

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, San Fransisco, USA
Ameisensäure (98-100%)	Merck, Darmstadt
Brij 35-Lösung	Merck, Darmstadt
Casein	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monophosphat	Merck, Darmstadt
DEPC	Fluka, Taufkirchen
2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat dNTP Set	Pharmacia, Freiburg
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Eosin	Chroma, Köngen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (99,8%)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Life Technologies, San Fransisco, USA
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycergel	Dako, Carpinteria, CA, USA
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Natriumhypochlorid	Sigma, Deisenhofen
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Sephadex-G25	Pharmacia, Freiburg
Tissue freezing medium	Jung, Nussloch
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Leek, NL
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Häufig verwendete Lösungen

Elektrophoresepuffer

DNA-Probenauftragspuffer (10 x): 10 x TAE; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
TAE (pH 7,8): 40 mM Tris; 2 mM EDTA; 20 mM NaAc; 29,6 mM Essigsäure

Lösungen für Northern-Blot

RNA-Längenstandard (Nr.362)	BioLabs, Schwalbach
10 x Denaturierungs-Gel-Puffer	Ambion, Huntingdon, UK
10 x MOPS	Ambion, Huntingdon, UK
Formaldehyd-Load-Dye	Ambion, Huntingdon, UK
Blot-Transfer-Puffer	Ambion, Huntingdon, UK
Wash Solution	Ambion, Huntingdon, UK
Hybridisierungslösung	Ambion, Huntingdon, UK

Fertiglösungen

AEC-Substratlösung	Dako, Carpinteria, CA, USA
Mayer's Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
100 bp DNA-Längenstandard	Invitrogen, Leek, NL
10 x DNase-Puffer	Ambion, Huntingdon, UK
Glycergel	Dako, Carpinteria, CA, USA
SYBR-Green-Master-Mix	Qiagen, Hilden

Lösungen für Immunhistochemie

10 x PBS (pH 7,2): 80 g NaCl; 2 g KCl; 11,5 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 2 g KH₂PO₄

Lösungen für PET-Blot

10 x TBS (pH 7,8): 100 mM Tris; 1 M NaCl
PK-Puffer: 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 0,5 % Brij 35
Substratpuffer (pH 9,5): 100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O
NTM (pH 9,5): 100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂ x 6 H₂O

2.1.3 Geräte

Histokinette	Leica, Solms
Kryostat	Mikrom, Walldorf
Schlittenmikrotom	Mikrom, Walldorf
Entwässerungsautomat	Leica, Solms
Histologiewasserbad	Vogel, Oostsingel, NL
Paraffinausgießstation	Mikrom, Walldorf
Trockenschrank	Heraeus, Osterode
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Stereomikroskop	Zeiss, Jena
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	BioRad, Richmond, USA
Photometer Ultraspec 3300 pro	Amersham Pharmazia, Braunschweig
Videokamera	Zeiss, Jena
Digitalkamera	Zeiss, Jena
Hybridisierungssofen	Heraeus, Osterode
Thermozykler	Perkin Elmer, Langen
Universalwaage	Mettler, Gießen

Automatischer Filmentwickler Curix 60	Agfa, Köln
Spannungsgeräte	Pharmazia, Uppsala, Schweden
Färbebank	Engelbrecht, Edermünde
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Real-Time-Gerät	Perkin Elmer, Langen
Autoradiographiekassetten	Kodak, New York, USA
Szintillationszähler	Packard, Frankfurt am Main
Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Göttingen
SpeedVac Concentrator SVC 100H	Savant, Albrville, USA

2.1.4 Antikörper

Tabelle: 1.1 Primärantikörper für immunhistochemische Experimente

Antikörper	Spezifität	Anwendung und Verdünnung	Herkunft
Anti-6H4 (PrP)	Human	Western-Blot, Paraffin 1:1000	Prionics, Zürich, Schweiz
Anti-CD11b (Mac-1)	Maus	Gefrierschnitt 1:100	Dr. Britta Engelhardt, Münster
Anti-GFAP	Maus, Rind	Paraffin, Western-Blot 1:100	Dako, Carpinteria, USA

Tabelle: 1.2 Sekundärantikörper für immunhistochemische Experimente

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-Maus IgG, biotinyliert	1:200	Amersham, Braunschweig
Anti-Ratte IgG, biotinyliert	1:200	Amersham, Braunschweig
Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	1:200	Amersham, Braunschweig
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	1:200	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	1:2000	Amersham, Braunschweig

2.1.5 Enzyme

DNase	Ambion, Huntingdon, UK
Proteinase K	Boeringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Langen
Uracil-N-Glycosilase	Amersham Pharmazia, Braunschweig
Klenow-Fragment	Amersham Pharmazia, Braunschweig

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für PCR

β-Aktin reverse: 5'CGC TCG TTG CCA ATA GTG AT 3'
β-Aktin forward: 5'AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT 3'

Primer für Northern-Blot-Sonden

GFAP reverse: 5'GAC CTC ACC ATC CCG CAT CT 3'
GFAP forward: 5'GCG GGA GTC GGC CAG TTA CC 3'

IL-1-Rezeptor-Typ1 reverse: 5'GCT CTT CAG CCA CAT TCC 3'
IL-1-Rezeptor-Typ1 forward: 5'GGG ACT CCA GGA TTC ATC AG 3'

IL-1β reverse: 5'CGT TGC TTG GTT CTC CTT G 3'
IL-1β forward: 5'CAG GCA GGC AGT ATC ACT C 3'

ICE reverse: 5'CAG CAG TGG GCA TCT GTA G 3'
ICE forward: 5'CGT GGA GAG AAA CAA GGA G 3'

β-Aktin reverse: 5'CGC TCG TTG CCA ATA GTG AT 3'
β-Aktin forward: 5'AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT 3'

Primer für Real-Time-PCR

IP-10 reverse: 5'ATA ACC CCT TGG GAA GAT GG 3'
IP-10 forward: 5'AAG TGC TGC CGT CAT TTT CT 3'

MIG reverse: 5'TTC CCC CTC TTT TGC TTT TT 3'
MIG forward: 5'TTT TGG GCA TCA TCT TCC TG 3'

Lysozym reverse: 5'AGG GGA AAT CGA GGG AAT GT 3'
Lysozym forward: 5'CTG GCC GAC TGG GTG TG 3'

GAPDH reverse: 5'ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'
GAPDH forward: 5'TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'

OAS reverse: 5'TAC TGT GGA GGC AAT GGC TTC 3'
OAS forward: 5'GGT CTC TGA GCT TCAAGC TGA G 3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Berlin) oder der Firma Tib-Molbiol (Berlin) hergestellt.

2.1.7 Verwendete Kits

First-Strand cDNA Synthese-Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
RNeasy Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quanti Tect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Megaprime DNA-labelling Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8 Labortiere

C57/B6-Mäuse	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
IL-1-Rezeptor-Typ1-defiziente Mäuse (über sieben Generationen in C57/B6 rückgekreuzt)	Manfred Kopf, ETH Zürich, Schweiz

2.1.9 Scrapie-Stamm

Erregerstamm 139A	R.H. Kimberlin, Edinburgh, UK
-------------------	-------------------------------

2.1.10 Einwegmaterialien

Sterilfilter	Schleicher und Schuell, Dassel
Zentrifugenröhrchen Falcon 50 ml steril	Becton Dickinson, Rutherford, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon 15 ml steril	Becton Dickinson, Rutherford, USA
Histosette	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	BioRad, Richmond, USA
Sarstedtröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Kryomolschälchen	Vogel, Oostsingel, NL
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Hybond N ⁺ -Nylon Transfer-Membran	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost	Menzel, Burgdorf
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme	Kodak, New York, USA

2.1.11 Radioaktivität

[α ³² P]-dCTP (Desoxynukleosidtriphosphat)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
--	----------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Für die Infektionen wurden sechs Wochen alte IL-1R1^{-/-}-Mäuse (Stamm: C57/B6) und C57/B6-Wildtypmäuse als Kontrollen verwendet. Diese wurden mit dem Scrapie-Erreger 139A intracerebral (i.c.) mit verschiedenen Infektionsdosen (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}) eines 10 %igen Hirnhomogenates infiziert. Das Homogenat wurde aus einem Pool von Hirngewebe terminal an Scrapie erkrankten Tieren hergestellt. Vom Impfpool wurden 20 µl intracerebral in den vierten Hirnventrikel injiziert. Als Negativkontrollen (mock-infizierte Tiere) wurden alters- und geschlechtsgleiche Mäuse mit Hirnhomogenat von nichtinfizierten Tieren beimpft. Alle Tiergruppen wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Für die klinische Diagnose der Erkrankung wurden folgende Kriterien zugrundegelegt: Verhalten (z. B. Apathie, Nervosität), Konstitution (z. B. Gewichtsverlust, Beschaffenheit des Felles) und Bewegungsstörungen (z. B. Ataxie) der Tiere. Die während der Scrapie-Erkrankung auftretenden Symptome waren bei den IL-1R1^{-/-}-Tieren und den entsprechenden C57/B6-Wildtypkontrollmäusen identisch. Zum Zeitpunkt 125 Tage nach der Erregerinokulation und zum terminalen Krankheitsstadium (d. h. Auftreten klinischer Symptome) wurden sechs Scrapie-infizierte IL-1R1^{-/-}-Mäuse und Wildtypkontrolltiere sowie je sechs mock-infizierte Tiere getötet. Die Hirne wurden für spätere immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen. Für immunhistochemische Färbungen an Paraffingewebe wurden die Hirne in Formalin fixiert oder für Färbungen an Gefrierschnitten und für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

2.2.2.1 Gewebefixierung

Um eine postmortale Veränderung des Gewebes zu verhindern, wurden die Organe zunächst fixiert. Dazu wurden diese sofort nach der Gewebeentnahme in eine 4 %ige phosphatgepufferte Formaldehydlösung überführt. Die Präparate wurden dann für 24 Stunden bei 4 °C in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gewebeentwässerung und die Einbettung der Gehirne in Paraffin.

2.2.2.2 Paraffineinbettung

Die fixierten Gehirne wurden vor der Paraffineinbettung coronal in vier Areale geteilt (siehe Abbildung 4). Anschließend erfolgte eine automatisierte Entwässerung der Organe über Nacht. Dazu wurde folgendes Programm verwendet:

Ethanol 70 %	12 h
Ethanol 70 %	40 min
Ethanol 80 %	40 min
Ethanol 90 %	40 min
Ethanol absolut	40 min
Ethanol absolut	40 min
Ethanol 50 %/Xylol 50 %	30 min
Ethanol 50 %/Xylol 50 %	30 min
Xylol	30 min
Xylol	30 min
Paraffin	25 min
Paraffin	25 min
Paraffin	25 min

Am folgenden Tag wurden die Organe in einer Histokinette mit 60 °C heißem Paraffin übergossen. Nach Erkalten des Paraffins waren die Präparate schnittfähig.

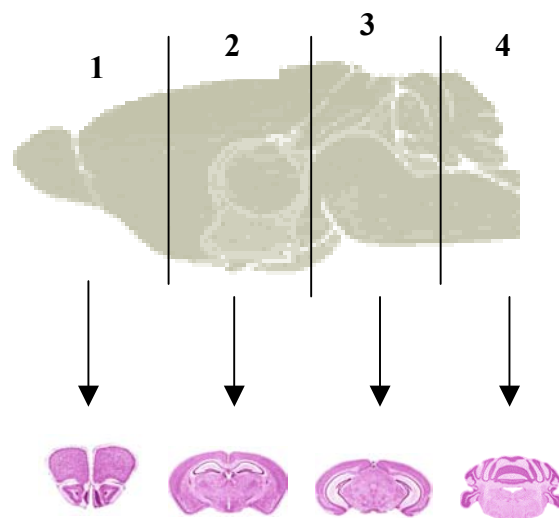


Abbildung 4: Skizze eines Gehirnes in Sagittalansicht mit den vier coronalen Schnittebenen.

Zu den untersuchten Arealen gehörten: Hippocampus, Cortex, Stammhirn, Kleinhirn und Riechhirn.

2.2.2.3 Silanisierung von Objektträgern

Um eine gute Haftbarkeit der Schnitte zu gewährleisten, wurden die Objektträger zuvor mit Silan beschichtet. Dies wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 5 min in Aceton tauchen
- 5 min in 2 % Silan/Aceton tauchen
- 2 x kurz in Aceton tauchen
- 2 x kurz in A. dest tauchen

Im Anschluss wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C getrocknet.

2.2.2.4 Herstellung der Paraffinpräparate

Die Gewebeschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom in horizontaler Schnittrichtung bei Raumtemperatur angefertigt. Die 6 µm dicken Präparate wurden zur Entfaltung in ein Wasserbad (50 °C) überführt und schwimmend auf zuvor mit Silan beschichtete Objektträger aufgebracht und anschließend über Nacht bei 37 °C getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte unterschiedlichen Färbemethoden unterzogen oder für spätere Färbungen in Präparatekästen aufbewahrt.

Für PET-Blot-Analysen wurden die Paraffinschnitte auf Nitrocellulosemembranen aufgezogen. Die Membranen wurden danach sofort in einen 60 °C heißen Trockenschrank gelegt und über Nacht getrocknet.

2.2.2.5 ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex)

Die ABC-Methode zählt zu den indirekten histologischen Nachweismethoden und hat gegenüber dem direkten Nachweis mit Hilfe eines konjugierten Primärantikörpers eine höhere Sensitivität.

Diese Methode nutzt die starke Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin oder Streptavidin zum Vitamin Biotin. Die freien Bindungsstellen des Biotins werden durch das Avidin des anschließenden Peroxidasekomplexes gebunden (siehe Abbildung 5).

Zunächst wird das darzustellende Antigen im Gewebe durch den unkonjugierten Primärantikörper erkannt und gebunden. Der Erstantikörper wird dann von einem Biotin-gekoppelten Zweitantikörper erkannt. Durch anschließende Inkubation mit einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, kann das Antigen sichtbar gemacht werden. Das Enzym Peroxidase des Komplexes ermöglicht mit 2,3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Substratchromogen eine Färbung. AEC

bildet ein rotes Endprodukt, welches in Alkohol löslich ist. Deshalb erfolgt die Eindeckelung des Präparates in einem wässrigen Eindeckmedium.

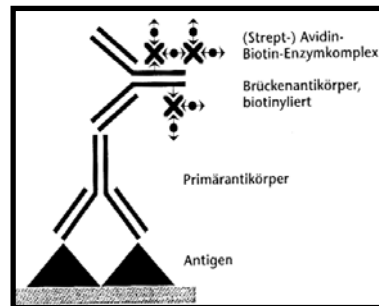


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode (Quelle: „Praxis der Immunhistochemie“, Noll/Schaub-Kuhen, S.17)

2.2.2.6 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

2.2.2.6.1 Nachweis aktivierter Astrozyten

Zur Darstellung von aktivierten Astrozyten im Gehirn wurde als Marker das Protein des Intermediärfilamentes GFAP (saures Gliafaserprotein) verwendet, welches auf den Zellfortsätzen von aktivierten Astrozyten exprimiert wird. Folgendes Protokoll wurde angewendet:

2 x 5 min	Xylol
2 x 5 min	Aceton
2 x kurz in	A. dest tauchen
20 min	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % H ₂ O ₂ /Methanol
5 min	Waschen mit A. dest
30 min	Blocken mit 10 % FCS/PBS
1 h	Anti-GFAP-AK (1:100 in FCS/PBS) bei 37 °C
5 min	Waschen mit PBS
1 h	Anti-Kaninchen-IgG (1:100 in 10 % FCS/PBS), biotinyliert bei RT
5 min	Waschen mit PBS
45 min	Streptavidin-Peroxidase-Komplex bei RT, (1:100 in 10 % FCS/PBS)
5 min	Waschen mit PBS
1-10 min	Färben mit AEC-Substratlösung
1 min	Gegenfärbung mit Hämalaunlösung
	Eindeckeln mit Glycergel

Anschließend wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und danach für 1 h in einer 2 %igen Natriumhypochloridlösung desinfiziert.

2.2.2.6.2 Färbung von Prion-Protein

Zum Nachweis des murinen Prion-Proteins wurde der 6H4-Antikörper verwendet. Dieser AK bindet an das Epitop der Aminosäuren 144-152 des Prion-Proteins (Haritani et al., 1994). Die Durchführung der Färbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Haritani et al. (Haritani et al., 1994).

2 x 5 min	Xylol
2 x 5 min	Aceton
2 x kurz in	A. dest tauchen
3 x 5 min	Mikrowellenvorbehandlung in A. dest zur Antigendemaskierung
kurz abkühlen lassen	
5 min	Ameisensäure zur Antigendemaskierung
20 min	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % H ₂ O ₂ /Methanol
5 min	Waschen mit A. dest
30 min	Blocken mit 10 % FCS/PBS
Anti-6H4-AK (1:1000 in 10 % FCS/PBS) über Nacht	
5 min	Waschen mit PBS
1 h	Anti-Maus-IgG (1:100 in 10 % FCS/PBS), biotinyliert bei RT
5 min	Waschen mit PBS
45 min	Streptavidin-Peroxidase-Komplex bei RT, (1:100 in 10 % FCS/PBS)
5 min	Waschen mit PBS
1-10 min	Färben mit AEC-Substratlösung
1 min	Gegenfärbung mit Hämalaunlösung
Eindeckeln mit Glycergel	

Anschließend wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und danach für 1 h in einer 2 %igen Natriumhypochloridlösung desinfiziert.

2.2.2.7 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE)

Um die spongiformen Veränderungen des Gewebes zu beurteilen, wurden Paraffinschnitte mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu ist folgendes Protokoll verwendet worden:

2 x 5 min	Xylol
2 x 5 min	Aceton
2 x kurz in	A. dest tauchen
1 min	Meyer's Hämalaunlösung
kurz in A. dest zum Entfärben	
1 min in	Eosin (0,1g/l)
10 min in	Leitungswasser
2 x kurz in	Aceton
2 x kurz in	Xylol
Eindeckeln mit D.P.X.	

Anschließend wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und danach für 1 h in einer 2 %igen Natriumhypochloridlösung desinfiziert.

2.2.2.8 Durchführung des PET-Blots (Paraffin-embedded tissue blot)

Kommerzielle Antikörper können derzeit zwischen dem zellulären und der pathologischen Isoform des Prion-Proteins nicht unterscheiden.

Der PET-Blot ermöglicht eine genaue Differenzierung zwischen den beiden Protein-Formen und kann eine qualitative und quantitative Darstellung von PrP^{Sc} auf Paraffinschnitten, die zuvor auf eine Nitrocellulosemembran aufgezogen wurden, gewährleisten. Durch Behandlung der Gewebeschnitte mit dem Enzym Proteinase K wird es ermöglicht, das zelluläre PrP^C zu verdauen und ausschließlich pathologisches PrP^{Sc} durch die anschließende immunhistochemische Färbung zu detektieren. Die Durchführung des PET-Blots erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schulz-Schäffer (Schulz-Schäffer et al., 2000).

2 x 5 min	Xylol
5 min 95 %	Isopropanol
5 min 80 %	Isopropanol
5 min 70 %	Isopropanol
5 min 50 %	Isopropanol
2 x kurz Spülen mit 0,1 % Tween/bidest	
10 min	Trocknen der Membran bei 55-60 °C
20 min	Anfeuchten der Membran mit TBST
2 h	PK-Verdau (25 µg/ml) bei 55 °C
3 x 10 min	Waschen mit TBST
10 min	Denaturierung der Proteine mit 3 M Guanidiniumthioisocyanat bei RT
3 x 10 min	Waschen mit TBST
30 min	Blockierung mit 0,2 % Casein/TBST
Primärantikörper (6H4, 1:1000) in 0,2 % Casein/TBST über Nacht auf Schüttler bei 4 °C	
3 x 10 min	Waschen mit TBST
1 h	Anti-Maus IgG, AP-gekoppelt (1:2000 in 0,2% Casein/TBST) bei RT
5 x 10 min	Waschen mit TBST
2 x 10 min	Vorinkubieren mit NTM
3-10 min	Farbreaktion mit NBT/BCIP
5 min	Stoppen der Farbreaktion mit Stopplösung
3 x kurz	Waschen mit A. dest
1 h	Trocknen der Membran bei 55-60 °C

Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Objektträger gelegt, diese mit Tesafilm zusammengeklebt und archiviert. Eine Quantifizierung der PrP^{Sc}-Ablagerungen und eine anatomische Strukturanalyse erfolgte mit einem Stereomikroskop der Firma Zeiss.

2.2.2.9 Herstellung der Gefrierpräparate

Nach Präparation der Gehirne wurden diese in 15 mm x 15mm x 5mm große Kryomolschälchen gelegt, mit Einbettmedium übergossen, über Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zum Schneiden der Eisorgane wurden diese auf Metallprobenplättchen mit Gefriermedium aufgebracht. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von -17°C am Kryostat bei einer Schnittdicke von $8\ \mu\text{m}$ angefertigt. Anschließend wurden die Objektträger 1 h bei RT getrocknet. Für eventuelle spätere Färbungen wurden die Präparate bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.10 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Für vergleichende immunhistochemische Analysen von aktivierten Mikrogliazellen wurde der Anti-CD11b-Antikörper verwendet. Die Färbung der Gefrierschnitte wurde nach einem modifizierten Protokoll von Jeffrey et al. (Jeffrey et al., 1998) durchgeführt:

10 min	Fixierung mit eiskaltem Aceton
10 min	Trocknung der Schnitte
20 min	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % H_2O_2 /Methanol
5 min	Waschen mit A. dest.
30 min	Blocken mit 10 % FCS/PBS
1 h	Ratte-Anti-Maus-CD11b-AK (unverdünnt) bei 37°C
5 min	Waschen mit PBS
1 h	biotinylierter-Anti-Ratte-IgG-AK bei RT, (1:100 in 10 % FCS/PBS)
5 min	Waschen mit PBS
45 min	Avidin-Peroxidase-Komplex bei RT, (1:100 in 10 % FCS/PBS)
5 min	Waschen mit PBS
1-10 min	Färben mit AEC-Substratlösung
1 min	Gegenfärbung mit Hämalaunlösung
	Eindeckeln mit Glycergel

Anschließend wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und danach für 1 h in einer 2 %igen Natriumhypochloridlösung desinfiziert.

2.2.2.11 Histologische Analyse

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Die fotografische Dokumentation der Färbungen erfolgte mit einer zugehörigen Digitalkamera und dem Softwareprogramm Axiovision von Zeiss.

Zur Bestimmung und Auswertung der anatomischen Hirnstrukturen wurde der stereotaktische Atlas „The mouse brain in stereotaxic coordinates“ von Franklin und Paxinos (2002) verwendet.

2.2.2.12 Quantifizierung der Färbung

Entsprechend der Schnittebene wurden auf coronalen Schnitten folgende Hirnareale bewertet:

- Kleinhirn,
- Riechhirn,
- Cortex,
- Hippocampus und
- Stammhirn.

Die einzelnen Hirnareale wurden beurteilt und der Expressionsgrad semiquantitativ ermittelt.

Zuvor wurden folgende Expressionsgrade in Form von Eichfotos festgelegt:

- 0 = kein Signal
- 1 = sehr schwaches Signal
- 2 = schwaches Signal
- 3 = mittelstarkes Signal
- 4 = starkes Signal
- 5 = sehr starkes Signal

Um Unterschiede in den Expressionsgraden zu ermitteln, wurde ein semiquantitatives Auswertesystem genutzt. Mindestens zehn Gesichtsfelder pro Hirnregion wurden bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet und das positive Signal in Schweregrade von 0 bis 5 eingeteilt. Im Anschluss wurden die Mittelwerte der errechneten Indices (Summe der Anzahl der Schweregrade dividiert durch die Anzahl der ausgewerteten Gesichtsfelder) ermittelt und Unterschiede zwischen den Gruppen erfasst.

2.2.2.13 Statistik

Anhand des „*unpaired students t-test*“ wurden die statistischen Unterschiede bei den Überlebenszeiten zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Als statistisch signifikant unterschiedlich bewertet wurden Ergebnisse ab einem Wert von $p < 0,05$.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Elektrophoresen

2.2.3.1.1 DNA

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der DNA wurde diese gelelektrophoretisch in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Die 1,4 %igen Gele bestanden aus Agarose, TAE-Puffer und EtBr (0,5µg/ml). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V in TAE-Puffer mit EtBr (0,5µg/ml). Die Qualität und Quantität der DNA wurde mit Hilfe eines Längenstandards unter UV-Licht kontrolliert und dokumentiert.

2.2.3.1.2 RNA

Eine qualitative und quantitative Analyse von RNA erfolgte in denaturierenden Formaldehydgelen. Die einprozentigen Gele bestanden aus Agarose, Denaturierungs-Gel-Puffer und DEPC-dest. Die Elektrophorese wurde bei 40 V in MOPS-Puffer durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde die Qualität unter UV-Licht überprüft.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, DNA-Fragmente selektiv zu amplifizieren. Eine PCR-Reaktion besteht aus der wiederholten Abfolge von DNA-Denaturierung, dem Anlagern (Annealing) und der Verlängerung (Elongation) von spezifischen Primern. Katalysiert wird diese Reaktion durch die hitzestabile Taq-Polymerase. Eine Standard-PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wie folgt angesetzt:

Reaktionsansatz:

0,5 µl cDNA

5 µl 10x PCR-Puffer

5 µl MgCl₂ (25 mM)

je 1 µl dNTP (je 2,5 mM)

2 µl Vorwärtsprimer (10 µM)

2 µl Rückwärtsprimer (10 µM)

0,3 µl Taq-Gold (5 Units/µl)

31,2 µl PCR-H₂O

Die Reaktion erfolgte in einem Thermozykler der Firma Perkin Elmer nach folgendem Standard-Programm:

Zyklusprogramm:

Initiale Denaturierung:	10 min	95 °C	
Denaturierung:	30 sek	95 °C	} 30 Zyklen
Annealing:	30 sek	62 °C	
Elongation:	1 min	72 °C	
Finale Elongation:	5 min	72 °C	

2.2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Gehirn mittels Trizol

Für die Isolierung von RNA wurden ganze Gehirne in Trizol (100 mg/ml) mit einem Ultra-Turraxer homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend in Sarstedtröhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C (12.000 x g) zentrifugiert. Durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform/ml Trizol als Ausgangsmenge (15 sek Schütteln, 5 min bei RT inkubieren) wurde die RNA in die obere, wässrige Phase extrahiert. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol durchmischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert, um die RNA dann bei 12.000 x g (4 °C, 5 min) zu pelletieren. Das Sediment wurde anschließend zweimal mit jeweils 1 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen (7.500 x g, 4 °C, 5 min). Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Danach wurde die Qualität der RNA auf einem Formaldehydgel überprüft und die RNA-Menge photometrisch vermessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Extinktion 260 nm} \times \text{Verdünnung} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.4 Northern-Blot-Analysen

2.2.3.4.1 Durchführung des Northern-Blots

Zunächst wurden 10 µg RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht die Qualität und Quantität der RNA kontrolliert und dokumentiert. Durch Kapillartransfer wurde die zuvor aufgetrennte RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Transferpuffers der Firma Ambion. Zum Blotten wurden nacheinander die Membran, mit Transferpuffer befeuchtetes Blotpapier und ein Stapel saugfähiges Papier auf das Gel gelegt. Der Transfer wurde durch Beschwerung mit einem

Gewicht verbessert. Nach dem Transfer wurde die RNA durch 20 minütiges Backen bei 80 °C unter Vakuum kovalent an die Membran gebunden. Die RNA-Blots wurden bis zur Hybridisierung in einer Folie verpackt und bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.3.4.2 Sondenherstellung

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden wurde mit Hilfe des Megaprime DNA-labelling-Systems (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Nach Denaturierung des zu markierenden DNA-Doppelstranges erfolgte der Nukleotideinbau des [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP durch die Klenow-Polymerase, wobei Random-Hexamere als Primer dienten. Der Reaktionsansatz wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Reaktion wurden nicht eingebaute Radionukleotide über eine G25-Sephadexsäule abgetrennt. Diese wurde zunächst mit TE-Puffer äquilibriert und im Anschluss mit der zugegebenen Probe für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Einbau der Radioaktivität durch Messung eines Aliquots im Szintillationszähler bestimmt. Es wurden nur Sonden verwendet, die nach dem Einbau der Radioaktivität mindestens einen Wert von 1×10^9 dpm/ μg DNA aufwiesen.

2.2.3.4.3 Hybridisierung und Autoradiographie

Die Membran wurde zunächst mit dem Hybridisierungspuffer (Ambion) für mindestens 4 h bei 42 °C in einem Rollinkubator prähybridisiert. Anschließend wurde die zuvor radioaktiv markierte und denaturierte Sonde ($1,0\text{-}1,5 \times 10^6$ dpm/ml Hybridisierungslösung) über Nacht bei 42 °C in einem Rollinkubator hybridisiert. Danach wurden die Blots gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Folgende Waschschrte schlossen sich an:

5 min low-stringently-washsolution bei RT

5 min low-stringently-washsolution bei 42 °C

2 x 15 min high-stringently-washsolution bei 42 °C

Im Anschluss wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt und bei –80 °C autoradiographiert. Eine Quantifizierung der Signale der Autoradiographie erfolgte mit Hilfe des E.A.S.Y.-WIN-Programms von Herolab. Zur erneuten Verwendung der Blots wurde die gebundene Radioaktivität durch zehnmütiges Kochen in 0,1 % SDS entfernt.

2.2.3.5 Nachweis der Genexpression verschiedener Gene mittels quantitativer Real-Time RT-PCR

2.2.3.5.1 DNase-Verdau und Reinigung der RNA

Um eventuelle Reste von DNA nach der RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau angeschlossen. Hierzu wurden zu 10 µg Gesamt-RNA folgende Reagenzien gegeben:

6 µl 10 x DNase-Puffer

2 µl DNase

add 60 µl 0,1 % DEPC

Der Ansatz wurde anschließend für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und im Anschluss mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen gereinigt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

2.2.3.5.2 cDNA-Synthese von Gesamt-RNA

Für die Real-Time PCR-Analysen wurden 10 µg der Gesamt-RNA mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Um die Sekundärstrukturen der Gesamt-RNA zu denaturieren wurden diese für 5 min bei 65 °C inkubiert und im Anschluss Puffer, Primer, dNTPs und Reverse Transkriptase nach Angabe des Herstellers zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Unter entsprechenden Bedingungen synthetisiert die Reverse Transkriptase mit den vier NTPs eine Kopie der mRNA, wobei zunächst ein cDNA-mRNA-Hybrid entsteht. Mit Hilfe der RNase wird die mRNA degradiert und somit aus dem Hybrid entfernt. Anschließend wurde der Erfolg der cDNA-Synthese anhand einer Kontroll-PCR für die Expression des „housekeeping“-Gens β -Actin überprüft.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5.3 Quantitative Real-Time RT-PCR

Mit Hilfe des Quanti-Tect-SYBR-Green-PCR Systems (Qiagen) ist es möglich, cDNA zu amplifizieren und zu quantifizieren. Da diese Methode eine hohe Sensitivität aufweist, konnten auch sehr gering exprimierte Gene untersucht werden. Das System nutzt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, der an kleine Vertiefungen der doppelsträngigen DNA-Helix bindet. Der Farbstoff hat keine Sequenzspezifität. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch die spezifische Sequenz der entsprechenden PCR-Primer festgelegt. An

dem entstehenden Amplifikat, welches durch die Taq-Polymerase synthetisiert wird, binden mehrere Moleküle des Farbstoffs. Durch die Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Dadurch kann man einen Rückschluss auf die Zahl der Ausgangskopien im PCR-Ansatz ziehen. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwerts, dem sogenannten „Threshold-Cycle“ oder C_T -Wert. Zur Signalquantifizierung werden Proben einer Standardreihe mit bekannter Konzentration verglichen. Mit Hilfe dieser Eichgerade lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln. Die Anregung des SYBR-Green Farbstoffes erfolgt durch das Fluorometer des Zyklers bei einer Wellenlänge von 528 nm. Dieser steht im Kontakt mit einem angeschlossenen Computer an dem sich die quantitative und qualitative Auswertung anschließt.

Folgende Komponenten wurden für eine Reaktion benötigt:

Reaktionsansatz:

6,25 µl	Quanti Tect SYBR Green PCR MasterMix
0,36 µl	Vorwärtsprimer (50 mM)
0,36 µl	Rückwärtsprimer (50 mM)
3,37 µl	RNase-freies Wasser
0,125 µl	Uracil-N-Glycosylase (1 Unit/µl)
2 µl	cDNA (zuvor 1:40 mit A. dest verdünnt)

Von jeder Probe erfolgte eine 4-fach Bestimmung. Zu jedem Versuch wurde eine Leerwertkontrolle mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Die Reaktion wurde in einem Real-Time-Zykler (Perkin Elmer) durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet:

Zyklerprogramm

50 °C	2 min	
95 °C	15 min	
95 °C	30 sek	} 40 Zyklen
50 °C-60 °C	30 sek	
72 °C	1 min	

Als externer Standard wurde das „housekeeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet.

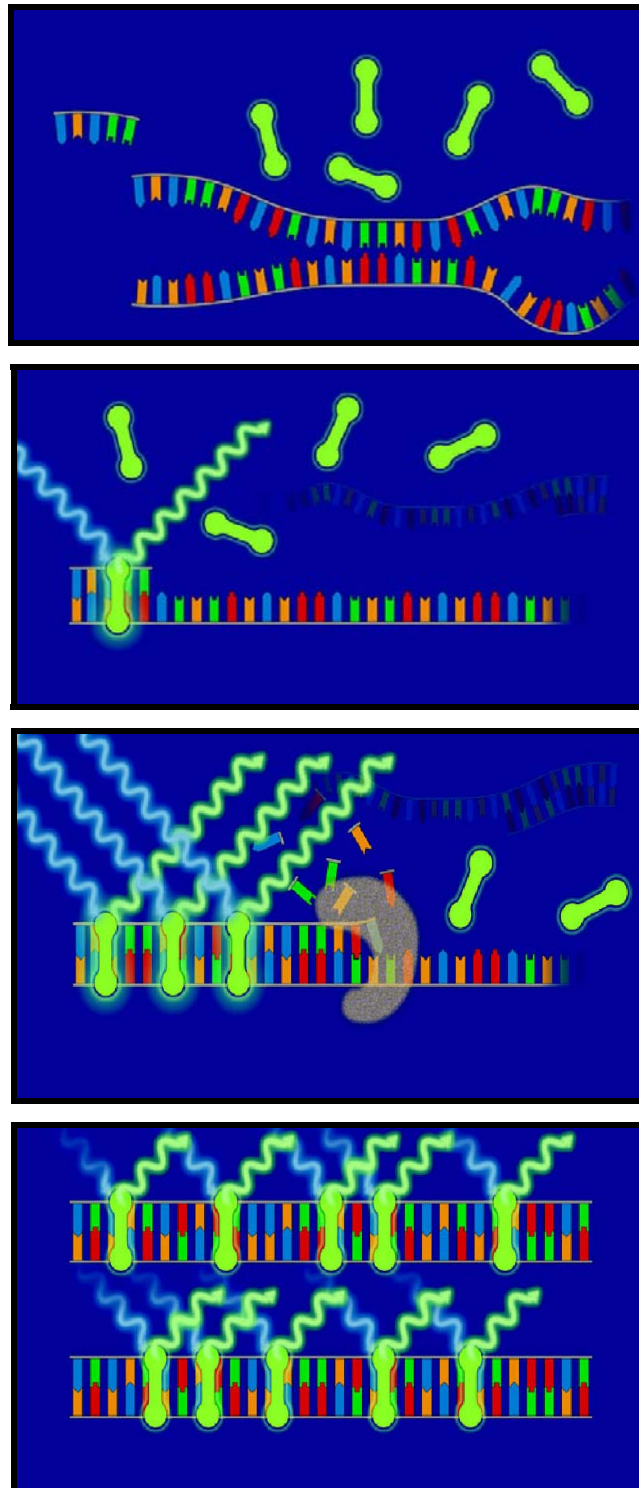


Abbildung 6: Schematischer Ablauf einer RT-PCR-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green. (Quelle:www.pcr.at)

Nach der Synthese eines neuen DNA-Doppelstrangs kommt es zur Bindung von mehreren Molekülen SYBR-Green an den neusynthetisierten Strang. Durch die Bindung des Farbstoffes wird die emittierte Fluoreszenz frei und die Intensität des Signals kann gemessen werden. Die Intensität ist direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge.