

3 Ergebnisse

3. 1. Northern-Blot-Analyse des IL-1-Systems in der murinen

Scrapie-Pathogenese

Um die Rolle von Interleukin-1 in der Scrapie-Pathogenese zu untersuchen, wurden zunächst mit Hilfe von Northern-Blots wesentliche Elemente des IL-1-Systems auf eine veränderte Gen-Expression untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gehirngewebe von infizierten C57/B6-Mäusen, die mit dem Scrapie-Stamm 139A infiziert wurden, mit den entsprechenden mock-infizierten Kontrolltieren verglichen.

Es wurden je zwei Tiere pro Gruppe im terminalen Krankheitsstadium (176 dpi) als Doppelwerte eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion konnten die für eine Scrapie-Infektion typischen Krankheitssymptome (Verhalten, Konstitution und Bewegungsstörungen) diagnostiziert werden. Nach Genickbruch der Tiere wurden die Gehirne herauspräpariert und Gesamt-RNA mit Hilfe von Trizol isoliert. Für die Blots wurden je 10 µg Gesamt-RNA von Scrapie-infiziertem Hirngewebe und mock-infiziertem Kontrollgewebe gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet.

Zur Herstellung von genspezifischen DNA-Sonden für die Northern-Blot-Analyse wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Anschließend wurden die Sonden radioaktiv markiert und im Northern-Blot analysiert. Zur quantitativen Beurteilung der aufgetragenen Gesamt-RNA-Mengen wurden die Blots mit der Sonde des „housekeeping“-Gens β -Aktin rehybridisiert.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, kommt es während der Scrapie-Infektion zu einem 4 bis 6-fachen Expressionsanstieg der untersuchten Faktoren IL-1-Rezeptor-Typ1, IL-1 β und dem Interleukin-1-converting-enzym (ICE) gegenüber der mock-infizierten Kontrollmäuse. Eine Rehybridisierung der Northern-Blot-Membran mit dem „housekeeping“-Gen β -Aktin ergab quantitativ gleiche Mengen an aufgetragener Gesamt-RNA und zeigte die Intaktheit der eingesetzten RNA (siehe Abbildung 7 D).

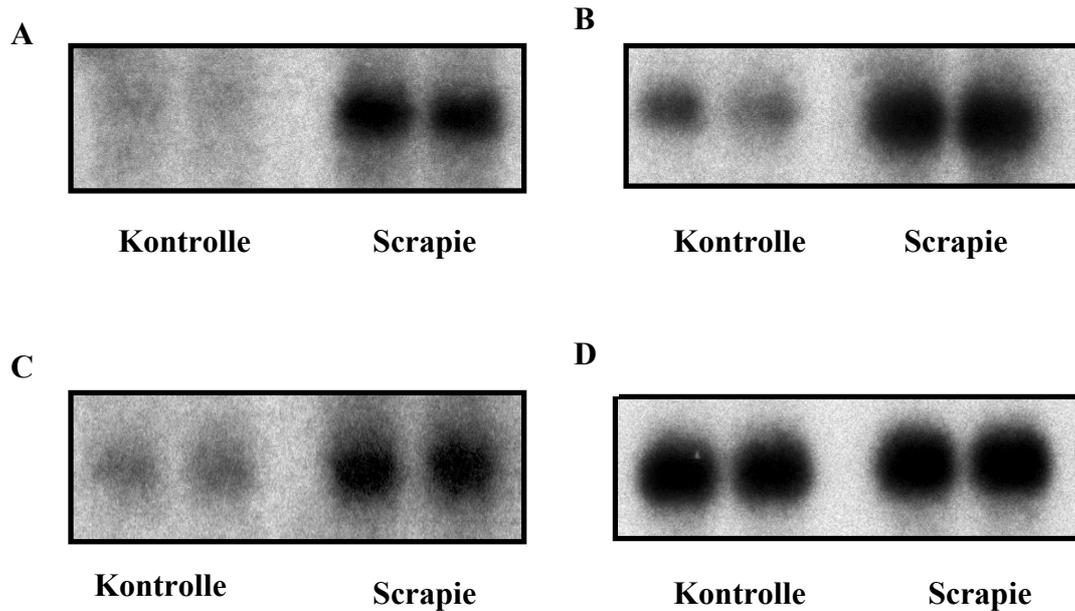


Abbildung 7: Autoradiographie der Northern-Blot-Analysen der veränderten Genexpression von Faktoren des IL-1-Systems in der murinen Scrapie-Pathogenese.

Dargestellt sind jeweils zwei mock-infizierte Kontrollmäuse (links) im Vergleich zu zwei Scrapie-infizierten Mäusen (rechts). Es wurden jeweils 10 μ g Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen. Folgende radioaktiv markierte Sonden wurden eingesetzt:

A: IL-1 β **B:** IL-1R1 **C:** IL-1-converting-enzyme (ICE) **D:** β -Aktin als Standard

3.2. Infektionsstudien von IL-1R1-defizienten-Mäusen

Um die Rolle von Interleukin-1 in der Scrapie-Pathogenese zu charakterisieren, wurden IL-1R1^{-/-}-Mäuse (C57/B6-Hintergrund) mit dem Scrapie-Stamm 139A i.c. infiziert. Für die Infektion wurden Verdünnungen eines 10 %iges Hirnhomogenats aus einem Pool von sechs Mäusen eingesetzt, die terminal an Scrapie erkrankt waren. Als entsprechende Kontrollgruppe wurden C57/B6-Mäuse mit dem selben Scrapie-Homogenat infiziert und unter gleichen Bedingungen gehalten. Die jeweilige Infektionsdosis der verschiedenen Versuche und die Anzahl der infizierten Tiere pro Gruppe sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Ergebnisse

<u>Verdünnung des 10% Hirnhomogenates</u>	<u>IL-1R1^{-/-}-Tiere</u>	<u>C57/B6-Kontrolltiere</u>
10 ⁻²	197 ± 7 (n=4)	172 ± 4 (n=8)
10 ⁻³	203 ± 3 (n=3)	181 ± 13 (n=13)
10 ⁻⁴	226 ± 14 (n=9)	204 ± 7 (n=16)

Tabelle 2: Überlebensdaten (dpi) der Scrapie-infizierten IL-1R1^{-/-}-Tiere und der C57/B6-Kontrolltiere mit den entsprechenden Verdünnungen eines 10 %igen Hirnhomogenats

n = Anzahl der Versuchstiere

Alle drei Versuche, die jeweils mit einer unterschiedlichen Verdünnung eines 10 %igen Hirnhomogenates durchgeführt wurden (siehe Tabelle 2), zeigen eine Verlängerung der Überlebenszeit der infizierten IL-1R1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden C57/B6-Kontrolltieren.

Bei einer Verdünnung des Hirnhomogenates von 10⁻² war die durchschnittliche Lebensdauer der IL-1R1^{-/-}-Tiere 197 dpi (±7), bei der C57/B6-Kontrolltiergruppe lag die Durchschnittsüberlebensdauer bei 172 dpi (±4). Bei der Verdünnung des Hirnhomogenates von 10⁻³ verlängerte sich die Inkubationszeit, wobei die Knockout-Tiere im Durchschnitt erst 203 Tage nach der Infektion starben (±3), während die C57/B6-Kontrolltiere schon 181 Tage nach der Infektion (±13) starben. Dieser Unterschied konnte auch bei einer Hirnhomogenatverdünnung von 10⁻⁴ gezeigt werden. Bei diesem Versuch war die Überlebensdauer der IL-1R1^{-/-}-Tiere im Durchschnitt 226 Tage, während die Wildtypkontrolltiere nach 204 (±7) Tagen den terminalen Krankheitszustand erreicht hatten. Diese Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 8 dargestellt.

Ergebnisse

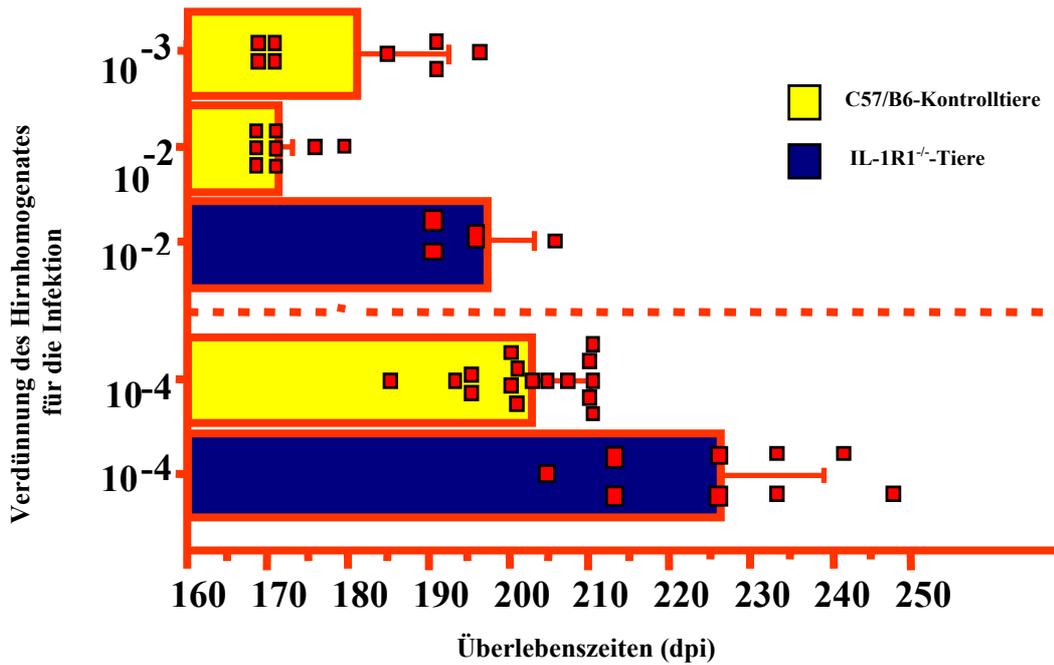


Abbildung 8: Übersicht zu den Überlebenszeiten der Scrapie-infizierten Tiergruppen bei den verschiedenen Infektionsversuchen.

Im Vergleich sind die Scrapie-infizierten IL-1R1^{-/-}-Mäuse und die entsprechenden C57/B6-Kontrolltiere dargestellt. Die Knockout-Tiere zeigen ein verlängertes Überleben im Vergleich zu der C57/B6-Kontrollgruppe im Durchschnitt von 25 Tagen. Diese Beobachtungen waren bei allen durchgeführten Versuchen statistisch signifikant. Die Standardabweichung zwischen den beiden Tiergruppen ist durch den Fehlerbalken angegeben. (Mittelwert \pm Standardfehler; * $p < 0,01$ im ungepaarten, zweiseitigen t-Test)

3.3 Immunhistochemische Analyse der Scrapie-infizierten

IL-1R1-defizienten-Mäuse im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren

Wie in Abbildung 8 gezeigt, gibt es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Überlebenszeiten der Scrapie-infizierten IL-1R1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den C57/B6-Kontrollmäusen. Um diese Unterschiede im Krankheitsverlauf der Tiergruppen zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter im Gehirn immunhistochemisch untersucht:

- Stärke der Prion-Ablagerung,
- Aktivierung von Astrozyten,
- Mikrogliaaktivierung und
- Vakuolisierung des Gewebes.

Für diese Untersuchungen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten die Gehirne der Tiere entnommen. Die erste Entnahme erfolgte 125 Tage nach der Infektion, eine zweite jeweils ca. 24 h vor dem voraussichtlichen Tod der Tiere (terminales Krankheitsstadium). Für Untersuchungen an Paraffingewebe wurden die Gehirne nach der Entnahme in 4 %igem Formalin fixiert und vor der Einbettung in vier coronale Areale geteilt. Für immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten wurden die Gewebe in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Zu den Gehirnregionen, die immunhistochemisch analysiert wurden, gehörten der Hippocampus, Cortex, das Stammhirn, Kleinhirn und Riechhirn der Tiere (siehe Abb. 4).

3.3.1 Astrozytenaktivierung

Während der Aktivierung von Astrozyten kommt es zu einer Hypertrophie der Zellfortsätze (Wietgreffe et al., 1985; Dietrich et al., 1987) und damit verbunden zu einer Expression spezifischer Proteine, die sich immunhistochemisch nachweisen lassen. Die Astrozytenaktivierung wurde anhand der Expression des sauren Faserproteins (GFAP) auf den Astrozytenfortsätzen untersucht. Die Immunfärbungen wurden mit Hilfe des GFAP-Antikörpers der Firma Dako angefertigt. Die histologischen Auswertungen erfolgten wie unter 2.2.2.12 angegeben.

3.3.1.1 Astrozytose im asymptomatischen Krankheitsstadium (125 dpi)

Die histochemischen Untersuchungen von Scrapie-infizierten C57/B6-Mäusen zeigten 125 dpi eine massive Aktivierung von Astrozyten, die vor allem im Stammhirn, Hippocampus und

Ergebnisse

Kleinhirn zu beobachten waren. Die Analyse der IL-1R1^{-/-}-Mäuse zeigte vergleichsweise eine deutlich verringerte Astrozytose. Zum frühen Zeitpunkt der Erkrankung konnten im Kleinhirn und Stammhirn der Knockout-Tiere fast keine aktivierten Astrozyten nachgewiesen werden. Bei den C57/B6-Kontrolltieren war der Aktivierungszustand der Astrozyten dieser Hirnregionen deutlich stärker. Die beobachteten Ergebnisse wurden in Form von mikroskopischen Aufnahmen dokumentiert und sind in Abbildung 9 dargestellt.

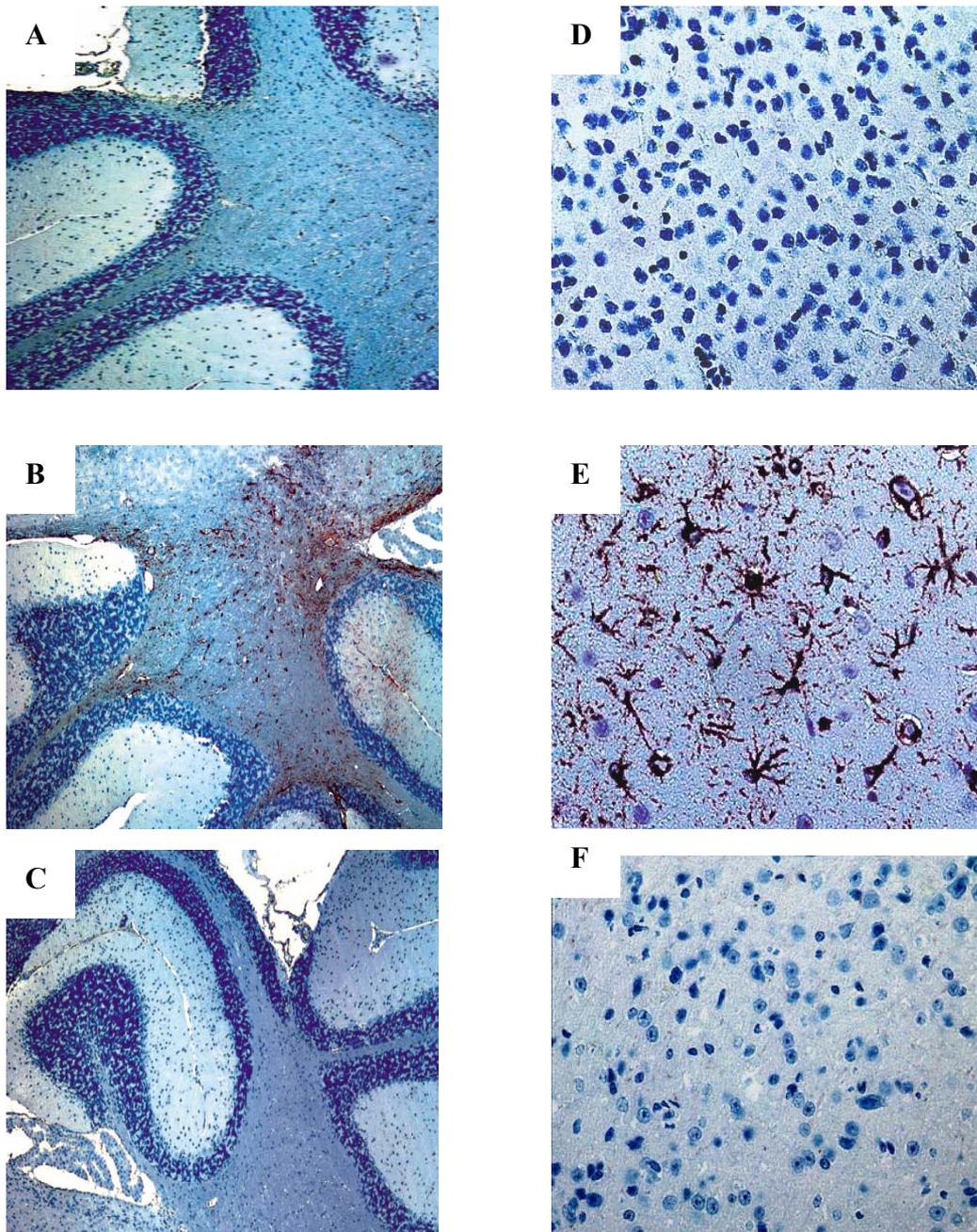


Abbildung 9: Expression von GFAP im Kleinhirn von $IL-1R1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; 125 dpi.

Die Aktivierung von Astrozyten im Kleinhirn war bei den Knockout-Tieren deutlich geringer im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren. Die mock-infizierten Mäuse zeigten keine Immunreaktivität gegenüber GFAP.

A: $IL-1R1^{-/-}$ -Mäuse **B:** C57/B6-Kontrollmäuse **C:** mock-infizierte Mäuse;

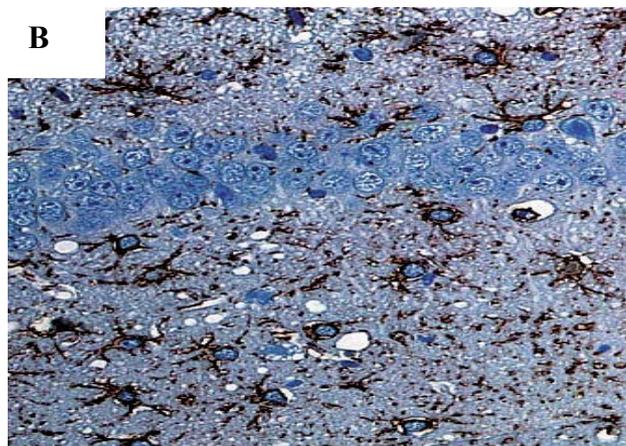
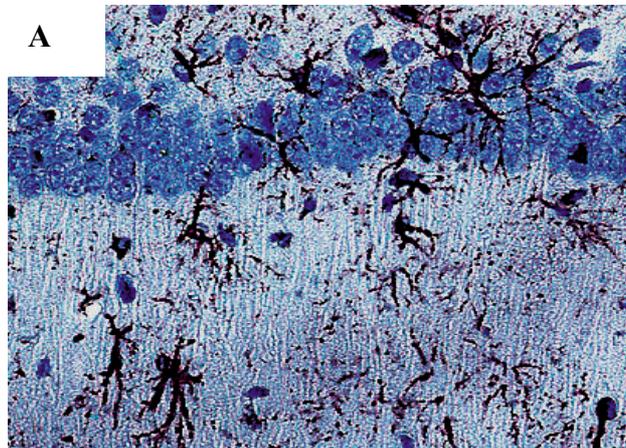
Vergrößerung: 100-fach

D: $IL-1R1^{-/-}$ -Mäuse **E:** C57/B6-Kontrollmäuse **F:** mock-infizierte Mäuse;

Vergrößerung: 400-fach

3.3.1.2 Astrozytose im terminalen Krankheitsstadium

Die Astrozytenaktivierung verstärkt sich im Verlauf der Scrapie-Erkrankung (Lefrancois et al., 1994). Ein Aktivierungsunterschied der Astrozyten zwischen den Scrapie-infizierten Tiergruppen konnte im terminalen Krankheitsstadium nicht mehr festgestellt werden (siehe Abb. 10). Beide mit dem Scrapie-Stamm 139A infizierten Tiergruppen zeigten ein starke Aktivierung von Astrozyten, die in allen untersuchten Hirnarealen festgestellt werden konnte. Bei der mock-infizierten Kontrollgruppe konnte ebenfalls eine beginnende Astrozytose im Cortex und Stammhirn beobachtet werden. Diese ist auf das zunehmende Alter der Tiere zurückzuführen (Westaway et al., 1994).



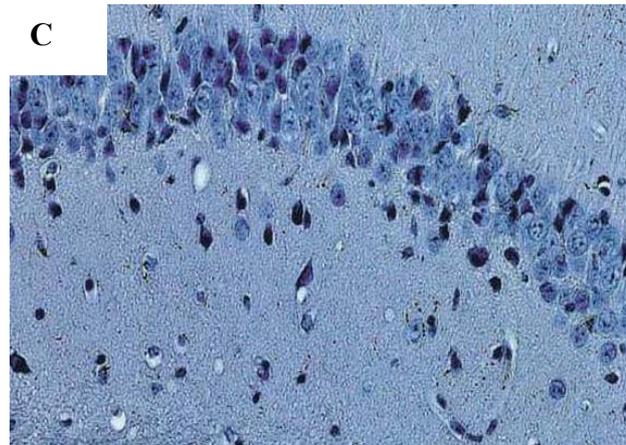


Abbildung 10: Expression von GFAP im Kleinhirn von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; terminales Krankheitsstadium.

Bei der Untersuchung des terminalen Krankheitsstadiums konnten bei der Auswertung der Aktivierung von Astrozyten bei den Scrapie-infizierten Tiergruppen keine Unterschiede festgestellt werden. Die mock-infizierten Tiere zeigten eine leichte Immunreaktivität im Cortex und Stammhirn gegen den GFAP-AK.

A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse **B:** C57/B6-Kontrollmäuse **C:** mock-infizierte Mäuse

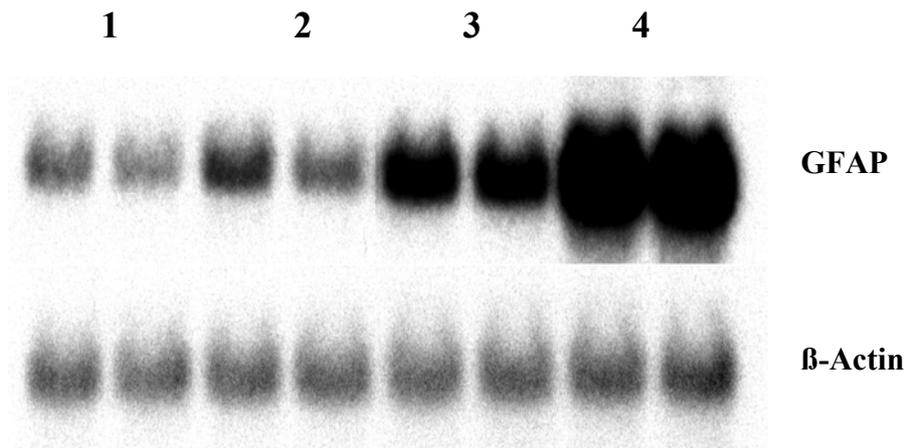
Vergrößerung: 400-fach

3.3.1.3 Northern-Blot-Analyse zur Astrozytenaktivierung

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung bezüglich der Astrozytenaktivierung weiter zu erhärten, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde Total-RNA von Scrapie-infizierten IL-1R1^{-/-}-Tieren und Total-RNA entsprechender C57/B6-Kontrolltiere eingesetzt. Für den Northern-Blot wurden 10 µg Gesamt-RNA von je zwei Tieren pro Gruppe zu je zwei verschiedenen Zeitpunkten (125 dpi; terminal) gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Zur Herstellung von genspezifischen Sonden wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Im Anschluss wurden die Sonden radioaktiv markiert und im Northern-Blot analysiert. Zur quantitativen Beurteilung der aufgetragenen Gesamt-RNA-Mengen wurden die Blots mit der Sonde des „housekeeping“-Gens β-Aktin rehybridisiert. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich ist, wird 125 dpi der Astrozytenmarker GFAP in den C57/B6-Mäusen zwischen 3 bis 5-fach höher exprimiert als bei den entsprechenden IL-1R1^{-/-}-Mäusen (Vergleich Spur 2 und 3). Somit konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von

Ergebnisse

Astrozyten bei den IL-1R1^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt 125 Tage nach der Infektion verringert ist. Der durchgeführte Northern-Blot bestätigte die Beobachtungen der immunhistochemischen Analyse.



**Abbildung 11: Autoradiographie der Northern-Blot-Analysen zur Astrozytenaktivierung
Vergleich zwischen IL-1R1^{-/-}-Tieren, mock-infizierten Mäusen und C57/B6-Kontrolltieren.**

1: mock-infizierte Kontrollmäuse

2: IL-1R1^{-/-}-Tiere; 125dpi

3: C57/B6-Kontrolltiere; 125dpi

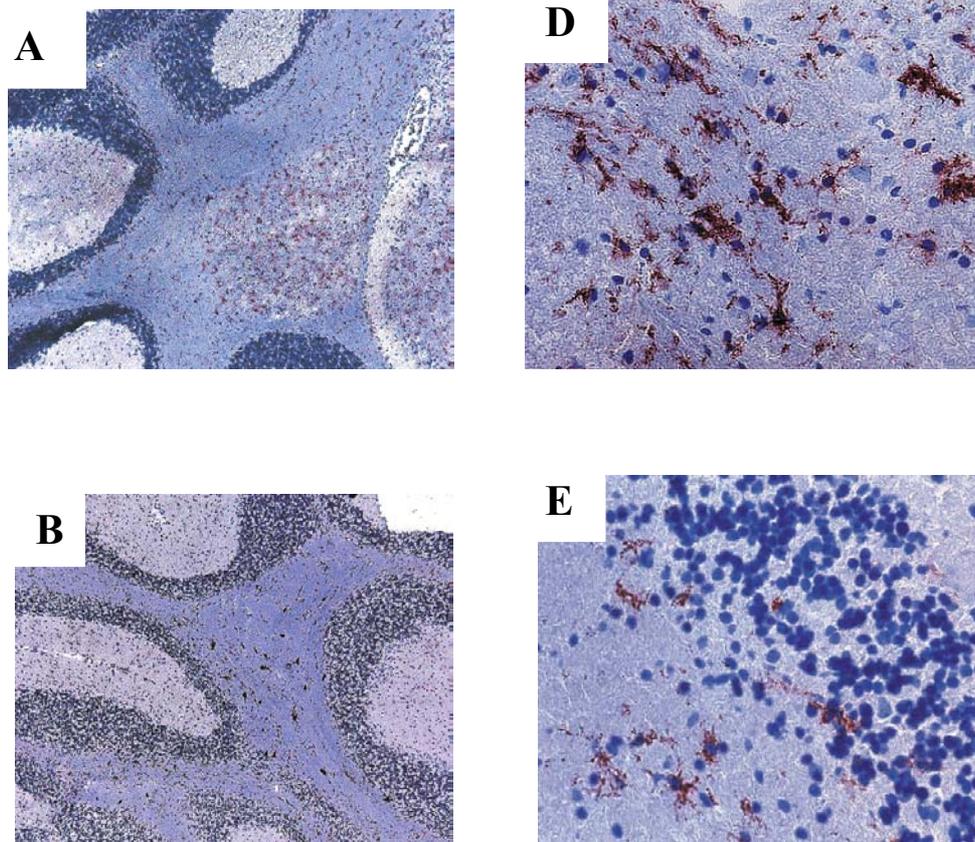
4: C57/B6-Kontrolltiere; terminales Krankheitsstadium

3.3.2 Aktivierung von Mikroglia

Im Krankheitsverlauf nach der Scrapie-Infektion kommt es zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen im Gehirn (Williams et al., 1994; Campell et al., 1994). Während der Aktivierung kommt es auf den Zellen zur Expression verschiedener Proteine, die sich immunhistochemisch nachweisen lassen (Graeber et al., 1988). Der Nachweis von aktivierten Mikroglia erfolgte mit einem Anti-Mac-1-Antikörper, der gegen den CD11b-Mikroglia-Aktivierungsmarker gerichtet ist. Die immunhistologischen Untersuchungen wurden wie unter 2.2.2.12 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

3.3.2.1 Aktivierung von Mikroglia im asymptomatischen Krankheitsstadium

Im frühen Krankheitsstadium konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Mikroglia-Aktivierung bei den IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren vorhanden ist (siehe Abb. 12). Sehr deutliche Unterschiede waren vor allem im Kleinhirn und Stammhirn der immunhistochemischen Präparate zu beobachten.



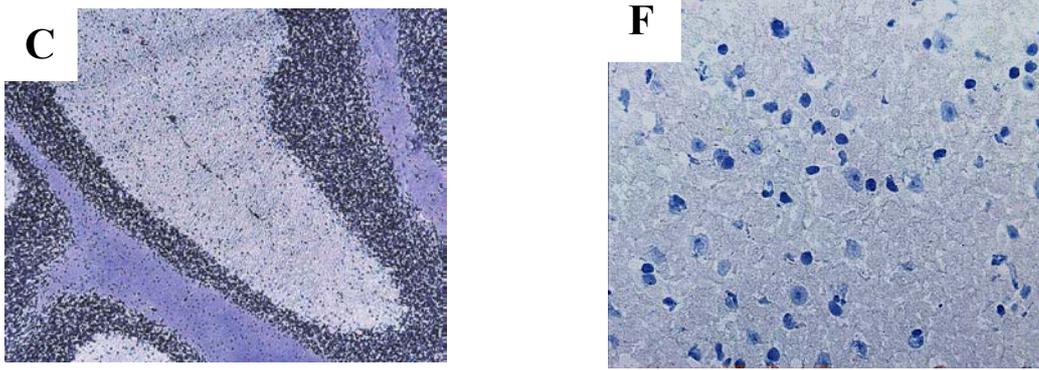


Abbildung 12: Expression von CD11b im Kleinhirn von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; 125 dpi.

Die Untersuchungen zur Aktivierung von Mikrogliazellen im Gehirn der Scrapie-infizierten Tiergruppen ergaben eine deutlich stärkere Mikrogliose bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren. Eine Immunreaktion bei den mock-infizierten Mäusen konnte nicht gezeigt werden.

A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse **B:** C57/B6-Kontrollmäuse **C:** mock-infizierte Mäuse;

Vergrößerung: 100-fach

D: IL-1R1^{-/-}-Mäuse **E:** C57/B6-Kontrollmäuse **F:** mock-infizierte Mäuse;

Vergrößerung: 400-fach

3.3.2.2 Aktivierung von Mikroglia im terminalen Krankheitsstadium

Die Aktivierung von Mikrogliazellen nimmt im Verlauf der Scrapie-Erkrankung zu. Es konnte festgestellt werden, dass die Mikrogliose der IL-1R1^{-/-}-Tiere im Vergleich zu der C57/B6-Kontrollgruppe verstärkt war. Eine Aktivierung von Mikrogliazellen konnte in allen untersuchten Hirnarealen beobachtet werden (siehe Abb.13).

Ergebnisse

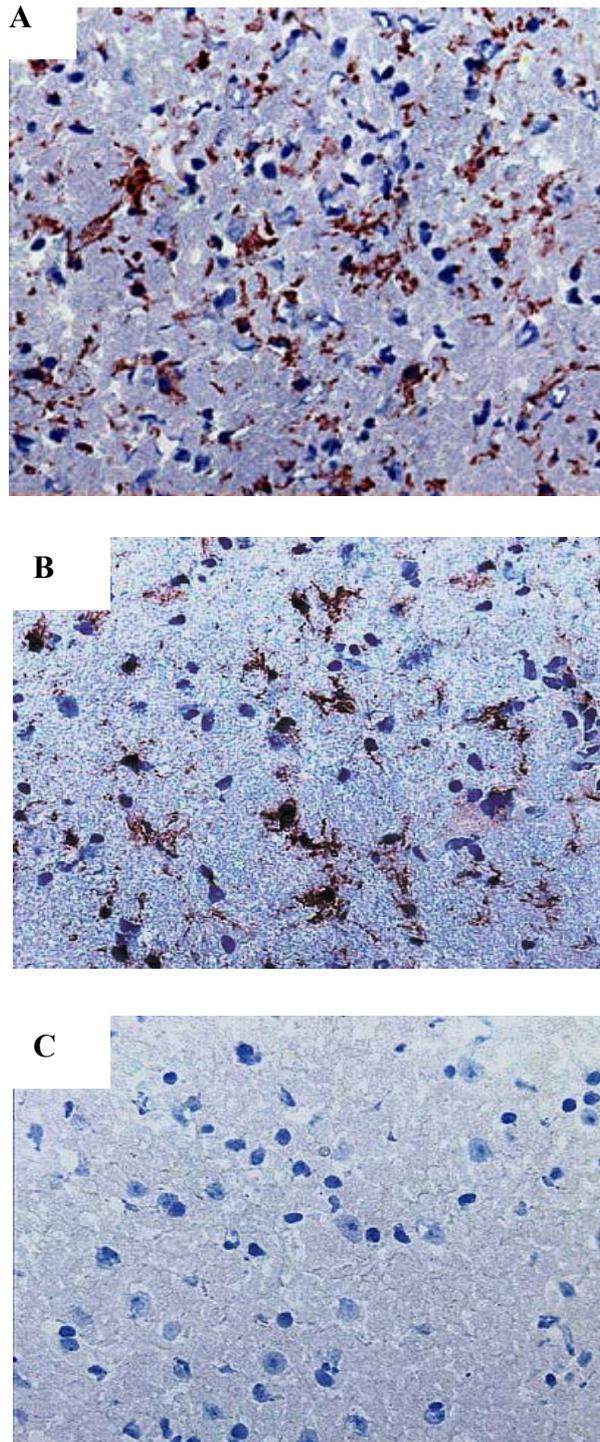


Abbildung 13: Expression von CD11b im Kleinhirn von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; terminales Krankheitsstadium.

Die Auswertung der Mikrogliose zum terminalen Krankheitsstadium ergab eine verstärkte Aktivierung von Mikrogliazellen bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrollmäusen. Die mock-infizierten Tiere zeigten keine Immunreaktion gegen das Mac-1-Antigen.

A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse **B:** C57/B6-Kontrollmäuse **C:** mock-infizierte Mäuse

Vergrößerung: 400-fach

3.3.3 Untersuchung zur Ablagerungen von PrP^{Sc} im Gewebe

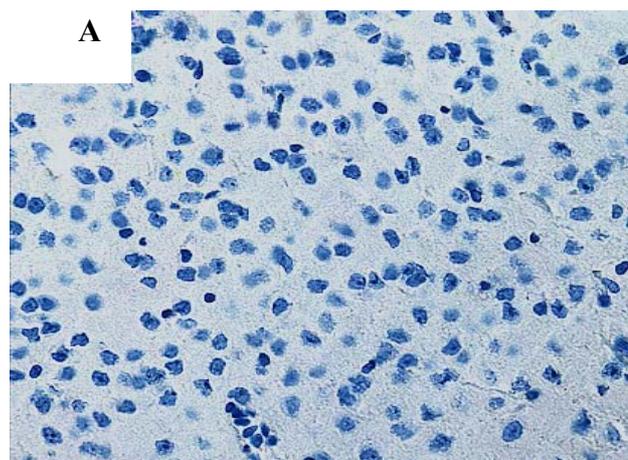
Als zentrales Ereignis bei der Scrapie-Infektion gilt die Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn. Um die Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn der Scrapie-infizierten Mäuse zu untersuchen, wurden mit Hilfe des 6H4-Antikörpers Immunfärbungen durchgeführt.

Die Auswertung der angefertigten Schnitte erfolgte wie unter 2.2.2.12 beschrieben. Um die Ergebnisse der Immunhistochemie zu verifizieren, wurden zusätzlich PET-Blot-Analysen durchgeführt.

3.3.3.1 Prion-Ablagerung im asymptomatischen Krankheitsstadium (125 dpi)

3.3.3.1.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, ist die Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein 125 dpi in den C57/B6-Kontrollmäusen deutlich stärker als in den IL-1R1^{-/-}-Mäusen. Die Akkumulation von PrP^{Sc} in den Knockout-Tieren war in allen untersuchten Hirnarealen sehr moderat bzw. kaum oder nicht detektierbar. Bei der C57/B6-Kontrollgruppe hingegen ließen sich starke Ablagerungen von PrP^{Sc} vor allem im Cortex, Stammhirn und Kleinhirn der Tiere beobachten. Beginnende Ablagerungen waren ebenfalls im Hippocampus und im Riechhirn der Tiere zu verzeichnen. Die mock-infizierten Kontrolltiere zeigten kein Signal mit dem 6H4-Antikörper (siehe Abb. 14).



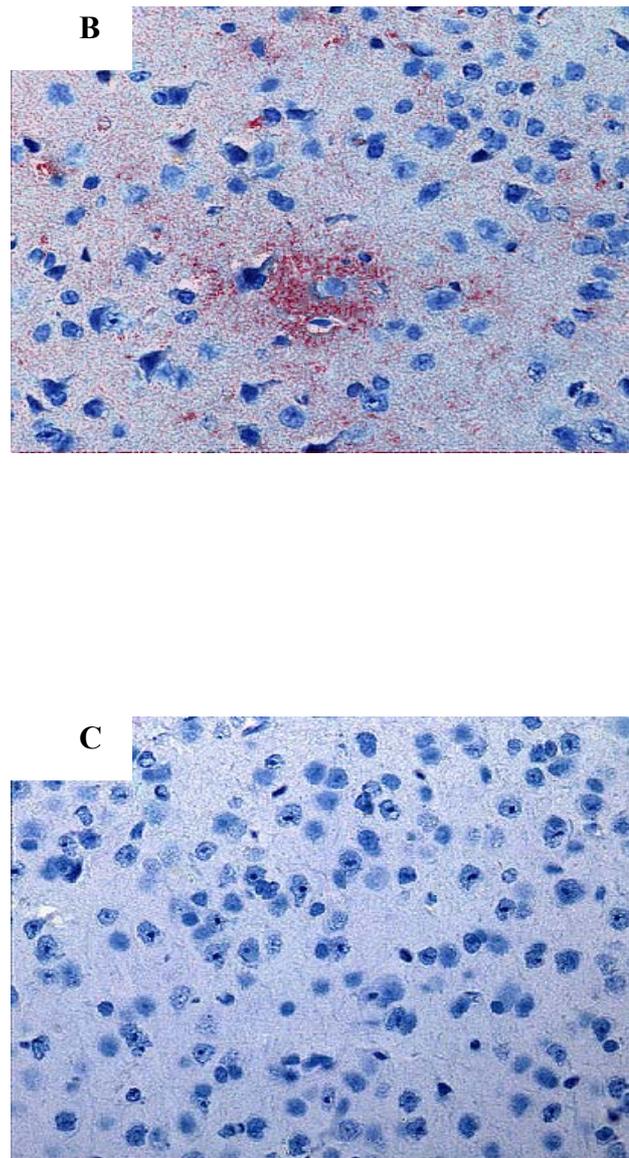


Abbildung 14: Ablagerung von PrP^{Sc} im Kleinhirn von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; 125 dpi.

Die Untersuchungen zur Ablagerung von Prion-Protein 125 Tage nach der Infektion ergaben eine deutlich verringerte oder kaum detektierbare PrP^{Sc}-Akkumulation bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrollmäusen. Die mock-infizierten Tiere zeigten keine Reaktion mit dem 6H4-Antikörper.

A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse B: C57/B6-Kontrollmäuse C: mock-infizierte Mäuse

Vergrößerung: 400-fach

3.3.3.1.2 PET-Blot-Analysen im asymptomatischen Krankheitsstadium (125 dpi)

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung (siehe Abb. 14) konnten mit Hilfe von PET-Blot-Analysen bestätigt werden.

Die Quantifizierung des Signals erfolgte wie unter 2.2.2.12 beschrieben. Wie auch bei der immunhistochemischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein 125 Tage nach der Infektion bei den C57/B6-Kontrolltieren deutlich stärker ist im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren (siehe Abb. 15). Eine beginnende Ablagerung fand sich vor allem im Cortex und Thalamus der Gehirne. Als Negativkontrolle ist in Abbildung 17 ein mock-infiziertes Gehirn dargestellt, welches im PET-Blot kein Signal zeigte.

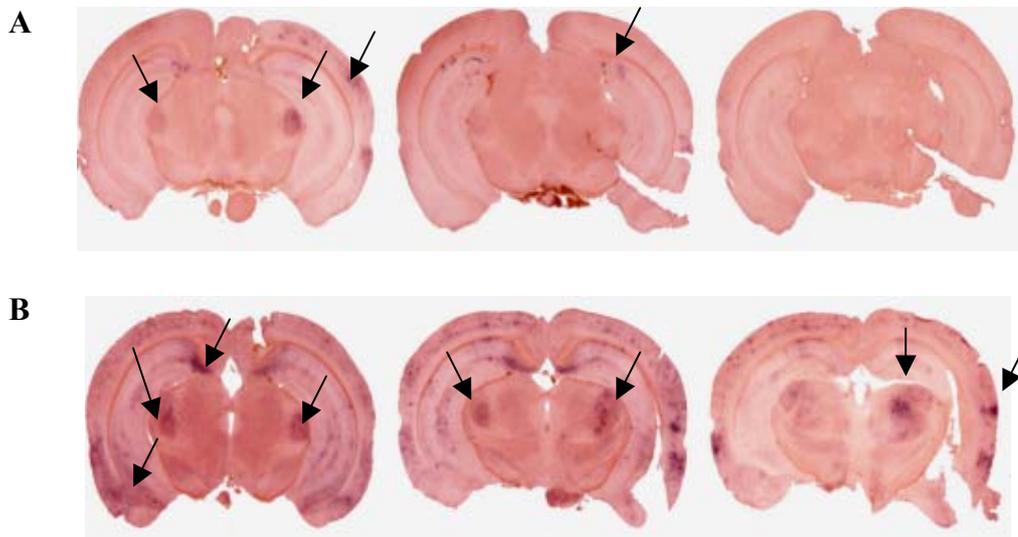


Abbildung 15: PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP^{Sc} bei den IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollmäusen; 125 dpi.

Die Knockout-Mäuse (A) zeigten 125 Tage nach der Infektion eine deutlich schwächere Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein im Vergleich zu den C57/B6-Kontrolltieren (B).

3.3.3.2 Prion-Ablagerung im terminalen Krankheitsstadium

3.3.3.2.1 Immunhistochemische Untersuchung

Zum terminalen Krankheitsstadium der Tiere lassen sich keine Unterschiede mehr in der Stärke der Prion-Protein-Ablagerungen feststellen. Sowohl die C57/B6-Mäuse als auch die IL-1R1^{-/-}-Tiere zeigten starke PrP^{Sc}-Ablagerungen über das gesamte Gehirn verteilt. Im Gegensatz dazu ist kein Signal bei der mock-infizierten Kontrollgruppe zu verzeichnen (siehe Abb. 16).

Ergebnisse

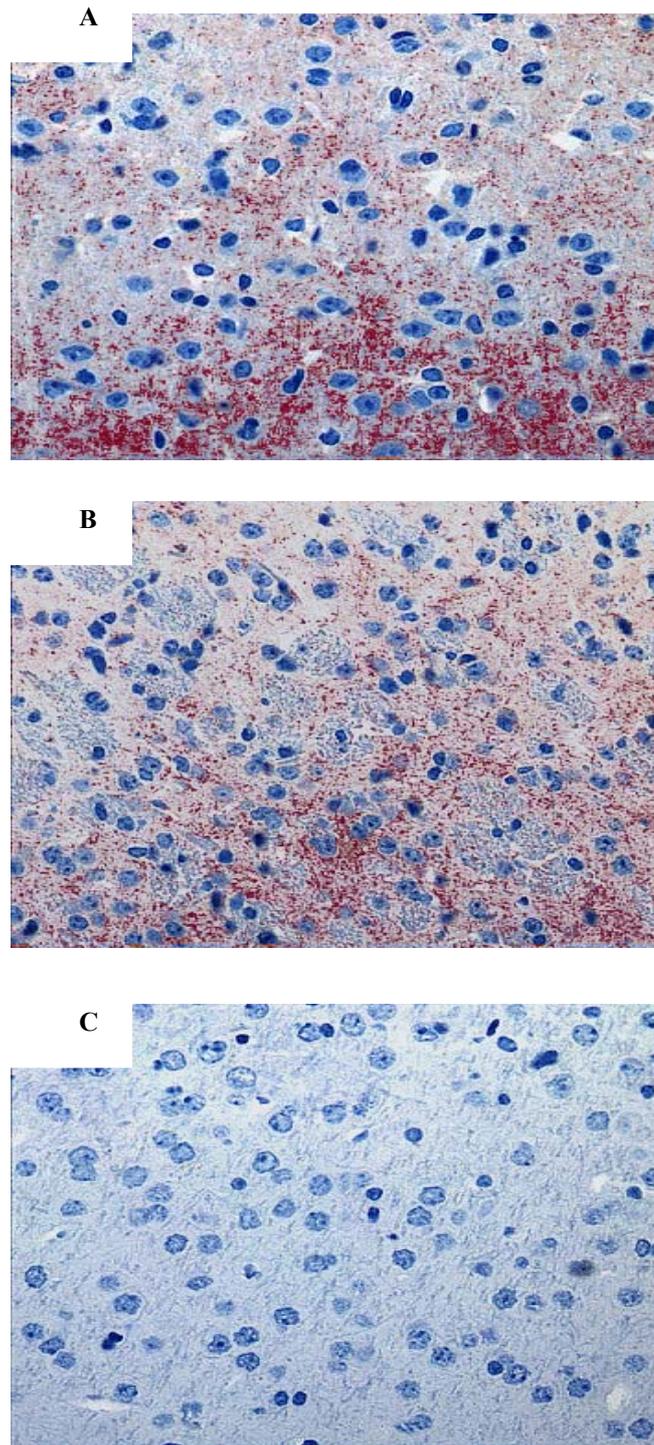


Abbildung 16: Ablagerung von PrP^{Sc} im Kleinhirn von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; terminales Krankheitsstadium.

Die Untersuchungen zur Ablagerung von Prion-Protein zum terminalen Krankheitszeitpunkt ergab keinen Unterschied in der PrP^{Sc}-Akkumulation bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57/B6-Kontrollmäusen. Die mock-infizierten Tiere zeigten keine Reaktion mit dem 6H4-Antikörper.

A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse B: C57/B6-Kontrollmäuse C: mock-infizierte Mäuse

Vergrößerung: 400-fach

3.3.3.2.2 PET-Blot-Analysen im terminalen Krankheitsstadium

Die PET-Blot-Analysen des terminalen Krankheitsstadiums bestätigten die immunhistochemische Auswertung (siehe Abb. 16). Die Ablagerung von Prion-Protein war über den gesamten Schnitt verteilt und zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Scrapie-infizierten Tiergruppen (siehe Abb. 17 A und B). Ein besonders starkes Signal war im Cortex, Hippocampus und Thalamus der Präparate zu beobachten. Als Negativkontrolle ist in Abbildung 17 (C) die mock-infizierte Maus dargestellt, die kein Signal aufwies.

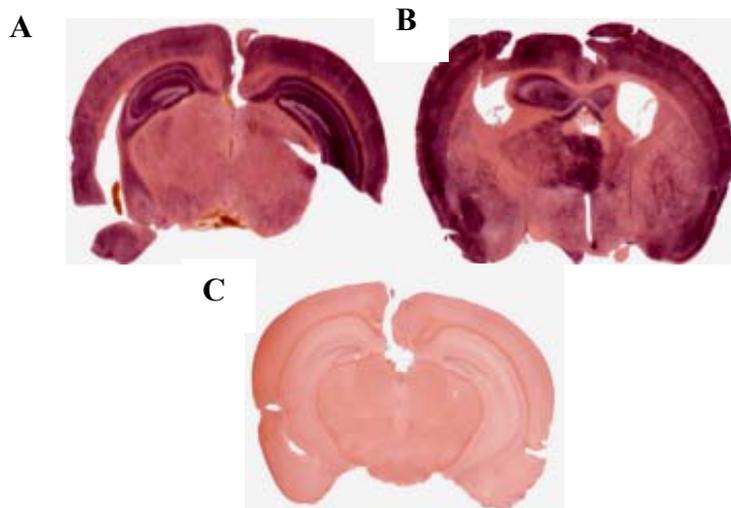


Abbildung 17: PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP^{Sc} bei den IL-1R1^{-/-}-Mäusen (A),

Wildtypkontrollmäusen (B) und den mock-infizierten Mäusen (C) zum terminalen Krankheitsstadium.

Die Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein war bei den beiden Scrapie-infizierten Tiergruppen im terminalen Krankheitsstadium gleich stark (A und B). Die mock-infizierten Mäusen zeigten im PET-Blot keine Reaktion mit dem 6H4-Antikörper (C).

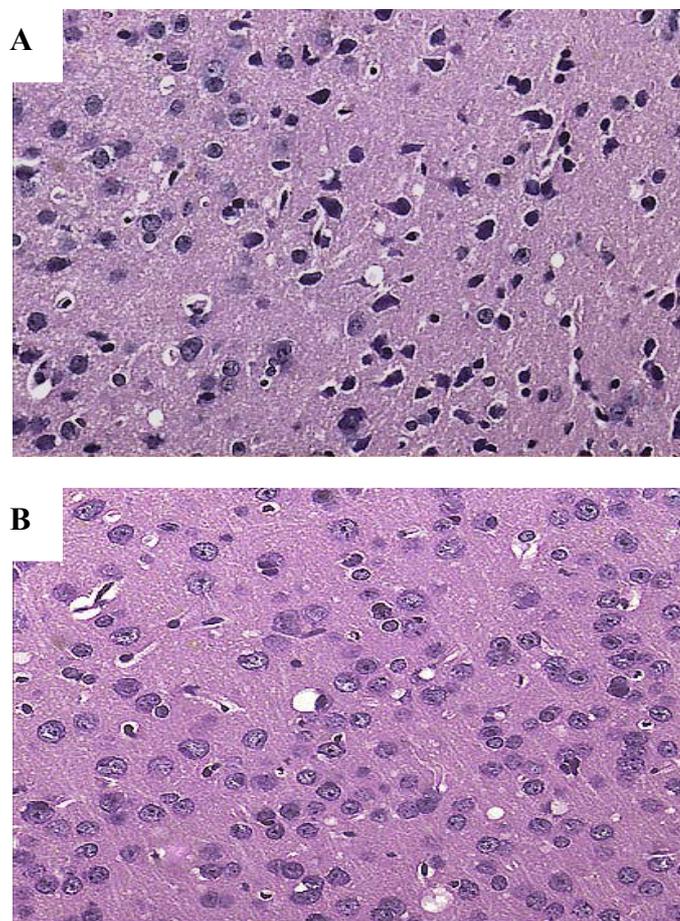
3.3.4 Untersuchung der Vakuolisierung des Hirngewebes

Im Verlauf von TSE's kommt es neben der Gliose und PrP^{Sc}-Ablagerungen auch zu einer Vakuolisierung des Hirngewebes (Jeffrey et al., 1992). Diese spongiformen Veränderungen im Gewebe lassen sich durch eine Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung (siehe 2.2.2.7) darstellen. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte wie unter 2.2.2.12 beschrieben.

3.3.4.1 Spongiforme Veränderungen des Gewebes im asymptomatischen

Krankheitsstadium (125 dpi)

Zum frühen Zeitpunkt der Scrapie-Infektion lassen sich spongiforme Veränderungen vor allem im Kleinhirn, Stammhirn und beginnend im Riechhirn feststellen. Ein Unterschied in der Stärke der Vakuolisierung zwischen den IL-1R1^{-/-}-Mäusen und den C57/B6-Kontrollmäusen konnte 125 dpi nicht festgestellt werden. Bei der mock-infizierten Kontrollgruppe waren keine spongiformen Veränderungen des Gewebes zu beobachten (siehe Abb. 18).



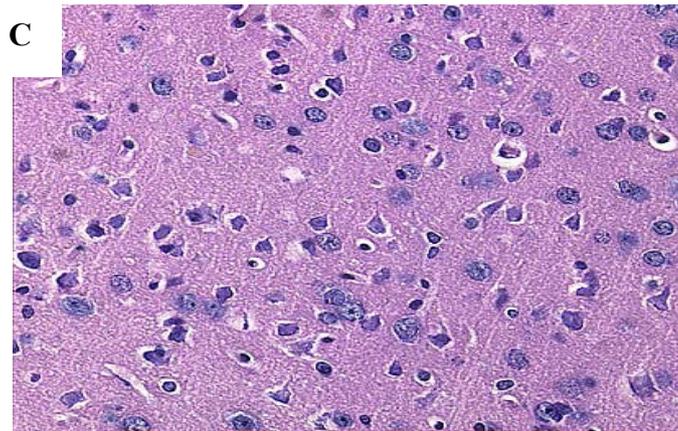


Abbildung 18: Vakuolisierung des Gewebes von IL-1R1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57/B6-Kontrolltieren und mock-infizierten Tieren; 125 dpi.

Die Auswertung der Vakuolisierung des Hirngewebes 125 dpi ergab keine Unterschiede zwischen den Scrapie-infizierten Tiergruppen. Die mock-infizierten Mäuse zeigten keine spongiformen Veränderungen des Gewebes. Zu den ausgewerteten Hirnarealen gehörten: Hippocampus, Cortex, Kleinhirn, Riechhirn und Stammhirn.

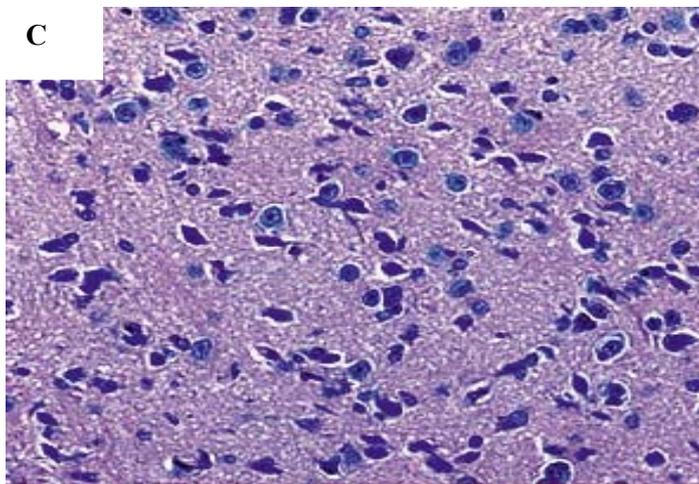
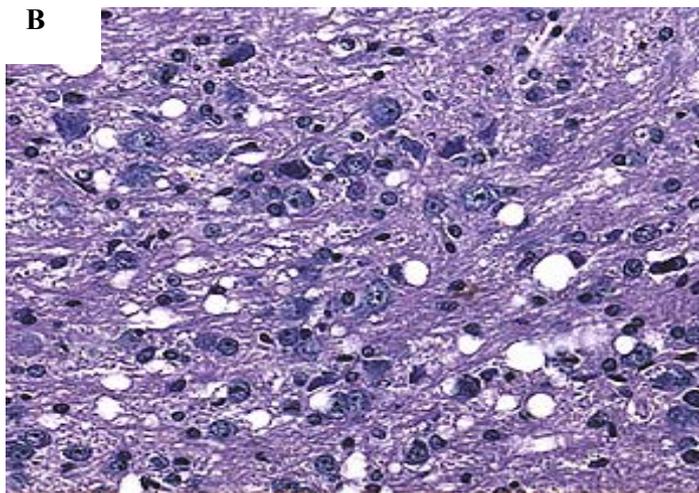
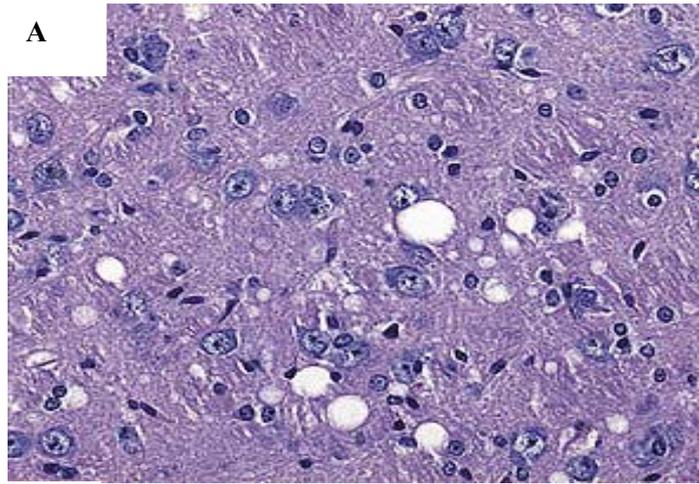
A: IL-1R1^{-/-}-Mäuse B: C57/B6-Kontrollmäuse C: mock-infizierte Mäuse

Vergrößerung: 400-fach

3.3.4.2 Spongiforme Veränderungen des Gewebes im terminalen Krankheitsstadium

Zu diesem Zeitpunkt sind starke spongiforme Veränderungen der Scrapie-infizierten Tiere zu beobachten. Diese sind über das gesamte Gehirn verteilt und betreffen alle untersuchten Hirnregionen. Ein Unterschied der Vakuolisierungsstärke konnte zwischen den Knockout-Tieren und der entsprechenden Kontrolltiergruppe nicht festgestellt werden. Bei den mock-infizierten Mäusen konnten keine spongiformen Veränderungen des Gewebes beobachtet werden (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

Ergebnisse



3.4 Expressionsanalyse verschiedener Gene mittels Real-Time-PCR

Für die Quantifizierung der Expression von den verschiedenen Genen, wurde pro Zeitpunkt (125 dpi, terminal) Total-RNA aus Gehirnen von je zwei Tieren pro Gruppe untersucht. Von jeder Probe erfolgte ein 4-fach Bestimmung und zu jedem Versuch wurde eine Leerwertkontrolle mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Als externer Standard wurde das „housekeeping“-Gen GAPDH verwendet. Zu den untersuchten Genen gehörten: 2'-5'-Oligo-A-Synthetase (OAS), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) und Lysozym.

Die Expressionsanalyse des externen Standard-Gens GAPDH zeigte keinen Unterschied in den untersuchten Scrapie-infizierten Tiergruppen (siehe Abb. 20). Dies bestätigte, dass gleiche Mengen an cDNA von den jeweiligen Tieren eingesetzt wurde. Die Untersuchung zur Expression des Chemokins CXCL10 ergab zum Zeitpunkt 125 dpi eine 7-fach höhere Expression bei den Wildtypkontrolltieren im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren. Im terminalen Krankheitsstadium war der Expressionsunterschied noch 2,5-fach (siehe Abb. 21). Abbildung 22 zeigt die Expressionsanalyse des Chemokins CXCL9. Ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Tiergruppen war nur zum terminalen Stadium der Infektion zu beobachten und lag 8,5-fach erhöht bei den Wildtypkontrolltieren im Vergleich zu den Knockout-Mäusen vor. Abbildung 23 zeigt die Expressionsuntersuchung des Enzyms Lysozym, welches zum Zeitpunkt 125 dpi bei den Wildtypmäusen um 5-fach erhöht war. Im terminalen Krankheitsstadium konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Untersuchung der OAS zeigte 125 dpi eine 3-fach verstärkte Expression bei den C57/B6-Kontrolltieren (siehe Abb. 24). Die gezeigten Abbildungen stellen ein repräsentatives Ergebnis von drei unterschiedlichen Messungen dar.

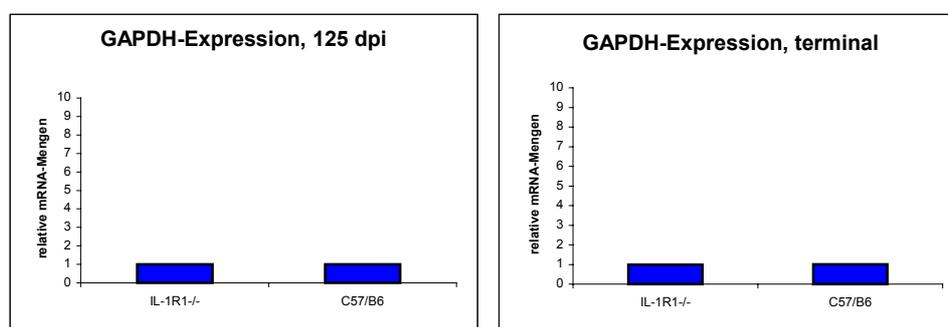


Abbildung 20: Quantitative Analyse der GAPDH-Expression von IL-1R1^{-/-}-Tieren und C57/B6-Kontrolltieren 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt.

Die Expressionsanalyse von GAPDH als externer Standard ergab keinen Unterschied bei den untersuchten Tiergruppen.

Ergebnisse

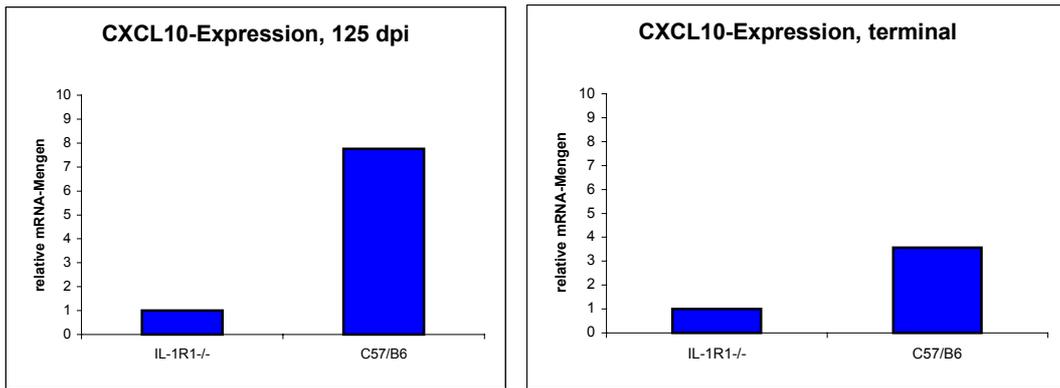


Abbildung 21: Quantitative Analyse der CXCL10-Expression von IL-1R1^{-/-}-Tieren und C57/B6-Kontrolltieren 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt.

Die Expressionsanalyse von CXCL10 ergab eine verstärkte Expression des Gens bei den C57/B6-Kontrolltieren im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren zu beiden untersuchten Zeitpunkten.

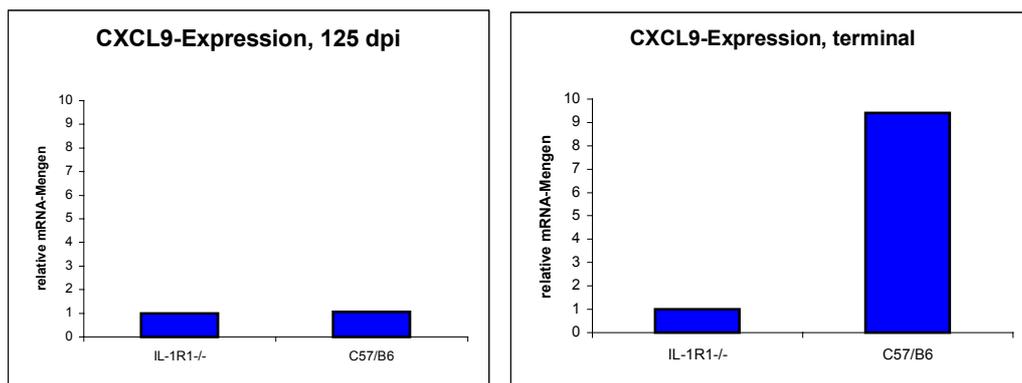


Abbildung 22: Quantitative Analyse der CXCL9-Expression von IL-1R1^{-/-}-Tieren und C57/B6-Kontrolltieren 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt.

Die Expressionsanalyse von CXCL9 ergab eine verstärkte Expression des Gens im terminalen Krankheitsstadium bei den C57/B6-Kontrolltieren im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren.

Ergebnisse

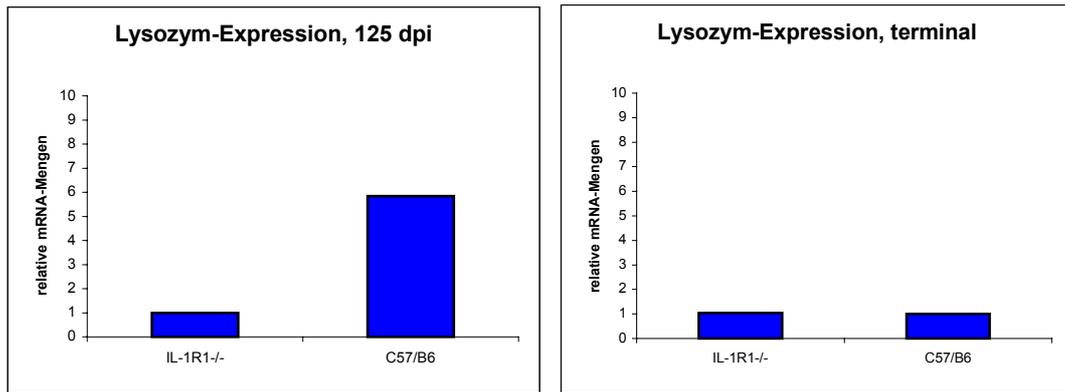


Abbildung 23: Quantitative Analyse der Lysozym-Expression von IL-1R1^{-/-}-Tieren und C57/B6-Kontrolltieren 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt.

Die Expressionsanalyse von Lysozym ergab eine verstärkte Expression des Gens bei den C57/B6-Kontrolltieren im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren 125 Tage nach der Infektion.

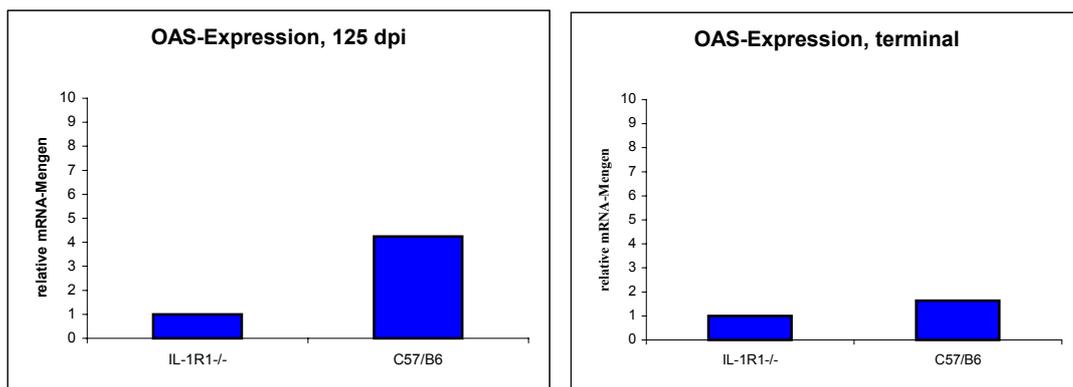


Abbildung 24: Quantitative Analyse der OAS-Expression von IL-1R1^{-/-}-Tieren und C57/B6-Kontrolltieren 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt.

Die Expressionsanalyse von OAS ergab eine verstärkte Expression des Gens bei den C57/B6-Kontrolltieren im Vergleich zu den IL-1R1^{-/-}-Tieren zu beiden untersuchten Zeitpunkten.