausgewählten Mikrogliazellen sollten aus den Kortexschichten vier und fünf (Lamina granularis interna und Lamina pyramidalis interna) stammen (Abbildung 2). Der Kortexbereich direkt oberhalb des CC (Lamina multiformis) reagiert stark auf eine Cuprizone-Behandlung, wenn auch im Vergleich zum CC selbst deutlich weniger [15]. Die Mikrogliazellen des Kortex sind aber deutlich leichter zu rekonstruieren, da sie nicht in den axonalen Bündeln des CC liegen und damit morphologisch „verfälscht“ sind [25]. Dieser Bereich sollte möglichst ausgespart werden, um nur Zellen für die Rekonstruktion auszuwählen, die detailliert rekonstruierbar sind. Die Markierung des angestrebten Kortexbereichs wurde unter der vereinfachten Annahme vorgenommen, dass alle sechs Laminae die gleiche Höhe im Kortex einnehmen. Die Orientierung erfolgte anhand des lateralen Ventrikels. Von den Seitenwänden der Ventrikel ausgehend wurden senkrechte Linien durch den Kortex gezogen. Die Höhe des Kortex wurde ausgemessen, die Distanz durch drei geteilt und mittels horizontalen Markierungen aufgeteilt. Im Anschluss wurden die Kortexschichten vier und fünf oberhalb des CC als ROI eingefasst (Abbildung 2).

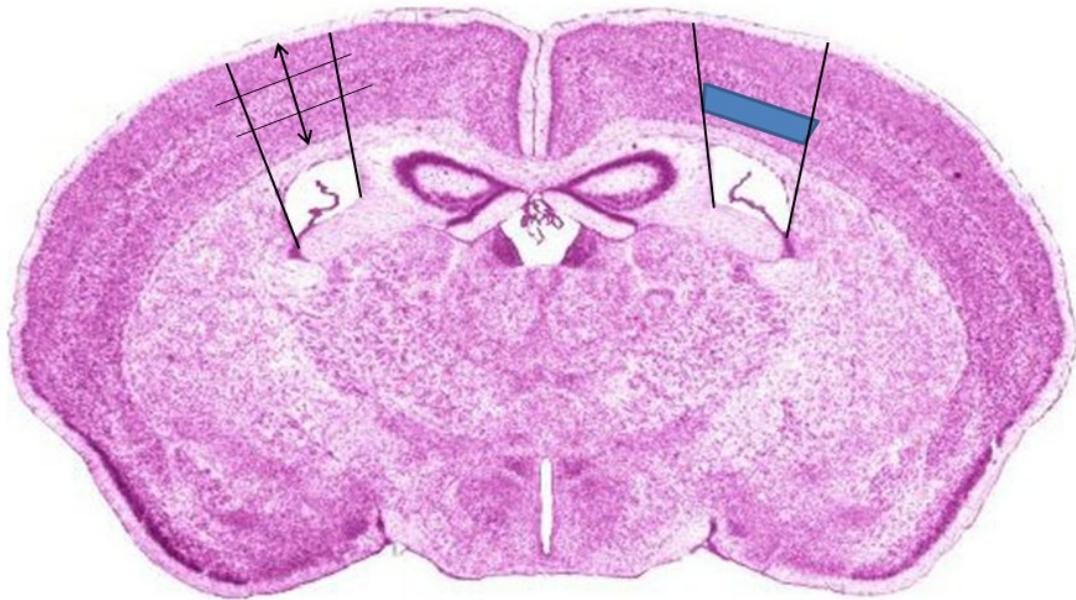


Abbildung 2: High Resolution Mouse Brain Atlas, Schnitt 265, nach Sidman et al. mit veranschaulichter Auswahl der ROI [24]

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden zunächst als Übersicht beider Hemisphären durch das Confocal-DSU-Mikroskop in 4-facher Vergrößerung als Hellfeld-Aufnahme mit 0,8 ms Belichtungszeit abgebildet. In der Übersicht wurden in den Kortizes der Hemisphären die Kortexschichten vier und fünf als ROI mit blauen Linien markiert und diese Bereiche mit dem Mikroskop vollständig in 0,5 μm -Stacks eingescannt. Das Einscannen der Schnitte von Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mausgehirnen erfolgte verblindet. Die Entblindung erfolgte nach Abschluss aller Rekonstruktionen und Auswertungen. Die Auswahl der einzelnen Mikrogliazellen aus den immunhistochemisch gefärbten Schnitten wurde direkt im Programm Neurolucida 360 durchgeführt.

2.9 Rekonstruktion der Mikrogliazellen in Neurolucida 360

Neurolucida 360 (MBF Bioscience, Version 2017.01.2, Williston, USA) ist ein Computerprogramm, mit dem eine schnelle und detaillierte Rekonstruktion von neuronalen Strukturen im dreidimensionalen Raum ermöglicht wird. Mit dem dazugehörigen Programm Neurolucida Explorer (MBF Bioscience, Version 2017.02.3, Williston, USA) können anschließend zahlreiche Analysen dieser Rekonstruktionen durchgeführt werden.

Das Neurolucida 360-Programm stellt die eingescannten Stacks als ein dreidimensionales Bild dar. Das Soma und der Verlauf der Dendriten werden darin auch in ihrem Verlauf in die Tiefe des Schnitts dargestellt. Zusätzlich ist eine Anpassung der Dicke der Fortsätze möglich. Der Schnitt kann im Programm in allen Ebenen rotiert und so vollständig aus allen Richtungen betrachtet werden. Dadurch wird eine akkurate Rekonstruktion der Zelle ermöglicht.

2.9.1 Methodische Durchführung

Das Programm Neurolucida 360 wird geöffnet. Es erscheint das Programmfenster auf dem Desktop. Es wird die .jpx-Datei eines Scans in das Fenster gezogen. Das Programm lädt alle Stacks. Der Ladevorgang wird am unteren Bildrand angezeigt. Das Programm befindet sich zu Beginn im „2D-View“. Es kann mit der Computermaus durch alle Stacks gescrollt werden. Um eine dreidimensionale Darstellung der Datei zu erhalten, werden in der oberen Menüleiste entweder die Schaltfläche „Trace“ oder „Image“ aktiviert und anschließend die Schaltfläche „3D Environment“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem die Datei im dreidimensionalen Raum dargestellt ist. Eine Kalibrierung muss nicht durchgeführt werden. Das Programm übernimmt automatisch die Maße, die beim Scannen der Datei gespeichert wurden.

Vor Beginn der Rekonstruktionen der Mikrogliazellen aus den immunhistochemisch gefärbten Schnitten wurde eine Auswahl an Zellen getroffen. Dafür wurden zunächst die Scans der einzelnen Aufnahmen der Hemisphären im Neurolucida 360-Programm in den „2D View“ geladen. Anschließend wurde ein Gitter über den Scan gelegt. Dazu werden in der

oberen Programmleiste die Schaltflächen „File“ und „Preferences“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird unter „Display Preferences“ die Schaltfläche „Grid“ ausgewählt. Im rechten Teil des neuen Fensters wird ein Häkchen bei „Grid enabled“ gesetzt. Das Gitter wird dadurch freigegeben. Es wird ein Häkchen bei „Bright grid“ gesetzt. Das Gitter wird mit weißen Linien dargestellt. Bei „Grid spacing (μm)“ werden bei „X“ und „Y“ die Maße für das Gitter eingetragen. Hier kann es zu Abweichungen kommen, da nicht jeder histologische Schnitt exakt gleich auf den Objektträger aufgebracht und deshalb nicht jede Hemisphäre in gleicher Ausrichtung gescannt wurde. Um das Gitter bei jedem Scan vergleichbar zu machen, wurden die Maße so gewählt, dass die vier Ecken der am Mikroskop mit blauen Linien markierten ROI genau auf jeweils einer Linie des Gitters lagen (Abbildung 3, B). Die Auswahl der Gittereinstellungen wird mit „OK“ bestätigt.

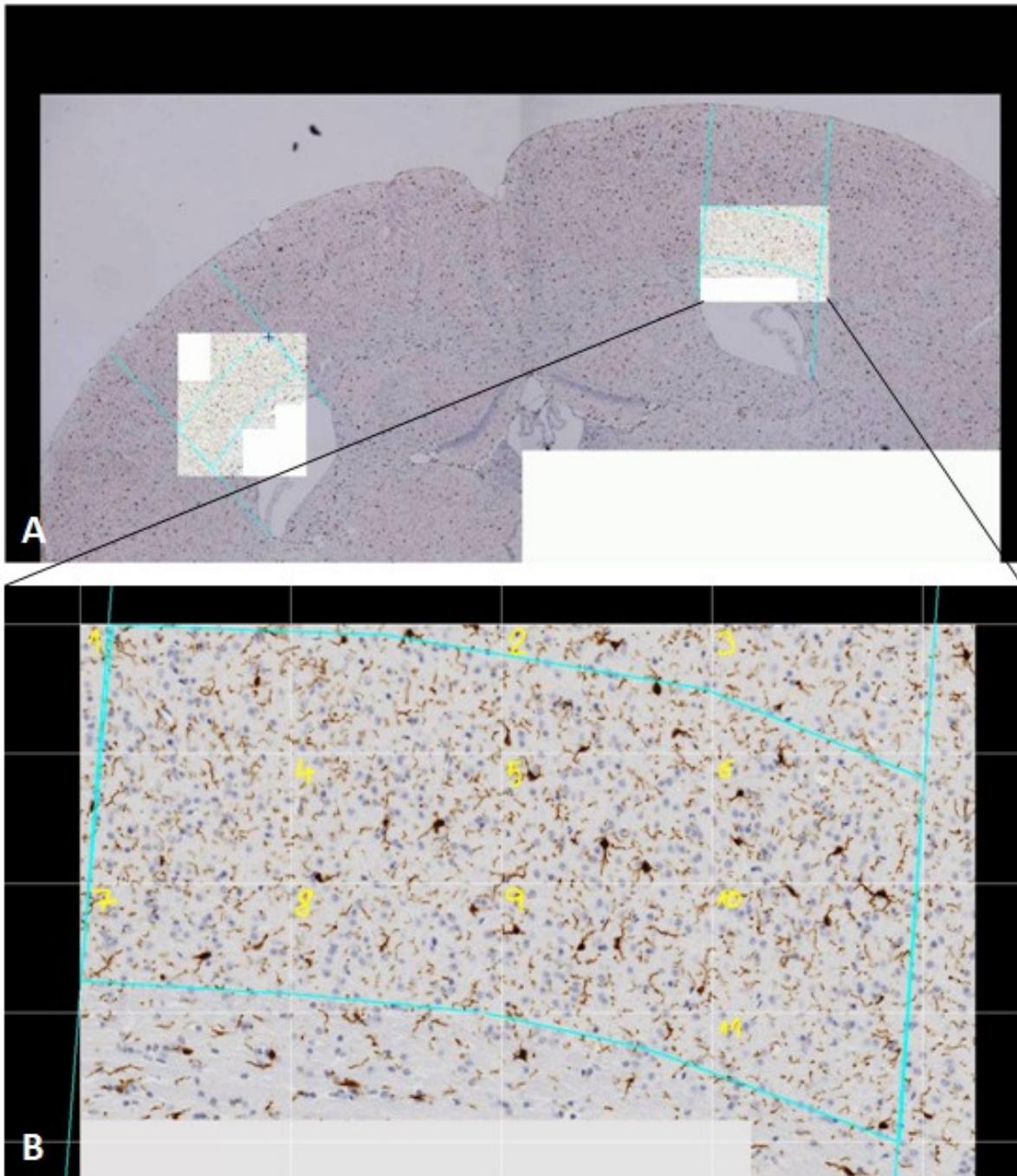


Abbildung 3: Scan eines immunhistochemischen Schnitts mittels Confocal-DSU-Mikroskop; **A:** Übersicht mit markierter ROI; **B:** Markierte ROI mit Grid/Gitter und Nummerierung für die Auswahl der Zellen für die Rekonstruktion

Für die Auswahl der Zellen für die Rekonstruktion wurden die Gitterkästchen von oben nach unten und von links nach rechts mit aufsteigenden Zahlen beschriftet (Abbildung 3, B). Dabei wurden nur Kästchen mit einer Zahl versehen, in der sich mindestens eine zu rekonstruierende Mikrogliazelle befand. Zellen, deren Soma oder Fortsätze nicht vollständig innerhalb der blauen Markierung der ROI lagen, wurden von der Auswahl ausgeschlossen.

Zusätzlich durfte das Soma der Zellen nicht nur angeschnitten sein, sondern musste vollständig innerhalb des Scans liegen. Die Zellen wurden dem Kästchen zugeschrieben, in dem das Soma der Zelle lag, unabhängig von der Lage der Fortsätze. Wenn das Soma einer Zelle auf einer Gitterlinie zwischen zwei oder mehreren Kästchen lag, wurde sie allen Kästchen zugeschrieben. Mit dem Programm Excel (Microsoft® Office Excel® 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) wurde dann eine zufällige Zahl aus der Anzahl der beschrifteten Kästchen generiert (Beispiel zu Abbildung 3, B: =ZUFALLSBEREICH(1;11)). Alle Zellen in dem Kästchen mit der zufällig generierten Zahl wurden in die Rekonstruktion mit eingeschlossen, wenn sie den vorher festgelegten Kriterien entsprachen. Die ausgewählten Zellen wurden aus dem Übersichtsscan einer Hemisphäre ausgeschnitten. Es wurde in der oberen Programmliste unter dem Reiter „Image“ die Schaltfläche „Crop“ aktiviert. Mit Linksklick und Gedrückthalten der linken Maustaste wurde eine Markierung um die ausgewählte Zelle gezogen. Es sollte immer ausreichend Abstand zwischen Zellfortsätzen und Rand bestehen. Durch das Loslassen der linken Maustaste wird das Schneiden des Scans im Programm ausgeführt. Der neue Ausschnitt wird als neue .jpx-Datei gespeichert. Dazu werden in der oberen Programmliste die Schaltflächen „File“ und „Save“ ausgewählt. Ein neues Fenster öffnet sich, in dem man Dateiname und Ablageort wählt. Es wurden insgesamt 118 immunhistochemisch gefärbte Mikrogliazellen für die Rekonstruktion ausgewählt. Da bei diesem Prozess die ausgewählten Zellen einer bestimmten Hemisphärenübersicht zugeordnet werden konnte und dadurch subjektive Vermutungen bezüglich der Zugehörigkeit zur Kontroll- oder Cuprizone-Gruppe getroffen werden konnten, wurden die ausgewählten Mikrogliazellen erneut mit dem Excel-Programm durch eine andere Person verblindet. Es wurden nicht aufeinanderfolgende Zufallszahlen generiert und die Dateien mit den entsprechenden Zahlen benannt. Die Entblindung erfolgte nach abgeschlossener Rekonstruktion und Auswertung aller Zellen. Es wurde immer alternierend eine Mikrogliazelle im NeuroLucida 360-Programm und eine andere Zelle im ImageJ-Programm rekonstruiert. Dabei wurden auch die Zellen in ihrer Reihenfolge für die Rekonstruktionen immer zufällig ausgewählt.

Für die Rekonstruktion des Somas können zwei Möglichkeiten im NeuroLucida 360 angewendet werden. Zum einen gibt es in der „3D Environment“ des Programms eine interaktive Suchfunktion, bei der das Soma automatisch durch das Programm erkannt und

durch Anklicken rekonstruiert wird. Zum anderen kann das Soma manuell im „2D View“ rekonstruiert werden, indem in jedem Stack das Soma in kleinen Abständen per Mausklick umfahren wird. Beim Öffnen in der „3D Environment“ verarbeitet das Programm diese dann zu einer zusammenhängenden Rekonstruktion.

Für die erste Möglichkeit wird der Scan in der „3D Environment“ geöffnet. Im rechten Programmfenster wird die Schaltfläche „Soma“ durch Anklicken aktiviert. Es wird die Fläche „Detect Somas“ mit mehreren Optionen darunter angezeigt. Damit das Programm das Soma differenziert erkennen kann, müssen die Parameter entsprechend eingestellt sein. Bei „Soma Detection Setting“ sollte eine möglichst niedrige Zahl gewählt werden. Wenn diese bei 100 liegt und auf das Soma geklickt wird, rekonstruiert das Programm einen rechtwinkligen Block um das Soma. Wenn die Zahl zu niedrig eingestellt wird, zeigt das Programm den Hinweis „Unable to detect a soma there“ an. Es muss in mehreren Schritten die richtige Einstellung für jedes einzelne Soma herausgefunden werden. Unter „Soma Detection Settings“ sollte bei „Interactive search region“ eine μm -Angabe gewählt werden, die in etwa der realen Größe des Somas entspricht. Bei „Size constraint“ sollte ebenfalls eine niedrige μm -Angabe gewählt werden. Es gilt aber, bei allen einzugebenden Größen mehrere Optionen und deren Ergebnisse durchzuspielen, um die optimale Rekonstruktion des Somas zu erreichen. Eine auf diese Weise erstellte Rekonstruktion kann durch Schließen der „3D Environment“ im „2D View“ manuell bearbeitet werden. Diese Schritte sind im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

Für ein akkurateres Ergebnis wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit der manuellen Rekonstruktion im „2D View“ verwendet. Nachdem die Datei in das Programmfenster geladen wurde, wird zunächst das Soma maximal herangezoomt. Dazu werden in der oberen Programmleiste die Schaltflächen „Image“ und „Zoom in“ ausgewählt. Durch Klicken auf das Soma wird dieses zentral vergrößert. Für jedes erneute Zoomen muss die Schaltfläche „Zoom in“ erneut aktiviert werden. Sollte der Bildausschnitt nicht optimal eingestellt oder das Soma am Bildrand abgeschnitten sein, gelangt man durch die Schaltfläche „Zoom to fit“ wieder zur Ausgangsposition des Scans und kann den Prozess wiederholen (Abbildung 4).

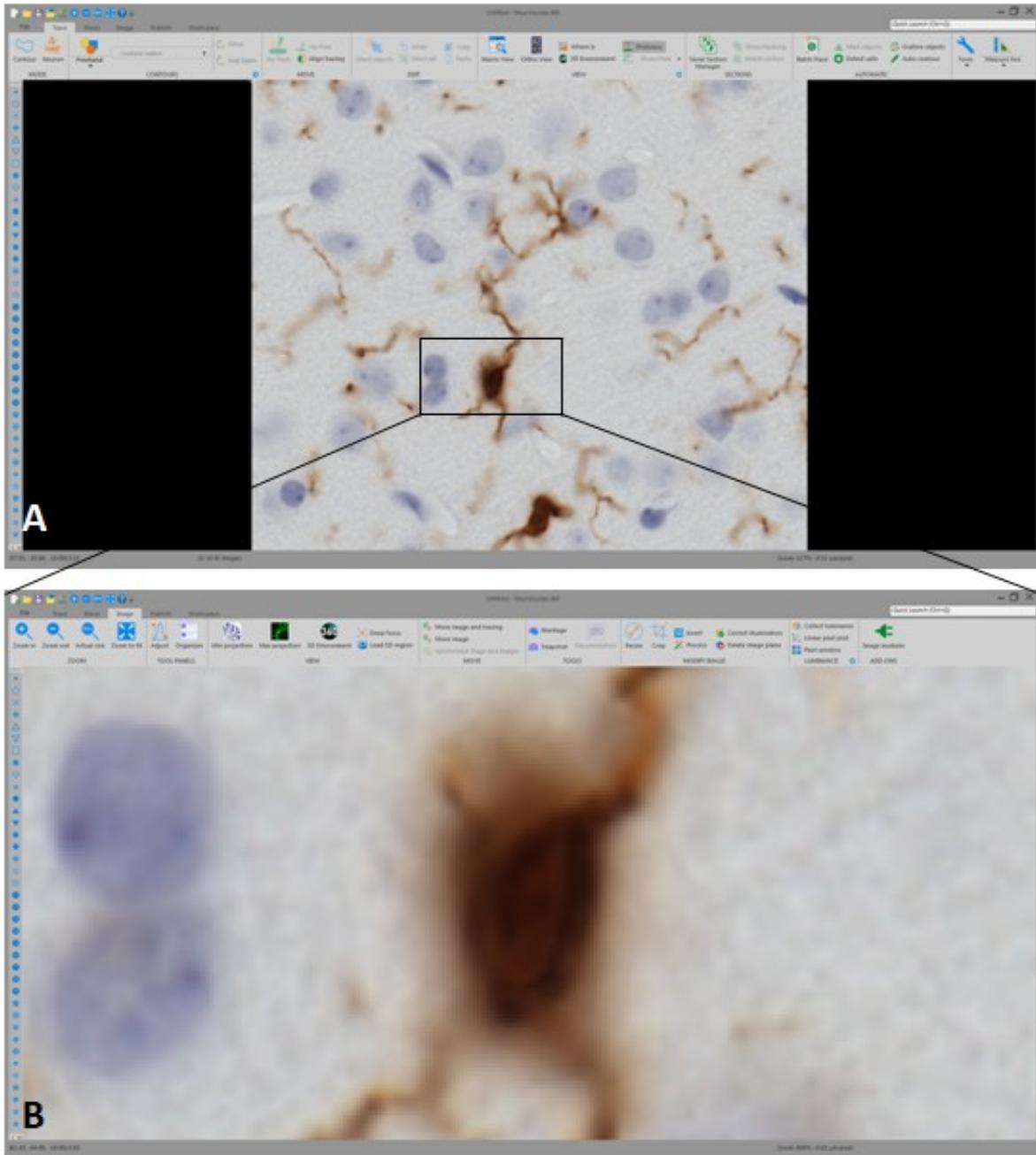


Abbildung 4: IBA1-immunohistochemisch gefärbte Mikrogliazelle in der 3D-Ansicht in NeuroLucida 360; **A:** Startbildschirm in NeuroLucida 360 nach Öffnen einer Scan-Datei mit beispielhaft verdeutlichtem, angestrebtem Bereich zur Vergrößerung; **B:** Ausschnitt des Somas nach Heranzoomen

Beim Einscannen der Schnitte im Confocal-DSU-Mikroskop wurde stets eine gewisse Anzahl an Stacks als Sicherheitsabstand früh und spät in der Schnittserie eingehalten, um das Soma der ausgewählten Mikrogliazelle vollständig abzubilden. Es sollten nur Rekonstruktionen des Somas in Stacks angefertigt werden, in denen es dann in der Schnittserie im Fokus liegt. Es ist hilfreich, mehrfach durch alle Stacks zu scrollen, um zu differenzieren, in welchen Stacks

das Soma im Fokus liegt. Die Nummer der Stacks ist am unteren Bildrand beim Scrollen zu sehen (z.B. „10 von 25“). Bei der Beispielzelle wurde die Rekonstruktion zwischen Stack 15 und Stack 30 erstellt. Es wird in der oberen Programmleiste die Schaltfläche „Trace“ ausgewählt und der „Contour“-Button durch Anklicken aktiviert. Er ist nun grau hinterlegt. Die Computermaus erscheint als rotes Kreuz im Programmfenster. Zum Deaktivieren wird erneut auf den „Contour“-Button geklickt. Es wird die Kontur des sich im Fokus befindenden Teils des Somas im Stack mit mehreren Mausklicks umfahren (Abbildung 5, B). Zum Abschließen der Kontur wird die rechte Maustaste geklickt und im neu erscheinenden Fenster die Schaltfläche „End Contour“ ausgewählt. Die Kontur schließt sich. Es wird in den nächsten Stack gescrollt und die Kontur erneut rekonstruiert, bis das Soma in allen zuvor festgelegten Stacks bearbeitet wurde (Abbildung 5, C und D). Es ist darauf zu achten, dass nur der tatsächlich im Fokus liegende Teil des Somas und nicht der unscharfe Bereich darum herum in die Kontur mit einbezogen wird. Nach Abschluss einer Kontur kann diese verändert und angepasst werden. Dazu wird die Schaltfläche „Select object“ aktiviert. Es wird auf die Kontur geklickt, die verändert werden soll. Nach Anklicken erscheint sie mit allen Zwischenpunkten. Diese können mit der Maus nun durch Klicken und Gedrückthalten der linken Maustaste verschoben werden. Möchte man einen Punkt hinzufügen, um eine Kontur detaillierter darzustellen, wird die Schaltfläche „Select objects“ aktiviert. Es wird mittels Rechtsklick auf die Kontur zwischen zwei Punkten geklickt und im sich öffnenden Fenster „Insert point in selected contour“ ausgewählt. Es wird auf eine Stelle der Kontur geklickt. Dort erscheint nun ein neuer Punkt, der verschoben werden kann. Zum Löschen eines Zwischenpunktes einer Kontur wird die Schaltfläche „Select objects“ aktiviert und die entsprechende Kontur ausgewählt. Es wird ein Punkt mittels Rechtsklick ausgewählt und im sich neu öffnenden Fenster „Delete point“ angeklickt. Um eine komplette Kontur zu löschen, wird die Schaltfläche „Select object“ ausgewählt und die Kontur mit der Computermaus durch Anklicken markiert. Es wird mit Rechtsklick auf die markierte Kontur geklickt und in dem sich neu öffnenden Fenster die Option „Delete selected contour“ ausgewählt. Anstelle des Rechtsklicks kann eine markierte Kontur auch mittels der „entf“-Taste auf der Tastatur vollständig entfernt werden. Wenn sich die Kontur des Somas zwischen Stacks nicht verändert, kann die Rekonstruktion dieses Stacks übersprungen werden. Zum Speichern der Rekonstruktionen wird in der oberen Programmleiste das Festplattensymbol ausgewählt. Ein neues Fenster öffnet sich, in dem man Dateinamen und Ablageort wählen kann. Die

Fortschritte der Rekonstruktion können auch, nach erstmaligem Speichern als neue Datei, automatisch durch das Programm in einem festen Zeitintervall gespeichert werden. Es wird im „2D View“ die Schaltfläche „File“ in der oberen Programmleiste und dann „Preferences“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird in der linken Leiste die Option „Autosave“ aktiviert und im rechten Teil des Fensters ein Häkchen bei „Enable AutoSave“ gesetzt. Es kann bei „Time interval“ die Anzahl an Minuten eingetragen werden, nach denen eine automatische Speicherung der im Programm geöffneten Rekonstruktion erfolgen soll. Zum Ausführen wird die Schaltfläche „OK“ ausgewählt. Das Fenster „Preferences“ schließt sich. Es sollte aber weiterhin auch manuell eine Speicherung nach wichtigen Schritten der Rekonstruktion erfolgen.

Nach Rekonstruktion aller Konturen wird die Schaltfläche „3D Environment“ aktiviert. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem alle Stacks sowie die rekonstruierten Somakonturen zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet werden (Abbildung 5, F). Wenn die rekonstruierten Konturen in der „3D Environment“ nicht zu einem Soma verarbeitet werden, liegt häufig der Fehler vor, dass eine Kontur nicht vollständig geschlossen ist. Dieser wird im „2D View“ behoben. Aufgrund der sich hier überlagernden Konturen der Stacks ist es schwierig zu erkennen, welche Kontur nicht geschlossen ist. Es muss jede Kontur einzeln überprüft werden. Dazu wird die Schaltfläche „Select objects“ ausgewählt. Nun wird jede einzelne Kontur mit der Maus markiert und mittels Rechtsklick ausgewählt. Wenn eine Kontur nicht geschlossen ist, findet man in dem sich neu öffnenden Fenster die Option „Close selected contour“. Bei vollständig geschlossenen Konturen wird diese Option nicht angezeigt. Um die Übersichtlichkeit der bereits überprüften Konturen zu erleichtern, können bereits kontrollierte Konturen in einer anderen Farbe dargestellt werden. Dazu wird erneut „Select objects“ ausgewählt, die Kontur durch Mausklick markiert und mittels Rechtsklick auf die Kontur die Nebenleiste geöffnet. Es wird „Change contour to color...“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster mit Namen „Color“. Hier kann eine beliebige, möglichst gut zu differenzierende Farbe durch Anklicken ausgewählt werden. Die Farbwahl wird durch die Schaltfläche „OK“ bestätigt und ausgeführt (Abbildung 5, E). Dies wird nach und nach mit allen überprüften Konturen durchgeführt, bis die noch offene Kontur gefunden wird. Die Farbe der Konturen kann nun, wenn gewünscht, wieder auf demselben Weg verändert

werden. Wenn nun in der „3D Environment“ geöffnet, liegt eine vollständige Somarekonstruktion vor.

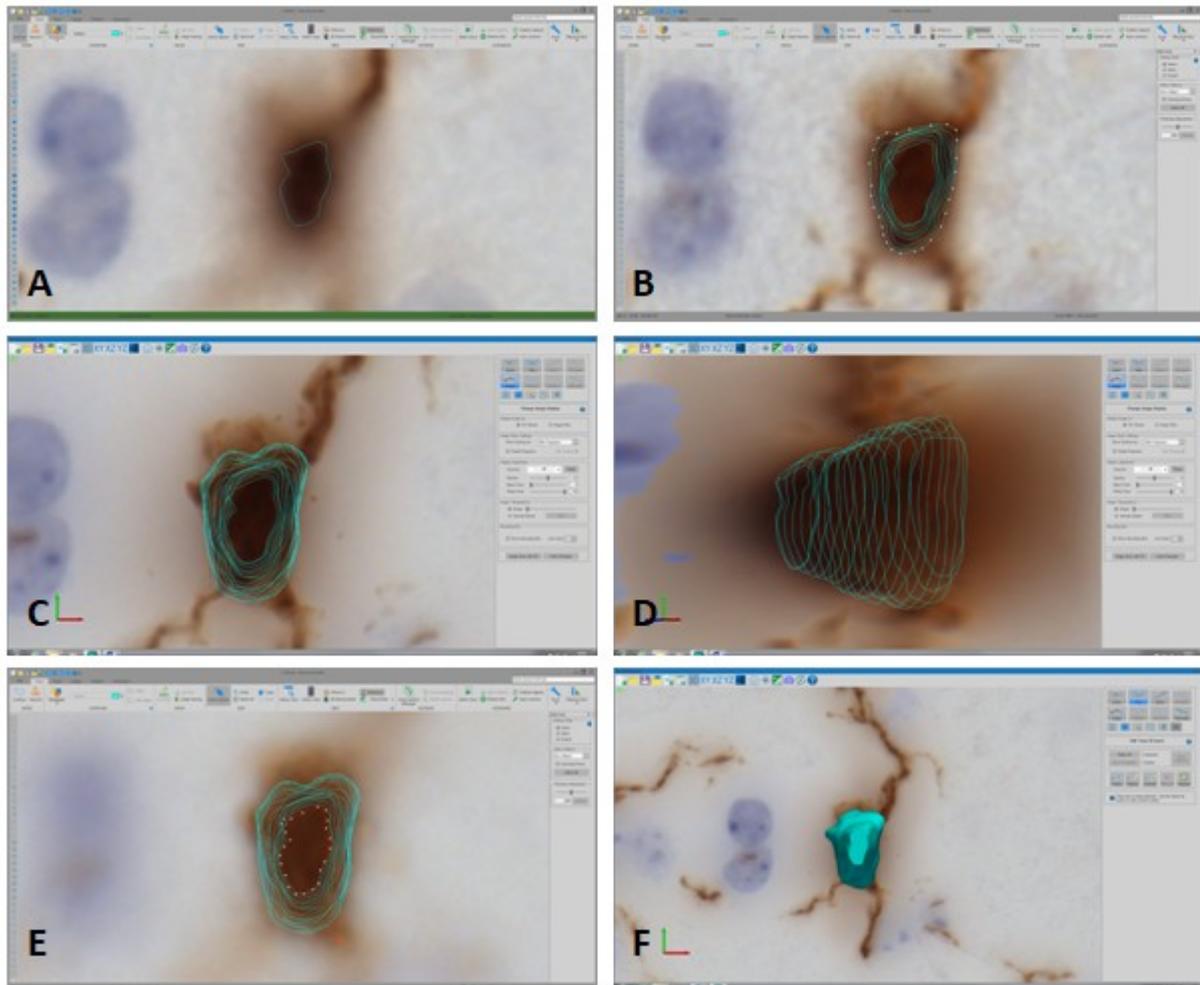


Abbildung 5: Rekonstruktion eines Somas in NeuroLucida 360; **A:** Nachfahren der Kontur des Somas in einem Stack in der 2D-Ansicht; **B:** Wiederholung durch jeden Stack wie in A; **C:** Ansicht der Stack-Rekonstruktionen von vorne; **D:** seitliche Ansicht der Stack-Rekonstruktionen; **E:** Änderung der Farbe einer der Konturen; **F:** vollständig rekonstruiertes Soma in der 3D-Ansicht

Zur leichteren Bearbeitung einer Rekonstruktion in der „3D Environment“ gibt es einige „Short Cuts“. Zum Drehen des Scans in allen Ebenen wird die linke Maustaste gedrückt gehalten und in eine beliebige Richtung bewegt. Um den Scan in derselben Position zu bewegen, ohne die Ebene zu verändern, wird auf der Tastatur die Taste „Shift“ gedrückt und der Scan mit der linken Maustaste bewegt. Das Vor- und Zurückscrollen des Rädchens der Computermaus ermöglicht ein Hinein- und Hinauszoomen. Um in die Ausgangsposition des Scans zurückzukehren wird der „Homebutton“ ausgewählt, die Schaltfläche mit dem Symbol des blauen Hauses in der oberen Programmleiste. Es ist sinnvoll, diesen Schritt im Laufe

einer Rekonstruktion einige Male durchzuführen, um sich einen Überblick über bisherige Fortschritte zu verschaffen. Ein Schritt einer Rekonstruktion kann rückgängig gemacht werden, indem auf der Tastatur die Tastenkombination „Strg + Z“ gleichzeitig gedrückt werden. Eine Rekonstruktion im Neurolucida 360 wird als .DAT-Datei gespeichert. Die Datei kann aus dem Ordner in das Programmfenster im „2D View“ gezogen werden und öffnet immer sowohl die Rekonstruktion, als auch den Scan, in dem diese erstellt wurde.

Nach der Rekonstruktion des Somas folgt die Rekonstruktion der Fortsätze der Mikrogliazelle. Vor Beginn der Rekonstruktion sollte die Zelle immer in allen Ebenen betrachtet werden, um sich ein umfassendes Bild über die Verläufe der Fortsätze zu machen, insbesondere über den Verlauf in die Tiefe des Schnittes (Z-Ebene). Von vorne betrachtet kann ein Fortsatz durchgehend erscheinen, was sich bei genauerer Betrachtung der Zelle in der Z-Ebene nicht bestätigt, sondern z.B. eine Überlagerung zweier Fortsätze von verschiedenen Zellen darstellt. Die Zelle wird herangezoomt, sodass eine gute Übersicht besteht. Rechts im Programmfenster werden die Einstellungen für die Rekonstruktion in der „3D Environment“ eingestellt. Es wird die Schaltfläche „Tree“ aktiviert. Sie ist nun blau umrahmt. In den Einstellungen unter „Tree“ wird bei „Tracing Mode“ ein Häkchen bei „User-guided“ gesetzt. Dadurch wird ein individuelles Nachfahren der Fortsätze mit der Computermaus vom Programm ermöglicht. Bei „Tracing Options“ wird ein Häkchen bei „Cycle tree colors“ gesetzt. Daneben kann eine Farbe für die Rekonstruktion des Fortsatzes ausgewählt werden. Wird diese nicht manuell ausgewählt, aktiviert das Programm per Zufall bei jeder neu begonnen Rekonstruktion eine neue Farbe. Bei „User-guided Tracing Options“ kann bei „Typical process width“ eine Dicke in μm für die Rekonstruktion der Fortsätze angegeben werden. Es sollte eine möglichst niedrige Dicke gewählt werden. Das Programm kann so auch sehr schwach angefärbte Fortsätze differenzierter in ihrem Verlauf im Scan erkennen und akkurater rekonstruieren. Dies reduziert den Anteil der späteren manuellen Anpassung. In dieser Arbeit wurde mit der „Typical process width“ von $0,3 \mu\text{m}$ gearbeitet. Zuletzt wird unter „User-guided Tracing Options“ bei „Method“ „Directional Kernels“ ausgewählt.

Die Maus erscheint als roter Kreis mit einem Kreuz (Bulls-eye) darin. Man geht mit der Maus zum somanahen Teil des Fortsatzes. Es ist wichtig, jede Rekonstruktion eines Fortsatzes am

Soma zu beginnen, da dies bei bestimmten Analysen durch den NeuroLucida Explorer erkannt wird und bei Nichteinhalten zu falschen Ergebnissen führen kann. Die Rekonstruktion wird mit einem Klick der linken Maustaste begonnen. Es wird mit der Maus den Fortsatz entlanggefahren. Das Programm erkennt bei guter chromogener Färbung den Verlauf automatisch, was eine Rekonstruktion großer Abschnitte eines Fortsatzes am Stück ermöglicht (Abbildung 6a, C). Erkennt das Programm den Fortsatz nicht, springt die Anzeige gegebenenfalls im Scan hin und her. In diesem Fall muss der Fortsatz in kleinen Abschnitten mit mehrmaligen Mausklicks rekonstruiert werden. Um eine angezeigte Rekonstruktion auszuführen, wird erneut mit der linken Maustaste geklickt. Dies kann beliebig oft durchgeführt werden, bis das Ende des Fortsatzes erreicht ist. Die Fortsatzrekonstruktion wird mit einem Rechtsklick der Computermaus beendet (Abbildung 6a, D). Im nächsten Schritt werden die Seitenäste des Hauptfortsatzes rekonstruiert. Die Maus wird zu der Verzweigungsstelle des Fortsatzes bewegt, an dem ein Seitenast beginnt. Wenn das Programm die Abzweigung erkennt, verändert sich das Bulls-eye, indem das Kreuz kleiner wird und eine schraffierte Kugel im bereits vorhandenen Fortsatz angezeigt wird (Abbildung 6a, E). Die Rekonstruktion des Seitenasts wird mittels Klick der linken Maustaste nun direkt vom bereits vorhandenen Fortsatz ausgehend begonnen. Die Maus wird wie zuvor entlang des Fortsatzes bewegt und die Rekonstruktion mit Rechtsklick der Maus beendet (Abbildung 6a, F). Hauptfortsatz und Seitenast haben nun dieselbe Farbe.

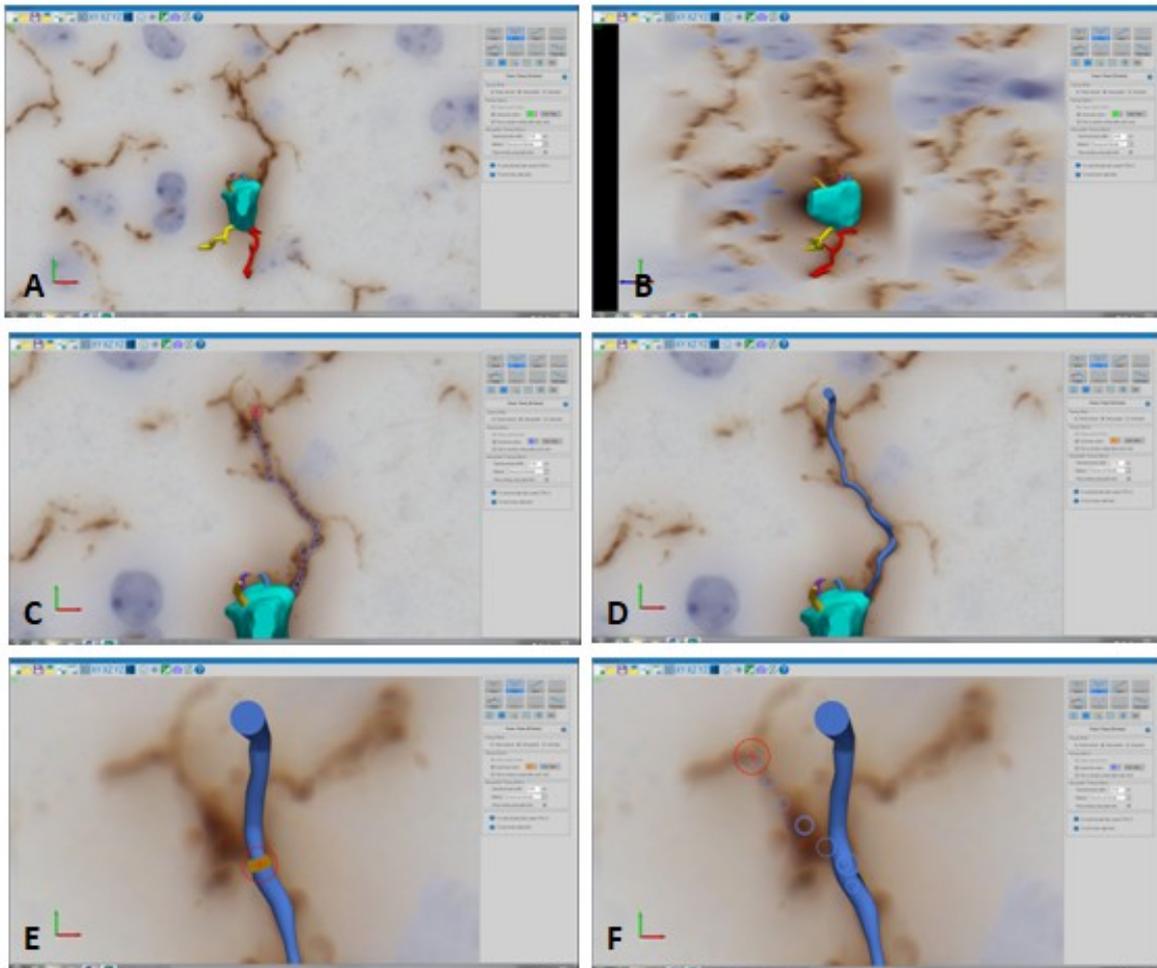


Abbildung 6a: Rekonstruktion eines Fortsatzes in NeuroLucida 360; **A:** Ansicht der Zelle von vorne in der 3D-Ansicht; **B:** seitliche Ansicht der Zelle in der 3D-Ansicht; **C:** Nachfahren eines Fortsatzes vom Soma ausgehend; **D:** Ausführung der vorgezeichneten Fortsatz-Rekonstruktion; **E:** Detektion einer Verzweigungsstelle mit Beginn am rekonstruierten Fortsatz; **F:** erneutes Nachfahren des Seitenastes

In einigen Fällen erkennt das Programm eine Verzweigung nicht und stellt nicht automatisch eine Verzweigungsstelle am Hauptfortsatz her (Abbildung 6b, A). In diesem Fall wird zunächst der Seitenast eigenständig wie oben beschrieben rekonstruiert. Das Programm wählt für diesen zufällig eine neue Farbe aus. Um manuell eine Verbindung zwischen dem Hauptfortsatz und dessen Seitenast herzustellen, werden die Schaltflächen „Edit“ und „Points“ aktiviert. Der erste Rekonstruktionspunkt des Seitenasts sollte einen gewissen Abstand zu dem Punkt des Hauptfortsatzes haben, mit dem er verbunden werden soll. Es wird die Schaltfläche „Connect“ aktiviert. Sie ist blau umrahmt. Es wird der erste Punkt des Seitenasts mit der linken Maustaste angeklickt (Abbildung 6b, B). Die linke Maustaste wird gedrückt gehalten und zu dem Punkt des Hauptfortsatzes gezogen, zu dem die Verbindung hergestellt werden soll. Dies ist an einer grünen Linie beim Ziehen der Maus von Punkt zu

Punkt zu erkennen (Abbildung 6b, C). Die linke Maustaste wird losgelassen. Das Programm verbindet die Fortsätze, das an der nun gleichen Farbe zu erkennen ist (Abbildung 6b, D). Die Verbindung zwischen zwei Rekonstruktionpunkten kann auch wieder gelöst werden. Dazu wird nach Aktivierung der Schaltflächen „Edit“ und „Points“ die Option „Detach“ ausgewählt. Es wird mit der linken Maustaste auf die Verbindungslinie zwischen zwei Punkten geklickt (Abbildung 6b, E). Das Programm trennt die Verbindung. Die beiden Fortsatzteile werden nun in unterschiedlichen Farben dargestellt (Abbildung 6b, F).

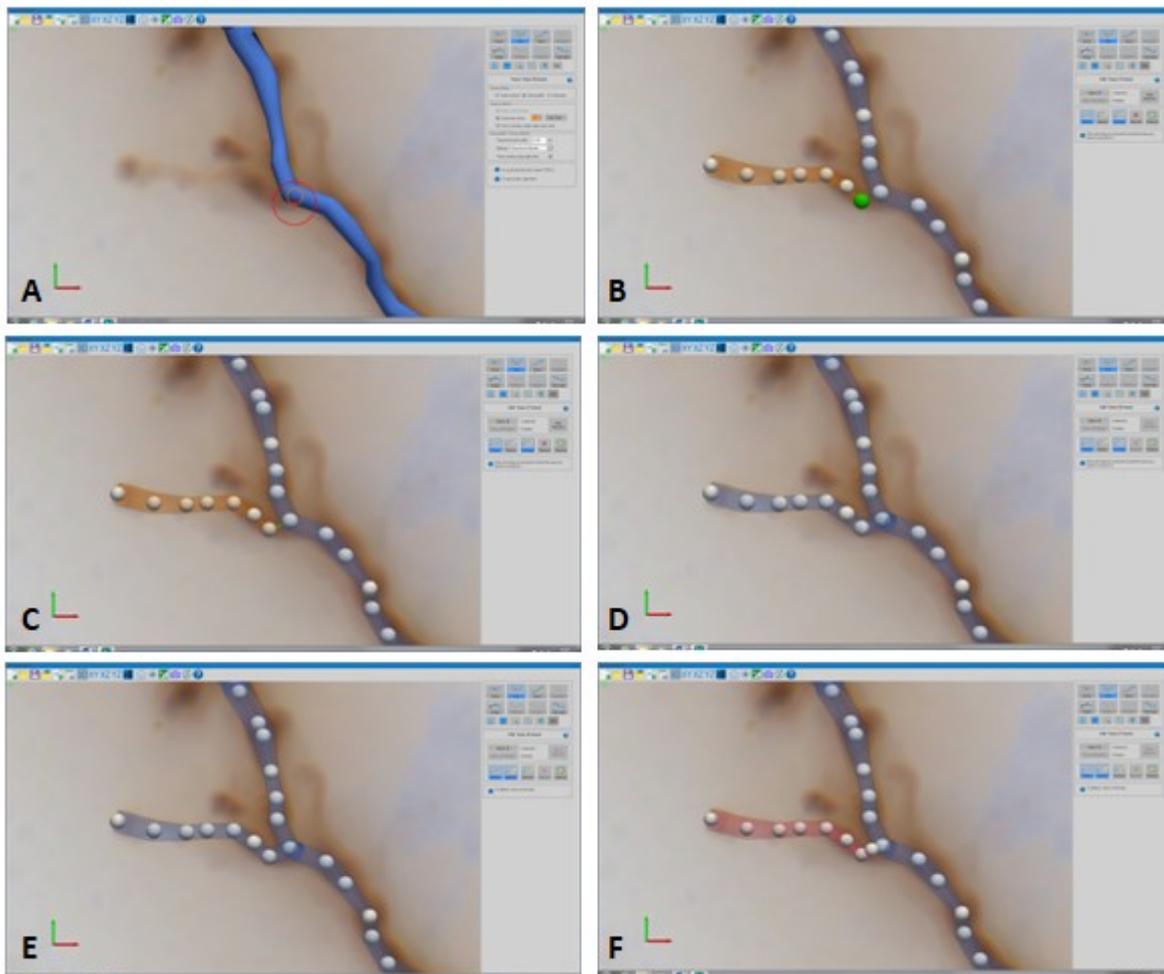


Abbildung 6b: Rekonstruktion eines Fortsatzes in NeuroLucida 360; **A:** Ansicht eines rekonstruiertes Fortsatzes; **B:** Rekonstruktion eines Seitenastes; **C:** Verbinden des Seitenastes mit dem Hauptfortsatz mittels „Connect“; **D:** Fortsatzrekonstruktionen in nun gleicher Farbe; **E:** Trennen eines Seitenastes von dem Hauptfortsatz mittels „Detach“; **F:** vom Hauptfortsatz getrennter Seitenast in neuer Farbe

Das NeuroLucida 360-Programm erkennt den Fortsatz während der Rekonstruktion nicht hundertprozentig akkurat. Es ist häufig eine manuelle Bearbeitung im Anschluss an die initiale Rekonstruktion notwendig. Dazu wird in der Leiste im rechten Programmfenster die

Schaltfläche „Edit“ und „Points“ aktiviert. Die Fortsatzrekonstruktion wird nun in ihren einzelnen Punkten angezeigt (Abbildung 6c). Ein Punkt kann durch Anklicken mit der linken Maustaste ausgewählt werden. Er erscheint grün. Um mehrere Punkte gleichzeitig zu markieren, wird nach Klicken auf den ersten Punkt die „Strg“-Taste der Tastatur gedrückt gehalten und beliebig viele weitere Punkte durch Anklicken markiert. Alternativ kann auch die „Strg“-Taste gedrückt und gehalten und mit der linken Maustaste durch Klicken und Halten ein Kasten um die entsprechenden Rekonstruktionspunkte gezogen werden. Die linke Maustaste wird losgelassen, die eingeschlossenen Punkte erscheinen grün. Ein oder mehrere markierte Punkte können dann mit gedrückter linker Maustaste verschoben und so genau angepasst werden. Hierbei ist es wichtig, die Lage der Rekonstruktionspunkte in allen Ebenen zu betrachten, um diese so akkurat wie möglich an den Scan anpassen zu können. Wenn der Punkt in der richtigen Position liegt, wird die linke Maustaste losgelassen.

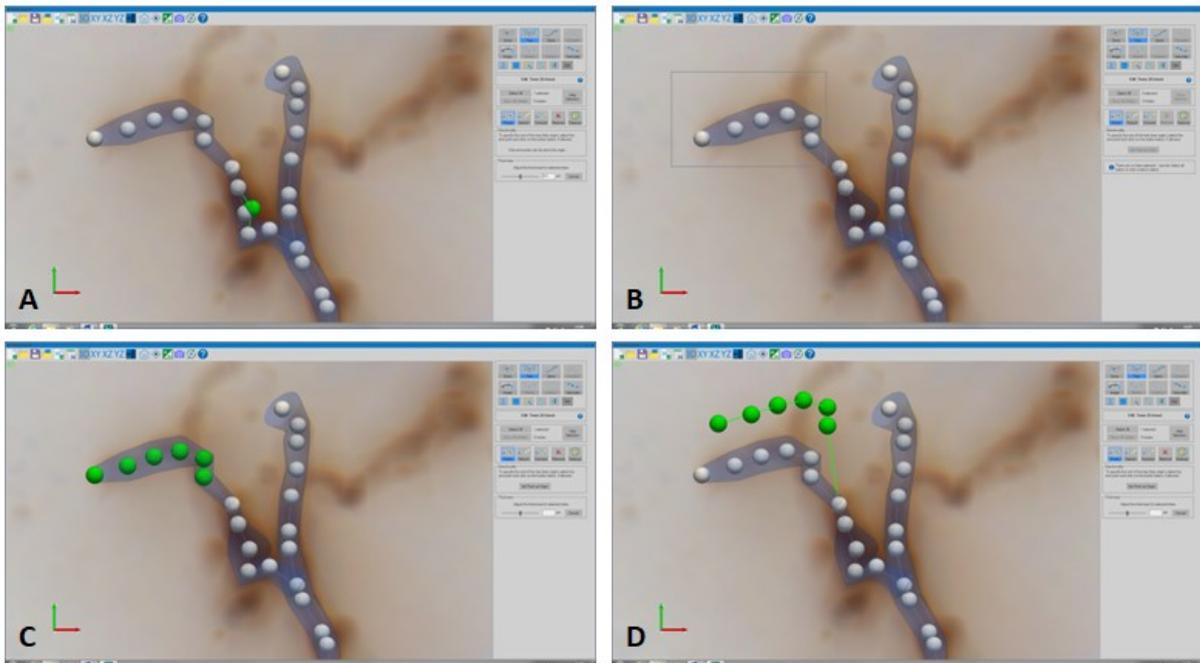


Abbildung 6c: Rekonstruktion eines Fortsatzes in NeuroLucida 360; **A:** Markierung eines Rekonstruktionspunktes; **B:** Markierung in Form eines Kastens; **C:** mehrere gleichzeitig markierte Rekonstruktionspunkte; **D:** gleichzeitiges Verschieben mehrerer markierter Rekonstruktionspunkte

Bei der dargestellten Beispielzelle ist zu erkennen, dass der letzte Rekonstruktionspunkt des Hauptfortsatzes in der Z-Ebene nach vorne verschoben ist. Um dies zu korrigieren, wird der Scan in die Y-Z-Achsenansicht verschoben (Abbildung 6d). Wie zuvor beschrieben wird der entsprechende Punkt markiert und zu den anderen Punkten des Hauptfortsatzes

verschoben. Es ist zu sehen, dass die Punkte der Rekonstruktion nach dem Verschieben kleiner geworden sind. Somit können auch zu groß erscheinende Rekonstruktionspunkte ein Hinweis auf einen solchen Fehler sein.

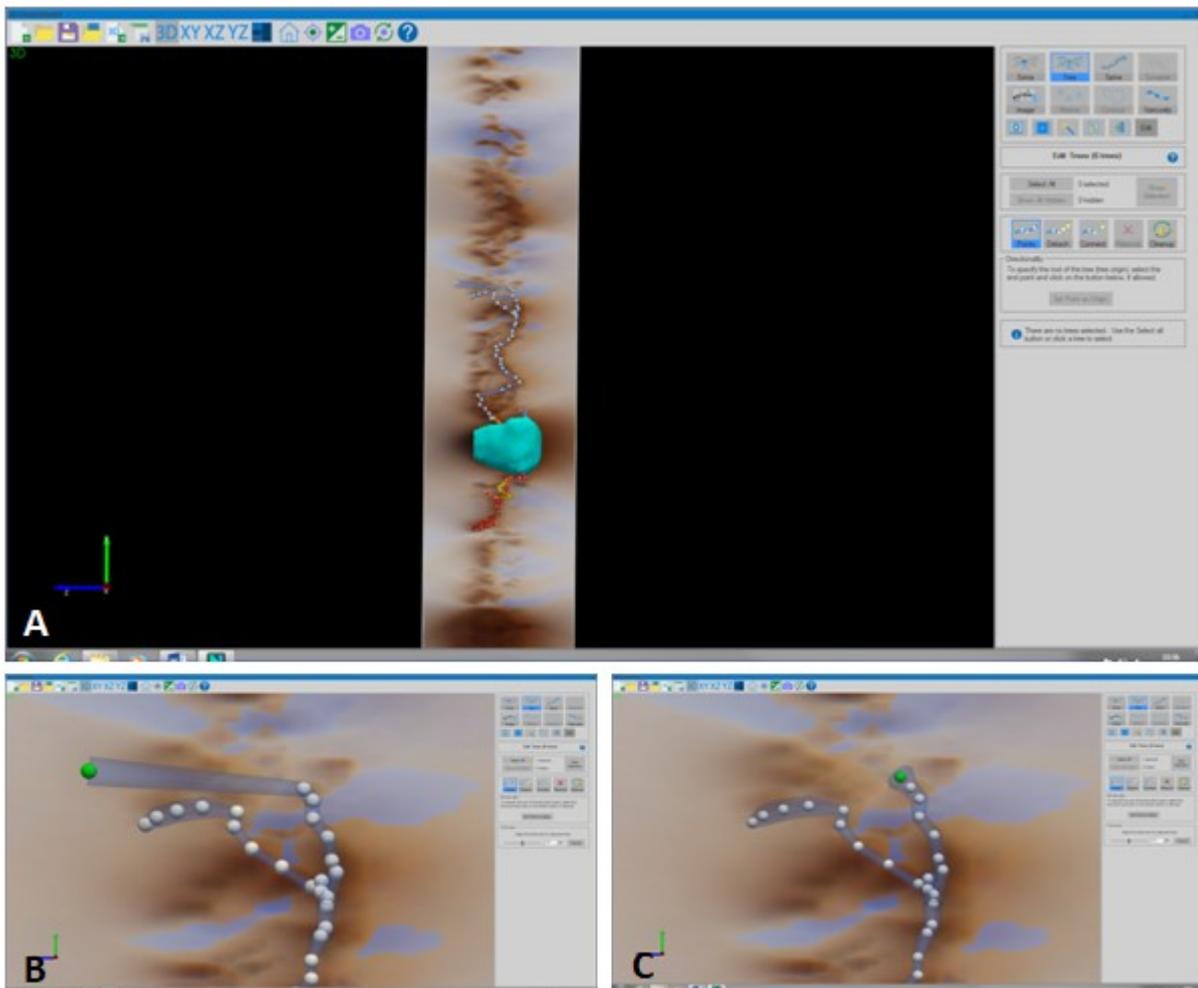


Abbildung 6d: Rekonstruktion eines Fortsatzes in NeuroLucida 360; **A:** seitliche Ansicht der gesamten Rekonstruktion in der 3D-Ansicht; **B:** Nahansicht des oberen Teils des rekonstruierten Fortsatzes mit markiertem verschobenem Endpunkt; **C:** markierter Rekonstruktionspunkt nach Verschiebung in den eigentlichen Fortsatzverlauf

Bei der Beispielizele ist ebenfalls zu sehen, dass an der Verzweigungsstelle des Fortsatzes viele Punkte durch das Programm gezeichnet wurden, was sich als Fehlbildung erkennen lässt (Abbildung 6e, A und B). Um einen Punkt einer Rekonstruktion zu löschen wird im „Edit“-Modus ein Punkt mittels Klick der linken Maustaste markiert. Der nun grün erscheinende Punkt kann entweder durch das Auswählen der Schaltfläche „Remove“ oder durch das Drücken der „Entf“-Taste der Tastatur gelöscht werden. Dieser Vorgang ist auch mit mehreren Punkten einer Rekonstruktion gleichzeitig möglich.

Um das Volumen eines Fortsatzes anzupassen, wird wie zuvor beschrieben der entsprechende Rekonstruktionspunkt markiert. Im rechten Programmfenster bei „Thickness“ kann das Volumen durch Verschieben des Reglers nach rechts für ein Erhöhen oder nach links für ein Verringern verändert werden (Abbildung 6e, C und D). Alternativ kann direkt eine neue Zahl im Feld neben μm eingegeben und die Enter-Taste auf der Tastatur gedrückt werden. In dieser Arbeit wurde das Verschieben des Reglers genutzt, um so jeden Punkt der Rekonstruktion differenziert an die Färbung im Scan anzupassen. Es können auch mehrere Punkte gleichzeitig markiert und deren Volumina durch Verschieben des Reglers gleichzeitig verändert werden.

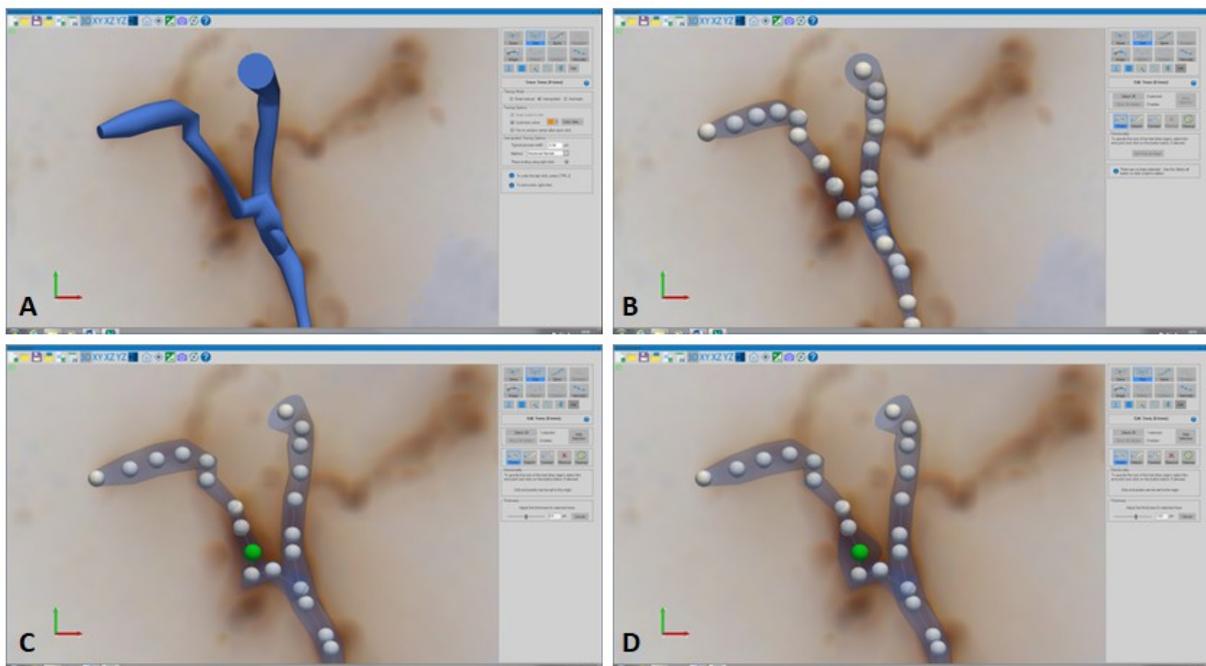


Abbildung 6e: Rekonstruktion eines Fortsatzes in NeuroLucida 360; **A:** Fehlrekonstruktion an der Verzweigungsstelle im oberen Fortsatzteil; **B:** Rekonstruktionsansicht mit zu vielen Rekonstruktionspunkten an der Verzweigungsstelle; **C:** markierter Rekonstruktionspunkt mit niedrigem Fortsatzvolumen; **D:** markierter Rekonstruktionspunkt mit hohem Fortsatzvolumen

Nach Fertigstellung der Rekonstruktion eines Fortsatzes sollte überprüft werden, ob er über die verschiedenen Ebenen hinweg korrekt rekonstruiert worden ist. Es werden die Schaltflächen „Tree“ und „Edit“ aktiviert. Der Fortsatz wird mit der linken Maustaste markiert, er erscheint weiß schraffiert (Abbildung 7, A). Im rechten Programmfenster wird unter „Transparency“ der Regler mit der linken Maustaste vollständig nach rechts verschoben. Der Fortsatz wird jetzt als eine Mittellinie (Centerline) dargestellt (Abbildung 7,

B). Der genaue Verlauf der Rekonstruktion ist zu erkennen, ohne dass dessen Volumen die Färbung des Scans überdeckt. Durch Bewegen des Scans kann der Verlauf der Fortsatzrekonstruktion nun in allen Ebenen auf seine Genauigkeit überprüft und gegebenenfalls angepasst werden. Durch Verschieben des Reglers nach links wird der Fortsatz wieder in der Gesamtheit seines Volumens angezeigt. Wenn die Transparenz auf die Centerline des Fortsatzes eingestellt ist und mit der linken Maustaste in den Scan geklickt wird, wird diese nicht mehr angezeigt. Um den Fortsatz wieder sichtbar zu machen, wird im „Edit“-Modus die Schaltfläche „Select All“ ausgewählt. Nun sind alle Fortsätze inklusive dem nicht mehr sichtbaren markiert. Der Regler bei „Transparency“ wird nach links bewegt. Alle Fortsätze sind nun wieder sichtbar. Mit diesem Vorgang kann man auch alle Fortsatzrekonstruktionen gleichzeitig auf ihre Centerlines reduzieren beziehungsweise unsichtbar machen. Dieser Vorgang kann auch auf das Soma angewendet werden, wenn man zur besseren Beurteilbarkeit eines Fortsatzbeginns die Somarekonstruktion nicht sehen möchte. Es werden die Schaltflächen „Soma“ und „Edit“ im rechten Programmfenster ausgewählt. Es kann entweder „Select All“ aktiviert werden, da nur ein Soma vorhanden ist, oder das Soma durch Anklicken mit der linken Maustaste direkt markiert werden. Unter „Transparency“ kann wieder mittels des Reglers das Soma durchsichtig gemacht werden (Abbildung 7, C und D). Um das Soma wieder sichtbar zu machen, wird der Regler unter „Transparency“ wieder nach links verschoben, gegebenenfalls mit vorheriger Auswahl von „Select All“.

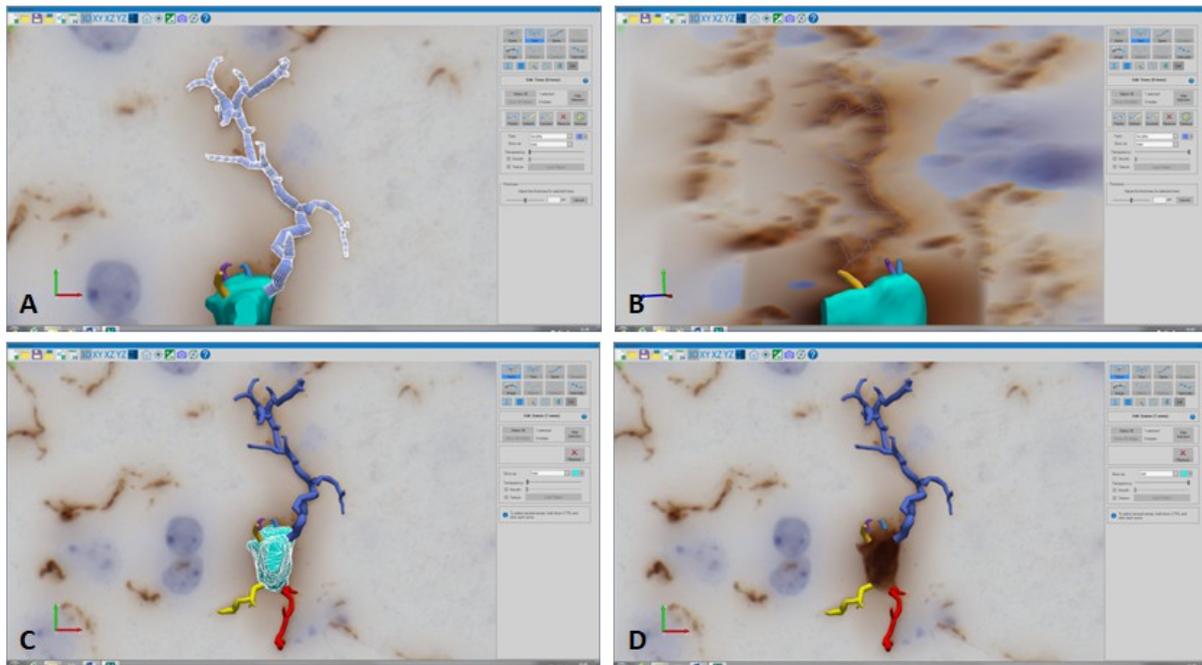


Abbildung 7: Rekonstruierte Mikrogliazelle in der 3D-Ansicht in NeuroLucida 360; **A:** Markierung des obersten Fortsatzes; **B:** oberster Fortsatz bei maximaler Transparenz mit sichtbarer Centerline; **C:** Mikrogliazelle mit markiertem Soma; **D:** Soma bei maximaler Transparenz

In der Regel ist der Ursprung eines Fortsatzes am Soma, wo die Rekonstruktion begonnen wird. Es kann dazu kommen, dass das Programm den Ursprung dennoch an einer anderen Stelle erkennt. Da es für einige Analysen im NeuroLucida Explorer wichtig ist, dass der Ursprung der Fortsätze korrekt am Soma liegt, sollte dies nach Fertigstellung der Rekonstruktion manuell überprüft werden. Es werden die Schaltflächen „Trees“, „Edit“ und „Points“ aktiviert. Es werden die ca. drei ersten somanahen Rekonstruktionspunkte eines Fortsatzes markiert. Im rechten Programmfenster unter „Directionality“ wird die Schaltfläche „Set to origin“ ausgewählt. Die Punkte werden nun vom Programm als Ursprung der Fortsatzrekonstruktion erkannt und als solcher verarbeitet. Wenn die markierten Punkte bereits als Ursprung verarbeitet sind, wird unter „Directionality“ statt vorheriger Auswahlmöglichkeit die Information „Selected point is already the origin of the tree“ angezeigt.

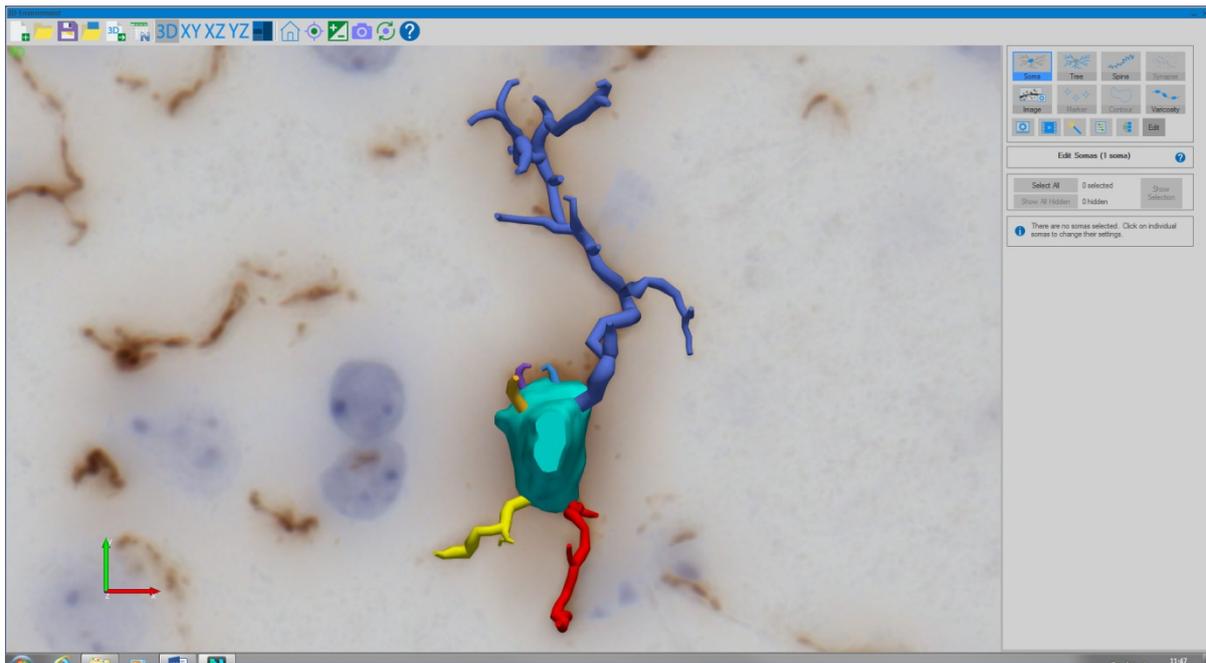


Abbildung 8: Vollständig abgeschlossene Rekonstruktion einer Mikrogliazelle in der 3D-Ansicht in Neurolucida 360

Das Neurolucida 360-Programm ermöglicht es, in der „3D Environment“ ein Video des Scans und der Rekonstruktion aufzunehmen. Es wird im rechten Programmfenster die Schaltfläche mit dem Filmsymbol (Filmrolle mit einem Play-Zeichen) ausgewählt. Darunter erscheint die Programmfläche „Create Movies“. Es wird ein Speicherort für die Videodatei ausgewählt, indem die Schaltfläche „Browser...“ über „Start Recording“ ausgewählt wird. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem der Speicherort festgelegt und mit „OK“ bestätigt wird. Für das Video kann man den Scan rotieren lassen um eine 360°-Ansicht der Mikrogliazelle oder dessen Rekonstruktion zu ermöglichen. Unter „Auto-Rotate Options“ kann die Rotationsrichtung des Scan durch Einstellen der weißen Kugel im 360°-Winkelkreis mit der linken Maustaste ausgewählt werden. In diesem Beispiel ist die Einstellung der Rotation bei 90° festgelegt. Der Scan dreht sich entsprechend nach rechts um seine vertikale Achse. Bei Einstellung auf 270° dreht sich der Scan nach links um seine vertikale Achse, bei 180° nach vorne und bei 0° nach hinten um seine horizontale Achse. Der Scan bzw. die Rekonstruktion wird so in der „3D Environment“ verschoben, wie sie aufgenommen werden soll. Die Videoaufnahme wird durch das Aktivieren der Schaltfläche „Start Recording“ begonnen. Durch Anklicken des Kästchens neben „Auto-Rotate“ unter „Auto-Rotate Options“ beginnt die Rekonstruktion sich wie eingestellt zu drehen. Durch erneutes Anklicken des Kästchens stoppt die Rotation wieder. Um die Videoaufnahme zu beenden, wird die Schaltfläche „Stop

Recording“ ausgewählt. Die .mp4-Videodatei wird durch das Programm erstellt und kann am ausgewählten Speicherort vorgefunden werden.

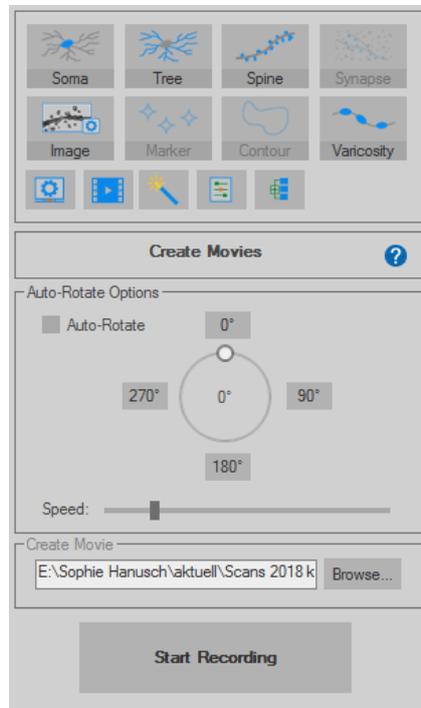


Abbildung 9: Ansicht des Steuerungsfelds „Create Movies“

2.9.2 Analyse in NeuroLucida Explorer

Die Auswertungen der im NeuroLucida 360-Programm erstellten Vektor-basierten Rekonstruktionen erfolgt im dazugehörigen Programm NeuroLucida Explorer. Es wird durch Doppelklick mit der linken Maustaste auf das Explorer-Symbol auf dem Desktop geöffnet. Die gespeicherte Datei der auszuwertenden Rekonstruktion wird geladen, indem sie vom Speicherort in das geöffnete Programmfenster des Explorers gezogen wird. Alternativ kann auch in der oberen Programmleiste des NeuroLucida Explorer die Schaltfläche „File“ und „Open“ ausgewählt werden. Es öffnet sich ein neues Fenster. Die Datei kann herausgesucht und durch „OK“ geladen werden. Eine im NeuroLucida 360-Programm bereits geladene Rekonstruktion kann auch direkt im NeuroLucida Explorer geöffnet werden. Dazu wird in der „3D Environment“ das Explorer-Symbol (links des 3D-Symbols) in der oberen Programmleiste ausgewählt. Es öffnet sich der NeuroLucida Explorer mit der zuvor im NeuroLucida 360 geladenen Rekonstruktion. Die Rekonstruktion wird auf dieselbe Weise im Programm

bewegt wie im Neurolucida 360. Damit die Analyse einer Zelle durchgeführt werden kann, muss die Rekonstruktion vollständig markiert sein. In der oberen Programmleiste werden die Schaltflächen „View“ und „Select All“ aktiviert. Die Rekonstruktion erscheint weiß umrahmt und schraffiert. Ohne die Markierung ist unter der Schaltfläche „Analyze“ keine Analyseoption auswählbar.

Die erste Analyse ist die Sholl-Analyse. Hierbei werden konzentrische Kreise im zweidimensionalen Raum bzw. konzentrische Kugeln im dreidimensionalen Raum in einem bestimmten Abstand zueinander gebildet (Abbildung 10). Sie beginnen im Zentrum des Somas der Rekonstruktion und verlaufen in einem festgelegten Abstand zueinander Richtung Peripherie. Die Sholl-Analyse im Neurolucida Explorer wertet die Rekonstruktionen automatisch nach verschiedenen Parametern aus. „Intersections“ sind alle Schnittpunkte zwischen einem Radius bzw. einer Kugelsphäre und allen Fortsätzen der Rekonstruktion. „Length“ in μm ist die Summe aller Fortsatzlängen zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären. „SArea“ (Surface Area) in μm^2 bezeichnet die Gesamtheit der Oberflächen aller Fortsätze zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären. „Volume“ in μm^3 bezeichnet die Gesamtheit des Volumens aller Fortsätze zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären. „Avg. Diameter“ (Average Diameter) in μm ist der gemittelte Durchmesser aller Fortsätze/Fortsatzdurchmesser zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären. „Nodes“ bezeichnet die Gesamtheit der Verzweigungsstellen aller Fortsätze zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären. „Endings“ bezeichnet die Gesamtheit der Fortsatzenden, die zwischen zwei Radii bzw. zwei Kugelsphären liegen. Zusätzlich ermöglicht die Sholl-Analyse im Neurolucida Explorer die Auswertung von verschiedensten „Spines“. Diese bezeichnen verschiedene Stacheln der Fortsätze, die ebenfalls im Programm rekonstruiert werden können. Für diese Arbeit wurde dies nicht genutzt.

Um eine Sholl-Analyse im Neurolucida Explorer durchzuführen, werden in der oberen Programmleiste unter „Analyze“ die Schaltflächen „Spatial“ und „Sholl Analysis“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem die Details der Analyse eingegeben werden. In dieser Arbeit wurde für „Starting radius“ und „Radius increment“, also der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgende Radii, jeweils $1 \mu\text{m}$ ausgewählt, um eine möglichst differenzierte Analyse über den gesamten Verlauf der Fortsätze einer Rekonstruktion zu erhalten. Die Optionen „Line thickness“ und die Farbe der Sphären der Sholl-Analyse können nach

Belieben gewählt werden. In dieser Arbeit betrug die „Line thickness“ 1 μm und für die Sphären wurde die Farbe Rot gewählt. Unter „Analyses“ wurde ein Häkchen bei „Dendrites“ gesetzt, da die Sholl-Analyse hier zur Auswertung der Fortsätze einer Rekonstruktion herangezogen wurde. Zur Ausführung der Analyse nach Auswahl der Details wird die Schaltfläche „Display“ aktiviert. Das Fenster schließt und ein neues öffnet sich. Dieses zeigt alle Ergebnisse der durchgeführten Sholl-Analyse an. Für diese Arbeit wurde der Parameter „Intersections“ für die Auswertung herangezogen.

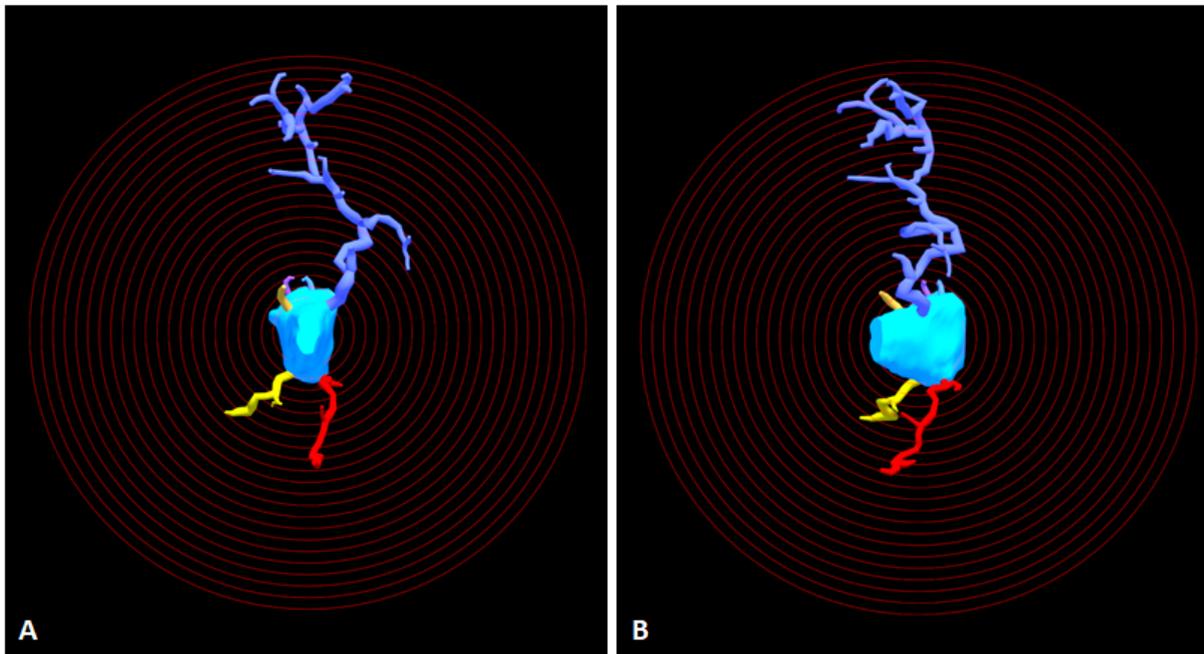


Abbildung 10: Sholl-Analyse in Neurolucida Explorer; Mikrogliazelle von vorne (A) und seitlich (B) in der 3D-Ansicht

Eine weitere Analyse im Neurolucida Explorer ist die „Neuron Summary“. Hierbei wird eine Mikrogliazellrekonstruktion in ihrer Gesamtheit nach bestimmten Parametern ausgewertet. Die Analyse teilt die Zelle in „Cell Body“, „Axon“, „Dendrite“ und „Apical Dendrite“ auf. Für die Auswertung der Mikrogliazellrekonstruktion wurden „Cell Body“ und „Dendrite“ herangezogen. Für beide Zellabschnitte wurden vom Programm die Parameter „Nodes“, „Ends“, „Length“ in μm , „Area“ in μm^2 , „Surface“ in μm^2 , „Volume“ in μm^3 und „Spines“ bestimmt. Zusätzlich werden die Parameter „Qty“ (Quantity) und „Complexity“ berechnet. „Qty“ ist in Bezug auf das Soma („Cell Body“) die Anzahl an manuell nachgezeichneten Stacks des Somas. In Bezug auf die Fortsatzrekonstruktion ist es die Anzahl der Fortsätze einer Rekonstruktion. Für die Auswertung der Rekonstruktionen wurde der Parameter der

Quantität bezogen auf die Fortsätze herangezogen. „Complexity“ ist ein Parameter, der die Komplexität des Somas und der Gesamtheit der Fortsätze einordnet. Für diese Arbeit wurde der Parameter nicht genutzt.

Zur Durchführung einer „Neuron Summary“-Analyse werden unter „Analyze“ die Schaltflächen „Structure“ und „Branched Structure Analysis“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird in der linken Programmleiste die Schaltfläche „Neuron Summary“ aktiviert und in der erscheinenden Übersicht ein Häkchen bei „Neuron Summary“ gesetzt. Die Analyse wird durch „OK“ ausgeführt. Es erscheint ein neues Fenster mit der Auswertung der Parameter der Rekonstruktion. Für diese Arbeit wurden die Parameter der Fortsatzanalyse „Quantity“, „Nodes“ und „Ends“ für die Auswertung herangezogen.

Bei der Convex Hull 3D-Analyse werden die periphersten Punkte der Rekonstruktion miteinander verbunden und bilden so einen die Zelle umgebenden Mantel. Die Analyse generiert die Parameter „Volume“ in μm^3 , der der Gesamtheit des ummantelten Volumens entspricht, und „Surface“ in μm^2 , der der gesamten Fläche der Ummantelung entspricht.

Für die Durchführung der Convex Hull 3D-Analyse werden unter „Analyze“ die Schaltflächen „Spatial“ und „Convex Hull Analysis“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird bei „Convex Hull 3D“ ein Häkchen gesetzt. Damit die Ausführung der Analyse auch im eigentlichen Programmfenster des Explorers dargestellt wird, wird ein Häkchen bei „Visualize surface“ gesetzt. Die Analyse wird mit „OK“ durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Parameter „Volume“ herangezogen.

Um eine veränderte Mikrogliazellmorphologie zu quantifizieren, wurde zusätzlich der Ramification Index (RI) herangezogen [23]. Der RI wird durch die Formel: $\text{RI} = \text{maximale Projektionsfläche der Zelle} / \text{Zellfläche}$ ($\text{RI} = \text{maximum projection area/cell area (Ap/Ac)}$) definiert [23]. Diese zweidimensionale Analyse wurde in dieser Arbeit auf die dreidimensionalen Rekonstruktionen im NeuroLucida Explorer übertragen (Abbildung 11). Das Volumen aus der Convex Hull 3D-Analyse wurde für die maximale Projektionsfläche der Zelle herangezogen, da es der Verbindung aller peripheren Rekonstruktionpunkte im

dreidimensionalen Raum entspricht (V_p). Für die Zellfläche wurde das Gesamtvolumen einer Rekonstruktion aus Soma und Fortsätzen aus der Neuron Summary errechnet (V_c).

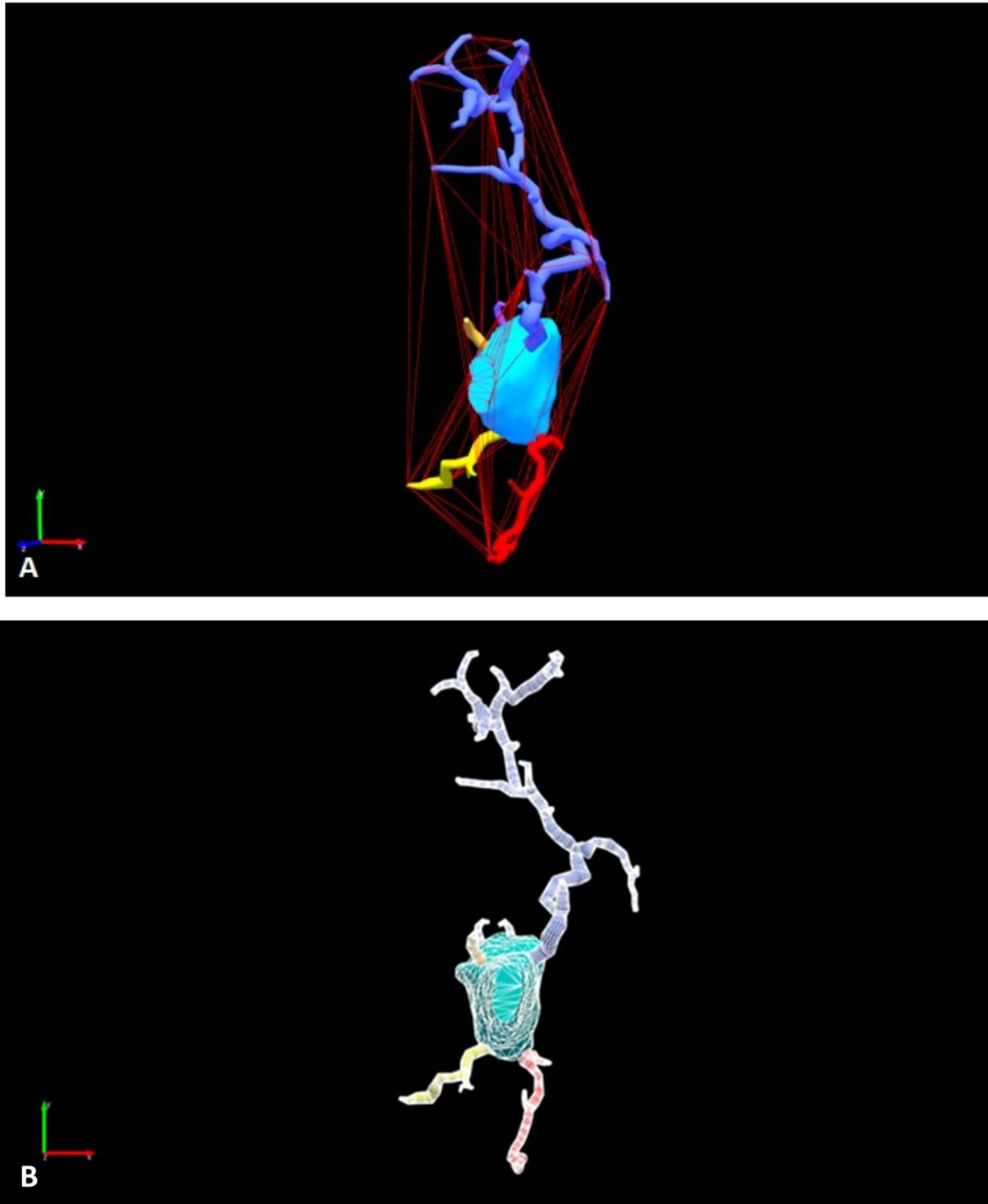


Abbildung 11: Auswahl des Ramification Index (RI) in Neurolucida Explorer; **A:** Maximales Projektionsvolumen der Zelle (V_p) mittels Convex Hull Analyse; **B:** Maximales Zellvolumen (V_c) mittels Neuron Summary

2.10 Rekonstruktion der Mikrogliazellen in ImageJ

ImageJ ist ein frei verfügbares Bildverarbeitungsprogramm, das für wissenschaftliche multidimensionale Bilder entwickelt wurde [26]. Es ist durch zahlreiche Plug-ins durch jede Nutzerin und jeden Nutzer der ImageJ-Gemeinschaft erweiterbar [26]. Seit der Entwicklung von ImageJ1 1997 wurden viele Nachfolgeprogramme geschrieben, die neue Erweiterungen mit dem bisherigen Programm kombinieren [26]. Für die hier durchgeführten Rekonstruktionen und Analysen von Mikrogliazellen wurde die Version Fiji (Fiji is just ImageJ) und darin das Programm ImageJ-win-64 (Version 1.51n für Windows, National Institute of Health, USA) verwendet.

Um die mit dem Confocal-DSU-Mikroskop eingescannten Bilddateien im ImageJ-Programm öffnen zu können, müssen diese in .tiff-Dateien konvertiert werden. Dazu wurde das Programm Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, USA) genutzt. Das Programm wird geöffnet. Eine Kalibrierung ist nicht notwendig. Es wird in der oberen Programmleiste „Image“ und „Image Organizer“ ausgewählt. Die entsprechende .jpx-Datei mit der Übersichtsaufnahme des Kortex einer Hemisphäre wird in das Programmfenster gezogen. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird rechts unten ein Häkchen gesetzt, damit alle zugehörigen Stacks der .jpx-Datei mit in das Programm geladen werden. So kann vor dem Konvertieren überprüft werden, ob die für die Rekonstruktion ausgewählte Mikrogliazelle zentral im Bildausschnitt liegt. So sollen Verwechslungen vermieden werden, da oft mehrere Zellen nebeneinander liegen. Es wird im „Image Organizer“ unten im Programmfenster „1:1“ angeklickt. Es werden in der oberen Programmleiste die Schaltflächen „File“, „Image Stack“, „Save As“ und „Tiff“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem ein Speicherort und Dateiname ausgewählt werden. Dieser Vorgang wird für jede Mikrogliazelle wiederholt. Die neuen .tiff-Dateien können nun im ImageJ-Programm geöffnet werden.

Für eine Rekonstruktion im ImageJ-Programm wurden die Stacks zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefasst, zu einem 8-bit-Bild konvertiert und die Silhouette der Mikrogliazelle mittels „polygonal“-Tool rekonstruiert. Es wurden eine Sholl-Analyse und eine manuelle Auswertung in Anlehnung an die Neuron Summary des NeuroLucida 360 durchgeführt sowie der Ramification Index ausgewertet. Damit sollten die Möglichkeiten zur

Rekonstruktion und Analyse der Mikrogliazellmorphologie im ImageJ-Programm den Möglichkeiten des Neurolucida 360-Programms gegenübergestellt werden.

2.10.1 Methodische Durchführung

Vor Beginn der Rekonstruktionen mit ImageJ muss eine Kalibrierung durchgeführt werden. Diese sollte möglichst für die Auswertung aller zusammengehörigen Rekonstruktionen beibehalten werden. Das Programm darf dafür bis zum Abschluss der Rekonstruktionen nicht mehr geschlossen werden. Bei jedem neuen Öffnen des Programms muss die Kalibrierung erneut durchgeführt werden. Das ImageJ-Programm wird geöffnet. Zur Kalibrierung wird ein Gitterbild in das Programm geladen. Für diese Arbeit wurde ein Gitter mit 25 µm-Abständen in 60-facher Vergrößerung mit dem Confocal-DSU-Mikroskop eingescannt. Es wird eine gerade Linie von einer Seite eines Quadrats zu der gleichen Seite des rechts davon liegenden Quadrats gezogen. Dazu wird in der Programmleiste die Schaltfläche „Straight“ durch Anklicken aktiviert und auf der Tastatur „Shift“ gedrückt gehalten, um mit der Computermaus eine gerade Linie zu ziehen. Die Kalibrierung wird festgelegt, indem anschließend die Schaltfläche „Analyze“ und „Set Scale“ ausgewählt werden. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird bei „Known Distance“ für die ausgemessene Strecke im Gitterbild die entsprechende absolute Länge von 25 µm eingegeben. Es wird die Schaltfläche „OK“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird ein Häkchen bei dem Kästchen „Global“ gesetzt und „OK“ ausgewählt. Die Kalibrierung wird so automatisch auf alle in ImageJ geöffneten Dateien angewendet, bis das Programmfenster geschlossen wird. Das Gitterbild wird geschlossen. Das Programm verarbeitet die Kalibrierung als Pixel/µm. Dadurch gibt es die Möglichkeit, direkt den Pixel/µm-Wert aus einer früheren Kalibrierung einzugeben.

Die .tiff-Datei mit der zu rekonstruierenden Mikrogliazelle wird in ImageJ geöffnet. Es werden aufeinanderfolgend die Schaltflächen „Image“, „Stacks“ und „Z Project“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es wird ein Projektionstyp ausgewählt. Für die hier durchgeführte Rekonstruktion wurde der Projektionstyp „Min Intensity“ ausgewählt, um den höchsten Kontrast zu erreichen. Die Stacks der ursprünglichen .tiff-Datei sind nun durch das Programm übereinandergelegt und zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefasst. Um

die zu rekonstruierende Zelle ausreichend groß darzustellen, wird diese ausgeschnitten. Es wird dazu in der Leiste am oberen Rand des Programmfensters die Schaltfläche „Rectangular“ aktiviert und mit der Maus ein Rechteck um die Zelle gezogen. Es wird die Schaltfläche „Image“ und „Crop“ ausgewählt (Abbildung 12, A). Das geschnittene Bild wird als neue Datei gespeichert.

Um eine Sholl-Analyse durchführen zu können, muss die vorliegende Datei in ein binäres Bild umgewandelt werden. Dadurch wird der Scan in Zelle und Hintergrund aufgeteilt. Das Programm kann erst dann auswerten, wo ein Schnittpunkt mit der Zelle besteht und wo nur Hintergrund liegt. Es werden die Schaltflächen „Image“, „Color“ und „Color Deconvolution“ ausgewählt. Ein Auswahlfenster öffnet sich, hier wird bei Vectors „H DAB“ ausgewählt. Das ursprüngliche Bild wird so in drei Farbkanäle aufgespalten. Es öffnen sich drei neue Fenster mit jeweils einem Farbkanal (Grün, Blau und Rot). Für die hier durchgeführte Rekonstruktion wurde der rote Farbkanal ausgewählt, da er den stärksten Kontrast aufweist (Abbildung 12, B). Alle anderen Bilder werden geschlossen. Durch die „Color Deconvolution“ wird die blaue Hämalaun-Gegenfärbung der Zellkerne durch das Programm herausgefiltert, sodass eine erschwerte Rekonstruktion durch Überlagerungen von Zellen durch deren Zellkerne vermieden wird.

Die Zelle wird im Programmfenster herangezoomt. Es wird in der oberen Leiste des Programmfensters die Schaltfläche „Polygon selections“ aktiviert. Die Zelle wird mittels mehrerer Mausklicks in kleinen Abständen exakt umfahren und so rekonstruiert (Abbildung 13, C). Die Rekonstruktion wird durch einen Klick mit der rechten Maustaste beendet, indem sich der erste und letzte Rekonstruktionspunkt automatisch verbinden. Wenn dies während der Rekonstruktion passiert, muss diese erneut begonnen werden. Nach Beendigung der Rekonstruktion können die einzelnen Punkte angepasst werden. Es sollten daher möglichst kleine Distanzen zwischen den einzelnen Rekonstruktionspunkten liegen. Die Rekonstruktion ohne die zugrundeliegende Bilddatei wird durch die Schaltflächen „File“, „Save As“ und „Selection“ gespeichert. Um die rekonstruierte Zelle als Bilddatei zu erhalten, werden die Schaltflächen „Edit“ und „Clear outside“ ausgewählt. Der Bildbereich außerhalb der Rekonstruktion wird dadurch mit einer einheitlichen Farbe ausgefüllt. Es wird dafür die Farbe Weiß verwendet, um den größtmöglichen Kontrast zur Rekonstruktion zu

gewährleisten. Die Farbe wird durch das Auswählen der Schaltflächen „Image“, „Color“ und „Color Picker“ eingestellt. Um den Bildbereich außerhalb der Rekonstruktion manuell auszufüllen, wird in der oberen Leiste im Programmfenster „Flood Fill Tool“ aktiviert und in den entsprechend Bildbereich außerhalb der Rekonstruktion geklickt. Die polygonale Rekonstruktion muss für diese Schritte im Programm geöffnet bleiben. Anschließend wird in den Bildbereich außerhalb der Rekonstruktion geklickt, sodass diese automatisch vom Programm geschlossen wird. Die neue Bilddatei mit der ausgeschnittenen Zelle wird als neue .tiff-Datei gespeichert.

Damit die Sholl-Analyse in ImageJ bei allen Zellen vergleichbar ist, erfolgte die Anwendung eines Schwellenwertes, um die höchste und immer gleiche Intensität der Zellrekonstruktionen zu erreichen. Es werden die Schaltflächen „Image“, „Adjust“ und „Auto Threshold“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster mit der Auswahl aller Auto Thresholds. Es wird der Threshold ausgewählt, der die Rekonstruktion vollständig ausfüllt. Die Rekonstruktion erscheint in Braun. Es werden die Schaltflächen „Image“, „Adjust“ und „Threshold“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem die genaue Höhe des Threshold eingestellt werden kann. Es muss sichergestellt werden, dass jeder Pixel der Rekonstruktion durch den Threshold erfasst wird. Er wird solange erhöht, bis die gesamte Rekonstruktion einheitlich ausgefüllt ist. Dies muss individuell für jede Rekonstruktion durchgeführt werden. Alternativ kann für jede Zelle ein so hoher Threshold gewählt werden, dass damit sicher alle Pixel in allen Rekonstruktionen ausgefüllt sind. In dieser Arbeit wurde der Threshold auf 195 festgelegt. Es wird die Schaltfläche „Apply“ ausgewählt und das Fenster geschlossen (Abbildung 12, C). Das Bild wird als neue .tiff-Datei gespeichert.

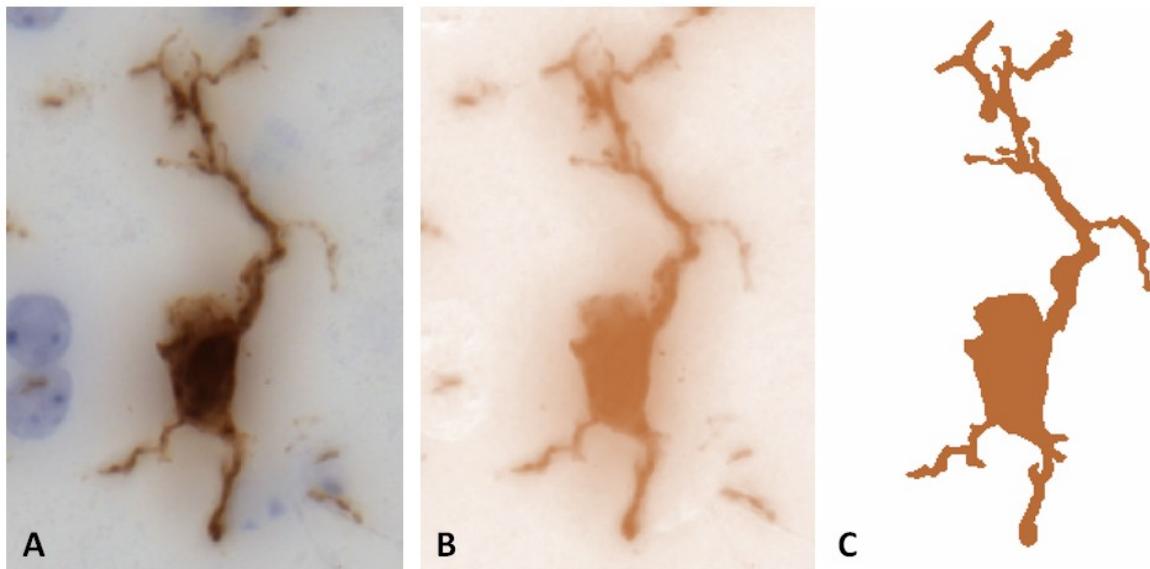


Abbildung 12: Rekonstruktion einer IBA1-immunhistochemisch gefärbten Mikrogliazelle in ImageJ; **A:** gecropte Zelle nach Anwendung des Z-Project; **B:** Zelle im Rotkanal der Color Deconvolution; **C:** Zelle nach Anwendung des Thresholds

2.10.2 Analyse in ImageJ

Um eine Veränderung der Morphologie der Mikrogliazellen zu untersuchen, wird eine Sholl-Analyse im ImageJ-Programm durchgeführt. Es werden die Schaltflächen „Analyze“ und „Sholl Analysis“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster. Es muss zunächst manuell das Zentrum des Somas der Zelle ausgewählt werden. Es gibt drei Optionen. Es wird eine gerade Linie vom Zentrum des Somas bis zu dem Punkt gezogen, der noch von der Analyse erfasst werden soll. Dafür wird die Schaltfläche „Straight“ in der oberen Programmleiste aktiviert, auf der Tastatur die Taste „Shift“ gedrückt gehalten und mit der Computermaus eine Linie gezogen. Alternativ wird die Schaltfläche „Point“ ausgewählt und in das Zentrum des Somas ein Punkt per Mausklick gesetzt. Als dritte Möglichkeit wird die Schaltfläche „Multi-Point“ ausgewählt und ein Punkt in das Zentrum des Somas sowie auf jeden primären Fortsatz des Somas gesetzt. Es werden erneut die Schaltflächen „Analyze“ und „Sholl Analysis“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem die notwendigen Analysedaten in die Felder „Starting radius“, „Ending radius“, „Radius step size“ und „Primary branches“ eingegeben werden. „Starting radius“ und „Radius step size“ werden analog der Sholl-Analyse im Programm NeuroLucida 360 auf 1 μm festgelegt. Der „Ending radius“ wird im ImageJ-Programm so hoch geschätzt, dass alle Fortsätze mit eingeschlossen werden. Bei der ersten Option ist dieser Wert bereits durch den Endpunkt der gezogenen Linie festgelegt.

Wenn zuvor die Variante „Multi-Point“ genutzt wurde, wird die Anzahl der „Primary branches“ automatisch durch das Programm gewählt. Wenn diese nicht genutzt wurde, werden die „Primary branches“ manuell markiert. Es wird ein Häkchen bei „Create intersections mask“ gesetzt und die Schaltfläche „OK“ ausgewählt, um die Sholl-Analyse durchzuführen (Abbildung 13, A)

Um einen Vergleich zur Neuron Summary im Neurolucida 360-Programm zu ermöglichen, wurden bei jeder Rekonstruktion manuell die Anzahl der Fortsätze (Quantity), die Anzahl der Verzweigungsstellen (Nodes) und die Anzahl der Endpunkte der Fortsätze (Endings) ausgezählt. Dazu wird die Schaltfläche „Points“ in der oberen Programmleiste aktiviert und in drei Durchgängen die drei genannten Parameter in der Threshold-Datei jeder Zelle in ihrer Anzahl markiert und gespeichert. Es sollte gewährleistet sein, dass bei dem Parameter Nodes die gleichen Kriterien wie im Neurolucida Explorer zur Messung angewendet werden. Der Neurolucida Explorer zählt eine Verzweigungsstelle, wenn zwei Seitenäste von demselben Rekonstruktionspunkt eines Hauptasts abgehen. Wenn sich im ImageJ-Programm zwei Seitenäste mit ihren Ausgangspunkten von ihrem Hauptast direkt gegenüberlagern, wurden diese dementsprechend als eine Verzweigungsstelle gezählt.

Um zusätzlich eine veränderte Mikrogliazellmorphologie quantifizieren zu können, wird der RI bestimmt ($RI = \text{maximum projection area}/\text{cell area} (A_p/A_c)$) [23]. Für die maximale Projektionsfläche wird in der oberen Leiste im Programmfenster die Schaltfläche „Polygonal“ aktiviert und die prominentesten Punkte der Zelle per Mausklick miteinander verbunden (Abbildung 13, B). Für die Zellfläche wird die zuvor durchgeführte polygonale Rekonstruktion (A_c) der Zelle genutzt (Abbildung 13, C). Diese wird zum erneuten Öffnen als Datei in die Programmleiste gezogen. Die dazugehörige Threshold-Datei muss bereits geöffnet sein. Es werden nun die Schaltflächen „Analyze“ und „Measurement“ ausgewählt. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem die Fläche der Rekonstruktion („Area“) abzulesen ist. Nach der Rekonstruktion der maximalen Projektionsfläche (A_p) werden diese Schritte zur Auswertung der peripheren Fläche ebenfalls durchgeführt.

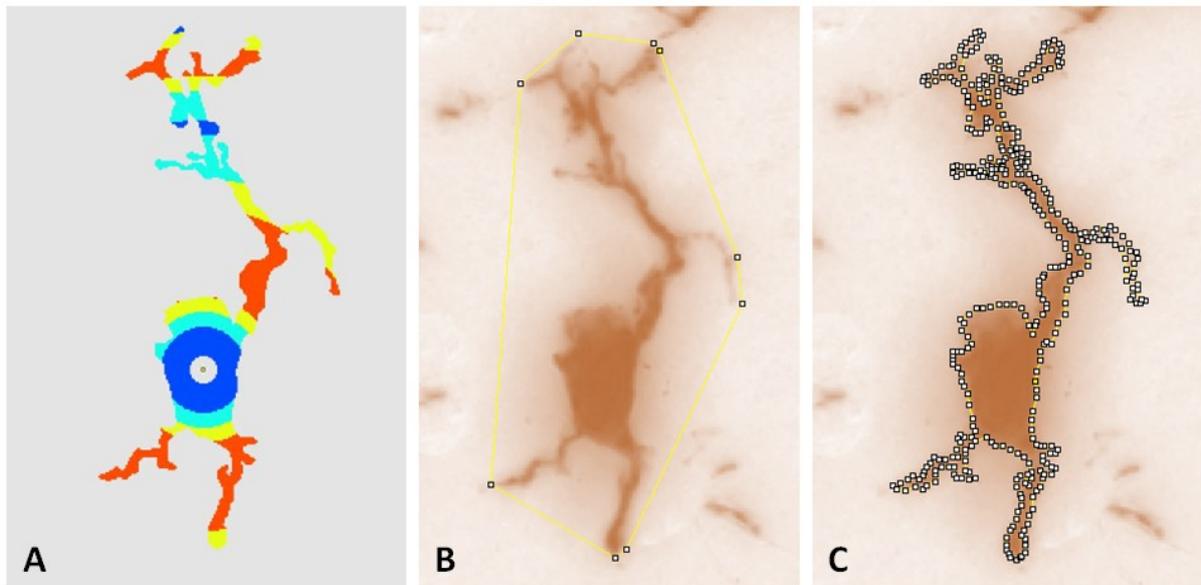


Abbildung 13: Analysen in ImageJ; A: Intersection Mask der Sholl-Analyse; B: polygonale Rekonstruktion, Zellfläche (A_c); C: maximale Projektionsfläche (A_p)

2.11 Statistische Auswertung

Nach Abschluss der Rekonstruktionen und deren Analysen in den Programmen Neurolucida 360/ Explorer und ImageJ wurden die Zellen entblindet. Auf fünf Mäuse in der Kontrollgruppe ($n = 5$) verteilt wurden insgesamt 44 Mikrogliazellen ausgewählt und rekonstruiert. Auf fünf Mäuse in der Cuprizone-Gruppe ($n = 5$) verteilt wurden insgesamt 74 Mikrogliazellen ausgewählt und rekonstruiert. Die Daten der Zellen wurden auf das jeweilige Tier zurückbezogen und für jede Maus ein Mittelwert für die jeweiligen Parameter errechnet.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 9.0.1 für Windows, San Diego, CA, USA) genutzt. Als statistischer Test wurden der Two-Way ANOVA (analysis of variance) mit two-tailed Tukey's Multiple Comparison angewendet, um sowohl einen Vergleich der Parameter zwischen den Daten der Kontroll- und Cuprizone-Gruppe sowie einen Vergleich der Parameter zwischen dem Neurolucida 360- und dem ImageJ-Programm zu erhalten. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (engl.: Standard Deviation, SD) angegeben. Bei einer vorhandenen Signifikanz zwischen den Gruppen sind diese mit einem Sternchen gekennzeichnet ($* = p < 0,05$). Alle anderen nicht signifikanten Ergebnisse sind mit dem entsprechenden p-Wert ($p > 0,05$) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Die verschiedenen Analysen wurden zur Beantwortung zweier Fragestellungen herangezogen. Zum einen sollte herausgefunden werden, ob bereits in der Frühphase einer Demyelinisierung morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden können (Abbildung 14). Diese Frühphase der MS wurde durch die Fütterung von Cuprizone für sieben Tage imitiert. Zum anderen sollte herausgefunden werden, mit welchem Computerprogramm, Neurolucida 360 oder ImageJ, diese morphologischen Unterschiede besser quantifizierbar sind.

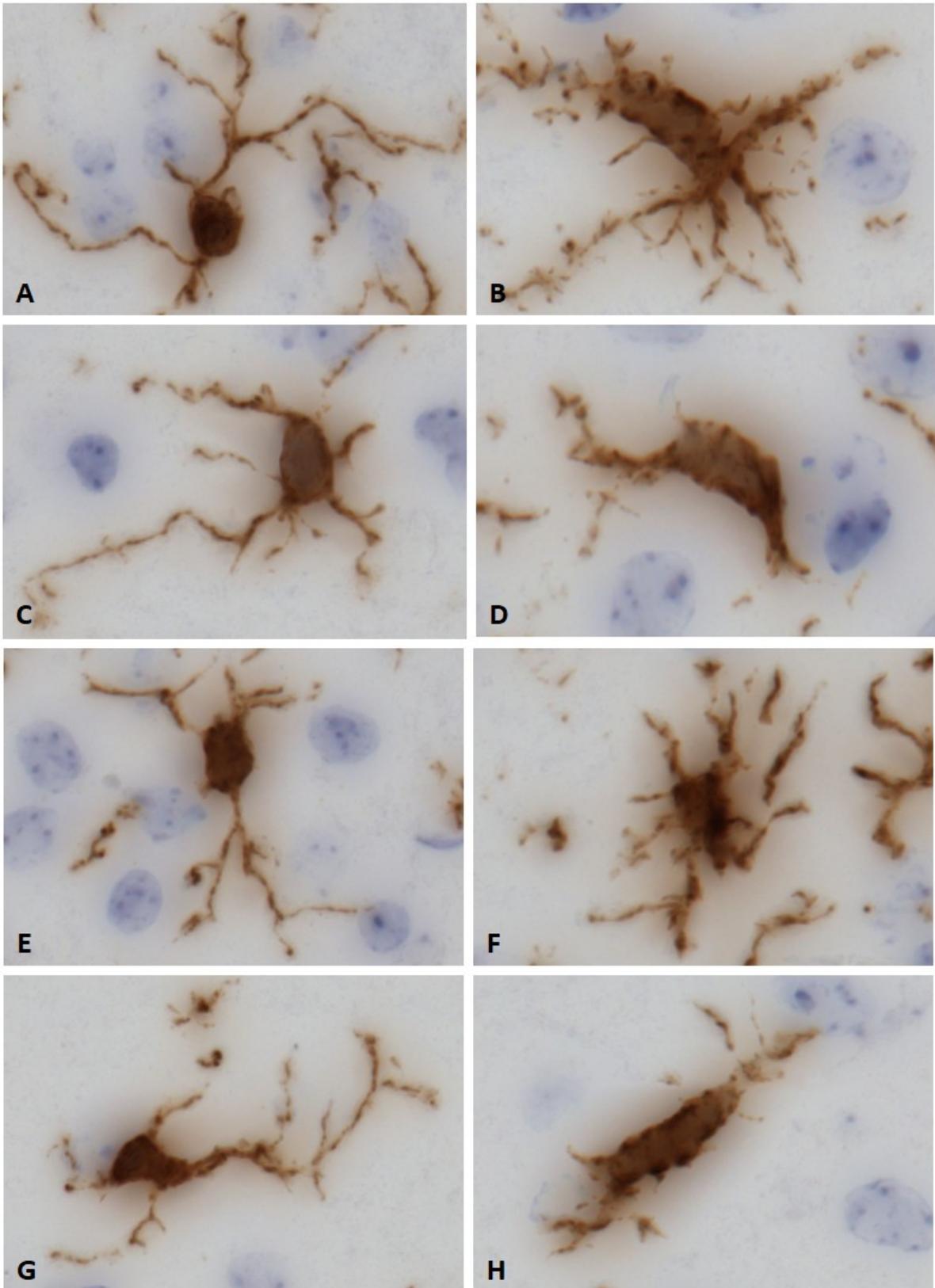


Abbildung 14: Repräsentative IBA1-immunohistochemisch gefärbte Mikrogliazellen; **A, C, E, G:** Kontrollgruppe; **B, D, F, H:** Cuprizone-Gruppe

3.1 Sholl-Analyse

Die Sholl-Analyse wurde zur Auswertung der Schnittpunkte der Fortsätze einer Rekonstruktion mit mehreren Radii bzw. Sphären (Intersections, Abbildung 16, A) herangezogen. Um eine übersichtliche Betrachtung zu ermöglichen, wurden dafür die Radii bzw. Sphären in 5 μm -Schritten ausgewertet (Abbildung 15).

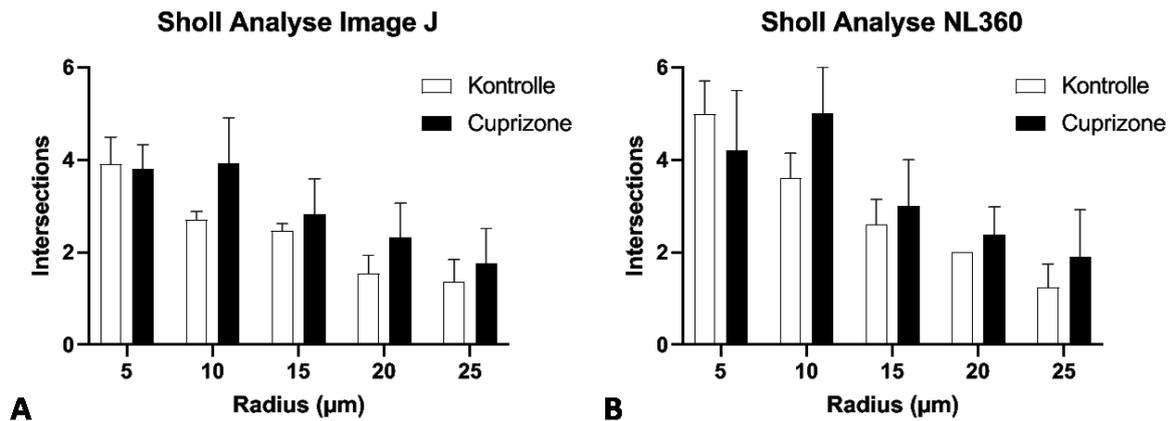
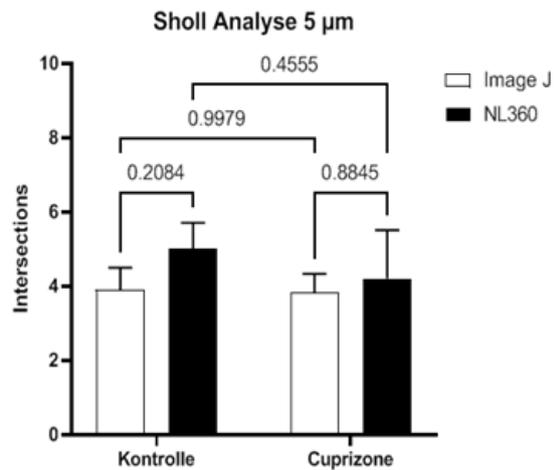
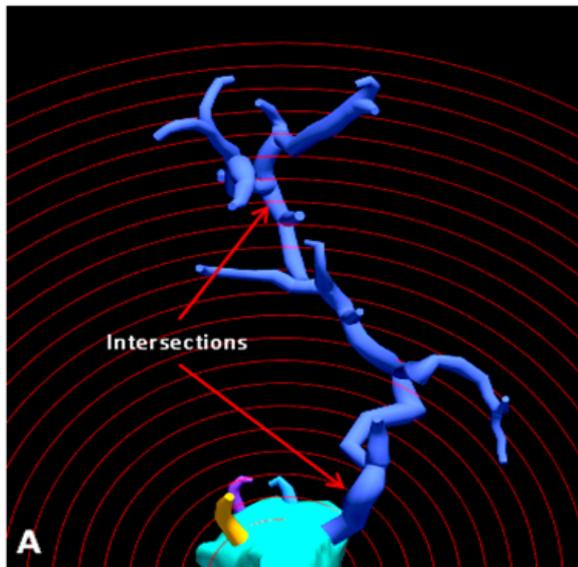
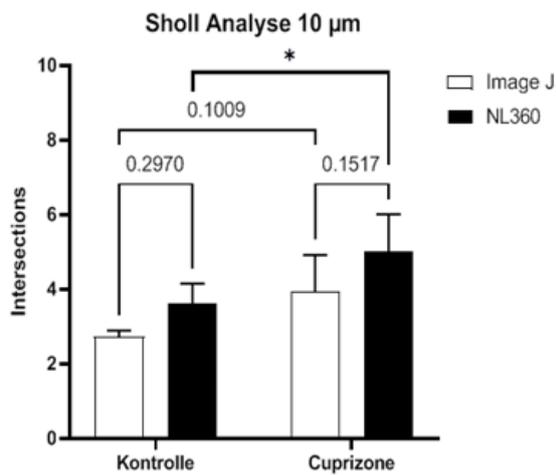


Abbildung 15: Übersicht Auswertung der Intersections ImageJ vs. NeuroLucida 360 in der Sholl-Analyse; **A:** Grafik zu Intersections in der Sholl-Analyse im ImageJ-Programm in 5 μm -Schritten; **B:** Grafik zu Intersections in der Sholl-Analyse in NeuroLucida 360 in 5 μm -Schritten

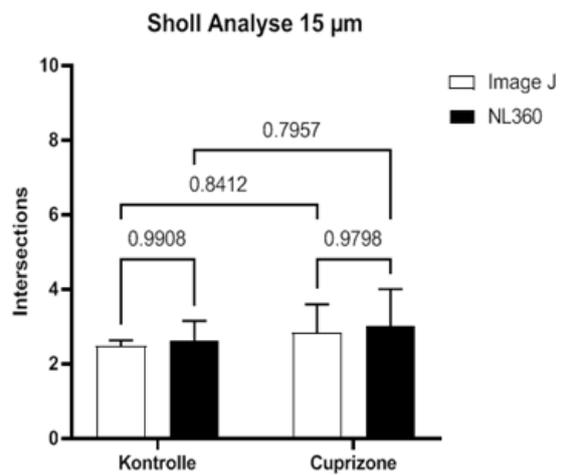
Für die statistische Auswertung wurde jeder 5 μm -Schritt eigenständig sowohl bezüglich des Vergleichs von Kontroll- und Cuprizone-Gruppe, als auch bezüglich des Vergleichs zwischen NeuroLucida 360 und ImageJ ausgewertet (Abbildung 16, B-F). Dafür wurde der statistische Test Two-Way ANOVA genutzt.



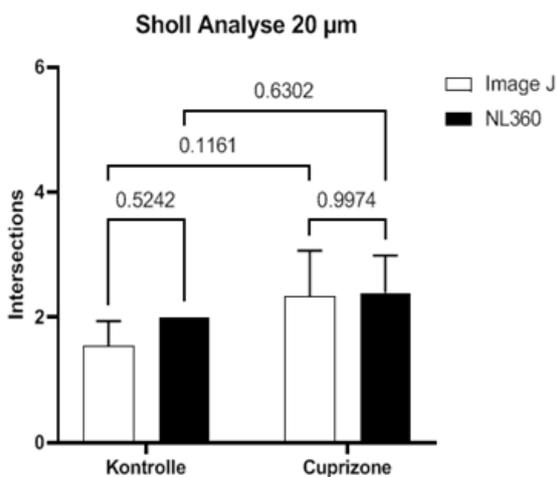
B



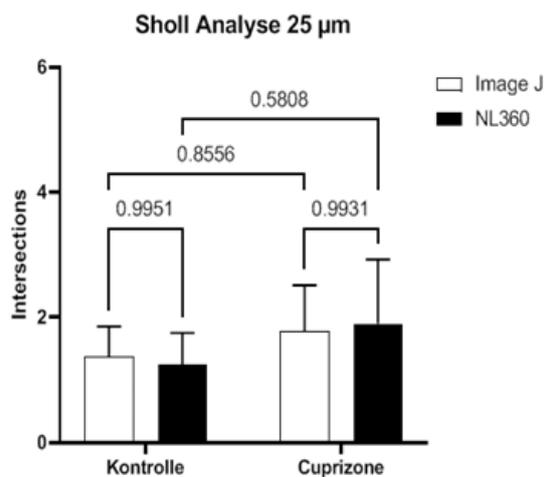
C



D



E



F

Abbildung 16: Statistische Auswertungen des Parameters Intersections in der Sholl-Analyse; **A:** Parameter Intersections an einer Beispielrekonstruktion; Statistische Auswertungen des Parameters Intersections in der Sholl-Analyse bei 5 µm (**B**), 10 µm (**C**), 15 µm (**D**), 20 µm (**E**) und 25 µm (**F**) unter Angabe des p-Werts in NeuroLucida 360 und ImageJ

Bei einem 5 μm -Radius zeigte sich in der Sholl-Analyse beim Vergleich der Kontroll- und Cuprizone-Gruppen von ImageJ und Neurolucida 360 weder im ImageJ-Programm (Kontrolle: $3,91 \pm 0,59$; Cuprizone: $3,81 \pm 0,52$; $p = 0,2084$), noch im Neurolucida 360 (Kontrolle: $5,0 \pm 0,71$; Cuprizone: $4,2 \pm 1,3$; $p = 0,8845$) ein signifikanter Unterschied bei den Intersections zwischen Kontrollen und Cuprizone-behandelten Mäusen. Beim Vergleich der Kontrollen zwischen ImageJ und Neurolucida 360 (Kontrolle ImageJ: $3,91 \pm 0,59$; Kontrolle NL360: $5,0 \pm 0,71$; $p = 0,9979$) sowie beim Vergleich der Cuprizone-behandelten Mäuse zwischen ImageJ und Neurolucida 360 (Cuprizone ImageJ: $3,81 \pm 0,52$; Cuprizone NL360: $4,2 \pm 1,3$; $p = 0,4555$) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen (Abbildung 16, B).

Bei einem 10 μm -Radius zeigte sich für die Intersections im ImageJ-Programm ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Cuprizone-Gruppe (Kontrolle: $2,72 \pm 0,17$; Cuprizone: $3,92 \pm 1,0$; $p = 0,297$). Im Neurolucida 360-Programm zeigte sich dagegen eine signifikant höhere Anzahl an Intersections in der Cuprizone-behandelten Mausgruppe (Kontrolle: $3,6 \pm 0,55$; Cuprizone: $5,0 \pm 1,0$; $*p = 0,0457$). Beim Vergleich der Kontrollen und der Cuprizone-behandelten Tiere zwischen ImageJ und Neurolucida 360 zeigte sich weder bei den Kontroll-Gruppen (Kontrolle ImageJ: $2,72 \pm 0,17$; Kontrolle NL360: $3,6 \pm 0,55$; $p = 0,1009$), noch bei den Cuprizone-Gruppen (Cuprizone ImageJ: $3,92 \pm 1,0$; Cuprizone NL360: $5,0 \pm 1,0$; $p = 0,1517$) ein signifikanter Unterschied (Abbildung 16, C).

Bei einem 15 μm -Radius zeigte sich für die Intersections beim Vergleich von Kontrolle und Cuprizone-Behandlung in ImageJ (Kontrolle: $2,47 \pm 0,15$; Cuprizone: $2,83 \pm 0,76$; $p = 0,9908$) sowie in Neurolucida 360 (Kontrolle: $2,6 \pm 0,55$; Cuprizone: $3,0 \pm 1,0$; $p = 0,9798$) kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der Kontroll- mit der Cuprizone-Gruppe zwischen dem ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen (Kontrolle ImageJ: $2,47 \pm 0,15$ - Kontrolle NL360: $2,6 \pm 0,55$; $p = 0,8412$; Cuprizone ImageJ: $2,83 \pm 0,76$ - Cuprizone NL360: $3,0 \pm 1,0$; $p = 0,7957$) (Abbildung 16, D).

Bei einem Radius von 20 μm zeigte sich bei der Anzahl der Intersections bei Vergleich von Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen in ImageJ (Kontrolle: $1,55 \pm 0,39$; Cuprizone:

2,33 ± 0,74; p = 0,5242) sowie in Neurolucida 360 (Kontrolle: 2,0 ± 0; Cuprizone: 2,39 ± 0,6; p = 0,9974) kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der Kontroll- sowie der Cuprizone-Gruppen zwischen dem ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen (Kontrolle ImageJ: 1,55 ± 0,39 - Kontrolle NL360: 2,0 ± 0,0; p = 0,1161; Cuprizone ImageJ: 2,33 ± 0,74 - Cuprizone NL360: 2,39 ± 0,6; p = 0,6302) (Abbildung 16, E).

Bei einem 25 µm-Radius zeigte sich für die Intersections beim Vergleich von Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen in ImageJ (Kontrolle: 1,38 ± 0,48; Cuprizone: 1,77 ± 0,74; p = 0,9951) sowie in Neurolucida 360 (Kontrolle: 1,25 ± 0,5; Cuprizone: 1,9 ± 1,03; p = 0,9931) kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der Kontroll- sowie der Cuprizone-Gruppen zwischen dem ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen (Kontrolle ImageJ: 1,38 ± 0,48 - Kontrolle NL360: 1,25 ± 0,5; p = 0,8556; Cuprizone ImageJ: 1,77 ± 0,74 - Cuprizone NL360: 1,9 ± 1,03; p = 0,5808) (Abbildung 16, F).

In der statistischen Auswertung der Sholl-Analyse ließ sich bei der Anzahl der Intersections zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Tieren weder im Neurolucida 360-, noch im ImageJ-Programm ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen.

Bei der statistischen Auswertung der Anzahl der Intersections zwischen den jeweiligen Kontroll- und Cuprizone-Gruppen im Neurolucida 360- und im ImageJ-Programm zeigte sich bei den Cuprizone-behandelten Tieren, dass bei dem 10 µm-Radius die Anzahl der Intersections der Rekonstruktionen in der Neurolucida 360-Cuprizone-Gruppe signifikant höher lag, als bei derselben Cuprizone-Gruppe im ImageJ-Programm (Abbildung 16, C).

3.2 Neuron Summary

Die Neuron Summary wurde zur Analyse der Gesamtheit der Fortsätze jeder Rekonstruktion herangezogen. Es wurden die Parameter Anzahl der Fortsätze (Quantity), Verzweigungspunkte der Fortsätze (Nodes) und Endpunkte der Fortsätze (Endings) in der Neuron Summary im Neurolucida Explorer analysiert (Abbildung 17, A). Im ImageJ-Programm erfolgte diese Analyse durch manuelles Auszählen.

Für die statistische Auswertung wurde jeder Parameter zum einen bezüglich des Vergleichs von Kontroll- und Cuprizone-Gruppe, zum anderen bezüglich des Vergleichs zwischen Neurolucida 360 und ImageJ ausgewertet. Dafür wurde der statistische Test Two-Way ANOVA angewendet.

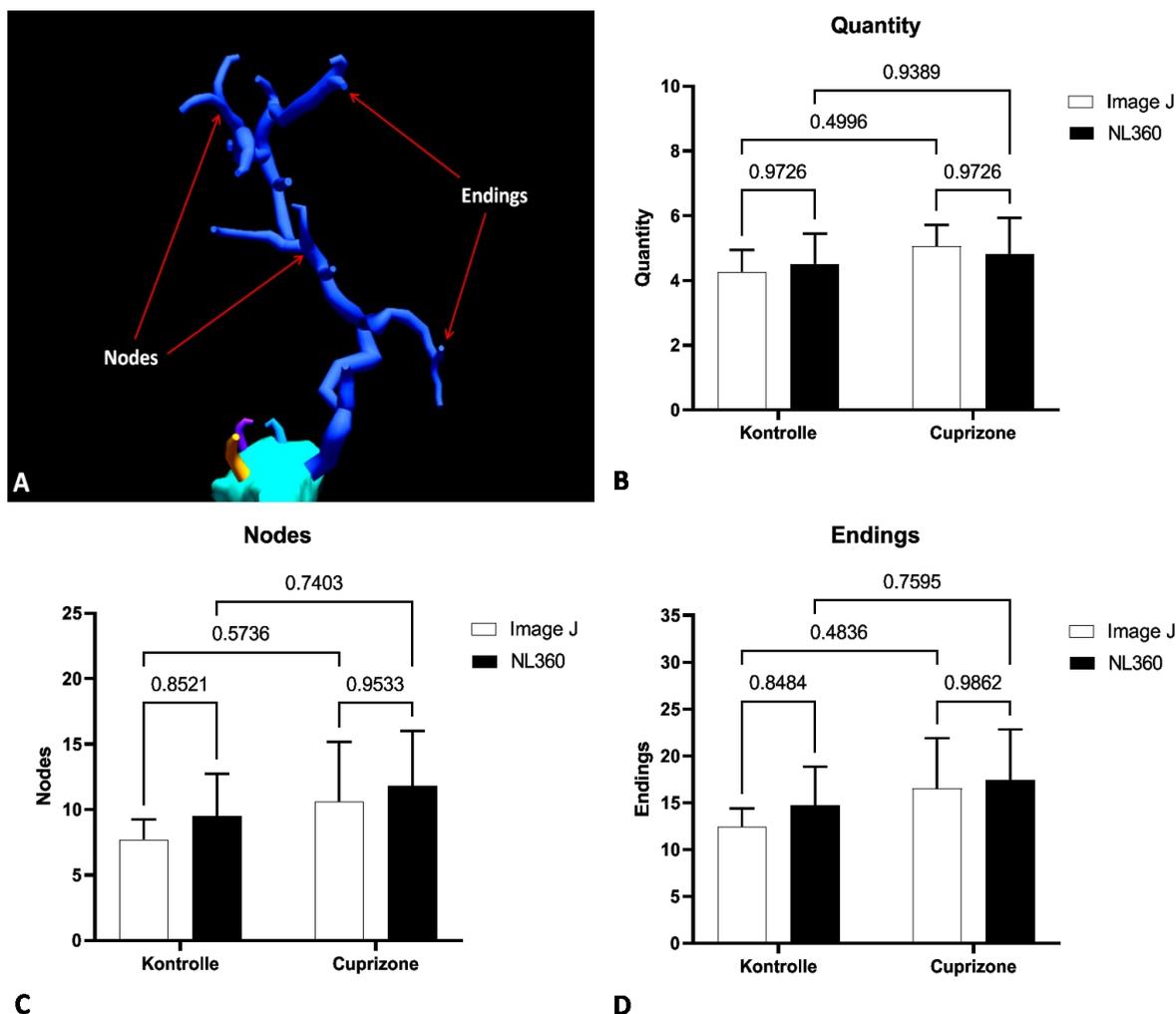


Abbildung 17: Statistische Auswertung der Neuron Summary; **A:** Parameter Nodes und Endings an einer Beispielrekonstruktion; Statistische Auswertung der Parameter Quantity (**B**), Nodes (**C**) und Endings (**D**) in der Neuron Summary

Bei der statistischen Auswertung des Parameters Quantity der Neuron Summary zeigte sich beim Vergleich der Kontroll- und Cuprizone-Gruppen von ImageJ und Neurolucida 360 weder im ImageJ-Programm (Kontrolle: $4,28 \pm 0,67$; Cuprizone: $5,06 \pm 0,66$; $p = 0,9726$), noch im Neurolucida 360 (Kontrolle: $4,51 \pm 0,93$; Cuprizone: $4,83 \pm 1,11$; $p = 0,9726$) ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen. Beim Vergleich der

Kontrollen zwischen ImageJ und Neurolucida 360 (Kontrolle ImageJ: $4,28 \pm 0,67$; Kontrolle NL360: $4,51 \pm 0,93$; $p = 0,4996$) sowie beim Vergleich der Cuprizone-behandelten Mäuse zwischen ImageJ und Neurolucida 360 (Cuprizone ImageJ: $5,06 \pm 0,66$; Cuprizone NL360: $4,83 \pm 1,11$; $p = 0,9389$) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen (Abbildung 17, B).

Bei der statistischen Auswertung des Parameters Nodes zeigte sich beim Vergleich von Kontrolle und Cuprizone-Behandlung in ImageJ (Kontrolle: $7,73 \pm 1,54$; Cuprizone: $10,66 \pm 4,52$; $p = 0,8521$) sowie in Neurolucida 360 (Kontrolle: $9,54 \pm 3,2$; Cuprizone: $11,83 \pm 4,17$; $p = 0,9533$) kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der Kontroll- sowie der Cuprizone-Gruppen zwischen dem ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen (Kontrolle ImageJ: $7,73 \pm 1,54$ - Kontrolle NL360: $9,54 \pm 3,2$; $p = 0,5736$; Cuprizone ImageJ: $10,66 \pm 4,52$ - Cuprizone NL360: $11,83 \pm 4,17$; $p = 0,7403$) (Abbildung 17, C).

Bei der statistischen Auswertung des Parameters Endings zeigte sich beim Vergleich von Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen in ImageJ (Kontrolle: $12,44 \pm 1,95$; Cuprizone: $16,53 \pm 5,38$; $p = 0,8484$) sowie in Neurolucida 360 (Kontrolle: $14,72 \pm 4,15$; Cuprizone: $17,48 \pm 5,36$; $p = 0,9862$) kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich der Kontroll- sowie der Cuprizone-Gruppen zwischen dem ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen (Kontrolle ImageJ: $12,44 \pm 1,95$ - Kontrolle NL360: $14,72 \pm 4,15$; $p = 0,4836$; Cuprizone ImageJ: $16,53 \pm 5,38$ - Cuprizone NL360: $17,48 \pm 5,36$; $p = 0,7595$) (Abbildung 17, D).

In der statistischen Auswertung der Daten der Neuron Summary ließ sich für keinen der drei Parameter Quantity, Nodes und Endings ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen in beiden Programmen sowie kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Kontrollen und Cuprizone-behandelten Mäuse zwischen dem Neurolucida 360- und dem ImageJ-Programm feststellen.

3.3 Ramification Index

Eine weitere Möglichkeit, morphologische Veränderungen von Mikrogliazellen zu quantifizieren, ist der Ramification Index (RI). Dieser ergibt sich bei einer zweidimensionalen Rekonstruktion und Auswertung im ImageJ-Programm aus $RI = \text{maximale Projektionsfläche (Area peripheral =Ap)} / \text{Zellfläche (Area cell =Ac)}$ [23]. Für die Rekonstruktion und Auswertung im dreidimensionalen Raum im Neurolucida 360-Programm wurden dafür die jeweiligen Volumina herangezogen ($RI = \text{maximales Projektionsvolumen} = Vp / \text{Zellvolumen} = Vc$), um den RI aus beiden Programmen miteinander vergleichbar zu machen.

Für die statistische Auswertung wurde der Ramification Index sowohl bezüglich des Vergleichs von Kontroll- und Cuprizone-Gruppe, als auch bezüglich des Vergleichs zwischen Neurolucida 360 und ImageJ ausgewertet (Abbildung 18). Dafür wurde der statistische Test Two-Way ANOVA genutzt.

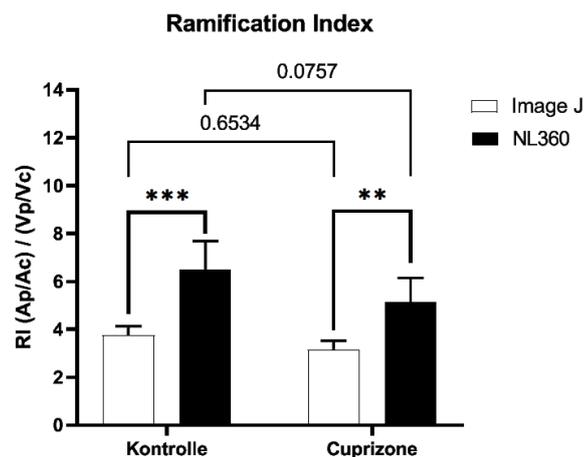


Abbildung 18: Statistische Auswertung des Ramification Index (RI)

Bei der statistischen Auswertung des Ramification Index zeigte sich beim Vergleich der Kontroll- und Cuprizone-Gruppen von ImageJ und Neurolucida 360 weder im ImageJ-Programm (Kontrolle: $3,76 \pm 0,37$; Cuprizone: $3,16 \pm 0,37$; $p=0,6534$), noch im Neurolucida 360 (Kontrolle: $6,51 \pm 1,18$; Cuprizone: $5,15 \pm 1,0$; $p=0,0757$) ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Cuprizone-behandelten Mäusen.

Beim Vergleich der Kontrollen zwischen ImageJ und Neurolucida zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Programmen (Kontrolle ImageJ: $3,76 \pm 0,37$; Kontrolle NL360: $6,51$

$\pm 1,18$; $*p=0,0004$). Beim Vergleich der Cuprizone-behandelten Mäuse zwischen ImageJ- und Neurolucida 360-Programm zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Cuprizone ImageJ: $3,16 \pm 0,37$; Cuprizone NL360: $5,15 \pm 1,0$; $*p=0,007$) (Abbildung 18).

In der statistischen Auswertung des Ramification Index ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Tieren im Neurolucida 360- oder im ImageJ-Programm feststellen. Bei dem Vergleich der Kontrollen und der Cuprizone-behandelten Mäuse beider Computerprogramme miteinander zeigte sich sowohl bei den Kontroll-, als auch bei den Cuprizone-Gruppen, dass der Ramification Index der Rekonstruktionen bei beiden im Neurolucida 360 signifikant höher lag, als der Ramification Index der Rekonstruktionen im ImageJ-Programm.

4. Diskussion und Ausblick

Die Morphologie von Mikrogliazellen und ihre Quantifizierung ist ein wichtiges Mittel, um bei neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer [2], Parkinson [2], aber auch traumatischen Verletzungen des Gehirns [27] einen Einblick in deren Neuropathologien zu erhalten. Insbesondere in der Frühphase der Erkrankungen oder des Traumas ist die Veränderung der Mikrogliazellmorphologie interessant, da diese Zellen als Immunsystem des ZNS als erste und dabei bereits auf feinste Veränderungen ihrer Umwelt reagieren [28].

Ein gängiges Mittel zur Auswertung der Morphologie von Mikrogliazellen ist das open-source Programm ImageJ [26]. Durch diverse Plug-Ins wird es der Nutzerin und dem Nutzer ermöglicht, zahlreiche Parameter hinsichtlich der Morphologie zu betrachten und Veränderungen zu quantifizieren. Auch in dieser Arbeit wurde ImageJ genutzt, um eine Methode mit zweidimensionaler Rekonstruktion und Auswertung von Mikrogliazellen der dreidimensionalen Methode des Neurolucida 360-Programms gegenüberzustellen.

Der in den Methoden erläuterte Versuchsaufbau sollte der Beantwortung zweier Fragestellungen dienen. Zum einen sollte die Frage beantwortet werden, ob bereits in der Frühphase der MS morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden können. Zum anderen diene er der Fragestellung, mit welchem der zwei Computerprogramme morphologische Unterschiede besser quantifizierbar sind. Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden die Sholl-Analyse und die Neuron Summary zur Auswertung der Mikrogliazellen und ihrer morphologischen Veränderungen herangezogen.

Eine weitere verwendete Analyse zur Betrachtung der Fragestellungen war der Ramification Index (RI). Er wird durch die Formel $RI = \text{maximum projection area}/\text{cell area} (A_p/A_c)$ berechnet [23, 29, 30]. Da eigentlich für zweidimensionale Rekonstruktionen ausgelegt, wurde er in dieser Arbeit auf die dreidimensionale Rekonstruktion im Neurolucida 360-Programm übertragen, indem statt der jeweiligen Fläche das jeweilige Volumen einer Zellrekonstruktion herangezogen wurde. Verzweigte, ruhende Mikrogliazellen haben eine große Projektionsfläche (A_p) bzw. ein großes Projektionsvolumen (V_p) und eine relativ kleine

Zellfläche (Ac) bzw. ein relativ kleines Zellvolumen [23]. Kommt es zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen, nähern sich die Zell- und maximale Projektionsfläche bzw. das Zell- und maximale Projektionsvolumen zunehmend einander an [23]. Je näher der RI-Wert an 1 liegt, desto stärker ist die Mikrogliazelle aktiviert [23].

Der Ramification Index wurde in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten zum Nachweis zellmorphologischer Unterschiede angewendet [31 - 33]. In dieser Promotionsarbeit konnte dennoch kein signifikanter Unterschied der Morphologie der rekonstruierten Mikrogliazellen zwischen Kontroll- und Cuprizone-Gruppe nachgewiesen werden. Dies traf auf beide Programme zu. Die Fragestellung, ob bereits in der Frühphase der MS morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden können, lässt sich in dieser Arbeit also nicht bestätigen. Was in dieser Arbeit mit der Auswertung des RI dagegen gezeigt werden konnte, ist, dass das Neurolucida 360-Programm mit der hier möglichen dreidimensionalen Auswertung differenziertere Ergebnisse durch bessere Erfassung der Gesamtheit an Fortsätzen ermöglicht und damit besser für die Rekonstruktion und Auswertung der Morphologie von Mikrogliazellen geeignet zu sein scheint, als das ImageJ-Programm mit einer zweidimensionalen Auswertung. Eine Antwort auf die Fragestellung, mit welchem der zwei Computerprogramme morphologische Unterschiede besser quantifizierbar sind, wird also durch die Auswertung des RI gegeben. Die Messwerte des RI lagen im Neurolucida 360 sowohl bei der Kontroll-, als auch bei der Cuprizone-Gruppe signifikant höher, als bei denselben Gruppen im ImageJ-Programm, womit auch die Messwerte, aus denen sich der RI berechnet, signifikant höher lagen. Das Neurolucida 360-Programm eröffnet durch seine dreidimensionale Rekonstruktion, die die Schnitttiefe mit einbezieht, eine differenziertere Auswertung der Zellmorphologie und das bereits bei einer Dicke der Schnitte von 5 μm . Wenngleich der RI in ImageJ-Auswertungen zur Untersuchung von Zellmorphologien gut geeignet ist, so kann dieselbe Auswertung im Neurolucida 360 die Power der Daten dieser Analyse steigern.

Eine weitere Analyse in dieser Promotionsarbeit ist die Neuron Summary. Im Neurolucida 360-Programm bietet diese Analyse u.a. die Auswertung der Gesamtheit der Fortsätze einer Rekonstruktion nach zahlreichen Parametern (Quantity, Nodes, Endings, Length, Area, Volume, Surface, Complexity). Um hier einen Vergleich zum ImageJ-Programm ziehen zu

können, wurden die Parameter Quantity, Nodes und Endings in ImageJ manuell bei den Rekonstruktionen ausgezählt und diese drei Parameter in dem jeweiligen Programm zwischen Kontroll- und Cuprizone-Gruppe sowie die Kontroll-Gruppen und die Cuprizone-Gruppen der Programme miteinander verglichen.

In der statistischen Auswertung der Daten der Neuron Summary ließ sich hier für keinen der drei Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Mäusen im Neurolucida 360- oder im ImageJ-Programm feststellen. Die Fragestellung, ob bereits in der Frühphase der MS morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden können, ließ sich auch in dieser Analyse nicht bestätigen.

Für die Fragestellung, mit welchem der zwei Computerprogramme morphologische Unterschiede besser quantifizierbar sind, weißt die Neuron Summary bei nicht signifikanten Unterschieden bei allen Parametern darauf hin, dass beide Programme gleich gut geeignet sind. In Betracht zu ziehen ist hier, dass der Vorteil, den das Neurolucida 360 mit seiner dreidimensionalen Rekonstruktion erbringt, bei einem Schnitt von 5 μm Dicke nicht hervortritt, was sich bei einer Dicke von 10 μm oder mehr bereits ändern könnte. Dies bleibt in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Zusätzlich bietet das Neurolucida 360-Programm ein Vielzahl an weiteren Parametern in der Neuron Summary, die in dieser Arbeit nicht herangezogen wurden, da diese mit den hier genutzten Tools nicht im ImageJ-Programm reproduziert wurden. Tatsache ist aber, dass es Plug-Ins für ImageJ gibt, die eine genauere Analyse der Rekonstruktionen zulassen, als es in dieser Arbeit der Fall war. Das Plug-In AnalyzeSkeleton [34] wurde 2010 entwickelt und ermöglicht u.a. die Auswertung der Parameter Fortsatzendpunkte/Zelle und Fortsatzlänge ($\mu\text{m}/\text{Zelle}$) und ist prinzipiell sowohl auf zweidimensionale, als auch auf dreidimensionale Bilder anwendbar. Mit diesen Parametern lässt sich eine Aussage zu der Verzweigung (ramification) einer Mikrogliazelle treffen [35]. Dabei kann AnalyzeSkeleton auf eine gesamte Mikrofotografie mit zahlreichen Mikrogliazellen angewendet werden [35]. Das Neurolucida 360-Programm wird für die Rekonstruktion und Auswertung von individuellen Zellen genutzt. Daher stellt sich die Frage, ob sich bei dem Ziel der Auswertung einer großen Zahl an Zellen nach morphologischen Aspekten das ImageJ Plug-In AnalyzeSkeleton [34] eher anbietet, da es auch auf dreidimensionale Bilder angewendet werden kann. Für die in dieser

Arbeit untersuchte individuelle Rekonstruktion und Auswertung von Mikrogliazellen hat diese Frage allerdings keine weiterführende Bedeutung und muss an anderer Stelle weiter untersucht werden.

Ein weiteres ImageJ Plug-In ist FraCLac [35, 36], das 2014 entwickelt wurde und u.a. die Analyse von Fractal Dimension, Span Ratio und Density von individuellen Zellen ermöglicht [35]. Dieses Plug-In erlaubt dadurch Aussagen zu Zellkomplexität, Zellform und Zellgröße von einzelnen Mikrogliazellen [35]. Es ist also auch mit dem ImageJ-Programm möglich, weitere Parameter, die mit denen der Neuron Summary im NeuroLucida 360-Programm vergleichbar wären, zu generieren. Jedoch bleibt zu beachten, dass das FraCLac nur zweidimensionale Auswertungen vornimmt [35, 36], womit die Vermutung besteht, dass die dreidimensionale Auswertung von Mikrogliazellen im NeuroLucida 360 differenziertere Ergebnisse erbringt. Auch dieser Vergleich bleibt in einer zukünftigen Gegenüberstellung des NeuroLucida 360 mit dem ImageJ Plug-In FraCLac zu untersuchen. Hier wäre der Parameter Complexity (NL360) bzw. Fractal Dimension (FraCLac) von besonderem Interesse, da damit beide Programme direkt über den Parameter der Zellkomplexität verglichen werden könnten.

Die Sholl-Analyse [22] ist eine häufig genutzte Analyse zur Betrachtung und Auswertung von dendritischer Zellmorphologie und –komplexität [37]. Es werden von einem zentralen Punkt in der Mitte des Somas einer Zelle bzw. deren Rekonstruktion konzentrische Kreise (Radii) bzw. im dreidimensionalen Raum Kugeln (Sphären), in einem immer gleichen Abstand zueinander über die Zelle gelegt und verschiedene Parameter innerhalb zweier Radii bzw. Sphären ausgewertet [22]. So können die Fortsätze einer Zelle in ihrem gesamten Verlauf differenziert analysiert werden [37].

In dieser Promotionsarbeit wurde für die Vergleichbarkeit der beiden gegenübergestellten Programme NeuroLucida 360 und ImageJ in der Sholl Analyse ausschließlich der Parameter Intersections herangezogen. In der statistischen Auswertung der Sholl-Analyse ließ sich bei der Anzahl der Intersections zwischen Kontroll- und Cuprizone-behandelten Tieren weder im NeuroLucida 360-, noch im ImageJ-Programm ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Die Fragestellung, ob bereits in der Frühphase der MS morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt

werden können, konnte durch die Auswertung der Daten in der Sholl Analyse nicht bestätigt werden.

Für die Fragestellung, mit welchem der zwei Computerprogramme morphologische Unterschiede besser quantifizierbar sind, zeigte die statistische Auswertung der Sholl Analyse ein signifikantes Ergebnis bei einer von fünf Auswertungen. Da bei dem 10 µm-Radius die Anzahl der Intersections bei den Rekonstruktionen der Cuprizone-Gruppe im Neurolucida 360 signifikant höher lag, als bei derselben Cuprizone-Gruppe im ImageJ-Programm, lässt dies vermuten, dass eine differenziertere Rekonstruktion der Mikrogliazellen durch das Neurolucida 360-Programm ermöglicht wird.

In dieser Promotionsarbeit wurde im ImageJ-Programm die in der Standardversion integrierte Sholl-Analyse genutzt [38]. Es ist anzumerken, dass es das PlugIn Simple Neurite Tracer [39] für ImageJ gibt, mit dem ebenfalls eine Zelle mit ihren Fortsätzen aus einer zweidimensionalen und dreidimensionalen Stack-Ansicht von histochemisch gefärbten Schnitten einer Mikrogliazelle rekonstruiert und diese Rekonstruktion anschließend mittels Sholl-Analyse ausgewertet wird. Allerdings ermöglicht es ebenfalls nur die Auswertung des Parameters Intersections, eine Programmierung weiterer Parameter ist aber möglich [39].

Eine interessante Neuerung ist das PlugIn AutoSholl [40], das 2019 entwickelt wurde und die bisherige Sholl-Analyse im ImageJ-Programm um eine Reihe an neuen Parametern erweitert. Die integrierte Sholl-Analyse in ImageJ [38] ermöglicht die Auswertung einer Rekonstruktion nach Intersections, wobei der Ausgangspunkt für die Sholl-Analyse manuell durch die Nutzerin oder den Nutzer festgelegt wird [38]. Durch das neue PlugIn AutoSholl erfolgt dieser Teil automatisch und es wird die Auswertung von weiteren Parametern wie Anzahl der primären, sekundären und tertiären Fortsatzanteile, Durchmesser und Länge der Fortsätze innerhalb zweier Radii bzw. Sphären ermöglicht [40]. Dieses PlugIn kann sowohl auf zweidimensionale Bilder, als auch für dreidimensionale Datensätze angewendet werden [40]. Es stellt damit eine echte Alternative zur Sholl-Analyse des Programms Neurolucida 360 dar. Des Weiteren ist die Analyse mit vorheriger Aufbereitung der Datensätze insgesamt schnell und auch für ungeübte Nutzerinnen und Nutzer einfach ausführbar [40]. Demgegenüber steht das Programm Neurolucida 360, das nicht frei zugänglich ist und eine intensive Einarbeitung und Übung erfordert, um dieses effizient ausführen zu können [41]. Auf der anderen Seite ermöglicht das Neurolucida 360 eine Vielzahl an Analysen mit zahlreichen Parametern im dreidimensionalen Raum und damit differenzierte Auswertungen

von Zellmorphologie und -komplexität der darin erstellten Rekonstruktionen verschiedenster Zelltypen. Eine Gegenüberstellung des AutoSholl-PlugIns in ImageJ und der Sholl-Analyse im NeuroLucida 360 bleibt Gegenstand weiterer zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten.

Zu diskutieren bleiben die Ergebnisse der Analysen bezüglich der Fragestellung, ob bereits in der Frühphase der MS morphologische Unterschiede der Mikrogliazellen zwischen einer Kontroll- und einer Cuprizone-behandelten Gruppe feststellbar sind. Bis auf eine Ausnahme zeigte keine der statistischen Auswertungen der Analysen beider Programme ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen, sodass sich die oben genannte Fragestellung in dieser Arbeit insgesamt nicht bestätigen lässt. Das eine signifikante Ergebnis zeigte sich in der Sholl-Analyse bei einem 10 µm-Radius. Im NeuroLucida 360-Programm war die Anzahl der Intersections in der Cuprizone-Gruppe hier signifikant höher, als in der Kontrollgruppe. Wenngleich signifikant, wurde von uns entsprechend Torres-Platas et al. [19] in der Sholl-Analyse erwartet, dass die Anzahl der Intersections bei den Cuprizone-behandelten Tieren niedriger ist, als bei den Mäusen der Kontrollgruppe. In der Neuron Summary wurde von uns ebenfalls erwartet, dass sich bei den Parametern Quantity, Nodes und Ends zeigt, dass deren Anzahl in der Cuprizone-Gruppe gesunken ist. Entgegen unserer Annahmen zeigte sich aber in diesen Analysen, dass die Mikrogliazellen der Cuprizone-behandelten Mäuse zwar nicht signifikant, aber dennoch eine höhere Anzahl an Intersections in der Sholl-Analyse sowie eine höhere Anzahl an Fortsätzen, Verzweigungsstellen und Endpunkten in der Neuron Summary zeigten. Einzig die Ergebnisse des Ramification Index zeigten sich wie erwartet. Der RI der Cuprizone-behandelten Mäuse war zwar nicht signifikant, aber erkennbar niedriger, als der RI der Kontrollgruppe. Es ist beschrieben, dass gelegentlich auch eine hyperverzweigte/hyperkomplexe („hyper-ramified“/„hyper-complex“) Morphologie bei Mikrogliazellen festzustellen ist [27]. Diese kann z.B. in Mausgehirnen bei chronischem Stress [42, 43] sowie als frühe Reaktion auf Verletzungen des Gehirns [44, 45] zu finden sein. Die bei den Ergebnissen dieser wissenschaftlichen Arbeit zu erkennenden morphologischen Veränderungen der rekonstruierten Mikrogliazellen lassen sich also trotz ihres seltener beschriebenen Vorkommens plausibel in das aktuelle wissenschaftliche Spektrum einordnen [27]. Dabei lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass trotz einer hyperverzweigten/hyperkomplexen

Mikrogliazellmorphologie insgesamt eine Verkürzung der Fortsätze bei gleichzeitiger Hypertrophie von Zellkörper und –fortsätzen auftritt [46], was in einem verminderten RI resultiert.

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Dauer der Behandlung einer Mausgruppe mit Cuprizone für eine Woche bereits ausreicht, um eine hinreichend starke und damit erst signifikante Aktivierung der Mikrogliazellen auszulösen. In zuvor veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten der letzten Jahre wurden mRNA-Expressionslevel in der weißen Substanz des Corpus callosum von Mausgehirnen einer Kontroll- und einer für zwei Tage mit Cuprizone behandelten Mausgruppe untersucht [25, 47]. Bereits nach dieser kurzen Zeit ließen sich hochregulierte mRNAs von zahlreichen Zellen, u.a. auch Mikrogliazellen nachweisen [25]. Eine Aktivierung von Mikrogliazellen lässt sich also bereits nach wenigen Tagen einer einwöchigen Cuprizone-Behandlung nachweisen. Es ist aber fraglich, ob eine quantifizierbare morphologische Veränderung der Mikrogliazellen nach dieser kurzen Zeit nachweisbar ist. Bei einer Cuprizone-Behandlung von 1 – 3 Wochen ist die Aktivierung von Mikrogliazellen deutlich stärker [25]. Hierbei ist zu beachten, dass diese Ergebnisse für Mikrogliazellen im Corpus callosum erhoben wurden. Im Kortex und anderen Regionen der grauen Substanz zeigte sich eine weniger starke Aktivierung von u.a. Mikrogliazellen [48 - 50], was wiederum die morphologische Auswertung beeinflusst. Hier wäre ein Ansatzpunkt, eine erneute Auswertung mit Mikrogliazellen von länger als eine Woche mit Cuprizone behandelten Mausgehirnen durchzuführen, um zu untersuchen, ob hier signifikante Ergebnisse gezeigt werden können.

Schlussendlich sei noch kritisch angemerkt, dass in dieser Arbeit eine Anzahl von fünf Mäusen für die Kontroll- sowie fünf Mäusen für die Cuprizone-Gruppe herangezogen wurde. Auch hier kann ein Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse liegen, sodass für weiterführende Experimente eine größere Mausanzahl verwendet werden sollte. Ebenfalls anzumerken ist, dass die doppelte Verblindung der ausgewählten Mikrogliazellen vor deren Rekonstruktion dazu geführt hat, dass eine unterschiedlich große Anzahl an zu rekonstruierenden Zellen für die Kontrollgruppe (44 Zellen) und die Cuprizone-Gruppe (74 Zellen) eingeschlossen wurden. Auch dies sollte in zukünftigen Experimenten vermieden und

stattdessen eine nahezu gleichgroße Gruppengröße gewählt werden, um so die Ergebnisse nicht zu verzerren.

Insgesamt lässt sich sagen, dass in den letzten Jahren die Rolle der Mikrogliazellen in der Pathophysiologie verschiedenster neurodegenerativer Erkrankungen mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist und sich hier vielversprechende Ansätze zur Beurteilung und letztendlich möglichen Behandlung der MS im speziellen sowie auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen ableiten lassen. Die Auswertung der Mikrogliazellmorphologie kann ein hilfreiches Werkzeug für weitere Untersuchungen sein. Das Programm Neurolucida 360 ist dafür nach Beurteilung dieser Arbeit geeignet, mit zahlreichen Analysen und Parametern eine differenzierte Beurteilung der Morphologie von Mikrogliazellen, voraussichtlich in allen Aktivierungsstadien, zu ermöglichen und damit neue Erkenntnisse über ihre Bedeutung in verschiedenen neurologischen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen voranzutreiben.

5. Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist die häufigste Autoimmunerkrankung des ZNS. Mikrogliazellen als Immunabwehr des ZNS spielen hier eine wichtige Rolle für den Verlauf der Erkrankung. Sie reagieren auf Stress und andere Einflüsse in ihrer Umgebung mit einer Aktivierung im Sinne einer Veränderung ihrer Zellmorphologie. Diese morphologischen Veränderungen sind u.a. mittels Sholl-Analyse und Ramification Index (RI) quantifizierbar. Zur Untersuchung der MS werden verschiedene Tiermodelle verwendet, u.a. demyelinisierende Modelle, bei denen u.a. das Toxin Cuprizone zur Untersuchung primär demyelinisierender Schäden des ZNS genutzt wird. Da noch keine Quantifizierung der Mikrogliazellmorphologie in einem Demyelinisierungsmodell der MS untersucht wurde, beschäftigt sich diese Promotionsarbeit zum einen mit der Hypothese, dass die Mikrogliazellen im Kortex von mit Cuprizone behandelten Mäusen eine veränderte Morphologie aufweisen, zum anderen mit der Gegenüberstellung der zwei in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme zur Darstellung und Quantifizierung der Mikrogliazellmorphologie. Methodisch wurden hierzu jeweils fünf Mäuse in eine Cuprizone- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Tiere der Cuprizone-Gruppe erhielten für eine Woche zu ihrem Futter Cuprizone beigemischt. Nach einer Woche erfolgte die transkardiale Perfusion der Versuchstiere sowie die Präparation und Paraffineinbettung der Mausgehirne. Entsprechend des High Resolution Mouse Brain Atlas nach Sidmann et al. wurden 5 µm-dicke Kryoschnitte der Region 265 angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Zur Darstellung der Mikrogliazellen wurde eine anti-IBA-1-Antigenfärbung verwendet. Die Schnitte wurden mit einem Confocal-DSU-Mikroskop eingescannt. Die Laminae vier und fünf des Kortex wurden markiert, die Schnitte verblindet und hieraus per Zufallsprinzip mittels des Excel-Programms Mikrogliazellen der Cuprizone-behandelten und der Kontrollgruppe nach zuvor festgelegten Kriterien ausgewählt. Die ausgewählten, verblindeten Mikrogliazellen wurden im NeuroLucia 360- sowie im ImageJ-Programm rekonstruiert und die Rekonstruktionen mittels Sholl-Analyse, Neuron Summery und RI mit ihren jeweiligen Parameter analysiert. Hiernach wurden die Zellen entblindet. Insgesamt wurden 44 Mikrogliazellen der Mausgehirne der Kontrollgruppe rekonstruiert und 74 Mikrogliazellen der Mausgehirne der Cuprizone-Gruppe. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Bei den Ergebnissen wurden zum einen die Mikrogliazellen der Cuprizone- und Kontrollgruppe gegenübergestellt. Zum

anderen wurden die verschiedenen Analysen zwischen dem Neurolucida 360- und dem ImageJ-Programm verglichen mit der Frage, durch welches Computerprogramm die morphologischen Unterschiede differenzierter darstellbar sind. Zwischen den Cuprizone-behandelten und den Mäusen der Kontrollgruppe zeigte sich nur in der Sholl-Analyse im Neurolucida 360-Programm bei einem Radius von 10 μm signifikant mehr Intersectiones in der Cuprizone-behandelten Mausgruppe. Bei den weiteren durchgeführten Analysen ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen zwischen den beiden Mausgruppen. Bei der Auswertung des RI zeigte sich sowohl zwischen den Kontrollen, als auch den Cuprizone-Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Rekonstruktionen im Neurolucida 360-Programm und dem ImageJ-Programm. In beiden Fällen lag der RI der im Neurolucida 360 rekonstruierten Mikrogliazellen signifikant höher in beiden Mausgruppen, als bei den im ImageJ rekonstruierten Mikrogliazellen. Bei den weiteren Analysen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Programmen.

Mit der Auswertung des RI konnte in dieser Arbeit also gezeigt werden, dass mit einer dreidimensionalen Rekonstruktion im Neurolucida 360-Programm eine differenziertere Analyse der Mikrogliazellmorphologie möglich war, als bei einer zweidimensionalen Rekonstruktion im ImageJ-Programm.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Neurolucida 360-Programm bereits bei einer Schnittdicke von 5 μm eine differenziertere Auswertung der Zellmorphologie ermöglichen und damit die Validität der Daten aus den verschiedenen Analysen steigern kann. Gleichzeitig bleibt zu untersuchen, ob die Rekonstruktion und Auswertung von Mikrogliazellen mit einer Schnittdicke von 10 μm oder mehr zu eindeutigeren Ergebnissen führt. Zusätzlich wurden nur ausgewählte Analysemöglichkeiten im ImageJ-Programm für diese Promotionsarbeit genutzt. Hier muss weiter untersucht werden, ob die Vorteile des Neurolucida 360-Programms auch im Vergleich zu weiteren Rekonstruktions-Plugins im ImageJ-Programm vorhanden sind, die teils in den vergangenen Jahren entwickelt und in dieser Arbeit nicht verwendet wurden.

Hingegen konnte in dieser Arbeit mit keinem der beiden Computerprogramme gezeigt werden, dass bereits in der Frühphase der MS eindeutige morphologische Veränderungen der Mikrogliazellen nachweisbar sind.

Hier stellt sich die Frage, ob eine Exposition mit Cuprizone für sieben Tage ausreichend ist, um eine morphologisch nachweisbare Mikrogliazellaktivierung in den Laminae vier und fünf des Kortex zu erreichen. Ob signifikante Unterschiede nach längerer Zufütterung von Cuprizone sowie die Untersuchung von Mikrogliazellen anderer Hirnregionen nachweisbar sind, bleibt durch andere wissenschaftliche Arbeiten zu beantworten.

Insgesamt muss die geringe Anzahl an Mäusen in der Kontroll- und Cuprizone-Gruppe und die unterschiedlich große Anzahl der Mikrogliazellen in den Rekonstruktionsgruppen (44 vs. 74) in dieser Arbeit kritisch genannt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Neurolucida 360-Programm zur Auswertung von Zellmorphologien gut geeignet ist und hier mit einer differenzierten Beurteilung durch eine Vielzahl von Parametern in verschiedenen u.a. neurodegenerativen Erkrankungen zu weiteren Erkenntnissen beitragen kann.

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IBA1-immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Mikrogliazellen (5 µm Schnittdicke) verschiedener Aktivierungsstadien	10
Abbildung 2: High Resolution Mouse Brain Atlas, Schnitt 265, nach Sidman et al. mit veranschaulichter Auswahl der ROI	25
Abbildung 3: Scan eines immunhistochemischen Schnitts mittels Confocal-DSU-Mikroskop	28
Abbildung 4: IBA1-immunhistochemisch gefärbte Mikrogliazelle in der 3D-Ansicht in Neurolucida 360	31
Abbildung 5: Rekonstruktion eines Somas in Neurolucida 360	34
Abbildung 6a: Rekonstruktion eines Fortsatzes in Neurolucida 360	37
Abbildung 6b: Rekonstruktion eines Fortsatzes in Neurolucida 360	38
Abbildung 6c: Rekonstruktion eines Fortsatzes in Neurolucida 360.....	39
Abbildung 6d: Rekonstruktion eines Fortsatzes in Neurolucida 360	40
Abbildung 6e: Rekonstruktion eines Fortsatzes in Neurolucida 360	41
Abbildung 7: Rekonstruierte Mikrogliazelle in der 3D-Ansicht in Neurolucida 360.....	43
Abbildung 8: Vollständig abgeschlossene Rekonstruktion einer Mikrogliazelle in der 3D- Ansicht in Neurolucida 360	44
Abbildung 9: Ansicht des Steuerungsfelds „Create Movies“	45
Abbildung 10: Sholl-Analyse in Neurolucida Explorer	47
Abbildung 11: Auswahl des Ramification Index (RI) in Neurolucida Explorer.....	49
Abbildung 12: Rekonstruktion einer IBA1-immunhistochemisch gefärbten Mikrogliazelle in ImageJ.....	54
Abbildung 13: Analysen in ImageJ	56
Abbildung 14: Repräsentative IBA1-immunhistochemisch gefärbte Mikrogliazellen	58
Abbildung 15: Übersicht Auswertung der Intersections ImageJ vs. Neurolucida 360 in der Sholl-Analyse	59
Abbildung 16: Statistische Auswertungen des Parameters Intersections in der Sholl-Analyse	60
Abbildung 17: Statistische Auswertung der Neuron Summary	63
Abbildung 18: Statistische Auswertung des Ramification Index (RI).....	65

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	14
Tabelle 3: Allgemeine Lösungen	15
Tabelle 4: Arbeitsschritte der Paraffineinbettung	19
Tabelle 5: Arbeitsschritte der Entparaffinierung und Rehydrierung	22
Tabelle 6: Arbeitsschritte der Dehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe	23

V Literaturverzeichnis

- [1] Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014 Sep 9;83(11):1022-4. doi: 10.1212/WNL.0000000000000768. PMID: 25200713; PMCID: PMC4162299.
- [2] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*. 2005 Jun;76(2):77-98. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004. PMID: 16081203.
- [3] Lublin F D, Reingold S C for the National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee of Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*, 1996. 46(4):907-11.
- [4] Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*. 2017 Mar;27(2):123-137. doi: 10.1111/bpa.12454. Epub 2017 Jan 11. PMID: 27792289; PMCID: PMC8029141.
- [5] Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):495-9. doi: 10.1038/nm.2324. Epub 2011 Mar 27. PMID: 21441916.
- [6] Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005 Nov;128(Pt 11):2705-12. doi: 10.1093/brain/awh641. Epub 2005 Oct 17. PMID: 16230320.
- [7] Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012 Nov 5;8(11):647-56. doi: 10.1038/nrneuro.2012.168. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23007702.
- [8] Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 26;15(8):1074-7. doi: 10.1038/nn.3168. PMID: 22837037; PMCID: PMC7097342.
- [9] Bakker, D. A., & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci*, 78(2), 125-137. doi:10.1016/0022-510x(87)90055-4.
- [10] Messori L, Casini A, Gabbiani C, Sorace L, Muniz-Miranda M, Zatta P. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Trans*. 2007 Jun 7;(21):2112-4. doi: 10.1039/b701896g. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17514330.
- [11] Carlton WW. Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1966 May;8(3):512-21. doi: 10.1016/0041-008x(66)90062-7. PMID: 6006739.

- [12] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* 2009 Dec;118(6):723-36. doi: 10.1007/s00401-009-0591-3. Epub 2009 Sep 18. PMID: 19763593.
- [13] Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, Gudi V, Stangel M, Zhan J, Santrau E, Greiner T, Frenz J, Müller-Hilke B, Müller M, Amor S, van der Valk P, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia.* 2021 Apr;69(4):925-942. doi: 10.1002/glia.23937. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33245604.
- [14] Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci.* 1967 Jan 1;6(1):11-9. doi: 10.1016/0024-3205(67)90356-6. PMID: 6030552.
- [15] Buschmann JP, Berger K, Awad H, Clarner T, Beyer C, Kipp M. Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J Mol Neurosci.* 2012 Sep;48(1):66-76. doi: 10.1007/s12031-012-9773-x. Epub 2012 Apr 22. PMID: 22528463; PMCID: PMC3413816.
- [16] Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol.* 2008 Apr;172(4):1053-61. doi: 10.2353/ajpath.2008.070850. Epub 2008 Mar 18. PMID: 18349131; PMCID: PMC2276412.
- [17] Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000 Jun;47(6):707-17. doi: 10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q. PMID: 10852536.
- [18] Liebetanz D, Merkler D. Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol.* 2006 Nov;202(1):217-24. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.05.032. Epub 2006 Jul 20. PMID: 16857191.
- [19] Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, Giros B, Mechawar N. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation.* 2014 Jan 21;11:12. doi: 10.1186/1742-2094-11-12. PMID: 24447857; PMCID: PMC3906907.
- [20] Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Jun 1;57(1):1-9. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00040-0. PMID: 9630473.
- [21] Bird AD, Cuntz H. Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. *Cell Rep.* 2019 Jun 4;27(10):3081-3096.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.097. PMID: 31167149.
- [22] SHOLL DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* 1953 Oct;87(4):387-406. PMID: 13117757; PMCID: PMC1244622.

[23] Becker B, Demirbas M, Johann S, Zendedel A, Beyer C, Clusmann H, Haas SJ, Wree A, Tan SKH, Kipp M. Effect of Intrastratial 6-OHDA Lesions on Extrastriatal Brain Structures in the Mouse. *Mol Neurobiol*. 2018 May;55(5):4240-4252. doi: 10.1007/s12035-017-0637-9. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28616718.

[24] Sidman, Kosaras, Misra, & Senft. (2017). High Resolution Mouse Brain Atlas. Retrieved from <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>

[25] Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*. 2020 Mar 31;9(4):843. doi: 10.3390/cells9040843. PMID: 32244377; PMCID: PMC7226799.

[26] imageJ.net [Internet]. USA, National Institute of Health; c2021 [cited 2016 April 28th]. Available from: <https://imagej.net/software/imagej/>.

[27] Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci Rep*. 2017 Oct 16;7(1):13211. doi: 10.1038/s41598-017-13581-z. PMID: 29038483; PMCID: PMC5643511.

[28] Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752-8. doi: 10.1038/nn1472. Epub 2005 May 15. PMID: 15895084.

[29] Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP. Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia*. 1998 Feb;22(2):180-8. PMID: 9537838.

[30] Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer N, Nitsch R. Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur J Neurosci*. 1999 Dec;11(12):4251-61. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00852.x. PMID: 10594651.

[31] Kosonowska E, Janeczko K, Setkowicz Z. Inflammation induced at different developmental stages affects differently the range of microglial reactivity and the course of seizures evoked in the adult rat. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:66-70. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.063. Epub 2015 May 16. PMID: 25989877.

[32] Wasmuth S, Jalilvand TV, Laffer B, Busch M, Bauer D, Langmann T, Thanos S, Kasper M, Heiligenhaus A. Phenotypic Differences in Primary Murine Microglia Treated with NOD1, NOD2, and NOD1/2 Agonists. *J Mol Neurosci*. 2020 Apr;70(4):600-609. doi: 10.1007/s12031-019-01466-x. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31907866.

[33] Hohmann U, Pelzer M, Kleine J, Hohmann T, Ghadban C, Dehghani F. Opposite Effects of Neuroprotective Cannabinoids, Palmitoylethanolamide, and 2-Arachidonoylglycerol on Function and Morphology of Microglia. *Front Neurosci*. 2019 Nov 7;13:1180. doi: 10.3389/fnins.2019.01180. PMID: 31787870; PMCID: PMC6853843.

- [34] Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech.* 2010 Oct;73(11):1019-29. doi: 10.1002/jemt.20829. PMID: 20232465.
- [35] Young K, Morrison H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *J Vis Exp.* 2018 Jun 5;(136):57648. doi: 10.3791/57648. PMID: 29939190; PMCID: PMC6103256.
- [36] Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jan 30;7:3. doi: 10.3389/fncel.2013.00003. PMID: 23386810; PMCID: PMC3558688.
- [37] Binley KE, Ng WS, Tribble JR, Song B, Morgan JE. Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods. *J Neurosci Methods.* 2014 Mar 30;225:65-70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.01.017. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24485871.
- [38] Ferreira TA, Blackman AV, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, Sjöström PJ, van Meyel DJ. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods.* 2014 Oct;11(10):982-4. doi: 10.1038/nmeth.3125. PMID: 25264773; PMCID: PMC5271921.
- [39] Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics.* 2011 Sep 1;27(17):2453-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr390. Epub 2011 Jul 4. PMID: 21727141.
- [40] Srinivasan A, Srinivasan A, Ferland RJ. AutoSholl allows for automation of Sholl analysis independent of user tracing. *J Neurosci Methods.* 2020 Feb 1;331:108529. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108529. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31760060; PMCID: PMC7098465.
- [41] Dickstein DL, Dickstein DR, Janssen WGM, Hof PR, Glaser JR, Rodriguez A, O'Connor N, Angstman P, Tappan SJ. Automatic Dendritic Spine Quantification from Confocal Data with Neurolucida 360. *Curr Protoc Neurosci.* 2016 Oct 3;77:1.27.1-1.27.21. doi: 10.1002/cpns.16. PMID: 27696360; PMCID: PMC5113738.
- [42] Hellwig S, Brioschi S, Dieni S, Frings L, Masuch A, Blank T, Biber K. Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain Behav Immun.* 2016 Jul;55:126-137. doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.008. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26576722.
- [43] Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb Cortex.* 2013 Aug;23(8):1784-97. doi: 10.1093/cercor/bhs151. Epub 2012 Jun 17. PMID: 22710611.
- [44] Rowson SA, Harrell CS, Bekhbat M, Gangavelli A, Wu MJ, Kelly SD, Reddy R, Neigh GN. Neuroinflammation and Behavior in HIV-1 Transgenic Rats Exposed to Chronic Adolescent Stress. *Front Psychiatry.* 2016 Jun 20;7:102. doi: 10.3389/fpsy.2016.00102. PMID: 27378953; PMCID: PMC4913326.

- [45] Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*. 2013 Jan 11;10:4. doi: 10.1186/1742-2094-10-4. PMID: 23311642; PMCID: PMC3570327.
- [46] Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*. 1999 Apr;57(6):563-81. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00069-0. PMID: 10221782.
- [47] Fischbach F, Nedelcu J, Leopold P, Zhan J, Clarner T, Nellessen L, Beißel C, van Heuvel Y, Goswami A, Weis J, Denecke B, Schmitz C, Hochstrasser T, Nyamoya S, Victor M, Beyer C, Kipp M. Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia*. 2019 Feb;67(2):263-276. doi: 10.1002/glia.23538. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30511355.
- [48] Krauspe BM, Dreher W, Beyer C, Baumgartner W, Denecke B, Janssen K, Langhans CD, Clarner T, Kipp M. Short-term cuprizone feeding verifies N-acetylaspartate quantification as a marker of neurodegeneration. *J Mol Neurosci*. 2015 Mar;55(3):733-48. doi: 10.1007/s12031-014-0412-6. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25189319.
- [49] Große-Veldmann R, Becker B, Amor S, van der Valk P, Beyer C, Kipp M. Lesion Expansion in Experimental Demyelination Animal Models and Multiple Sclerosis Lesions. *Mol Neurobiol*. 2016 Sep;53(7):4905-17. doi: 10.1007/s12035-015-9420-y. Epub 2015 Sep 12. PMID: 26363796.
- [50] Clarner T, Diederichs F, Berger K, Denecke B, Gan L, van der Valk P, Beyer C, Amor S, Kipp M. Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2012 Oct;60(10):1468-80. doi: 10.1002/glia.22367. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22689449.

VI Eidesstattliche Versicherung

Hanusch, Sophie Maria

Name, Vorname

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Morphologische Veränderungen von Mikroglia in der Frühphase eines Multiple Sklerose Tiermodells“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bochum, 13.02.2025

Ort, Datum

Sophie M. Hanusch

Unterschrift Sophie Maria Hanusch

VII Danksagung

Hiermit möchte ich den vielen Menschen danken, die mich während meiner Dissertation betreut und auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorarbeitsbetreuer, Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, danken. Während meiner gesamten Dissertation, insbesondere während meiner Forschungszeit im Labor, fand er für Fragen und Probleme stets die Zeit, mich mit Ratschlägen, Anregungen und Motivation zu unterstützen. Ganz besonders für die Freiheit und damit auch das Vertrauen in mich, selbst den Weg in meinem Forschungsprojekt entwickeln zu können, bin ich besonders dankbar.

Bei Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz möchte ich mich bedanken, dass ich mein Forschungsprojekt an seinem Lehrstuhl durchführen und meine Dissertation erstellen durfte und von allen Mitarbeitenden des Lehrstuhls hierin unterstützt wurde.

Ganz besonders möchte ich mich bei den technischen Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München bedanken, ohne die meine Dissertation nicht zustande gekommen wäre: Astrid Baltruschat, Beate Aschauer und Sabine Tost. Für ihre unermüdliche Unterstützung während der vielen Stunden im Labor sowie ihrem Zuspruch auch in frustrierenden Momenten danke ich ihnen sehr.

Auch danke ich meinen Mitdotorandinnen und -dotoranden für die gegenseitige Motivation sowie den gegenseitigen Ansporn. Insbesondere möchte ich Felix Schweiger danken, der sowohl in der Forschungsarbeit, als auch im Persönlichen immer für mich da war und mich in dieser Zeit mehr unterstützt hat, als ich ihm dafür danken kann. Auch möchte ich mich besonders bei Felix Fischbach bedanken, der mir noch in der langen Zeit bis zur Fertigstellung der Dissertation stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freundinnen, insbesondere Isabell, Kiki, Lili, Janna, Resi, Silvia und all den anderen, die mich in den vielen Jahren seit Beginn meiner Dissertation unterstützt, an mich geglaubt und mich unermüdlich motiviert haben, bis zur Fertigstellung durchzuhalten. Ich danke euch von Herzen.