

4 Ergebnisse

Eine Scrapie-Infektion geht mit charakteristischen histopathologischen Veränderungen wie PrP^{Sc}-Ablagerung, Mikrogliose, Astrozytose und spongiformer Degeneration einher, die zu Neuronenverlust und Tod des betroffenen Tieres führen. Um den Einfluss des CD40-CD40L-Systems auf die Scrapie-Pathogenese im ZNS zu bestimmen, wurden CD40L^{-/-}-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund 129SF x C57B/6 und Wildtyp-Kontrollmäuse mit gleichem Hintergrund intrazerebral mit einem 10⁻³ verdünnten 10%igen Hirnhomogenat infiziert, das aus einer scrapie-infizierten Maus im terminalen Krankheitsstadium stammte (siehe Punkt 3.2.2.2). Für die Untersuchung der histopathologischen Veränderungen wurde ein Teil der Mäuse zum Zeitpunkt 125 dpi getötet, die Gehirne wurden entnommen und ihrem Verwendungszweck entsprechend fixiert (siehe Punkt 3.2.2.3). Die übrigen Mäuse wurden bis zum Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums in ihren Gruppen belassen.

4.1 Vergleich der Überlebenszeiten

Es wurden die Überlebenszeiten von insgesamt 11 CD40L^{-/-}-Mäusen mit 13 Tieren aus der Wildtyp-Gruppe mit gleichem genetischen Hintergrund verglichen. Jedes Tier wurde euthanasiert, wenn es das terminale Krankheitsstadium erreicht hatte. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch einen schlechten Pflegezustand, eine gekrümmte Körperhaltung sowie eine ausgeprägte Orientierungslosigkeit. In diesem Stadium ist mit dem Tod der Maus innerhalb der nächsten 48 Stunden zu rechnen.

Die Tabelle 4 zeigt, dass die CD40L^{-/-}-Mäuse durchschnittlich nach 144±4 dpi das terminale Krankheitsstadium erreichten. Die Wildtyp-Kontrolltiere waren im Durchschnitt erst nach 184±10 dpi terminal erkrankt. Dies entspricht einem Unterschied von 40 Tagen und ist statistisch hochsignifikant ($p < 0,00001$, ungepaarter t-Test).

Die durchschnittliche Überlebenszeit der für diese Studie verwendeten Wildtyp-Kontrollmäuse mit gemischtem (129SF x C57B/6) genetischen Hintergrund, entspricht bei gleicher Infektionsdosis derjenigen von C57B/6-Mäusen. Der genetische Hintergrund (129SF x C57B/6) der Wildtyp-Kontrollmäuse hat also keinen Einfluss auf die Überlebenszeiten.

Tabelle 4: Überlebenszeiten (in Tagen) der CD40L^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Verdünnung des 10%igen Hirnhomogenats	CD40L ^{-/-} -Mäuse (129SF x C57B/6)	Wildtyp-Kontrollmäuse (129SF x C57B/6)	Wildtyp-Mäuse (C57B/6)
10 ⁻³	144 ± 4, n = 11 (142, 142, 142, 143, 143, 143, 143, 143, 143, 149, 156)	184 ± 10, n = 13 (170, 174, 177, 177, 181, 181, 181, 181, 188, 195, 197, 197, 198)	185 ± 8, n = 18

Bei der auf Tötung und Organentnahme folgenden Obduktion der Mäuse wurden keine makroskopischen Unterschiede zwischen den Mäusen aus der CD40L^{-/-}- und der Kontrollgruppe festgestellt.

4.2 PrP^{Sc}-Ablagerung

4.2.1 Western Blot

Unter Verwendung des Erstantikörpers 6H4 wurde nach einem Proteinase K-Verdau zur Degradation von PrP^C (siehe Punkt 3.2.5.1) ein Western Blot durchgeführt, um die Menge des im Verlauf der Scrapie-Infektion entstandenen PrP^{Sc} 125 dpi und zum terminalen Zeitpunkt zu bestimmen. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils die Gehirne zweier CD40L^{-/-}-Mäuse und zweier Wildtyp-Kontrollmäuse untersucht.

Alle Proben zeigten nach der Durchführung des Western Blots die charakteristischen drei Banden des PrP^{Sc} mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa, die der unglykosylierten, einfach- und zweifach glykosylierten Form des PrP^{Sc} entsprechen (Abb. 2, Spur 1 bis 8). Zusätzlich wiesen die Spuren 1 bis 6 unterhalb der 20 kDa Bande eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte zusätzliche Bande auf, die eine unspezifische Bindung des 6H4-Antikörpers darstellt. In der Abbildung 2 zeigen die Spuren 1 bis 4 die Ergebnisse zweier Mäuse aus der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 125 dpi (Spur 1 u. 2) und terminal (Spur 3 u. 4), während die Spuren 5 bis 8 die entsprechenden Ergebnisse für die CD40L^{-/-}-Mäuse zum Zeitpunkt 125 dpi (Spur 5, 6) und terminal (Spur 7, 8) darstellen. In beiden Gruppen ist eine geringfügige Zunahme der Bandenintensität vom Zeitpunkt 125 dpi zum terminalen Zeitpunkt feststellbar. Vergleicht man

die Spuren einer Gruppe untereinander (z.B. Spur 1 und 2), so zeigt sich, dass die Bandenintensität deutlich variieren kann, was den individuellen Krankheitsverlauf in den einzelnen Tieren widerspiegelt. Insgesamt ist zwischen den CD40L^{-/-}-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollmäusen kein Unterschied feststellbar, weder zum Zeitpunkt 125 dpi (Spur 1, 2. bzw. 5, 6) noch zum terminalen Zeitpunkt (Spur 3, 4 bzw. 7, 8). Im Western Blot mock-infizierter Mäuse (ohne Abbildung) ist zu keinem Zeitpunkt eine PrP^{Sc}-Ablagerung feststellbar.

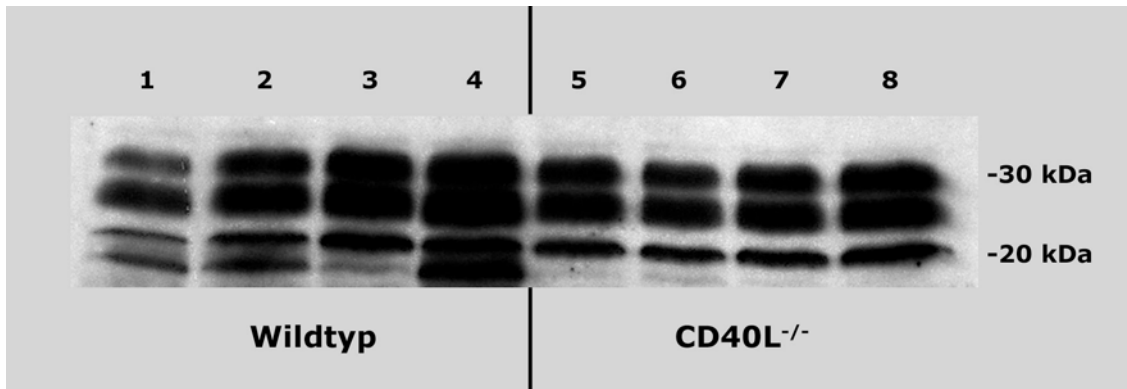


Abbildung 2: Western Blot zur Bestimmung der PrP^{Sc}-Ablagerung.

Spur 1, 2: Wildtyp-Kontrollmäuse 125 dpi; Spur 3, 4: Wildtyp-Kontrollmäuse terminal;

Spur 5, 6: CD40L^{-/-}-Mäuse 125 dpi; Spur 7, 8: CD40L^{-/-}-Mäuse terminal;

Zwischen CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen konnte kein Unterschied hinsichtlich der Menge der PrP^{Sc}-Ablagerung festgestellt werden.

4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von PrP^{Sc}

Durch den immunhistochemischen Nachweis von PrP^{Sc} sollten sowohl Menge als auch Lokalisation des fehlgefalteten Prionproteins zum Zeitpunkt 125 dpi bestimmt werden. Wie im Western Blot (siehe Punkt 4.2.1) wurde der Nachweis von PrP^{Sc} mit dem 6H4-Antikörper durchgeführt.

Die Stärke der PrP^{Sc}-Akkumulation wurde in den Hirnregionen Kleinhirn, Hirnstamm, Medulla oblongata, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Cortex und Bulbus olfactorius bestimmt.

Der Vergleich der Lokalisation und Intensität der PrP^{Sc}-Ablagerung in den einzelnen Hirnregionen ergab keine Unterschiede hinsichtlich der zwischen den CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen. Eine besonders stark ausgeprägte PrP^{Sc}-Ablagerung fand sich in beiden Gruppen in den Hirnregionen Thalamus, Hippocampus und Cortex. In Abbildung 3 sieht man exemplarisch den Vergleich der PrP^{Sc}-Ablagerung im Hippocampus zum Zeitpunkt 125 dpi. Sowohl in der scrapie-infizierten CD40L^{-/-}-Maus (A) als auch in der Kontrollmaus (B) war eine hochgradige PrP^{Sc}-Ablagerung (rotes Signal) feststellbar. Obwohl der zum Nachweis verwendete 6H4-Antikörper an beide Prion-Isoformen binden kann, war im mock-infizierten Tier (C) kein Signal feststellbar, was möglicherweise auf die Antigen-Demaskierungsschritte im Färbeverfahren (siehe Punkt 3.2.3.3.1) zurückzuführen ist und sich auch mit den Ergebnissen von Kovács und Kollegen deckt (Kovács et al., 2002).

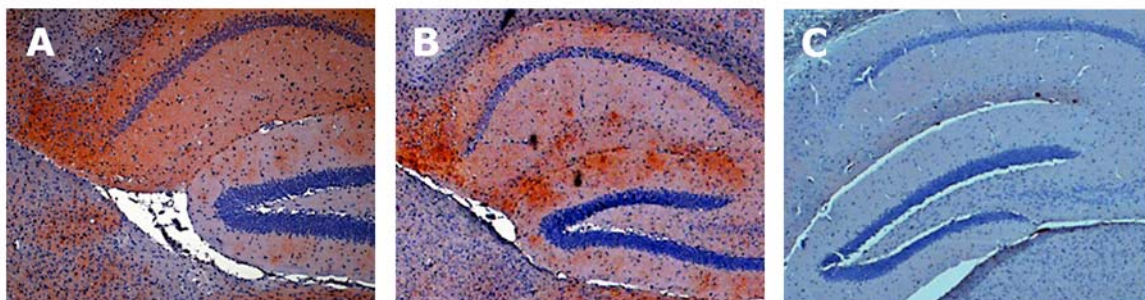


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis der PrP^{Sc}-Ablagerung mit dem 6H4-Antikörper. Hippocampus, 100-fache Vergrößerung. (A) CD40L^{-/-}-Maus, (B) Wildtyp-Kontrollmaus, (C) mock-infizierte Maus. Es konnte kein Unterschied in der PrP^{Sc}-Ablagerung zwischen CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen festgestellt werden.

4.2.3 Paraffin embedded tissue blot (PET Blot)

Um die Ergebnisse des Western Blots und der Immunhistochemie zu verifizieren, wurde die PrP^{Sc}-Ablagerung zusätzlich mit Hilfe der hochsensitiven PET Blot-Methode untersucht. Diese Methode bietet die Möglichkeit, das Hirngewebe bei guter Erhaltung der Morphologie einem Proteinase K-Verdau zu unterziehen, wodurch PrP^C degradiert wird. Auch mit dieser Methode konnten die Ergebnisse des Western Blots (siehe Punkt 4.2.1) und der Immunhistochemie (siehe Punkt 4.2.2) bestätigt werden. Es wurden bei geringgradigen individuellen Abweichungen insgesamt keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität und Lokalisation des detektierten PrP^{Sc} zwischen CD40L^{-/-}-Mäusen (Abb. 4, A) und Wildtyp-Kontrollen (B) festgestellt. Beide Gruppen zeigten eine besonders starke PrP^{Sc}-Ablagerung in den Hirnregionen Hippocampus, Cortex und Thalamus. Die Regionen Medulla oblongata, Mittelhirn und Striatum wiesen eine mittelgradige PrP^{Sc}-Ablagerung auf, während in Kleinhirn und Bulbus olfactorius die geringsten Mengen an PrP^{Sc} feststellbar waren. Im Gehirn des mock-infizierten Tiers (C) war keine PrP^{Sc}-Ablagerung feststellbar.

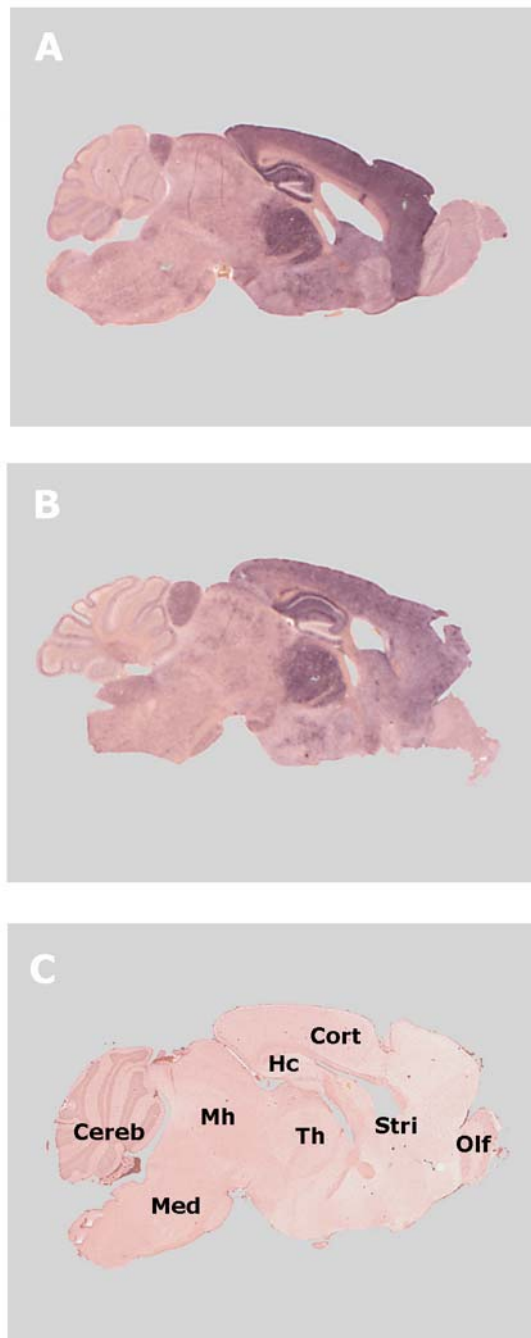


Abbildung 4: Nachweis der PrP^{Sc}-Ablagerung mit Hilfe der PET Blot-Methode in den Hirnregionen Cerebellum (Cereb), Medulla oblongata (Med), Mittelhirn (Mh), Thalamus (Th), Hippocampus (Hc), Striatum (Stri), Cortex (Cort) und Bulbus olfactorius (Olf); CD40L^{-/-}-Maus (A), Wildtyp-Kontrollmaus (B), mock-infizierte Maus (C); Es waren keine Unterschiede zwischen CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen hinsichtlich der Intensität und Lokalisation der PrP^{Sc}-Ablagerung feststellbar.

4.3 Mikrogliaaktivierung

In der zentralnervösen Scrapie-Pathogenese kommt es als Folge der PrP^{Sc}-Ablagerung zu einer Aktivierung von Mikroglia (siehe Punkt 1.3.2). Im Zuge dieser Aktivierung kommt es auf diesen Zellen zu einer Expression verschiedener Proteine, die immunhistochemisch nachweisbar sind. Zu diesen Proteinen gehört das Oberflächenprotein F4/80. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung zum Zeitpunkt 125 dpi durch den Nachweis F4/80-immunreaktiver Mikroglia untersucht.

Sowohl in den CD40L^{-/-}-Mäusen als auch in den Wildtyp-Kontrollmäusen waren zu diesem Zeitpunkt F4/80-immunreaktive Mikroglia nachweisbar (Abb. 5, A bis D). In den CD40L^{-/-}-Mäusen war die Zahl F4/80-positiver Mikroglia in allen untersuchten Hirnregionen größer als in den Kontrollmäusen. Besonders stark war dieser Unterschied in Hippocampus und Cortex ausgeprägt (Abb. 5).

In den mock-infizierten Mäusen (Abb. 5, E, F) konnten keine F4/80-immunreaktiven Mikroglia festgestellt werden.

4.4 Astrozytenaktivierung

Neben den Mikroglia werden im Verlauf der Scrapie-Infektion auch Astrozyten aktiviert. Aktivierte Astrozyten exprimieren auf der Oberfläche ihrer Zellfortsätze das gliale, saure Faserprotein GFAP. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der Astrozytose durch den immunhistochemischen Nachweis GFAP-positiver Astrozyten untersucht.

Zwischen den scrapie-infizierten CD40L^{-/-}-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollmäusen konnte kein Unterschied hinsichtlich der Astrozytenaktivierung festgestellt werden (Abb. 7). In allen untersuchten Hirnregionen waren zum Zeitpunkt 125 dpi in großer Zahl aktivierte, GFAP-positive Astrozyten nachweisbar. Sowohl CD40L^{-/-}-Mäuse als auch die Wildtyp-Kontrollmäuse zeigten eine besonders starke Astrozytenaktivierung im Hippocampus (Abb. 7, A, C). Im Kleinhirn war ein schwächerer Aktivierungsgrad der Astrozyten zu beobachten (Abb. 7, B, D).

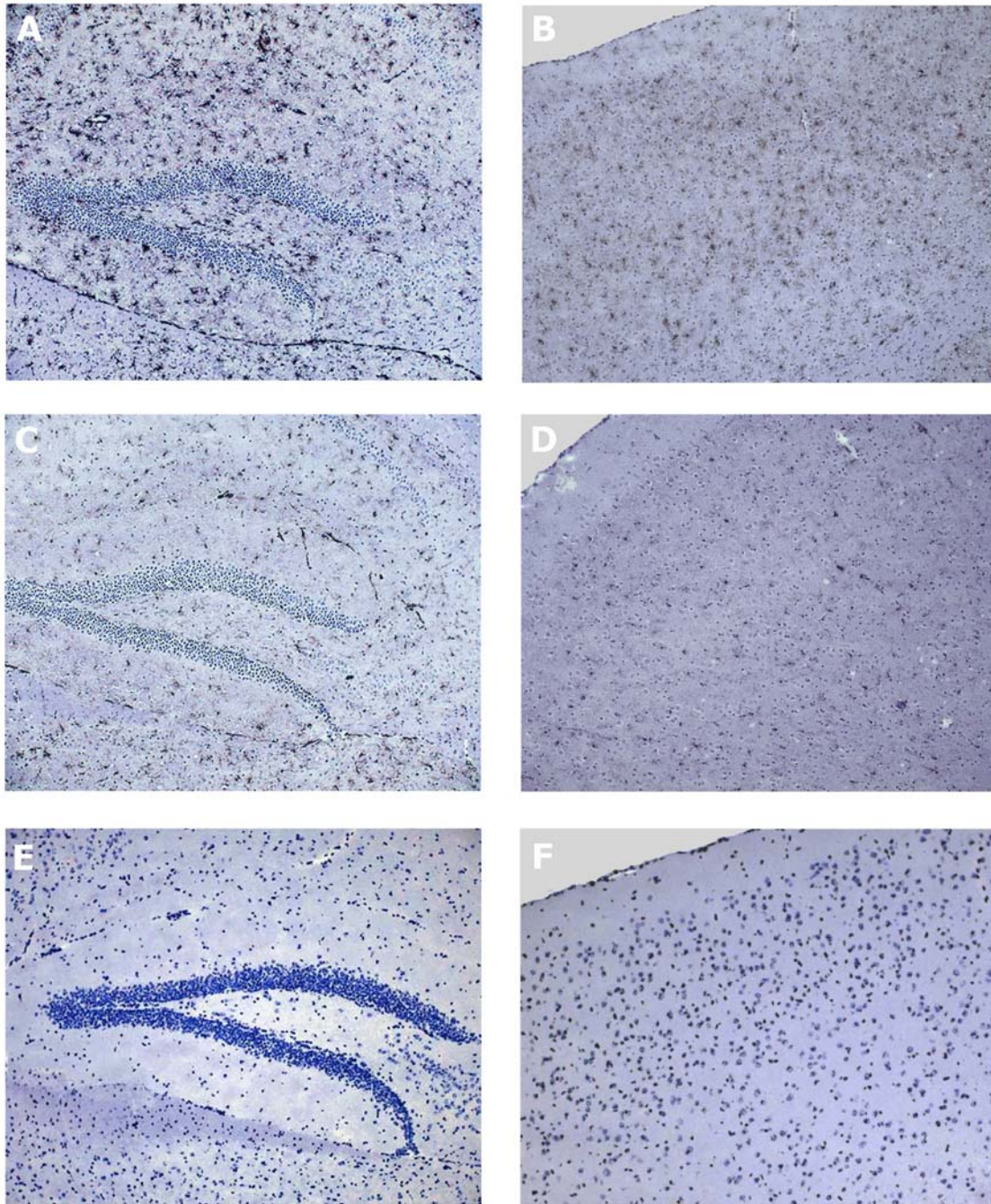


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis F4/80 immunreaktiver Mikroglia in Hippocampus (A, C, E) und Cortex (B, D, F); Vergrößerung 100-fach; CD40L^{-/-}-Maus (A, B), Wildtyp-Kontrollmäuse (C, D), mock-infizierte Mäuse (E, F); In den CD40L^{-/-}-Mäusen war in eine deutlich verstärkte Mikrogliose feststellbar.

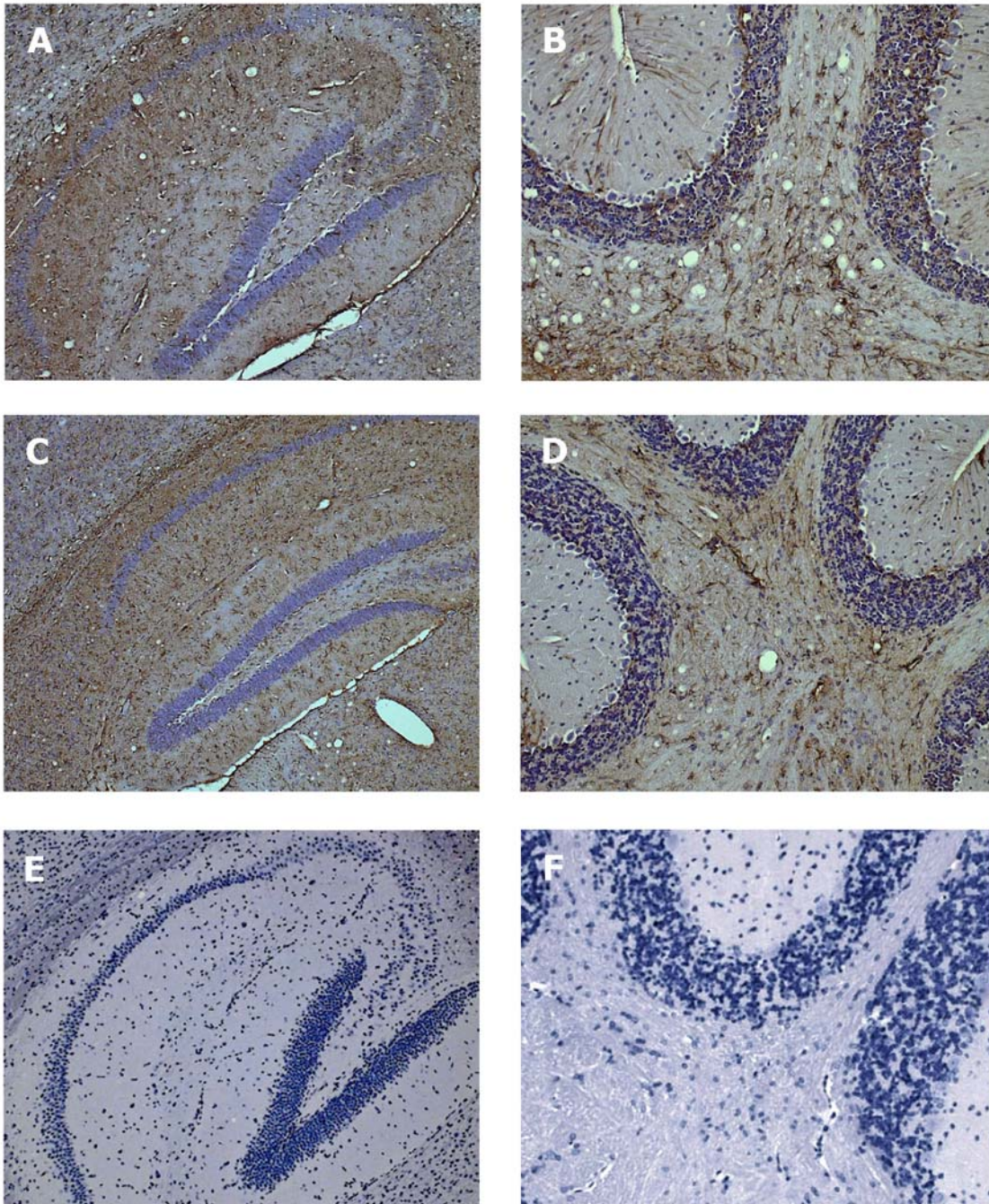


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis der Astrozytenaktivierung mittels GFAP in Hippocampus (A, C, E) und Cerebellum (B, D, F); Vergrößerung 100-fach; CD40L^{-/-}-Mäuse (A, B), Wildtyp-Kontrollen (C, D); mock-infizierte Kontrollen (E, F). Zwischen CD40L^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen war kein Unterschied in der Astrozytenaktivierung feststellbar.

4.5 Spongiforme Veränderungen/Vakuolisierung des Hirngewebes

Durch einen möglicherweise direkten neurotoxischen Effekt von PrP^{Sc} und/oder verschiedene neurotoxische Faktoren, die mit der Mikrogliose und Astrozytose im Zusammenhang stehen (siehe Punkt 1.3.2) kommt es im Verlauf der Scrapieinfektion zu charakteristischen spongiformen Veränderungen des Hirngewebes. Die Untersuchung dieser Veränderungen erfolgte an HE-gefärbten Gewebeschnitten. Beurteilt wurden das Ausmaß und die Verteilung der intraneuronalen Vakuolen sowie der Vakuolen im Neuropil, die durch neuronalen Zelluntergang entstehen. In beiden scrapie-infizierten Gruppen war zum Zeitpunkt 125 dpi eine Vakuolisierung von Neuronen und Neuropil feststellbar. In den CD40L^{-/-}-Mäusen war die Vakuolisierung in allen untersuchten Hirnregionen im Vergleich zu den Kontrollmäusen verstärkt, mit Ausnahme des Cerebellums, wo beiden Gruppen eine gleichermaßen geringe Vakuolenbildung aufwies. Der größte Unterschied war in der Hirnstammregion (Abb. 6) feststellbar. In der Detailvergrößerung (Abb. 6, B, D) zeigte sich, dass die Vakuolen in den CD40L^{-/-}-Mäusen in dieser Region auch in wesentlich stärkerem Maß zu Mikrozysten konfluiert waren. Die mock-infizierten Tiere entwickelten keine Vakuolisierung des Hirngewebes.

4.6 Neuronaler Zelltod

Die Auswirkung der Scrapie-Infektion auf den neuronalen Zelltod wurden durch den Nachweis parvalbumin-positiver Neuronen untersucht. Diese Subpopulation GABAerger inhibitorischer Neuronen erweist sich als besonders empfindlich gegenüber der mit der PrP^{Sc}-Akkumulation und Gliaaktivierung verbundenen Neurotoxizität (siehe Punkt 1.3.2).

Ausgehend von der Zelldichte parvalbumin-positiver Neuronen in den mock-infizierten Mäusen wurde die Abnahme in den scrapie-infizierten Wildtyp-Mäusen und den CD40L^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt 125 dpi verglichen (Abb. 8). In den scrapie-infizierten Wildtyp-Mäusen (Abb. 8; B, C) war zum Zeitpunkt 125 dpi eine geringgradige Abnahme an parvalbumin-positiven Neuronen im Vergleich zu den mock-infizierten Kontrollen (Abb. 8, D, E) feststellbar. Die CD40L^{-/-}-Mäuse (A, B) wiesen hingegen eine sehr starke Reduktion parvalbumin-positiver Neuronen im Vergleich zu den mock-infizierten Kontrollen auf.

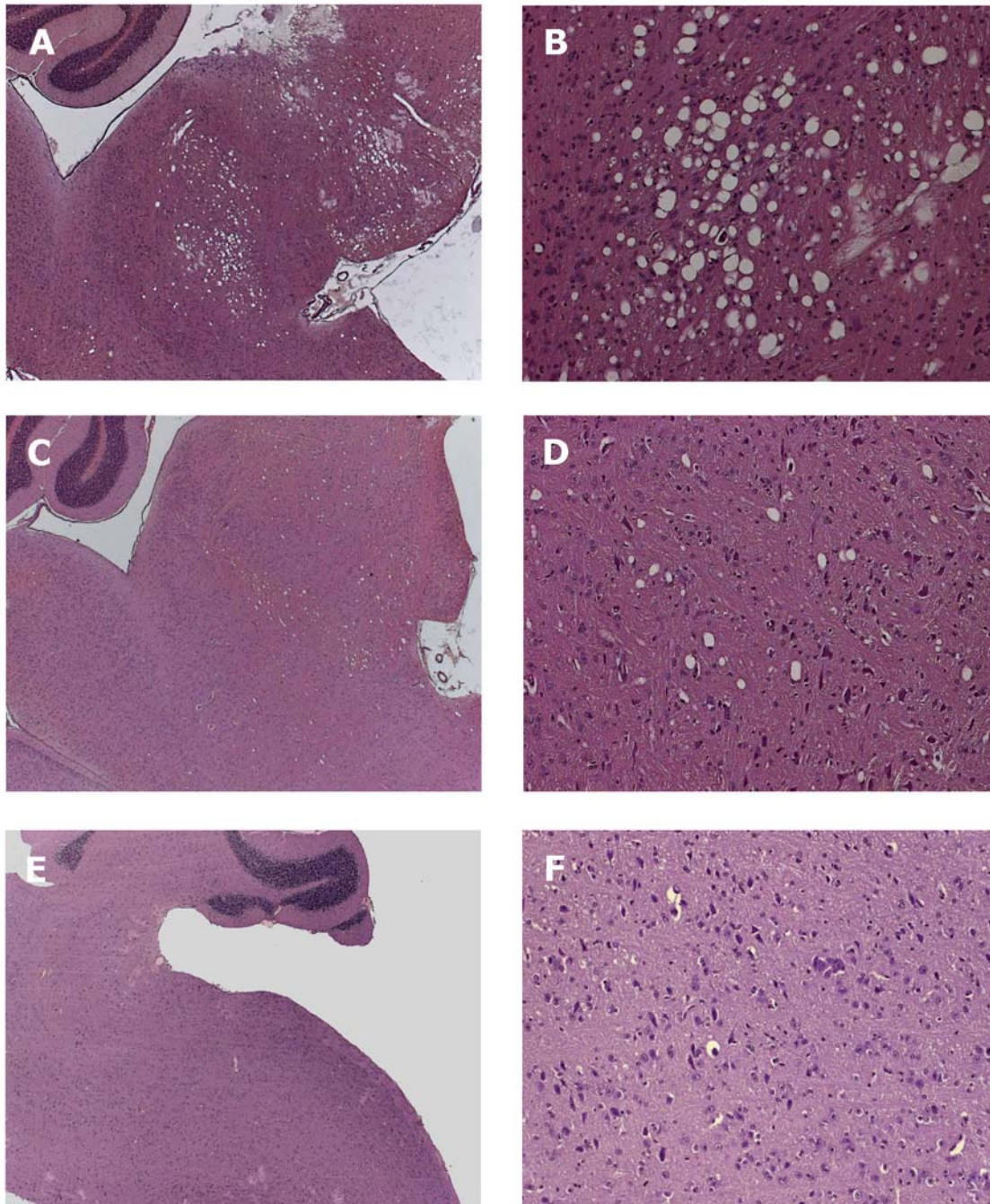


Abbildung 7: Histologischer Nachweis spongiformer Veränderungen des Hirngewebes im Bereich der Medulla oblongata in HE-gefärbten Gewebeschnitten. Übersichtsvergrößerung (40-fach) (A, C, E); Detailvergrößerung (100-fach) (B, D, F); CD40L^{-/-}-Mäuse (A, B), Wildtyp-Kontrollen (C, D); mock-infizierte Kontrolltiere (E, F). In den CD40L^{-/-}-Mäusen waren spongiforme Veränderungen in deutlich stärkerem Ausmaß feststellbar.

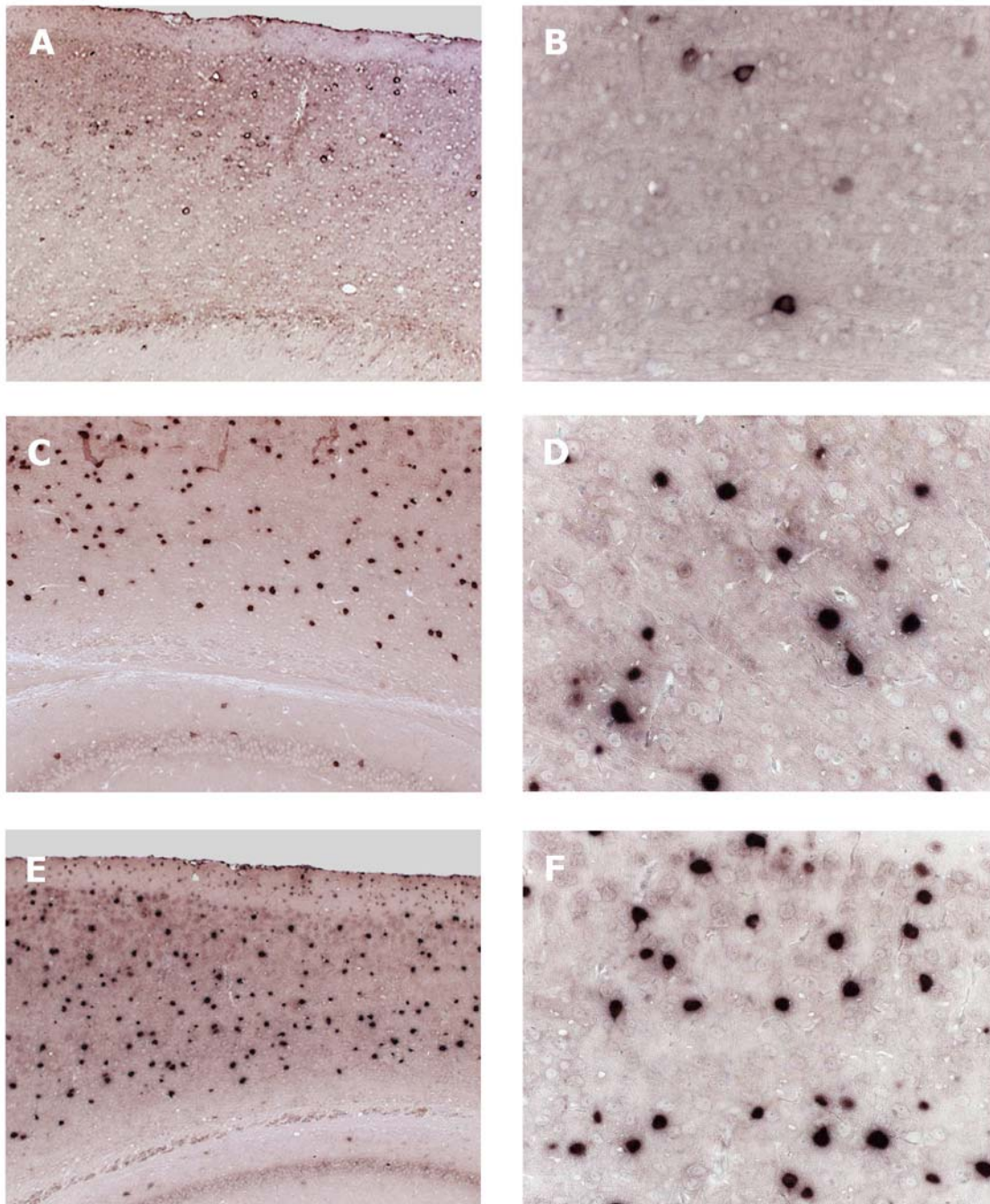


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis GABAerger parvalbumin-positiver Neurone im Cortex; Übersichtsvergrößerung (40-fach) (A, C, E); Detailvergrößerung (200-fach) (B, D, F); CD40L^{-/-}-Mäuse (A, B), Wildtyp-Kontrollmäuse (C, D), mock-infizierte Mäuse (E, F).

CD40L^{-/-}-Mäuse wiesen eine stark verringerte Zelldichte parvalbumin-positiver Neurone auf.

4.7 Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels TaqMan-PCR

Im Verlauf der Scrapie-Infektion sind Änderungen in der Expression zahlreicher Gene feststellbar. Zu den Genen, deren Expression im Gehirn scrapie-infizierter Mäuse erhöht ist, gehören Lysozym M, OAS und GFAP (Kopacek, 2000; Riemer, 2000).

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der TaqMan-PCR untersucht werden, ob und wie sich die Expressionslevel der Gene für Lysozym M, OAS und GFAP in den CD40L^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen im Verlauf der Scrapie-Infektion verändert.

Die Abbildung 9 zeigt die relative Veränderung der Expressionslevel dieser Gene in den CD40L^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt 125 dpi und zum terminalen Zeitpunkt anhand von je 2 repräsentativen Einzelwerten pro Zeitpunkt. Die mRNA-Vergleichslevel der Wildtyp-Mäuse sind in dieser Abbildung nicht gesondert dargestellt, sie entsprechen dem Wert 1. Die Expressionslevel von Lysozym M, einem Gen, das von aktivierten Mikroglia exprimiert wird, waren zum Zeitpunkt 125 dpi in den CD40L^{-/-}-Mäusen um den Faktor 10,6 bzw. 11,2 erhöht. Zum terminalen Zeitpunkt lagen die Level um das 1,8- bzw. 1,9-fache über denen der Wildtyp-Mäuse. Eine verstärkte Lysozym M-Expression ist somit in CD40L^{-/-}-Mäusen sowohl zum Zeitpunkt 125 dpi als auch terminal feststellbar, zum frühen Untersuchungszeitpunkt ist der Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen aber deutlich stärker ausgeprägt. Die Genexpressionslevel des Apoptosemarkers OAS lagen in den Gehirnen der CD40L^{-/-}-Mäuse zum Zeitpunkt 125 dpi um das 4,4- bzw. 6,4-fache über dem durchschnittlichen Level in Wildtyp-Mäusen, während sie zum terminalen Zeitpunkt nahezu identisch zum entsprechenden Wildtyp-Level waren. Eine Erhöhung war hier also nur im asymptomatischen Stadium feststellbar. Die Bestimmung der Expressionslevel für den Astrozytenaktivierungsmarker GFAP erbrachte schließlich weder für den Zeitpunkt 125 dpi noch für den terminalen Zeitpunkt nennenswerte Unterschiede zwischen CD40^{-/-}-Mäusen und den Kontrolltieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden auf der Proteinebene aus der immunhistochemischen Untersuchung der GFAP-Immunreaktivität.

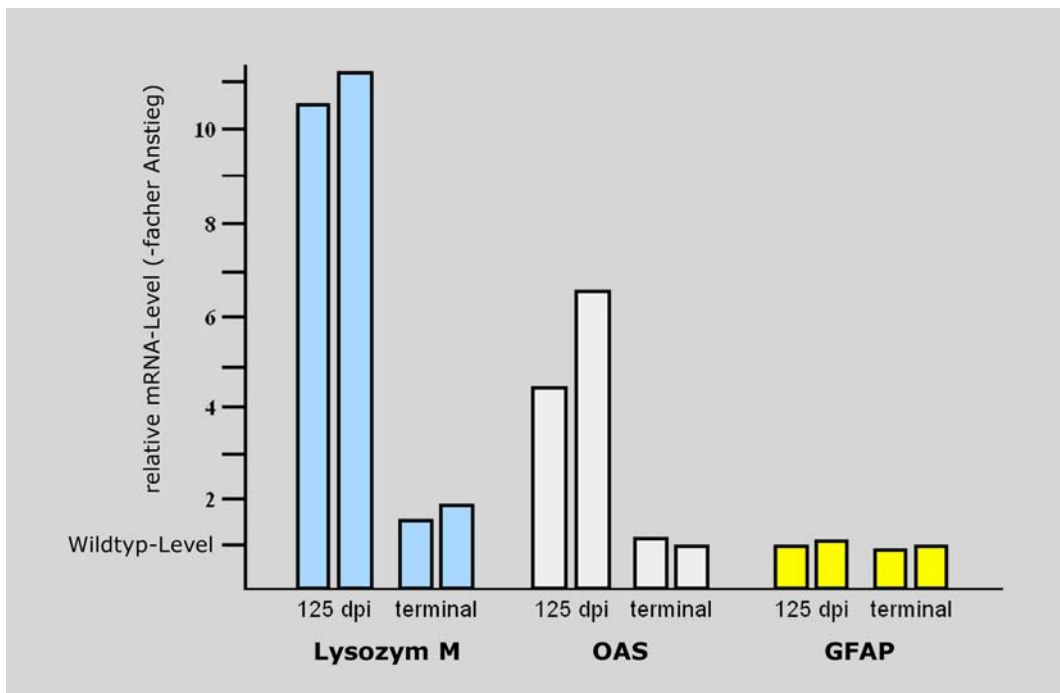


Abbildung 9: Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels TaqMan-PCR. Anstieg der Genexpressionslevel von Lysozym M, OAS und GFAP in $CD40L^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zum durchschnittlichen Expressionlevel in Wildtyp-Kontrollmäusen. Jeder Balken stellt eine repräsentative Einzelmessung der Genexpression im Gehirn einer Maus dar. Die Expressionslevel von Lysozym M waren zum Zeitpunkt 125 dpi in den $CD40L^{-/-}$ -Mäusen um den Faktor 10,6 bzw. 11,2 erhöht. Zum terminalen Zeitpunkt lagen die Level um das 1,8- bzw. 1,9-fache über denen der Wildtyp-Kontrollmäuse. Die Genexpressionslevel für OAS lagen zum Zeitpunkt 125 dpi um das 4,4- bzw. 6,4-fache über dem durchschnittlichen Level in Wildtyp-Kontrollmäusen, zum terminalen Zeitpunkt waren sie nahezu identisch zum entsprechenden Wildtyp-Level. Die GFAP-Expressionslevel in $CD40L^{-/-}$ -Mäusen lagen weder zum Zeitpunkt 125 dpi noch zum terminalen Zeitpunkt über den Leveln in den Wildtyp-Kontrollmäusen.