

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Weibliche CD40L^{-/-}-Mäuse (B6;129S-Tnfsf5^{tm1Imx}) (n = 17) sowie alters- und geschlechts-gleiche Kontrollmäuse (B6;129SF2/J) (n = 19) wurden von der Firma The Jackson Laboratory, Bar Harbor/USA bezogen. Weibliche C57B6-Kontrollmäuse (n = 18) wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin bezogen.

3.1.2 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
AEC	Dako, Carpinteria/USA
Agarose	Serva, Heidelberg
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammonium Nickel(II) Sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brij 35	Merck, Darmstadt
Casein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Eosin G	Chroma, Köngen
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Glycergel Eindeckmedium	Dako, Carpinteria/USA
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidin-Isothiocyanat	ICN Biomedicals, Meckenheim

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Magnesiumchloridlösung 25 mM	Applied Biosystems, Foster City/USA
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Silan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Gibco BRL, Eggenstein
Trizol	Invitrogen, Leek/NL
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden aus bidestilliertem und autoklaviertem Wasser (A. dest.) hergestellt.

Assay-Puffer(I) (pH 9.5)	100 mM Tris; 100 mM NaCl
Blotpuffer	48 mM Tris, 38 mM Glycin, 0,037 % SDS
Citratpuffer (pH 6,0) (1l)	18 ml 0,1 M Citronensäurelösung, 82 ml 0,1 M Na-Citratlösung, 900 ml A. dest.
DNase-Puffer	Ambion Huntington/UK
Foetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, San Francisco/USA
FKS/PBS (10 %) (100ml)	10 ml FKS, 90 ml PBS

Kryomedium	Jung, Nussloch
Laemli-Elektrophoresepuffer (10 x)	250 mM Tris/HCl, 1 % SDS, 1,92 M Glycin ad 2 l A. dest.
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Molekulargewichts-Längenstandard	Amersham, Little Chalfont/UK
NTM	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂
PBS (10 x) (pH 7,2)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PCR Gold Puffer	Applied Biosystems
phosphatgepufferte Formaldehydlösung (4 %)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K-Puffer	10 mM Tris; 100 mM NaCl; 0,5 % Brij 35
Stopplösung	20 mM EDTA/TBS
SYBR-Green Master Mix	Qiagen, Hilden
TBS (10x) (pH 7,8)	50 mM Tris; 1 M NaCl
TBST	TBS mit 0,05 % (w/v) Tween20
Tris Acetat (TAE)-Puffer (1l)	100 ml TAE; 900 ml A. dest.; 50 µl Ethidiumbromid

3.1.4 Antikörper, Konjugate und Substrate

AEC	Dako, Carpinteria/USA
BCIP-Färbelösung (4 ml)	0,1g BCIP; 4ml DMF
CDP-Star	Tropix, Bedford/USA
3,3 Diaminobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Donkey anti-rabbit immunglobulins (Ig), biotinylated	Amersham, Little Chalfont/UK
Goat anti-mouse Ig, biotinylated	Amersham, Little Chalfont/UK
Goat anti-rat Ig, biotinylated	Amersham, Little Chalfont/UK

Mouse anti-6H4 PrP monoclonal antibody	Prionics, Zürich/CH
Mouse anti-rat parvalbumin antibody (parv-19)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NBT-Färbelösung (4 ml)	0,2 mg Nitro Blue Tetrazolium; 2,8 ml DMF; 1,2 ml Ethanol
Rabbit anti-cow glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Dako, Carpinteria/USA
Rabbit anti-mouse IgG, alkaline phosphatase (AP) –conjugated	Dako, Carpinteria/USA
Rat anti-F4/80 monoclonal antibody	Serotec, Oxford/UK
Sheep anti-mouse Ig, biotinylated	Amersham, Little Chalfont/UK
Streptavidin horseradish peroxidase conjugate	Amersham, Little Chalfont/UK

3.1.5 Fertigkits

First-strand cDNA Synthese Kit	Amersham, Braunschweig
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Enzyme

DNase I	Ambion, Huntington/UK
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Uracil DNA Glycosylase	USB Corp., Cleveland/USA
Ampli Taq Gold [®] Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA

3.1.7 Primer

Alle Primer wurden von den Firmen Metabion, Martinsried oder Tib Molbiol, Berlin synthetisiert und geliefert.

β-Aktin	hin	5'-CGC TCG TTG CCA ATA GTG AT-3'
	rück	5'-AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT-3'
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	hin	5'-GCG GGA GTC GGC CAG TTA CC-3'
	rück	5'-GAC CTC ACC ATC CCG CAT CT-3'
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	hin	5'-GAC CTC ACC ATC CCG CAT CT-3'
	rück	5'-GCG GGA GTC GGC CAG TTA CC-3'
Lysozym M	hin	5'-GGG AAA CAG CAG TCG TG TG-3'
	rück	5'-CTG GGA ACA TCC TCT CAA GG-3'
2', 5'-oligoadenylate synthetase (OAS)	hin	5'-GGT CTC TGA GCT TCA AGC TGA G-3'
	rück	5'-TAC TGT GGA GGC AAT GGC TTC-3'

3.1.8 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

8 well Platten (PET Blot)	Nunc, Roskilde/DK
Blotting paper	Schleicher & Schüll, Dassel
Blotkammer, Gießvorrichtung, Power Supply	Bio-Rad, Richmond/USA
Dako-Pen (Markierungsstift)	Dako, Carpinteria, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Development Folder	Tropix, Bedford/UK
DPX (Eindeckmedium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresis Powersupply	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Entwässerungsautomat	Leica, Solms
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Glaswaren (Messzylinder, Petrischalen, Bechergläser)	Schott, Mainz
Histokinetten	Leica, Solms
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Magnetic Immunostaining Trays	Cellpath, Newtown/UK
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad, Richmond/USA
Objekträger	Roth, Karlsruhe
Optische Deckel für TaqMan-PCR	Applied Biosystems, Foster City/USA
Optische Röhrchen für TaqMan-PCR	Applied Biosystems, Foster City/USA
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Biozym, Oldendorf; SLG, Gauting
PCR-Reaktionsgefäße	SLG, Gauting
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Columbus/USA
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran	Millipore, Bedford/UK

Real Time Cyclor	Perkin Elmer, Langen
ReaktionsgefäÙe (1,5/2,0 ml)	Neolab, Heidelberg
Sarstedt-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Schüttler	Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer	Pharmacia, Freiburg
Stereomikroskop	Leica, Solms
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau
Trockenschränke	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax	IKA, Staufen
Vortex-Mixer	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Vogel, Oostsingel/NL
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

3.2 Methoden

3.2.1 Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit infektiösem Material

Der Scrapie-Erreger gehört zur Risikogruppe 3**, für eine Infektion des Menschen gibt es allerdings keinen schlüssigen Beweis. In allen Laboren wurde Schutzkleidung getragen. Bei Arbeiten im Tierstall und im Histologiebereich sowie bei Arbeiten mit hoch-erregertem Material wurden besondere, autoklavierbare Schutzkittel getragen. Beim Schneiden mit Mikrotom und Kryotom wurden Unterhandschuhe aus schnittfester Faser, schnitt- und stichfeste Nitrilhandschuhe sowie Kopfhaube und OP-Maske getragen. Glaswaren und Einwegmaterialien wurden in getrennten Edelstahlwannen autoklaviert (134 °C, 1 h, 3,3 bar). Die Desinfektion hitzelabiler, wiederverwendbarer Gegenstände erfolgte über Nacht in 0,3 M NaOH und 2 % SDS. Kontaminierte Flächen wurden mit 2 M NaOH (1 h Einwirkzeit) desinfiziert.

3.2.2 Tierversuch

3.2.2.1 Tierhaltung

CD40L^{-/-}-Mäuse, alters- und geschlechtsgleiche Kontrollmäuse und mock-infizierte C57/Bl6-Mäuse wurden jeweils in Fünfergruppen im Robert Koch-Institut in einem klimatisierten Tierstall bei 20 °C und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Nahrung und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2.2.2 Infektion, Überwachung und Tötung der Versuchstiere

Die Mäuse wurden im Alter von fünf Wochen mit jeweils 20 µl eines 10⁻³ verdünnten zehnpromzentigen Hirnhomogenats infiziert. Dieses stammte aus einem Pool terminal kranker Mäuse, die mit dem Scrapie-Stamm 139A (zur Verfügung gestellt von R.H. Kimberlin, Edinburgh, UK) infiziert waren. Als Negativkontrollen wurden alters- und geschlechtsgleichen C57/B6-Mäusen intrazerebral mit verdünntem Hirnhomogenat aus nichtinfizierten Mäusen mock-infiziert, um einen möglichen Effekt einer Injektion an sich feststellen bzw. ausschließen zu können. Während des Versuchs wurden alle Tiere zweimal wöchentlich klinisch auf das Auftreten typischer Scrapie-Symptome wie gekrümmte Haltung, Hinterhandschwäche, Bewegungs- und Orientierungsstörungen und Übererregbarkeit untersucht. Jeweils 6 Tiere aus jeder Gruppe wurden 125 Tage nach der Infektion getötet. Dieser Zeitpunkt entspricht bei der für diesen Versuch verwendeten Infektionsdosis einem klinisch asymptomatischen Krankheitsstadium. Die restlichen

Tiere wurden jeweils bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet. Dieses Stadium war erreicht, wenn aufgrund der klinischen Symptome mit dem Tod der Tiere innerhalb der nächsten 48 h zu rechnen war. Die Tötung erfolgte durch Genickbruch in tiefer Isofluran-Narkose. Nach der Entnahme der Gehirne für die weiteren Untersuchungen wurden die Tierkörper obduziert, um mögliche Veränderungen anderer Organsysteme feststellen zu können.

3.2.2.3 Organentnahme und -fixierung

Die Entnahme der Gehirne erfolgte unmittelbar nach der Tötung. Für die Histologie und Immunhistochemie an Paraffinschnitten vorgesehene Gehirne wurden zunächst für 24 Stunden in einer 4%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung fixiert. Danach wurden sie sagittal in der Medianebene geteilt, jede Hälfte wurde in eine Einwegkassette gegeben, in einem Entwässerungsautomaten entwässert und in Paraffin eingebettet. Diese Hirnhälften wurden in einer Paraffinausgießstation mittels einer Histokinette und der umgedrehten Einwegkassette in schnittfähige Paraffinblöcke gegossen. Für Gefrierschnitte bestimmte Gehirne wurden direkt nach der Entnahme sagittal geteilt und in Förmchen (Kryomoulds) mit Kryomedium in flüssigem Stickstoff zu schnittfähigen Blöcken gefroren, die anschließend bei -70 °C gelagert wurden. Für den Western Blot vorgesehene Gehirne wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70 °C aufbewahrt.

3.2.3 Histologie und Immunhistochemie

3.2.3.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

3.2.3.1.1 Vorbehandlung der Objektträger

Sämtliche verwendeten Objektträger wurden vor dem Gebrauch silanisiert, um ein besseres Anhaften der Gewebeschnitte zu gewährleisten. Dazu wurden sie für 5 min in 2 % (v/v) Silan/Aceton inkubiert, anschließend kurz in Aceton und A. dest. gespült und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

3.2.3.1.2 Anfertigung von Paraffin- und Kryoschnitten

Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms bei einer Schnittdicke von 6µm angefertigt. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein 50 °C warmes Wasserbad überführt, auf silanisierte Objektträger aufgezogen und im Brutschrank über Nacht bei 37 °C getrocknet. Paraffinschnitte, die für die PET Blot-Methode verwendet werden

sollten, wurden aus dem Wasserbad auf zugeschnittene Nitrocellulosemembranen aufgezogen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

Kryoschnitte wurden mit Hilfe eines Kryotoms bei einer Schnittdicke von 8 µm angefertigt. Nach dem Aufziehen auf Objektträger wurden die Schnitte für 1h bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend bei -20 °C eingefroren. Vor der Anwendung in der Immunhistochemie wurden die Schnitte für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und danach für 10 min luftgetrocknet.

3.2.3.2 *Hämalaun-Eosin (HE)-Übersichtsfärbung*

Die Hämalaun-Eosinfärbung dient zur Übersichtsfärbung von Geweben. Durch das Hämalaun werden alle basophilen Gewebebestandteile wie z.B. das Chromatin der Zellkerne blau angefärbt. Eosin hingegen färbt das Zytoplasma und die Interzellularsubstanz rot an. In der vorliegenden Arbeit diente diese Färbung zur Beurteilung der Vakuolisierung.

Die Schnitte wurden jeweils zweimal für 5 min in Xylol und Aceton entparaffiniert und in A. dest. gespült. Die Färbung mit Hämalaun erfolgte für 1 min, nach mehrmaligem Spülen in Leitungswasser wurde für 3 min mit Eosin gegengefärbt. Die Schnitte wurden für 10 min in Leitungswasser gebläut, anschließend jeweils zweimal für 1 min in Aceton und Xylol dehydriert und mit DPX eingedeckt.

3.2.3.3 *Immunhistochemische Färbemethoden*

3.2.3.3.1 Nachweis von PrP^{Sc}-Ablagerung

Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6H4. Dieser Antikörper erkennt die hochkonservierte Aminosäuresequenz DYEDRYRE des Prionproteins. Nach dem Entparaffinieren und Spülen in A. dest. (siehe Punkt 3.2.3.2) wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung 3 x 5 min in der Mikrowelle bei 700 W erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte als weiterer Antigendemaskierungsschritt eine fünfminütige Inkubation in Ameisensäure. Es folgte ein Waschschrift (3 x 5 min in PBS), der auch zwischen allen folgenden Schritten durchgeführt wurde. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Hirngewebe wurden die Schnitte für 10 min in 1 % Wasserstoffperoxid/A. dest. inkubiert. Es folgte eine Vorinkubation für 45 min in 10 % FKS/PBS zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper 6H4 (Verdünnung 1:1000 in FKS/PBS) wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Der Zweitantikörper anti-mouse (Verdünnung 1:100 in FKS/PBS) wurde für 1 h bei RT

verwendet. Zur Sichtbarmachung des Antigens erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-HP-Konjugat (Verdünnung 1:200 in FKS/PBS) für 1 h bei RT und danach die Färbung mit dem Substratchromogen AEC für 8 min. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun durchgeführt, nach dem Bläuen in Leitungswasser wurden die Schnitte mit Glycergel eingedeckt.

3.2.3.3.2 Nachweis aktivierter Astrozyten

Aktivierte Astrozyten exprimieren auf der Oberfläche ihrer Zellfortsätze das gliäre fibrilläre saure Faserprotein (glial fibrillary acidic protein (GFAP)), das mit Hilfe eines aus dem Kaninchen gewonnenen Antikörpers nachgewiesen werden kann.

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert. Nach der Blockierung endogener Peroxidaseaktivität und Vorinkubation in 10 % FCS/PBS (siehe Punkt 3.2.3.3.1) erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper anti-GFAP (Verdünnung 1:1000 in FKS/PBS) für 1 h bei 37 °C. Der Zweitantikörper anti-rabbit (Verdünnung 1:1000 in FKS/PBS) wurde für 1 h bei RT verwendet. Nach Inkubation mit Streptavidin-HP-Konjugat (Verdünnung 1:200 in FKS/PBS) für 1 h bei RT erfolgt die Färbung mit DAB für 3 min. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt, dehydriert und mit DPX eingedeckt.

3.2.3.3.3 Nachweis aktivierter Mikroglia

Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenglykoprotein F4/80 eingesetzt. Dieses wird von aktivierten Monozyten/Makrophagen als Plasmamembrankomponente exprimiert.

Nach dem Fixieren (siehe Punkt 3.2.3.1.2) der Kryoschnitte folgte ein Waschschrift. Anschließend wurden die endogenen Peroxidaseaktivität und unspezifische Bindungsstellen blockiert (siehe Punkt 3.2.3.3.2). Die Inkubation mit dem Erstantikörper anti-F4/80 (Verdünnung 1:100 in FKS/PBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der Zweitantikörper anti-rat (Verdünnung 1:100 in FKS/PBS) wurde für 1 h bei RT eingesetzt. Es schlossen sich die Inkubation mit Streptavidin-HP-Konjugat (Verdünnung 1:200 in FKS/PBS) für 1 h bei RT und die Färbung mit DAB für 5 min an. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun, und nach Dehydrierung wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt.

3.2.3.3.4 Nachweis parvalbumin-immunreaktiver Neurone

Parvalbumin ist ein calcium-bindendes Protein, das von einer Subpopulation GABAerger Neuronen exprimiert wird.

Zum Nachweis parvalbumin-positiver Neuronen wurden die Gewebeschnitte nach dem Entparaffinieren zur Antigendemaskierung in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 700 W für

3 x 5 min erhitzt. Nach dem Abkühlen, der Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität und der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (siehe Punkt 3.2.3.3.3) wurde der Erstantikörper anti-parv (Verdünnung 1:1000 in FKS/PBS) für 4 h bei RT eingesetzt. Die Inkubation mit dem konjugierten Zweitantikörper anti-mouse IG-AP (Verdünnung 1:100 in FKS/PBS) erfolgte für 1 h bei RT. Nach fünfminütiger Vorinkubation mit Substratpuffer wurde für 10 min mit NBT/BCIP gefärbt. Die Inkubation mit Stopplösung für 5 min beendete die Farbreaktion. Nach abschließendem Spülen in A. dest. für 2 x 5 min wurden die Schnitte in Glycergel eingedeckt.

3.2.4 Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET Blot)

Die PET Blot-Methode dient zum Nachweis von PrP^{Sc}. Der zur Detektion verwendete 6H4-Antikörper differenziert nicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc}, so dass zur alleinigen Darstellung von PrP^{Sc} ein Proteinase K-Verdau vorgenommen werden muss. Auf Objektträger aufgezoogene Gewebeschnitte widerstehen diesem Verdau nicht oder nur sehr schlecht. Die PET Blot-Methode arbeitet mit Gewebeschnitten, die auf Nitrozellulosemembranen aufgezoogen sind und deshalb den Proteinase K-Verdau morphologisch sehr viel besser überstehen. Es wurde ein modifiziertes Protokoll von Schultz-Schaeffer (Schultz-Schaeffer et al., 2000) verwendet.

Die Schnitte wurden zunächst 2 x 5 min in Xylol und je 5 min in einer absteigenden Isopropanolreihe (95 %, 80 %, 70 %, 50 %) entparaffiniert. Zum Permeabilisieren wurden sie 2 x 10 min in 0,1 % Tween 20/A. dest. inkubiert. Die Membranen wurden getrocknet, zugeschnitten und in 8 well plates auf einen Schüttler überführt, wo zunächst ein Waschschrift (3 x 10 min in TBST) durchgeführt wurde. Es folgte ein Proteinase K-Verdau (25 µg/ml Proteinase K-Puffer) für 2 h bei 55 °C, an den sich ein Waschschrift anschloss. Zur Denaturierung von PrP^{Sc} wurden die Schnitte für 10 min bei RT in 3 M Guanidin-Isothiocyanat in Tris-Puffer inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die Vorinkubation in 0,2 % Casein/TBST zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem Erstantikörper 6H4 (Verdünnung 1:10000 in 0,2 % Casein/TBST) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einem Waschschrift wurden die Schnitte 1 h bei RT mit dem konjugierten Zweitantikörper anti-mouse-AP (Verdünnung 1:2000 in 0,2 % Casein/TBST) inkubiert. Es folgten ein Waschschrift und die Vorinkubation der Schnitte mit NTM für 2 x 10 min. Die Färbung wurde mit NBT/BCIP durchgeführt, die Farbreaktion mit Stopplösung beendet, und abschließend wurden die Schnitte 3 x kurz in A. dest. gespült. Die Membranen wurden für 1 h bei 55 °C getrocknet und zum Glätten zwischen zwei Objektträgern eingelegt. Diese wurden

mit Tesafilm zusammengeklebt und unter dem Stereomikroskop ausgewertet.

3.2.4.1.1 Auswertungsmethoden für Histologie und Immunhistochemie

Zur Auswertung der Färbungen wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem angewendet. Mit Hilfe eines Maushirnatlas (Franklin & Paxinos, 2002) wurden in den sagittal geschnittenen Gehirnen 8 anatomische Regionen bestimmt, und zwar Kleinhirn, Hirnstamm, Medulla oblongata, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Cortex und Bulbus olfactorius (siehe Punkt 4.1.3, Abb. 4 C). Jede dieser Regionen wurde lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung durchgemustert und der Schweregrad der Veränderung der untersuchten Parameter (PrP^{Sc}-Ablagerung, Mikrogliose, Astrozytose, Vakuolisierung, Verlust parvalbumin-positiver Neuronen) bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde für die PET Blot-Schnitte mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt. Alle Auswertungen wurden an anonymisierten Schnitten von mindestens zwei Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt.

3.2.5 Western Blot

3.2.5.1 *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Vor dem immunologischen Nachweis im Western Blot wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch SDS werden Proteine denaturiert und mit einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung versehen, so dass ihre Wandergeschwindigkeit im Gel nur von ihrer Größe bestimmt wird.

Die Gehirne wurden zunächst in TBS mittels Ultraschall zerkleinert, wobei zehnpromtente Hirnhomogenate hergestellt wurden. Danach wurden die Homogenate für 1 h bei 37 °C einem Proteinase K-Verdau (Konzentration: 50 µg/ml) unterzogen. Es wurden je 20 µl der denaturierten Proteinproben sowie ein Molekulargewichts-Längenstandard in die Taschen eines SDS-Gels in einer vertikalen Elektrophoresekammer aufgetragen. Die Polyacrylamidkonzentration betrug im Trenngel 12,5 % und im Sammelgel 5 % (siehe Tab. 1). Der Gellauf erfolgte bei 200 V und wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Als Laufpuffer wurde 1 x Laemmli-Elektrophoresepuffer verwendet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	3,1 ml	1,25 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	1,25 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl
A. dest.	4,3 ml	3,07 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APS	30 µl	50 µl

3.2.5.2 Western Blot

Mit dem Western Blot kann eine spezifische Proteinbande nachgewiesen werden, indem sie auf Nitrocellulosemembran transferiert (geblottet) und durch Reaktion mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht wird. Untersucht wurde mit dem Western Blot die PrP^{Sc}-Ablagerung im Gehirn.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine mit 20 % (v/v) Methanol/Blotpuffer getränkte 0,45 mm PVDF-Membran gelegt. Die Membran mit dem Gel wurde zwischen zwei mit Blotpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Diese wurde für 20 min bei 200 V in eine Blotkammer eingespannt und geblottet, um die Proteine auf die Membran zu transferieren. Die Membran wurde anschließend aus der Kammer genommen und für 30 min in 3 % Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper 6H4 (Verdünnung 1:5000 in Magermilchpulver/TBST) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Folie 3 x kurz mit TBST und 3 x 5 min mit 3 % (w/v) Magermilchpulver/TBST gespült. Als Zweitantikörper wurde AP-konjugiertes anti Maus IgG aus der Ziege (Verdünnung 1:5000 in 3 % (w/v) Magermilchpulver/TBST) bei einer Inkubationsdauer von 90 min verwendet. Nach dreimaligem kurzem Spülen in TBST und einstündigem Spülen in 3 % (w/v) Magermilchpulver/TBST wurde die Membran für 2 x 5 min in Assaypuffer vorinkubiert, auf Filterpapier getrocknet und anschließend für 5 min mit 5 ml CDP-Star (Verdünnung 1:50 in Assaypuffer) inkubiert. Die Membran wurde nochmals getrocknet und in einem Development-Folder in eine Filmkassette eingelegt. Vor der Belichtung wurde die Folie 1 h in der Filmkassette belassen.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

3.2.6.1 Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA

RNA ist sehr empfindlich gegenüber RNasen, die unter anderem auch auf der Haut vorhanden sind. Daher wurden bei Arbeiten mit RNA stets neue Latexhandschuhe und gesonderte Laborkittel getragen. Außerdem wurden eigens für RNA-Arbeiten reservierte Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter benutzt. Lösungen wurden entweder RNase-frei bezogen oder, wenn diese selbst hergestellt wurden, mit 0,1 % DEPC versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese autoklaviert, wobei sich das DEPC zersetzt. Alle Arbeitsschritte mit RNA wurden wenn möglich auf Eis durchgeführt.

3.2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehirngewebe mit Hilfe der Trizol-Methode

Das Trizol-Reagenz stabilisiert bei der Homogenisierung der Proben die RNA, während Zellen und Zellbestandteile lysiert werden.

Die Gehirne wurden mit 1 ml Trizol/100 mg Gewebe mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax) für 3 x 10 sec homogenisiert. Die Homogenate wurde 1-3 min bei 1435 g und 4 °C zentrifugiert, um den entstandenen Schaum zu brechen. Nach Resuspendierung wurden die Proben in Sarstedt-Röhrchen umgefüllt und 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in neue Sarstedt-Röhrchen überführt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Trennung der Phasen wurde pro Röhrchen 0,2 ml Chloroform zugegeben und sofort für 15 sec kräftig geschüttelt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der RNA-Überstand wurde abgenommen und in neue Sarstedt-Röhrchen überführt. Jeder Probe wurde 0,5 ml Isopropanol zugesetzt und sofort 15 sec kräftig geschüttelt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Proben 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Hierzu wurde 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Wiederholung des Waschschrilles wurden die Proben 10 min bei 37 °C inkubiert, um den restlichen Alkohol zu verdampfen. Das Pellet wurde in 100 µl A. dest. gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

3.2.6.3 Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer

Die Konzentration von RNA wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) in einem Spektrophotometer bestimmt. Bei dieser Wellenlänge, die das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren darstellt, entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm etwa einer Konzentration 37 µg/ml für RNA.

3.2.6.4 Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA

Das Enzym DNase I baut Verunreinigungen der Gesamt-RNA mit genomischer DNA ab, die bei der Synthese von cDNA aus RNA mittels RT-PCR (siehe Punkt 3.2.6.6) das Ergebnis verfälschen können.

Je 20 µg Gesamt-RNA wurden nach Zugabe von 3 µl DNase I und 3 µl DNase-Puffer mit A. dest. auf ein Gesamtvolumen von 30 µl ergänzt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden die Proben auf Eis gegeben.

3.2.6.5 Aufreinigung der Gesamt-RNA

Um die Gesamt-RNA von mögliche Kontaminationen zu reinigen, wurde das RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Hierbei wird durch die Zugabe von Ethanol die selektive Bindung der Gesamt-RNA an eine Silikagel-Membran ermöglicht, während Kontaminationen ausgewaschen werden. Mit RNase-freiem Wasser wird die Gesamt-RNA aus der Membran eluiert.

3.2.6.6 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Weil das bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendete Enzym Taq-Polymerase DNA als Ausgangsmaterial benötigt, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des first-strand cDNA Synthese-Kits (Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden Random-Hexamere als Primer und die Reverse Transkriptase des Moloney-Murine Leukämie Virus eingesetzt. Für jeden Reaktionsansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der im Reaktionsmix die RNA durch Wasser ersetzt wurde, um in der späteren TaqMan PCR (siehe Punkt 3.2.6.9) Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können. Die Proben wurden zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe des Reaktionsmixes wurden die Proben für 1 h bei 37 °C in inkubiert und

bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Aktin

Mit Hilfe der PCR lassen sich kleinste Mengen einer definierten DNA-Sequenz amplifizieren. Eine Standard-PCR besteht aus drei Schritten: Zuerst erfolgt eine Denaturierung der DNA in zwei Einzelstränge bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im nächsten Schritt (=Annealing) hybridisieren kurze Oligonukleotide (Primer), die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt von beiden Seiten her begrenzen, mit den jeweils komplementären Basensträngen der DNA. Durch die hitzestabile Taq-Polymerase werden im letzten Schritt (=Elongation) die komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Durch zyklische Wiederholung dieser drei Schritte erreicht man eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges dient.

Um die Qualität der cDNA-Synthese aus dem vorausgegangenen Schritt zu beurteilen wurde eine PCR mit Primern für das Haushaltsgen β -Aktin durchgeführt. Die PCR wurde in einem Endvolumen von $20\text{ }\mu\text{l}$ mit $10\times$ PCR-Puffer, 25 mM MgCl_2 , je $10\text{ }\mu\text{M}$ Primer (β -Aktin hin, β -Aktin rück), $2,5\text{ mM dNTPs}$ und PCR- H_2O sowie $0,1\text{ }\mu\text{l}$ und $0,5\text{ }\mu\text{l}$ des cDNA-Ansatzes in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 2: Kontroll-PCR mit β -Aktin

Schritt	Dauer	Temperatur	Wiederholung
Aktivierung der DNA-Polymerase	10 min	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Denaturierung der cDNA	30 sec	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	35 x
Annealing (Idealtemperatur für β -Aktin-Primer)	30 sec	$62\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Elongation	1 min	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Ausschreiben aller DNA-Abschnitte	5 min	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	

3.2.6.8 Trennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte anhand ihrer Größe getrennt, und durch die Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarte DNA-Basenpaare, so dass die Doppelhelix teilweise entwunden wird. Im UV-Licht unter 366 nm fluoresziert es orange-rot und dient so zur opti-

schen Beurteilung der DNA.

Die Gele bestanden aus 1,4 % Agarose, 1x TAE-Puffer und Ethidiumbromid (0,5 µg/ml). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 100 V in 1x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml). Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde die Qualität der DNA unter UV-Licht kontrolliert.

3.2.6.9 Quantitative Real-Time PCR (TaqMan PCR)

Bei dieser Methode werden die PCR-Produkte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I nachgewiesen. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und emittiert dabei ein Fluoreszenzsignal, das direkt während der PCR (real-time) mit Hilfe eines Lasers gemessen und durch eine Detektionssoftware als Verlaufskurve auf einem Computer aufgezeichnet wird (Abbildung 1). Die Zunahme der Fluoreszenz folgt entsprechend der Zunahme an vervielfältigter Zielsequenz (Template) einem exponentiellen Verlauf. Zur Auswertung wird vom Benutzer ein Schwellenwert t (Threshold) der Fluoreszenz festgelegt. Die Anzahl der Zyklen (cycle number), die nötig sind, um den Schwellenwert zu erreichen, bezeichnet man als C_t -Wert. Die Auswertungssoftware zeichnet die Zunahme an Fluoreszenz auf und zeigt den C_t -Wert jeder Probe für den vom Benutzer definierten Schwellenwert an. Je niedriger der C_t -Wert einer Probe ist, desto höher ist die Expression des untersuchten Gens. Im logarithmisch-linearen Verlauf dieser Kurve bedeutet jeder Zyklus (x) eine Verdopplung an Template (Formel: 2^x).

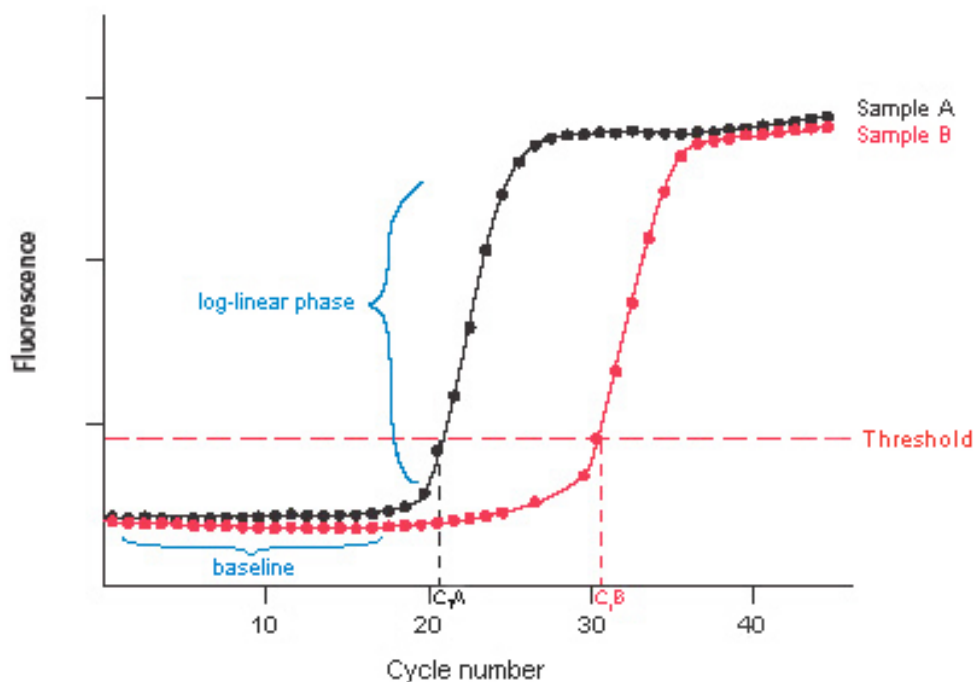


Abbildung 1: TaqMan-PCR-Verlaufskurve für die Zunahme an Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl

Für diese Arbeit wurde die TaqMan-PCR zur relativen Quantifizierung der Expression bestimmter Gene CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen eingesetzt. Um für alle Proben von derselben Menge an DNA ausgehen zu können, wurde zunächst für alle Proben ein Referenzwert ermittelt, indem eine TaqMan-PCR für das Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt wurde. Dies ist ein sogenanntes "Haushaltsgen", dessen Expression in einem Gewebe einer Tierart unter verschiedenen Bedingungen gleich hoch ist. Aus den erhaltenen C_T-Werten wurde der niedrigste ausgewählt (der Ansatz mit der größten Menge DNA) und die Differenz zwischen diesem und den Werten aller anderen Proben bestimmt. Der so für jede einzelne Probe erhaltene Differenzwert ΔC_T wurde bei allen weiteren TaqMan-PCR-Durchgängen für spezifische Gene mit den dabei erhaltenen C_T-Werten verrechnet.

Die für diese Methode verwendete *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA Polymerase liegt in einer inaktiven Form vor und wird bei 95 °C aktiviert. Durch diesen "hot start" der PCR werden Fehlhybridisierungen der Primer verhindert und dadurch die Spezifität erhöht. Um mögliche Kontaminationen durch PCR-Produkte aus vorherigen Ansätzen (carry-over contamination) zu eliminieren, wurde vor Beginn der eigentlichen PCR ein Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Verdau durchgeführt.

Für jede cDNA wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde die jeweilige Negativkontrolle (siehe Punkt 3.2.6.5) mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination der Proben mit Fremd-DNA bei der cDNA-Synthese feststellen zu können. Der Master Mix wurde für alle zu vergleichenden Proben zusammen angesetzt und in optische Röhrchen vorgelegt. In einem Endvolumen von 12,5 µl pro Probe waren 0,125 U UNG, je 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 6,25 µl SYBR Green PCR Master Mix sowie jeweils 2 µl der 1:10 mit tRNA/PCR-H₂O (Konzentration) verdünnten cDNA bzw. Negativkontrolle enthalten. Um mögliche Kontaminationen des Master Mix' ausschließen zu können, wurde ein cDNA-freier Leerwert mitgeführt. Die Reaktion wurde in einem Real Time Cycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 3: TaqMan-PCR mit GAPDH

Schritt	Dauer	Temperatur	Wiederholung
Durchführung des UNG-Verdau	2 min	50 °C	
Aktivierung der DNA-Polymerase	10 min	95 °C	
Denaturierung der cDNA	30 sec	95 °C	40 x
Annealing Idealtemperatur für GAPDH-Primer	30 sec	55 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Beendigung/Pause	beliebig	4 °C	