

Aus der Projektgruppe Neurodegenerative Erkrankungen
des Robert Koch-Instituts Berlin
und dem
Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Charakterisierung der Scrapie-Infektion von CD40Ligand-defizienten Mäusen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
MICHAEL BURWINKEL
Tierarzt aus Marl

Berlin 2006

Journal-Nr.: 2988

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Georg Pauli

Dritter Prüfer: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Scrapie, prion diseases, Alzheimer's disease, CD40L

Tag der Promotion: 28.04.2006

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Überblick über die TSE	8
1.1.1	TSE des Menschen	8
1.1.2	TSE der Säugetiere	9
1.2	Eigenschaften des Erregers	11
1.3	Pathogenese von TSE	12
1.3.1	Pathogenese in der Peripherie und Neuroinvasion	12
1.3.2	Pathogenese im zentralen Nervensystem (ZNS)	13
1.4	TSE und die Alzheimer Krankheit	15
1.5	Das CD40-CD40Ligand-System	16
1.5.1	CD40	16
1.5.2	CD40 Ligand	16
1.5.3	Signaltransduktion und Auswirkungen auf die Genexpression	16
1.5.4	Weitere Liganden für CD40	17
1.5.5	Biologische Effekte/Pathophysiologie	17
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1	Material	21
3.1.1	Versuchstiere	21
3.1.2	Chemikalien	21
3.1.3	Puffer und Lösungen	22
3.1.4	Antikörper, Konjugate und Substrate	23
3.1.5	Fertigkits	24
3.1.6	Enzyme	24
3.1.7	Primer	25
3.1.8	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	26
3.2	Methoden	28
3.2.1	Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit infektiösem Material	28
3.2.2	Tierversuch	28
3.2.2.1	Tierhaltung	28
3.2.2.2	Infektion, Überwachung und Tötung der Versuchstiere	28

3.2.2.3	Organentnahme und -fixierung	29
3.2.3	Histologie und Immunhistochemie	29
3.2.3.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	29
3.2.3.1.1	Vorbehandlung der Objektträger	29
3.2.3.1.2	Anfertigung von Paraffin- und Kryoschnitten	29
3.2.3.2	Hämalaun-Eosin (HE)-Übersichtsfärbung	30
3.2.3.3	Immunhistochemische Färbemethoden	30
3.2.3.3.1	Nachweis von PrP ^{Sc} -Ablagerung	30
3.2.3.3.2	Nachweis aktivierter Astrozyten.....	31
3.2.3.3.3	Nachweis aktivierter Mikroglia	31
3.2.3.3.4	Nachweis parvalbumin-immunreaktiver Neurone	31
3.2.4	Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET Blot)	32
3.2.4.1.1	Auswertungsmethoden für Histologie und Immunhistochemie.....	33
3.2.5	Western Blot	33
3.2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.2.5.2	Western Blot	34
3.2.6	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.6.1	Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA.....	35
3.2.6.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehirngewebe mit Hilfe der Trizol-Methode .	35
3.2.6.3	Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer	36
3.2.6.4	Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA	36
3.2.6.5	Aufreinigung der Gesamt-RNA.....	36
3.2.6.6	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	36
3.2.6.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Aktin	37
3.2.6.8	Trennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese	37
3.2.6.9	Quantitative Real-Time PCR (TaqMan PCR).....	38
4	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Vergleich der Überlebenszeiten	41
4.2	PrP^{Sc}-Ablagerung	42
4.2.1	Western Blot	42
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von PrP ^{Sc}	44
4.2.3	Paraffin embedded tissue blot (PET Blot)	45
4.3	Mikrogliaaktivierung.....	47
4.4	Astrozytenaktivierung	47

4.5	Spongiforme Veränderungen/Vakuolisierung des Hirngewebes.....	50
4.6	Neuronaler Zelltod.....	50
4.7	Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels TaqMan-PCR.....	53
5	DISKUSSION.....	55
5.1	Überlebenszeiten.....	55
5.2	PrP ^{Sc} -Ablagerung	56
5.3	Mikrogliose	57
5.4	Astrozytose.....	58
5.5	Vakuolisierung des Hirngewebes	59
5.6	Neuronaler Zelltod.....	59
5.7	Schlussfolgerungen / mögliche Erklärungen	60
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
7	SUMMARY.....	66
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
9	ANHANG	78
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	78
9.2	Tabellenverzeichnis.....	78
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	79
9.4	Publikationsliste	82
	DANKSAGUNG	83
	LEBENS LAUF	84
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	85