



**Nachweis einzelner krankheits-assoziiierter
Proteinaggregate
als diagnostische Methode für Prionkrankheiten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Franziska Henke

aus Leipzig

Düsseldorf, November 2009

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Abgabedatum

19. November 2009

Tag der mündlichen Prüfung

8. Dezember 2009

Betreuer

Prof. Dr. D. Willbold

2. Gutachter

Prof. Dr. D. Riesner

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate, kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, 19. November 2009

Franziska Henke

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Willbold, der mir diese Doktorarbeit in seinem Institut ermöglicht hat. Durch die Denkweise eines Chemikers sind interessante Diskussionen entstanden, die das Thema dieser Arbeit von einer anderen Seite beleuchtet haben. Bei Herrn Prof. Riesner möchte ich mich für seine stetiges Interesse an dieser Arbeit bedanken. Mit seinen Ideen hat er mir im Verlauf dieser Arbeit oft weitergeholfen.

Bei Eva Birkmann möchte ich mich für ihre tolle Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken. Danke für die tolle Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen, wenn auch nicht immer wissenschaftlicher Natur.

Danken möchte ich auch den restlichen Angehörigen der kleinen FCS-Gruppe Oliver Bannach und Elke Reinartz für die packenden Gesprächsrunden über die Sterne, Monde und andere unbekannte Bildobjekte am Bildschirmhimmel. Ohne die große Hilfe von Oliver Bannach und Fabian Dreßen wäre eine Auswertung dieser Bildobjekte nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Raum 72; Tommy und Toni, Lars, Steffen, Agi und Eva. Auch wenn es manchmal etwas schwierig war, sich in einem "Großraumbüro" etwas zurückzuziehen, möchte ich die wissenschaftlichen, persönlichen und topmodischen Konversationen nicht missen.

Bei allen Mitgliedern der Prionis und den anderen Arbeitsgruppen im Institut möchte ich für das tolle Arbeitsklima danken. Es war auch immer die Möglichkeit gegeben, bei Problemen sich im Institut zu besprechen, was oft eine Menge Arbeit erspart oder zu neuen Ideen geführt hat.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung erst diesen Weg ermöglicht haben. Bei meiner ganzen Familie möchte ich mich für die seelische Unterstützung bedanken und ihr stetes Interesse an meiner Arbeit. Danke.

Ein sehr liebevoller Dank ist an Sven gerichtet, der gerade zum Abschluss dieser Arbeit für mein leibliches Wohlbefinden gesorgt hat und mich immer wieder zum Lachen bringt.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Neurodegenerative Krankheiten.....	1
1.2 Prionkrankheiten	1
1.2.1 Scrapie.....	3
1.2.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie.....	4
1.2.3 Humane Prionkrankheiten.....	5
1.3 Das Prion-Protein	7
1.3.1 Die Prionhypothese	7
1.3.2 Zelluläres Prion-Protein	8
1.3.3 PrP ^C vs. PrP ^{Sc}	9
1.3.4 Prion-Stämme	10
1.3.5 Replikationsmodelle des Prion-Erregers.....	11
1.4 Erreger-Propagation.....	12
1.5 Diagnose von Prionkrankheiten.....	14
1.5.1 Molekulare Diagnose	14
1.5.2 Aktuelle diagnostische Ansätze.....	16
1.6 Fragestellung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Biologische Sicherheit.....	21
2.2 Chemikalien	21
2.3 Proteingelelektrophorese (SDS-Page).....	22
2.3.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	22
2.3.2 Comassiefärbung von Proteingelen.....	24
2.4 Semy-dry Western-Blot.....	24
2.5 Dot-Blot	25
2.6 Immunologischer Proteinnachweis	25

2.7	Rekombinantes Prion-Protein	26
2.8	Humane Hirnproben.....	26
2.9	Homogenisierung von humanen Hirngewebe	27
2.10	Reinigung von PrP^{CJD} aus Hirngewebe	27
2.10.1	NaPTA-Fällung mit Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	27
2.10.2	NaPTA-Fällung ohne MgCl ₂	28
2.11	Proteolyse mit Proteinase K.....	29
2.12	Kovalente Bindung von Antikörpern	29
2.12.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen	30
2.12.2	Protokoll zur kovalenten Bindung von Proteinen an Glasoberflächen.....	31
2.13	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	32
2.14	Verwendete Antikörper	34
2.15	Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.16	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	35
2.16.1	Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	35
2.16.2	Zweifarbenanalysen	36
2.16.3	Imaging mit der FCS-Apperatur	36
2.16.4	Auswertung der Bilddaten	37
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Kovalente Bindung des Capture-Antikörpers an den Glasboden der Microtiterplatte.....	41
3.1.1	Bestimmung der einzusetzenden Capturemenge	43
3.1.2	Kovalente Bindung des Captures in Abhängigkeit vom pH-Wert	45
3.1.3	Kovalente Bindung des Captures in Abhängigkeit von der Spacerkonzentration	46
3.2	Adaption und Optimierung von Surface-FIDA zum Nachweis einzelner PrP^{CJD}- Partikel.....	48
3.2.1	Single particle counting – Messung und Auswertung.....	49
3.2.2	Erhöhung der Spacerkonzentration.....	54
3.2.3	Analyse der Spaceraktivierung.....	55
3.2.4	Capture-vermittelte Bindung der Prion-Protein-aggregate	56
3.2.5	Optimierungen zur Targetbindung.....	57
3.2.6	Optimierung der Detektion von PrP ^{CJD}	69
3.3	Detektion von PrP^{CJD} in Hirngewebe	73

3.3.1	Sensitivitätsbestimmungen.....	74
4	DISKUSSION.....	79
4.1	Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose von humanen Prionkrankheiten	79
4.2	Anforderungen an eine Methode zur frühzeit-igen Diagnose von humanen Prionkrankheiten	82
4.3	Nachweis von Prion-Proteinaggregaten mittels Surface-FIDA	83
4.3.1	Verwendung eines PEG-Spacers zur kovalenten Bindung des Capture mit der Glasoberfläche.....	84
4.3.2	Einzelpartikelnachweis (single particle counting).....	86
4.3.3	Optimierung von Präparation und Nachweis von PrP ^{CJD}	87
4.3.4	Sensitivitätsbestimmungen mit Surface-FIDA.....	90
4.4	Surface-FIDA als diagnostischer Ansatz zur Diagnose humaner Prionkrankheiten .	92
4.5	Ausblick.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	SUMMARY	99
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
8	LITERATUR.....	103

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.2-1 Scrapie (Traberkrankheit)	3
Abbildung 1.2-2 An BSE-erkrankte Kuh	5
Abbildung 1.2-3 BSE und vCJD-Fälle in Großbritannien.....	6
Abbildung 1.3-1 Struktur von PrP ^C und Strukturmodelle von PrP ^{Sc}	9
Abbildung 1.3-2 Replikationsmodelle des Prion-Erregers.....	12
Abbildung 1.4-1 Ausbreitung und Transport von Prionen im menschlichen Körper.	13
Abbildung 1.5-1 Diagnostischer Ansatz Surface FIDA.....	18
Abbildung 2.3-1 Proteinstandard.....	23
Abbildung 2.10-1 Schematische Darstellung der NaPTA-Fällungen.....	29
Abbildung 2.12-1 Spacer NHS-PEG-COOH.....	30
Abbildung 2.13-1 Excitations- und Emissionsspektrum von Alexa Fluor Farbstoffen	32
Abbildung 2.16-1 Schematische Darstellung einer FCS- Messung und Auswertung	36
Abbildung 3.1-1 Schema der kovalenten Bindung von Biomolekülen an Glas	43
Abbildung 3.1-2 Kovalente Immobilisierung des Capture-Antikörpers Saf32	44
Abbildung 3.1-3 Bindung von Capture-Antikörpern in Abhängigkeit von dem pH-Wert	46
Abbildung 3.1-4 Nachweis der kovalenten Bindung des Capture-Antikörpers	47
Abbildung 3.2-1 Ablaufschema: Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten	49
Abbildung 3.2-2 Auswertung der Bilddaten	52
Abbildung 3.2-3 Bestimmung der Scanposition in z-Richtung.....	54
Abbildung 3.2-4 Erhöhung der Spacerkonzentration	55
Abbildung 3.2-5 Analyse der Spaceraktivierung	56
Abbildung 3.2-6 Capturevermittelte Bindung von Prion-Proteinaggregaten.....	57
Abbildung 3.2-7 PTA-Fällung mit MgCl ₂	58
Abbildung 3.2-8 Detektion von PrP ^{CJD} -Partikeln vor PrP ^C -Hintergrund	60
Abbildung 3.2-9 Fällung ohne MgCl ₂	61
Abbildung 3.2-10 Vergleich der NaPTA-Fällungen von PrP ^{CJD}	62
Abbildung 3.2-11 Vergleich der Targetresuspendierung und -inkubation.....	63
Abbildung 3.2-12 Analyse verschiedener Mengen an Hirngewebe.....	64
Abbildung 3.2-13 Sedimentation des Targets mittels Zentrifugation	65
Abbildung 3.2-14 Waschschrte mit SDS nach Targetinkubation.....	66
Abbildung 3.2-15 Protokoll zur Immobilisierung und Detektion von Prion-Proteinaggregaten..	68
Abbildung 3.2-16 Test verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper als Sonden.....	70

Abbildung 3.2-17 Detektion von Prion-Proteinaggregaten mittels Saf32 und 12F10	71
Abbildung 3.2-18 Parallele und serielle Inkubation der Sonden.....	72
Abbildung 3.3-1 Detektion von PrP ^{CJD} in Hirnproben	74
Abbildung 3.3-2 Nachweis von rek huPrP	75
Abbildung 3.3-3 Nachweis von PrP ^{CJD} verdünnt in sCJD-negativen Hirngewebe.....	76
Abbildung 4.1-1 Bereiche, die von einer frühzeitigen Diganose der TSE profitieren.....	81
Abbildung 4.3-1 Modell: Surface-FIDA nach Optimierung.....	84
Abbildung 4.3-2 Kovalente Bindung des Captureantikörpers an die Glasoberfläche	85
Abbildung 4.3-3 Vergleich der Auswertung von Immunoassays	87
Abbildung 4.3-4 Vergleich der NaPTA-Fällung von PrP ^{Sc} mit und ohne PK.....	88
Abbildung 4.3-5 Flächenerfassung bei einer Messung.....	91

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.2-1 Prionkrankheiten bei Mensch und Tier	2
Tabelle 1.3-1 Die Eigenschaften von PrP ^C und PrP ^{Sc} im Vergleich.....	10
Tabelle 1.5-1 <i>Post mortem</i> Schnelltests für Prionkrankheiten	15
Tabelle 2.8-1 Verwendete humane Hirnproben	26
Tabelle 2.14-1 Verwendete Antikörper	34
Tabelle 4.4-1 Vorteile von Surface-FIDA im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität.....	93

1 EINLEITUNG

1.1 Neurodegenerative Krankheiten

Neurodegenerative Krankheiten sind Erkrankungen des Gehirns bzw. des zentralen Nervensystems (ZNS) und sind vor allem durch einen Verlust des Nervengewebes gekennzeichnet. Der Verlust der Neuronen verläuft progressiv und ist irreversibel. Die dadurch hervorgerufenen schwerwiegenden Funktionsstörungen des Gehirns führen letztendlich zum Tod. Zu den neurologischen Symptomen gehören vor allem Störungen des Bewegungsapparates und Demenz. Die häufigsten neurodegenerativen Krankheiten sind die Alzheimer-Krankheit und die Parkinson-Krankheit, seltener treten die Chorea Huntington oder die Prionkrankheiten auf. Alle Krankheiten gehen mit der Ablagerung von fehlgefalteten Proteinen einher, die toxisch für die Nervenzellen sind. Aus diesem Grund wird diese Gruppe der neurodegenerativen Krankheiten auch als Proteinfehlfaltungskrankheiten bezeichnet.

1.2 Prionkrankheiten

Im Gegensatz zu den meisten neurodegenerativen Krankheiten sind Prionkrankheiten nicht nur genetisch oder sporadisch bedingt, sondern können auch übertragen werden. Der Name der Krankheiten beruht auf dem ungewöhnlichem Erreger, dem Prion, einer abnorm gefalteten Isoform des körpereigenen Prion-Proteins (Kapitel 1.3). Prionkrankheiten kommen sowohl beim Menschen als auch beim Tier vor (Überblick in Tabelle 1.2-1). Zu den Prionkrankheiten gehören unter anderem die Traberkrankheit (Scrapie) beim Schaf, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen.

Die gemeinsamen Charakteristika aller Prionkrankheiten sind lange symptomlose Inkubationszeiten von mehreren Jahren, während der Krankheitsverlauf sich über einen Zeitrahmen von Monaten bis zu wenigen Jahren erstreckt. Zunächst treten vor allem Störungen der Bewegungskoordination (Ataxie) auf; beim Menschen sind die kognitiven Probleme und später die Demenz besonders schwerwiegend.

Während des Fortschreitens der Krankheit kommt es im ZNS zu einer Vakuolisierung des Neuropils, einer abnormalen Vermehrung von Gliazellen und zu einem Verlust an Neuronen. Lichtmikroskopisch wird die Vakuolisierung des Neuropils und der Nervenzellverlust durch schwammartige (spongiforme) Veränderungen sichtbar. Aufgrund der Übertragbarkeit der Krankheit und der spongiformen Degeneration des Hirngewebes wird auch der Begriff transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) für Prionkrankheiten verwendet. Neben den neuromorphologischen Veränderungen treten zudem extrazelluläre plaqueartige Ablagerungen in Form von amorphen Aggregate und amyloiden Strukturen auf, welche überwiegend aus dem Prion-Protein bestehen. Entzündungen oder eine Immunantwort, wie bei anderen infektiösen Krankheiten, bleiben aus.

Tabelle 1.2-1 Prionkrankheiten bei Mensch und Tier

Krankheit	Wirt	Ursache
Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	Mensch	
<i>Iatrogen (iCJD)</i>		Infektion durch medizinische Unfälle
<i>Familiär (fCJD)</i>		Keimbahnmutation im Prion-Protein-Gen
<i>Sporadische (sCJD)</i>		Spontane Umfaltung des Prion-Proteins/somatische Mutation
<i>Neue Variante (vCJD)</i>		Übertragung durch kontaminierte Rinder-Produkte
Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom (GSS)	Mensch	Keimbahnmutation im Prion-Protein-Gen
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	Mensch	Keimbahnmutation im Prion-Protein-Gen
Scrapie	Schaf, Ziege	Sporadisch oder Infektion
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Infektion durch Scrapie-kontaminiertes Futter
Transmissible Nerz-Enzephalopathie (TME)	Nerz	Infektion durch kontaminiertes Futter
Chronische auszehrende Krankheit (CWD)	Hirsch, Elch	Unbekannt, horizontal übertragbar
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Katzen	Infektion durch kontaminiertes Futter
Exotische Huftier-Enzephalopathie	Nyala-, Kudu-Antilope	Infektion durch kontaminiertes Futter

1.2.1 Scrapie

Die Scrapie-Krankheit bei Schafen ist in Großbritannien bereits 1732 beschrieben worden, und ist damit die Prionkrankheit, die als erste entdeckt wurde. Der Name Scrapie rührt von der Tendenz der erkrankten Schafe her, sich die Wolle abzuschuern (von engl. *scrape* = „kratzen“), wie in Abbildung 1.2-1 B gezeigt wird. Erste klinische Symptome von Scrapie sind Ruhelosigkeit und eine gewisse Nervosität der Tiere. Ferner treten neben dem starken Juckreiz Störungen der Körperkoordination zum Beispiel beim Laufen auf, die auf Beeinträchtigungen des Kleinhirns hindeuten. Gelegentlich wird eine übermäßige Flüssigkeitszufuhr durch Trinken (Polydipsie) beobachtet. Die Variation der Symptome ist durch Funktionsverluste verschiedener Teile des Gehirns zu erklären.

In Deutschland wurde die Traberkrankheit (aufgrund des trabartigen Ganges der Schafe) erstmals im Jahr 1759 von dem Veterinärmediziner Leopoldt als ansteckende Krankheit beschrieben (Leopoldt 1759). Zwischen 1920 und 1950 war Scrapie ein großes Problem, da eine große Anzahl an englischen Suffolk-Schafen erkrankten. Wahrscheinlich war der internationale Handel mit diesen Schafen für die Verbreitung von Scrapie in weitere Länder verantwortlich.



Abbildung 1.2-1 Scrapie (Traberkrankheit)

A Erstbeschreibung der Übertragbarkeit der Traberkrankheit durch Johann George Leopoldt 1759. **B** An Scrapie erkranktes Schaf mit starkem Wolleverlust (Bild nach D. C. Gajdusek).

Scrapie war die erste Prionkrankheit, mit der die Infizierbarkeit von gesunden Schafen mit Rückenmarksgewebe von erkrankten Schafen nachgewiesen werden konnte (Cuillé and Chelle 1936). Es wird vermutet, dass sich Schafe in der Natur während oder direkt nach der Geburt infizieren (Pattison *et al.* 1974), da die meisten Schafe im Alter von zwei bis fünf Jahren erste Symptome aufweisen. Bei Scrapie spielt außerdem die Prion-Proteinsequenz (s. Kap. 1.3) des Schafes eine große Rolle in Bezug auf die Suszeptibilität. Auch bei Ziegen wurde Scrapie festgestellt (Dickinson 1976; Detwiler

1992). Eine erste speziesübergreifende Übertragung der Scrapie-Krankheit auf Maus konnte durch Chandler (1961) dokumentiert werden. Die Übertragung auf den syrischen Goldhamster erfolgte etwas später durch Marsh und Kimberlin (1975). Aufgrund der kürzeren Inkubationszeiten wurden daraufhin *in vivo*-Modellsysteme wie Maus und Hamster für die Grundlagenforschung der Prionkrankheiten verwendet. Eine Übertragbarkeit von Scrapie auf den Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

1.2.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

In Großbritannien gewann in den 1990iger Jahren die BSE an ökonomischer Bedeutung, die nur 1 bis 2 Jahre nach dem 1. Auftreten als Prionkrankheit indentifiziert werden konnte (Wells *et al.* 1987). Der Ursprung der BSE-Epidemie beruht höchstwahrscheinlich auf der Verfütterung von nicht ausreichend dekontaminierten Tiermehl aus Schlachtabfällen von Schafen, die an Scrapie erkrankt waren. Hierdurch wurde vermutlich die Artenbarriere überwunden (Wilesmith *et al.* 1991). Bei Übertragungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine orale Übertragung von BSE möglich ist (Anderson *et al.* 1996). Die meisten Tiere erkrankten in einem Alter von vier bis fünf Jahren, wobei sich die Inkubationszeit von 18 Monaten bis über mehrere Jahre erstrecken kann. Die Symptome beinhalten Verhaltensänderungen wie erhöhte Reizbarkeit und Nervosität, sowie Aggressivität der Tiere. Das Schwanken und Taumeln (Ataxie) sowie das Muskelzittern (Tremor) deuten auf das Fortschreiten der Krankheit hin (siehe auch Abbildung 1.2-2).

Das gehäufte Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie bei Rindern löste in Großbritannien Mitte der achtziger Jahre große Besorgnis über die Ausmaße der Krankheit aus. Die Verfütterung von Tiermehl an Rinder wurde 1988 in Großbritannien und 1994 in Frankreich verboten. 1996 wurde vom Amt für Gesundheit des Vereinigten Königreichs bekannt gegeben, dass der BSE-Erreger auf den Menschen übertragen wurde.



Abbildung 1.2-2 An BSE-erkrankte Kuh
(Bild nach D. C. Gajdusek)

1.2.3 Humane Prionkrankheiten

Die Kuru-Krankheit wurde 1957 das erste Mal von Gajdusek und Zigas bei Stämmen der Fore auf Neu Guinea beschrieben (Zigas and Gajdusek 1957). Stammesangehörige präparierten die Gehirne der Toten als rituelle Speise oder verteilten sie auch auf der Haut, um den Geist der Vorfahren zu ehren. Beim Vergleich histopathologischer Schnitte des Hirngewebes von an Kuru-Verstorbenen stellte sich eine Ähnlichkeit zwischen Scrapie und Kuru heraus, die das erste Mal von Hadlow (1959) als „*Scapie-Kuru-Connection*“ beschrieben wurde. Im gleichen Jahr wurde auch eine große Übereinstimmung mit der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, die schon in den zwanziger Jahren durch Hans G. Creutzfeldt und Alfons M. Jakob beschrieben wurde, dargelegt (Klatzo *et al.* 1959). Der infektiöse Charakter von Kuru konnte erst 1966 durch Inokulationsexperimente mit Schimpansen bestätigt werden (Gajdusek *et al.* 1966).

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (englisch: *Creutzfeldt-Jakob disease*; CJD) ist, die beim Menschen am häufigsten auftretende Prionkrankheit und kann in verschiedenen Formen auftreten. In 80 bis 90 % der Fälle tritt die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sporadisch (sCJD) auf. Des Weiteren gibt es die familiäre CJD (fCJD), die autosomal-dominant vererbt wird und 10 % der Fälle ausmacht. Die iatrogen erworbene CJD (iCJD) wurde durch medizinische Eingriffe verursacht, wie der Verwendung von kontaminierten Operationsbesteck, der Transplantation erregerrhaltiger Hirnhautpräparate oder der Verabreichung kontaminierter Wachstumshormone. In den genannten Fällen war die lange Inkubationszeit und die ungewöhnliche Resistenz des

Erregers gegenüber den normalen Desinfektionsmethoden nicht bekannt. Aus den iatrogenen Fällen lies sich eine Inkubationszeit von 15 bis 28 Monaten ableiten. Eine weitere Form von CJD wird als neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) bezeichnet, welche höchstwahrscheinlich durch den Verzehr von BSE-kontaminierten Nahrungsmitteln hervorgerufen wurde. Der erste vCJD-Fall ist 1995 in Großbritannien diagnostiziert worden (Chazot *et al.* 1996). Die Vermutung eines Zusammenhangs von BSE und vCJD entstand durch die Häufung der vCJD-Fälle in Großbritannien im zeitlichen Zusammenhang mit der BSE-Epidemie (Vergl. Abbildung 1.2-1). Untersuchungen ergaben, dass sich die proteinösen Ablagerungen sowie die Läsionsmuster im Gehirn bei BSE und vCJD mehr ähneln als bei vCJD und sCJD (Bruce *et al.* 1997). BSE ließ sich in Infektionsstudien auf Makaken übertragen (Lasmezas *et al.* 1996), was auch die Hypothese unterstützt, dass BSE auf den Menschen übertragbar ist.

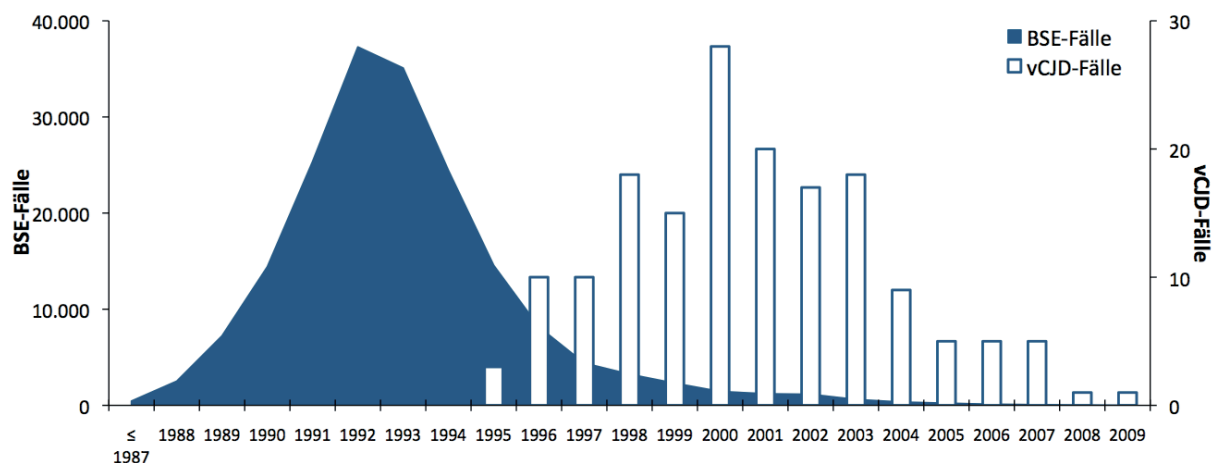


Abbildung 1.2-3 BSE und vCJD-Fälle in Großbritannien

Quelle für BSE-Fälle: OIE World Organisation for Animal Health - Stand 9/2009; Quelle: für vCJD-Fälle: National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit - Stand 07/2009

Bei der sporadischen CJD treten als ein Symptom eine rasch fortschreitende Demenz auf, welche von einem Zittern der Gliedmaßen, unkoordinierten Bewegungen, Zuckungen der Muskulatur und epileptischen Anfällen begleitet wird. Die vCJD dagegen unterscheidet sich von der klassischen CJD durch das Alter der Patienten von im Durchschnitt von 20 bis 30 Jahren im Vergleich zu 65 Jahren bei der klassischen CJD. Zunächst machen sich psychische Symptome, wie Depressionen oder Angstzustände bemerkbar. Die für CJD typische Demenz tritt erst später ein. Im Endstadium der Erkrankung haben die Patienten keinerlei Möglichkeit, mit ihrer Umwelt zu kommunizieren. Die Patienten versterben nach wenigen Monaten bis zwei Jahren.

1.3 Das Prion-Protein

1.3.1 Die Prionhypothese

Zu der Natur des Erregers der Prionkrankheiten wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Eine der ersten beinhaltete, dass es sich um einen Virus handelt. Aufgrund der langen Inkubationszeit wurde der Begriff „*slow virus*“ geprägt (Field 1969). Aber eine ungewöhnlich hohe Resistenz des Erregers gegenüber nukleinsäureschädigender Strahlung sprachen gegen diese Annahme (Alper *et al.* 1966). So wurden erste Vermutungen hinsichtlich eines sich selbst-replizierenden proteinartigem Erreger der Erkrankung (Griffith 1967) geäußert. Aufgrund der Übertragbarkeit des Scrapie-Erregers auf Hamster und Mäuse standen geeignete Modellsysteme, vor allem zur Bestimmung der Infektiosität, zur Verfügung. Versuche, bei denen das infektiöse Material nukleinsäureschädigender Behandlungen unterzogen wurde, zeigten, dass Infektiosität durch solche Behandlungen nicht zerstört wurde. Bei der Behandlung mit proteinschädigenden Techniken hingegen kam es zu einem Verlust an Infektiosität (Prusiner *et al.* 1981). Die Resistenz des Scrapie-Erregers gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Proteinase K (PK) war die Voraussetzung für die spätere Aufreinigung. So konnte belegt werden, dass die Hauptkomponente des Erregers ein Protein war (Bolton *et al.* 1982). Daraufhin wurde von S.B. Prusiner die Prion-Hypothese aufgestellt, die den Erreger als *proteinaceous infectious particle* (Prion) beschreibt (1982). Mittels quantitativer Analysen des gereinigten Scrapie-Erregers konnten Nukleinsäuren als wesentlicher Teil der Infektiosität ausgeschlossen werden (Kellings *et al.* 1992; Riesner *et al.* 1993; Safar *et al.* 2005). Die „*protein only*“ Hypothese besagt, dass der Erreger allein aus Protein besteht; sie wurde weiter bestärkt, als es gelang mit rekombinant hergestellten PrP-Fibrillen im Tierversuch geringe Mengen an Infektiosität nachzuweisen (Legname *et al.* 2004).

Die Aminosäuresequenz des krankheitsassoziierten Proteins wurde analysiert (Prusiner *et al.* 1984) und nachgewiesen, dass das Prion-Protein (PrP) im Wirtsgenom von infizierten als auch in nicht infizierten Organismen zu finden ist (Oesch *et al.* 1985) und als körpereigenes Protein exprimiert wird. Für die Entdeckung der Prionen als neuartigen Erregertyp erhielt Prusiner 1997 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

1.3.2 Zelluläres Prion-Protein

Das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) ist ein membrangebundenes Glykoprotein, welches von jedem Säuger exprimiert wird. PrP^C wird in den Zellen der meisten Organe exprimiert und ist evolutionär hoch konserviert. Die größte Menge an PrP-mRNA wurde in den Nervenzellen gefunden (Kretzschmar *et al.* 1986). Nach der Translation und Transkription erfolgen diverse Modifikationen des PrP^C. Der Glykophosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) wird nach der Abspaltung des C-terminalen Signalpeptides am C-Terminus verknüpft. Eine Disulfidbrücke bildet sich aus und PrP kann bis zu zwei N-Glykosylierungen besitzen. Am N-terminalen Ende treten sich wiederholende Aminosäuresequenzen auf, dieses sogenannte Oktarepeat kann fünf bis sechs Kupfer-Ionen (Cu²⁺) binden. Nach der posttranslationalen Modifikation weist PrP^C je nach Glykosylierung ein Molekulargewicht von 33 bis 35 kDa auf. Wie auch andere Membranproteine wird das PrP^C im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, durchquert den Golgi-Apparat und wird zur Zellmembran transportiert, wo es in Cholesterin-reichen Mikrodomänen wie den Lipid Rafts bzw. Caveolae verbleibt (Vey *et al.* 1996).

Die Funktion des Prion-Proteins ist bis heute noch nicht vollständig bekannt. Versuche mit transgenen Mäusen, deren *PRNP*-Gen deletiert wurde (sogenannte „*Knock-out*“ Mäuse), zeigten, dass diese Tiere lebensfähig sind (Bueler *et al.* 1992) und nur leichte Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *et al.* 1996), beim Geruchsinns (Le Pichon *et al.* 2009) oder eine fehlerhafte Vermehrung und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen (Steele *et al.* 2006) aufwiesen. Trotzdem konnte die genaue Funktion von PrP^C nicht bestimmt werden. Naheliegend sind Funktionen eines Membran-Rezeptors, Adhäsionsmoleküls oder Transportproteins. Wie oben erwähnt, kann PrP^C aufgrund des vorhandenen Oktarepeats mehrere Cu²⁺ Ionen binden (Hornshaw *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997). Zelllinien, die kein PrP exprimierten, wiesen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativen Stress auf. Daraus lässt sich schließen, dass das PrP bei der Kupferaufnahme an Synapsen beteiligt sein könnte. Es wurde vermutet, dass PrP^C eine Superoxiddismutase (SOD) Aktivität besitzt (Brown *et al.* 1997). Außerdem spielt PrP bei der Stabilität von Zell-Zell-Kontakten während der embryonalen Entwicklung eine Rolle, was auch die hohe Konservierung des Prion-Proteins erklären würde (Malaga-Trillo *et al.* 2009).

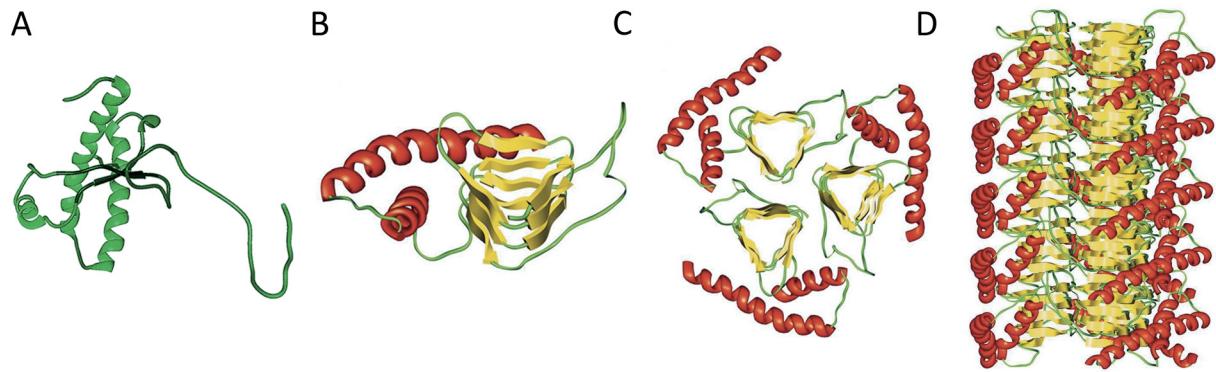


Abbildung 1.3-1 Struktur von PrP^C und Strukturmodelle von PrP^{Sc}

[A] NMR-Struktur des rekombinanten PrP mit den Aminosäuren 90 – 230 des syrischen Goldhamsters (verändert nach (Liu *et al.* 1999)). Das entspricht der Sequenz des, mit PK behandelten, N-terminal verkürzten PrP^{Sc}. **[B]** Auf elektronenmikroskopischen Daten von 2D-Kristallen beruhendes Strukturmodell von PrP27-30 als Einzeldarstellung von PrP^{Sc}; **[C]** als Trimer; und **[D]** als Fibrille aus übereinandergelagerten Trimeren (verändert nach (Govaerts *et al.* 2004)).

1.3.3 PrP^C vs. PrP^{Sc}

Das zelluläre Prion-Protein PrP^C unterscheidet sich weder in der Aminosäuresequenz noch in den posttranslationalen Modifikationen von dem Pathogen-assoziiertem Prion-Protein PrP^{Sc} (Stahl *et al.* 1993). PrP^{Sc} weist jedoch eine andere Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur auf. So besitzt PrP^C zu 42 % hauptsächlich eine α -helikale Struktur (siehe Abbildung 1.3-1). Die krankheits-assoziierte Isoform PrP^{Sc} hingegen wird von einer β -Faltblatt-Struktur dominiert (43 %), wobei der α -helikale Anteil 30 % beträgt (Pan *et al.* 1993). Neben den strukturellen Eigenschaften wurden weitere Unterschiede der beiden Isoformen in Bezug auf das biophysikalische und biochemische Verhalten festgestellt (siehe auch Tabelle 1.3-1). Im Gegensatz zu PrP^C ist PrP^{Sc} partiell resistent gegen die proteolytische Hydrolyse durch Proteinase K (PK). Dabei entsteht ein um etwa 70 Aminosäuren N-terminal verkürztes 27-30 kDa großes PrP-Fragment das PrP27-30, auch als resPrP bezeichnet. PrP27-30 bildet regelmäßige amyloide Strukturen („*prion rods*“), die weiterhin infektiös sind (Prusiner *et al.* 1983). PrP^C wird innerhalb weniger Minuten zu kurzen Oligopeptiden abgebaut (McKinley *et al.* 1983) und ist somit vollständig PK-sensitiv. Die meisten diagnostischen Schnelltests (Vergl. Kapitel 1.5.1) bedienen sich der PK-Resistenz als Marker für das krankheitsassoziierte Prion-Protein. Durch Solubilisierungsversuche mit dem ionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde zuvor infektiöses PrP27-30 in eine α -helikale, oligomerische und nicht infektiöse Form umgewandelt (Riesner *et al.* 1996). Die Bildung von unlöslichen Aggregaten des PrP^{Sc} *in vivo* korreliert mit der Infektiosität.

Tabelle 1.3-1 Die Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} im Vergleich

Zelluläre Isoform (PrP^C)	Scrapie Isoform (PrP^{Sc})
Nicht infektiös	Infektiös
Überwiegend α -helikale Struktur	Überwiegend β -Faltblatt Struktur
Monomer	Aggregiert
Löslich in milden Detergenzien	Unlöslich in milden Detergenzien
Proteinase K-sensitiv	Teilweise Proteinase K-resistent

1.3.4 Prion-Stämme

Schon 1961 wurden bei der experimentellen Übertragung von Scrapie auf Ziegen Unterschiede im Krankheitsverlauf festgestellt (Pattison and Millson 1961). Die Einteilung des TSE-Erregers in verschiedene Stämme resultierte aus Untersuchungen mit infizierten Mäusen, die genetisch identisch waren. Obwohl die Tiere den gleichen genetischen Hintergrund und damit die identische PrP-Sequenz besaßen, entwickelten die Mäuse Erkrankungen mit verschiedenen Phänotypen, wie Unterschiede in der Inkubationszeit, der klinischen Symptomatik und der Läsionsmuster im Gehirn (Dickinson *et al.* 1968; Bruce and Fraser 1991). Es wurden fünf Unterscheidungsmerkmale für verschiedene Prion-Stämme analysiert: Klinische Symptomatik, Übertragbarkeit, Inaktivierungsverhalten, PK-Resistenz von PrP^{Sc} sowie Glykosylierungsmuster von PrP^{Sc}. Lange war das Phänomen der Prion-Stämme ein Grund zur Annahme, dass Nukleinsäuren die stammspezifischen Informationen liefern. Heute geht man davon aus, dass die verschiedenen Stammeigenschaften durch variierende Konformationen des krankheitsassoziierten PrP^{Sc} bestimmt werden (Caughey *et al.* 1998; Sigurdson *et al.* 2007). Diese Vermutung wurde auch durch die verschieden starke Resistenz des PrP^{Sc} gegen Proteolyse mit PK gestützt. Zu dem konnte von Safar und Kollegen erstmalig ein PK-sensitiver Anteil des PrP^{Sc} nachgewiesen werden (senPrP^{Sc}). Bei verschiedenen Hamster-Scrapie-Stämmen variierte der Anteil an senPrP^{Sc} zwischen 5 % und 90 % vom Gesamtanteil an krankheitsassoziierten PrP^{Sc}. Somit weisen bei einigen Scrapie-Stämme nur 10 % des pathologischen Prion-Proteins auch PK-Resistenz auf.

1.3.5 Replikationsmodelle des Prion-Erregers

Bei Versuchen mit *Knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese nach Inokulation mit Prionen nicht erkranken (Bueler *et al.* 1992). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Expression des zellulären Prion-Proteins die Voraussetzung für die Vermehrung des Erregers ist und somit für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich ist. Auch die „*protein only*“ Hypothese beschreibt die Vermehrung (Replikation) des Erregers, indem PrP^{Sc} vorhandenes PrP^C strukturell in die krankheitsassoziierte Form umfaltet. Die Basis dieses Prozesses liegt demnach in der dreidimensionalen Struktur des PrP^{Sc}, da codierende Nukleinsäuren als Teil der infektiösen Einheit ausgeschlossen werden konnten (Vergl. Kap. 1.3.1). Den Modellen zur Replikation des Prion-Erregers wird vor allem eine Erklärung zur spontanen, genetischen und infektiösen Form der Krankheit abverlangt. Das Modell der keiminduzierten Aggregation von Jarrett und Lansbury (1993) beruht auf einer nukleationsabhängigen Polymerisation. Der entscheidende Schritt ist dabei nicht die Konversion von PrP^C und PrP^{Sc}, sondern die Bildung eines Nukleationskeims aus PrP (Keimbildung). An diesen Keim lagern sich nur PrP-Moleküle in der PrP^{Sc}-Form an. Die infektiöse Form des PrP besteht aus geordnetem und aggregierten PrP^{Sc}, aus denen durch Fragmentierung eine große Zahl neuer Keime entstehen kann (siehe Abbildung 1.3-2 A).

Ein zweites Modell beinhaltet ein semistabiles Intermediat bei der Bildung von PrP^{Sc} (Cohen *et al.* 1994). PrP^C kann in seltenen Fällen ein teilweise entfaltetes Monomer (PrP*) bilden, welches entweder wieder zurückgefaltet und abgebaut wird oder mit PrP^{Sc} einen Komplex (Heterodimer) bildet und zu PrP^{Sc} konvertiert (Abbildung 1.2-1B). Bei der genetisch bedingten Erkrankung ist laut diesem Modell die Umfaltung von PrP^C zu PrP* begünstigt. Bei der kinetischen Betrachtung des Modells stellte Manfred Eigen (1996) fest, dass bei einer sporadischen Erkrankung der Konversionsprozess extrem langsam ablaufen müsste, um die geringe Inzidenz von Prionkrankheiten zu erklären. Andererseits müsste der katalytische Effekt von PrP^{Sc} sehr hoch sein, damit die Krankheit während der Lebensspanne eines Organismus überhaupt ausbrechen kann. In Folge dessen stellte Eigen das kooperative Heterodimermodell auf (Kooperatives Prusiner Modell). Dabei muss das Zusammenwirken mehrerer PrP^{Sc}-Moleküle erfolgen, um ein PrP^C-Molekül umzuwandeln.

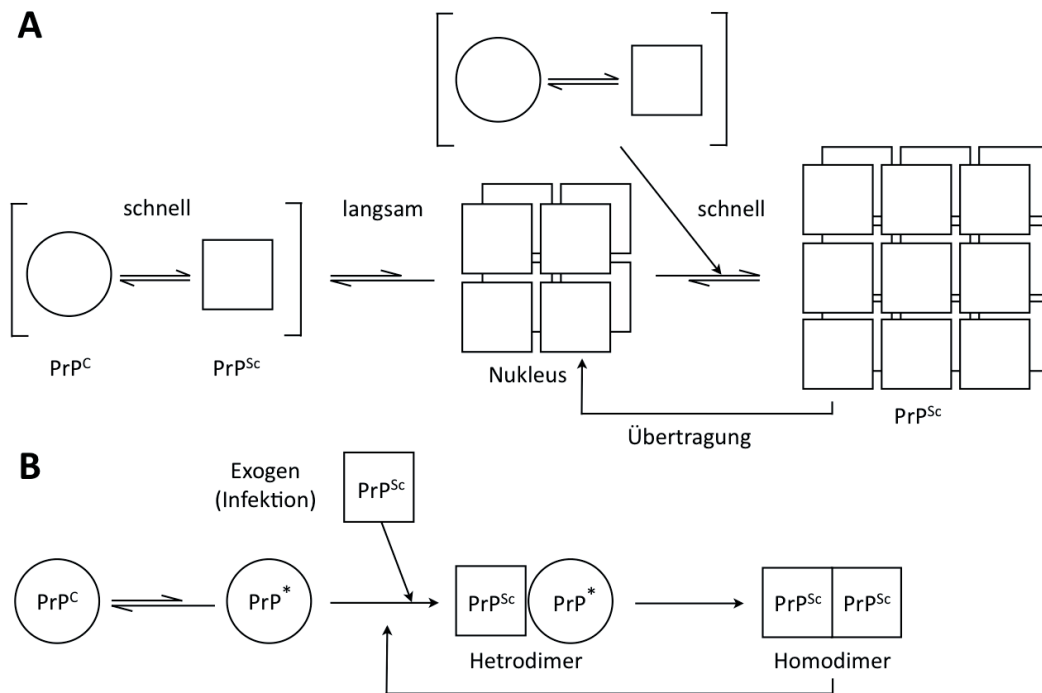


Abbildung 1.3-2 Replikationsmodelle des Prion-Erregers

[A] Modell der keimabhängigen Polymerisation (verändert nach (Jarrett and Lansbury 1993)), entscheidend für die Bildung von PrP^{Sc} ist das Überschreiten einer kritischen Keimgröße. **[B]** Heterodimermodell der Prionreplikation (verändert nach (Cohen *et al.* 1994)), die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} erfolgt über einen heterodimeren Zwischenzustand.

1.4 Erreger-Propagation

Bei der oralen Infektion erfolgt die Adsorption des Erregers über den Darm. Das Pathogen-assoziierte PrP^{Sc} durchquert die Schleimhäute des Verdauungstraktes, in den sogenannten Peyerschen Plaques, und repliziert, vor der Invasion des zentralen Nervensystems und der Entwicklung klinischer Symptome, in den lymphatischen Geweben. Dies wurde durch Experimente mit Scrapie-infizierten Mäusen belegt. Schon eine Woche nach der Inokulation des Scrapie-Erregers, wurde in den Peyerschen Drüsen und in Lymphknoten Infektiosität gefunden (Kimberlin and Walker 1989). PrP^{Sc} gelangt am distalen Dünndarm über die Blutbahn in die Lymphe sowie andere Organe und von dort aus über die peripheren Nerven in das Zentrale Nervensystem (Vergl. Abbildung 1.4-1). Wahrscheinlich erfolgt die Verteilung der Prionen im Körper durch Bindung an das im Blut vorhandene Eisen-transportierende Protein Ferritin (Mishra *et al.* 2004). Die Ausbreitung von PrP^{Sc} in Oligomerform über die Blut-Hirn-Schranke konnte von Banks und Kollegen gezeigt werden (2004). Somit kann PrP^{Sc} sowohl in das Hirngewebe als auch in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gelangen.

PrP^{Sc} wurde auch im Riechepithel (Tabaton *et al.* 2004) sowie im Muskelgewebe von sCJD-Patienten (Glatzel *et al.* 2003) nachgewiesen. In vCJD-Patienten wurden Anhäufungen an PrP^{Sc} sowohl in den Mandeln als auch im Blinddarm und in der Milz gefunden (Hilton *et al.* 2002). In TSE-erkrankten Tieren wurde Infektiosität in Speichel, Milch, Blut und Muskeln festgestellt (Angers *et al.* 2006; Mathiason *et al.* 2006; Lacroux *et al.* 2008). Des Weiteren zeigten Infektionsstudien bei vorheriger Entzündung von Organen, hervorgerufen durch andere Krankheiten, eine höhere Anfälligkeit gegenüber Prionen (Überblick in (Nuvolone *et al.* 2009)).

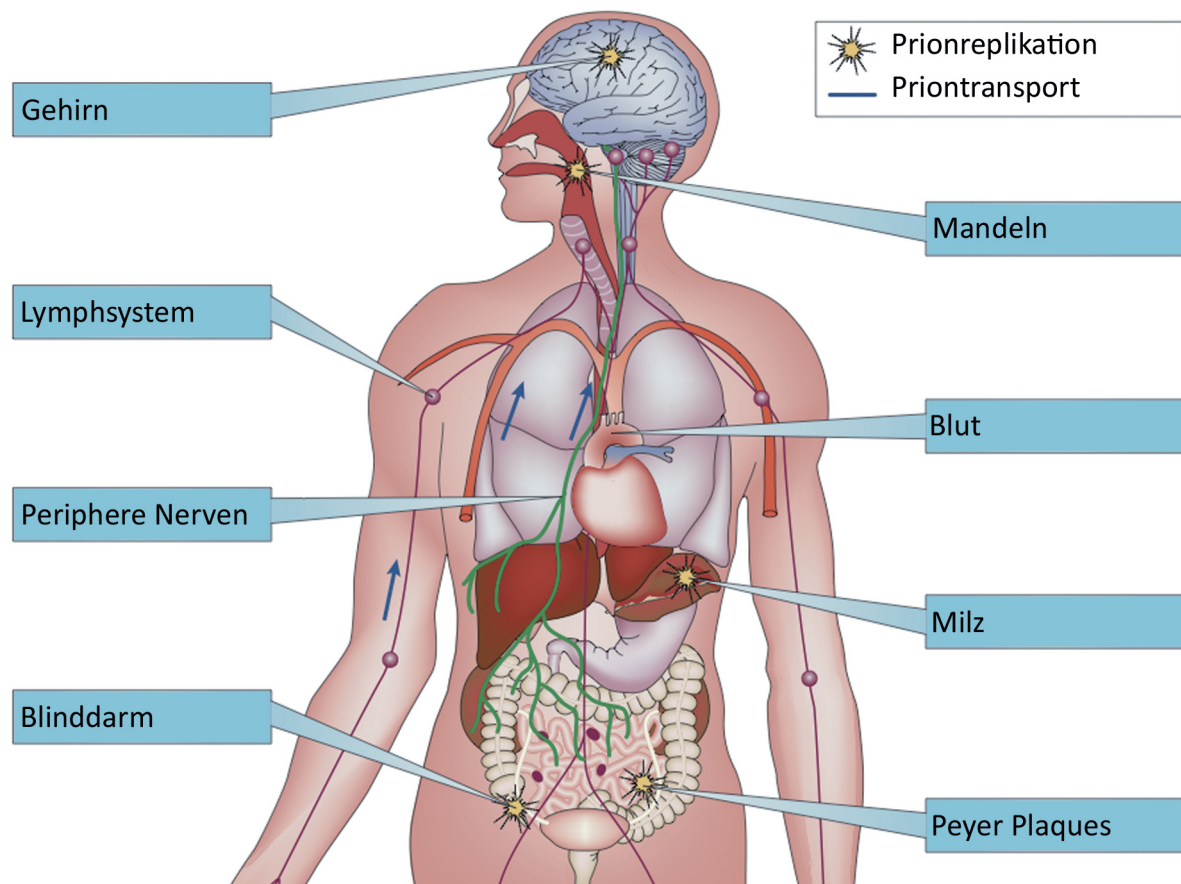


Abbildung 1.4-1 Ausbreitung und Transport von Prionen im menschlichen Körper.

Oral aufgenommenes PrP^{Sc} wird vom Darm, überwiegend an den Peyerschen Plaques, adsorbiert und in die Blutbahn sowie in lymphathische Flüssigkeiten transportiert. Nach einem Replikationsschritt in lymphatischen Organen wie Milz, Blinddarm oder Mandeln wird der Erreger vorwiegend über periphere Nerven ins Gehirn transportiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass PrP^{Sc} direkt über die Blut-Hirnschranke ins Gehirn gelangt (verändert nach (Soto 2004)).

1.5 Diagnose von Prionkrankheiten

Aufgrund der Natur des Erregers ist es eine große Herausforderung, eine sensitive molekulare Diagnostik für Prionkrankheiten zu entwickeln. Die größte Schwierigkeit liegt darin, dass die Krankheit durch die Fehlfaltung eines körpereigenen Proteins hervorgerufen wird und damit kaum eine Immunantwort erfolgt. Die gegenwärtige Diagnose der CJD oder anderer humaner Prionkrankheiten beruht auf klinischen Symptomen wie Demenz, Muskelzuckungen oder Koordinationsstörungen sowie Untersuchungen des Gehirns mittels Elektroenzephalogrammen und der Magnetresonanztomographie (Kretzschmar and Feiden 2002). Das Problem dieser Methoden liegt darin begründet, dass verschiedene Formen der CJD kaum von anderen neurodegenerativen Krankheiten unterschieden werden können. CJD kann zurzeit nur *post mortem* mittels neuropathologischer Untersuchungen und dem biochemischen Nachweis des Pathogen-assoziierten PrP^{Sc} im Hirngewebe bestätigt werden.

Aufgrund des infektiösen Charakters der Prionkrankheiten besteht die Gefahr der Übertragung, wie im iatrogenen Falle der CJD durch den Einsatz von Blutkonserven (Llewelyn *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004; Wroe *et al.* 2006; HealthProtectionAgency 2007) oder gerade in der Gehirnochirurgie. Eine Quantifizierung der Infektiosität ist nur mit Bioassays möglich. Dazu wird das zu untersuchende Material in Tierversuchen intracerebral injiziert und das Auftreten von klinischen Symptomen untersucht. Dabei werden hauptsächlich transgene Mäuse, die das humane PrP-Gen tragen, verwendet. Die Titerbestimmung findet mit Hilfe der Inokulation von einer logarithmischen Verdünnungsreihe statt. Der große Nachteil der Bioassays liegt in der langen Inkubationszeit und damit dem langen Zeitraum bis das endgültige Ergebnis feststeht.

1.5.1 Molekulare Diagnose

Im Zuge der BSE-Krise wurden Schnelltests zum Nachweis von PrP^{Sc} zahlreicher Rinderproben benötigt. So wurden von der Europäischen Union fünf Schnelltests zugelassen, die in Tabelle 1.5-1 zusammengefasst dargestellt sind. Alle BSE-Schnelltests sind Immunoassays, die das PK-resistente krankheitsassoziierte PrP *post mortem* im Hirngewebe nachweisen.

Der Prionics-Check Western beruht auf dem immunologischen Nachweis von resPrP^{Sc} nach einem Western-Blot (Schaller *et al.* 1999). Wohingegen die restlichen Nachweistests mit einem Sandwich-ELISA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) arbeiten. Der CDI (*Conformation dependent immunoassay*) unterscheidet sich etwas von dem ELISA-typischen Prinzip. Dieser konformationsabhängige Immunoassay basiert auf der Erkennung eines strukturabhängiges Epitops, welches bei dem nativen PrP^C zugänglich aber in der PrP^{Sc}-Konformation verdeckt ist (Safar *et al.* 2002). Nach der Denaturierung mit Guanidinhydrochlorid wird im Falle von PrP^{Sc} auch das Epitop entfaltet und eine Antikörperbindung ist möglich. Die Diagnose kann somit durch das Verhältnis der Detektion von denaturiertem und nativen PrP erfolgen. Um Hintergrundsignale des nativen PrP^Cs zu reduzieren wird auch hier eine proteolytischer Schritt mit PK verwendet.

Tabelle 1.5-1 Post mortem Schnelltests für Prionkrankheiten

Test	Testart	Einsatz von PK essentiell	Spezifität	Sensitivität	Vorteil	Nachteil	Nutzung
Prionics-Check Western	Western-Blot	Ja	100 %	75 % bei 10 ⁻¹	Schließt Falsch-Positive aus	Begrenzte Sensitivität	Kontrolle von 8 Mio Rindern
Prionics-Check LIA	Sandwich ELISA	Ja	100 %	100 % bei 10 ⁻²	Schnelligkeit, Automatisierung	Falsch-Positive durch unvollständige PK-Verdauung von PrP ^C	Weniger verwendet als Prionics-Check Western
Enfer TSE Assay	Sandwich ELISA	Ja	100 %	100 % bei 10 ^{-1,5}	Einfach und schnell	Falsch-Positive durch unvollständige PK-Verdauung von PrP ^C	Kontrolle von 3 Mio Rindern in Europa
Bio-Rad TeSeE	Sandwich ELISA	Ja	100 %	100 % bei 10 ⁻²	Hohe Sensitivität	Labor intensiv	Einsatz in Japan als früher Nachweis von BSE
InPro CDI-5 Test	Sandwich ELISA	Nein, wird aber eingesetzt, um Hintergrundsignale zu reduzieren	100 %	100 % bei 10 ^{-1,5}	Detektion von PrP ^{Sc}	Test könnte durch Einsatz von PK an Sensitivität verlieren	Kein Routine-Einsatz

(verändert nach (Lehto *et al.* 2006))

Im Jahr 2004 wurden von der Europäischen Kommission sieben weitere Schnelltests für den Nachweis von BSE zugelassen. Von diesen sieben Tests basieren sechs auf dem Nachweis von PK-resistentem PrP^{Sc}. Damit verlieren diese Immunoassays an Sensitivität, da sie kein senPrP^{Sc} detektieren, was gerade im frühen Stadium der Erkrankung auftreten könnte. Eine Ausnahme bildet der IDEXX HerdChek BSE Antigen EIA Test, der auf eine Behandlung von PK verzichtet. Das zu testende Hirngewebe wird ohne eine Vorbehandlung mit PK auf einer Microtiterplatte inkubiert, die mit einem PrP^{Sc}-spezifischen Polymer (Seprion-Affinitätsligand) beschichtet ist. Der Nachweis des PrP^{Sc} erfolgt hier immunologisch. Der Test erreicht bei einer 1:800 Verdünnung von Hirnhomogenat eine Sensitivität von 80 %. Mit diesem Test konnte Pathogen-assoziiertes PrP im Blut von präklinischen Scrapie-infizierten Schafen detektiert werden (Terry *et al.* 2009). Ein Nachteil dieser Methode ist eine leichte Vorbehandlung der Proben mit Enzymen wie Trypsin, wobei noch nicht geklärt ist, welche Auswirkung das auf vorhandenes senPrP^{Sc} hat (Pastrana *et al.* 2006).

Im Hinblick auf eine *ante mortem* Diagnose von CJD beim Menschen ist die Verwendung von Hirngewebe nicht praktikabel. So werden bei der Diagnose von sCJD Surrogatmarker wie das 14-3-3 Protein im Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) herangezogen (Hsich *et al.* 1996; Zerr *et al.* 1998). Der 14-3-3 Test ist für die neue Variante vCJD nicht anwendbar (Will *et al.* 2000; Huang *et al.* 2003). Des Weiteren tritt eine erhöhte Konzentration des 14-3-3 Proteins im CSF mit dem Absterben von Neuronen auf. Somit ist eine Differenzierung in der Diagnose von Prionkrankheiten zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit nur schwer möglich.

1.5.2 Aktuelle diagnostische Ansätze

1.5.2.1 Nachweis minimaler Mengen an PrP^{Sc} mittels Amplifikation

Ein sehr sensibler Ansatz zur Detektion von PrP^{Sc} im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten ist die zyklische Amplifikation des resPrP^{Sc} *in vitro* (Saborio *et al.* 2001). Dabei induzieren minimale Mengen an PrP^{Sc} die Umfaltung einer großen Menge an PrP^C zu PrP^{Sc}. Durch Ultraschallbehandlung werden die gebildeten PrP^{Sc}-Aggregate zerschlagen und mehr Anlagerungsfläche für neues PrP^C wird frei. Mit dieser Methode, auch als *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA) bezeichnet, können PrP^{Sc}-Partikel zehnmillionenfach vervielfältigt werden (Castilla *et al.* 2005). Der Nachweis von resPrP^{Sc}

erfolgt mittels Western-Blot. Der große Nachteil dieser Methode ist die mögliche spontane Konversion des PrP^C und somit der spontanen Bildung von PrP^{Sc} *de novo* (Deleault *et al.* 2007) was zu falsch-positiven Fällen führen kann. Ein weiterer Nachteil ist die Dauer des PMCA von mehreren Tagen bis Wochen.

1.5.2.2 Nachweis von Prion-Proteinaggregaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Auch in unserem Institut wurde ein diagnostischer Ansatz für Prionkrankheiten entwickelt, welcher auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten PrP-Aggregaten mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) beruht. Der konfokale Aufbau des FCS-Instruments ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzfluktuationen in einem sehr kleinen Volumen im femtoliter-Bereich und damit der Messung sehr geringer Konzentrationen an fluoreszierenden Molekülen. Mit der FCS können Diffusionszeiten sowie das Molekulargewicht von fluoreszierenden Molekülen bestimmt werden. Somit ist eine Unterscheidung von Monomeren und Aggregaten möglich.

In den Experimenten von Pitschke (1998) konnten mit dieser Methode Amyloid- β (A β)-Aggregate im CSF von Alzheimer-Patienten detektiert werden. Für den Nachweis der A β -Aggregate wurden Amyloid- β -Monomere fluoreszenzmarkiert und zu den CSF-Proben von Alzheimer-Patienten und von gesunden Probanden gegeben. Die fluoreszenzmarkierten A β -Monomere lagerten sich an A β -Aggregate an (keiminduzierte Multimerisation) und bildeten so hochfluoreszente A β -Aggregate. In den CSF-Proben der gesunden Probanden wurden nur geringe Fluoreszenzschwankungen der markierten Monomere detektiert, wohingegen in den CSF-Proben der Alzheimer Patienten hohe Intensitätspeaks, aufgrund der mehrfachmarkierten A β -Aggregate gemessen wurden.

Der beschriebene diagnostische Ansatz konnte in unserem Institut von Birkmann *et al.* (2006) auch auf Prionkrankheiten übertragen werden. Die Detektion von hochfluoreszenten Aggregaten beruhte nun nicht mehr auf der Anlagerung von fluoreszenzmarkierten Monomeren, sondern auf der Bindung von fluoreszenzmarkierten Anti-PrP-Antikörpern. So konnten Prion-Proteinaggregate sowohl im Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Hamster als auch BSE-infizierter Rinder nachgewiesen werden. Bei der Vorbehandlung der Hirnhomogenate wurde bewusst auf eine PK-Behandlung verzichtet, um einem Verlust an Sensitivität durch den Abbau von senPrP^{Sc} entgegenzuwirken. Durch die Erweiterung des Spektrometers mit einem

zweiten Laser konnten zwei verschieden markierte Detektionsantikörper als Sonden eingesetzt werden. Mit Hilfe von Koinzidenz-Analysen konnte so die Spezifität für den Prion-Proteinaggregatnachweis erhöht werden. Der zusätzliche Einsatz eines Beamscanners ermöglichte ein aktives Scannen der Lösung nach Prion-Proteinaggregaten. Trotz der technischen und biochemischen Optimierungen sind die Messungen in Lösung durch hohe Standardabweichungen der Messungen aufgrund der Verteilung der Aggregate in Lösung limitiert.

Eine weitere Entwicklung erfolgte durch die Konzentrierung der Prion-Proteinaggregate auf der Glasoberfläche eines Assay-Chips (Birkmann *et al.* 2007). Die Glasoberfläche der Microtiterplatte wurde mit einem PrP-spezifischen Captureantikörper beschichtet und die Prion-Proteinaggregate Capture-vermittelt auf der Oberfläche der Microtiterplatte gebunden (siehe Abbildung 1.5-1). Durch mäanderförmige Bewegung der Laserfoci konnte die Oberfläche systematisch nach den Prion-Proteinaggregaten abgescannt werden. Bei diesem Scannvorgang werden Intensitätenverteilungen über die Zeit aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA). Mit diesem diagnostischen Ansatz Surface-FIDA erfolgte eine signifikante Unterscheidung von Scrapie-infizierten Hamstern sowie BSE-infizierten Rinder von gesunden Tieren unter Verwendung von Hirngewebe. In vorläufigen Experimenten mit CSF von BSE-infizierten Rindern konnten Prion-Proteinaggregate in nicht vorbehandelten BSE-positiven CSF-Proben nachgewiesen werden.

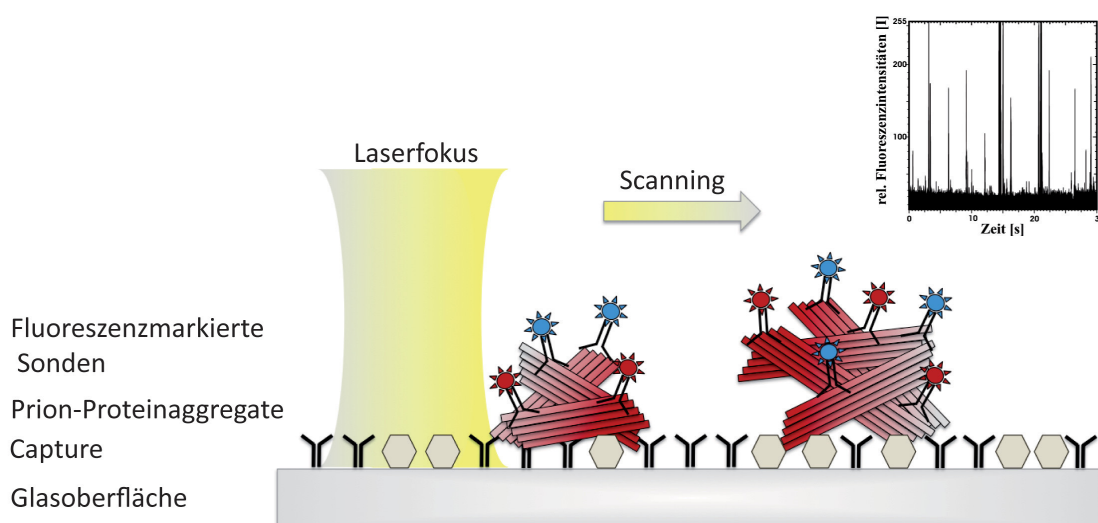


Abbildung 1.5-1 Diagnostischer Ansatz Surface FIDA

Die Glasoberfläche der Microtiterplatte wird mit Poly-D-Lysin beschichtet um einen spezifischen Prionantikörper (Capture) adhäsiv zu binden. Nach der Zugabe der gereinigten Prionen erfolgt die Detektion mit zwei verschieden fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Sonden). Mit Hilfe des FCS wird die Fläche über dem Glas nach hochfluoreszenten Aggregaten abgescannt.

1.6 Fragestellung

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist die am häufigsten vorkommende Prionkrankheit beim Menschen. Der Krankheitsverlauf ist von einer progressiven Degeneration des Nervengewebes gekennzeichnet und führt letztendlich zum Tod. Dabei spielen die für die Nervenzellen toxischen Aggregate bestehend aus dem körpereigenen fehlgefalteten Prion-Protein eine essentielle Rolle. Diese krankheits-assoziierten Prion-Proteinaggregate (PrP^{CJD}) bilden charakteristische Ablagerungen im zentralen Nervensystem von CJD-Patienten. Aufgrund des infektiösen Charakters der Prionkrankheiten hat sich herausgestellt, dass der Erreger neben dem zentralen Nervensystem auch in lymphatischen Geweben und dem Blut zu finden ist. Zurzeit gibt es noch keine *ante mortem* Diagnostik für CJD, die den Erreger auf molekularer Ebene nachzuweisen vermag. Die meisten Schnelltests zur *post mortem* Diagnose von Prionkrankheiten bei Tieren beruhen auf der PK-Resistenz des PrP^{Sc}. Da bekannt ist, dass gerade im Gehirn von CJD-Patienten der größte Teil des PrP^{CJD} PK-sensitiv ist, ist eine Diagnostik, welche auf Proteolyse verzichtet, wünschenswert. Mit dem diagnostischen Ansatz Surface-FIDA stand zu Beginn dieser Arbeit eine Methode zum Nachweis von Prion-Proteinaggregaten im Tiermodell zu Verfügung.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die Methode Surface-FIDA geeignet ist, Prion-Proteinaggregate auch in Hirngewebe humaner Herkunft zu detektieren. Dabei stellte sich die Frage, ob PrP^{CJD} sich gleichermaßen aus Hirngewebe reinigen lässt wie PrP^{Sc} im Tiermodell und die Konzentration an PrP^{CJD} ausreichend ist, um PrP^{CJD} mittels Surface-FIDA zu detektieren. Des Weiteren sollten geeignete PrP-spezifische Antikörper bestimmt werden, um PrP^{CJD} auf dem Glasboden des Assay-Chips zu immobilisieren und darauffolgend zu detektieren. In Folge dessen bestand die wissenschaftliche Fragestellung darin, ob Surface-FIDA für eine Diagnose der CJD beim Menschen adaptiert werden kann.

Neben dem diagnostischen Aspekt ist ein hochsensitiver molekularer Nachweis des Erregers von CJD im Hinblick auf die Sicherheit von Blut- und Gewebebanken essentiell, da iatrogene Übertragungen der CJD bekannt sind und inzwischen auch von ersten Übertragungen bei Bluttransfusionen berichtet wurde.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Biologische Sicherheit

Alle Arbeitsschritte wurden in einem S3**-Labor durchgeführt. Die Tätigkeiten mit infektiösem Probenmaterial des Prion-Erregers erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus HERAsafe, KENDRO Laboratory, Hanau) und unter Anlegen von Ärmelschonern (Sekuroka, Roth, Karlsruhe), sowie zwei Paar Handschuhen. Um eine Kontamination der Umgebung zu verhindern, wurde das zweite Paar Handschuhe nach jedem Verlassen der Werkbank gewechselt. Die Ärmelschoner wurden am Ende der Tätigkeit entsorgt. Zum Pipettieren wurden Pipettenspitzen mit integrierten Filtern von Biozym, Hessisch Oldendorf (SafeSeal-Tips) und Sarstedt, Nümbrecht (Biosphere Filter Tips) verwendet. Die Dekontamination der verwendeten Gegenstände erfolgte, indem der Festabfall in doppelten Lagen Polyamid-Vernichtungsbeuteln (Greiner, Kremsmünster, Österreich) für vier Stunden bei 134°C und bei einem Überdruck von 2,5 bar in wassergesättigtem Dampf autoklaviert wurde. Flüssig- sowie Gewebeabfälle wurden auf 2 M Natronlauge (NaOH) eingestellt und ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte oder Materialien, die im S2-Labor verbleiben und wieder benutzt werden, wurden für mindestens eine Stunde in 2 M NaOH eingelegt und anschließend neutralisiert.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprechen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines „Milli-Q-Wasser“ verwendet, das von der hauseigenen Aufreinigungsanlage mit dem nachgeschaltetem Wasseraufarbeitungssystem EPA Est. 41237-MA-1 (Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert wurde. Dieses wird im folgendem als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ bezeichnet.

2.3 Proteingelelektrophorese (SDS-Page)

Mittels denaturierender, diskontinuierlicher Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) ist es möglich Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde die aufzutrennende Probe in einem 3 %igen Sammelgel konzentriert und dann in einem 12 %igen Trenngel, gemäß der Größe ihrer Komponenten, aufgetrennt. In einer Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Plattengelen wurde die Elektrophorese nach dem Protokoll von Sambrook (1989) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte für 30 Minuten bei 180 Volt und dann für ca. zwei bis drei Stunden bei 300 Volt oder alternativ über Nacht bei 30 Volt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Marker mit Proteinstandard aufgetragen (siehe Abbildung 2.3-1 Proteinstandard).

2.3.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung (30 : 0,8)

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten mit Amberlite MB3 gerührt, um die freie Acrylsäure zu binden, und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

10 x Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli

0,25 M Tris/HCl pH 8,3

1,9 M Glycin

Bei der Elektrophorese wurde eine 1:10-Verdünnung mit 0,1 % SDS verwendet.

Trenngel

380 mM Tris/HCl, pH 8,8

12 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)

0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

124 mM	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
3 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)
0,1 %	SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 %	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
0,1 %	Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Auftragspuffer nach Laemmli

70 mM	Tris/HCl, pH 6,8
5 %	2- β -Mercaptoethanol
2 %	SDS
5 %	Glycerin
0,05 %	Bromphenolblau

Proteinstandard

Es wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder als Molekulargewichtsmarker von Fermentas (Burlington, Ontario, Canada) verwendet.

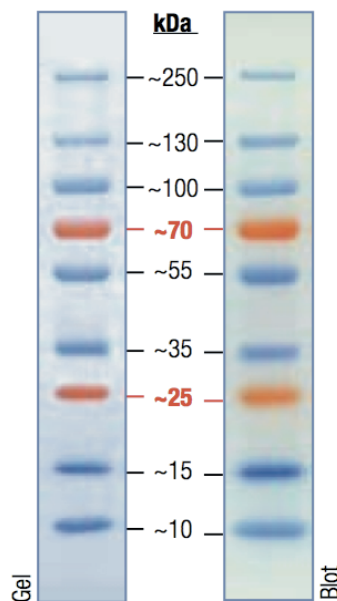


Abbildung 2.3-1 Proteinstandard

Bandenmuster des PageRuler Plus Prestained Protein Ladder in einem 4 – 20 % Tris-Glycin Gel.
Quelle: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/marksm1811.htm>.

2.3.2 Comassiefärbung von Proteingelen

Für den quantitativen Proteinnachweis nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) verwendet, der an die im Gel enthaltenen Proteine bindet. Der Triphenylmethanfarbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt die Proteine quantitativ an. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 bis 1 µg pro Bande. Die Durchführung erfolgte nach dem unten beschriebenen Schema:

- Färbung:* 1 – 3 h in der Färbelösung
(0,1 % Coomassie R-250, 45 % Ethanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v))
- Entfärbung:* nach Bedarf in H₂O_{deion} in der Mikrowelle bei maximaler Stufe für
15 – 30 min kochen (dabei Wasser mehrfach wechseln)

2.4 Semy-dry Western-Blot

Bei diesem Verfahren werden die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix nach SDS-PAGE (s. Kap. 2.3) über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Polyvinylflourid (PVDF) transferiert. Die hier verwendete PVDF-Membran (Millipore GmbH, Billerica, MA, USA) besitzt eine Porengröße von 0,45 µm. Das entspricht einem Ausschlussvolumen von > 10 kDa. Dabei bleibt die Proteinauftrennung der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Bevor die Gelmatrix in die Blotapparatur überführt wurde, erfolgte ein 5 minütiger Waschschrift in 1 x Laemmli ohne SDS. Das an die Proteine angelagerte SDS wurde bei diesem Vorgang ausgewaschen. Die Western-Blot-Aparatur (Semi-Dry Blotter, Sigma-Aldirch, St. Louis, USA) wurde wie folgt von der Anode zur Kathode zusammengestellt:

- drei Chromatographiepapiere (Whatman, 3MM Chr)
- ethanolgetränkte PVDF-Membran
- Gel
- drei Chromatographiepapiere.

Danach erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran für eine Stunde mit 1,5 mA/cm² Gel und maximal 25 V.

2.5 Dot-Blot

Mittels des Dot-Blot-Verfahrens werden Proben unter Vakuum auf eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Zuvor wurde die Membran mit Ethanol getränkt und zusammen mit einem Chromatographiepapier in "tris buffered sodium Tween" (TBST) geschwenkt. Der Aufbau der Blot-Apparatur bestand aus unterer Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen Lochplatte mit 96 Probenlöchern (S&S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel). In die Probenlöcher wurden zunächst 100 µl TBST vorgelegt und anschließend die Probe aufgetragen. Durch ein an die Dot-Blot-Apparatur angelegtes Vakuum wurden die Proben auf die Membran gesogen, wobei die Proteine auf die Membran übertragen wurden. Die Detektion der Proteine erfolgte durch den in Kapitel 2.6 erläuterten immunologischen Proteinnachweis.

2.6 Immunologischer Proteinnachweis

Zunächst wurden die nicht besetzten Bindestellen für Proteine auf der PVDF-Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver (Oxiod, Hampshire, UK) in TBST mindestens eine Stunde geblockt. Danach wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem Erstantikörper 3F4 (s. Tabelle 2.14-1 Verwendete Antikörper) schüttelnd inkubiert. Nach 3 zehnminütigen Waschschritten in TBST, folgte für eine Stunde die Inkubation des Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörpers (Goat-anti-mouse, Jackson Immuno-Research, Baltimore, USA). Abschließend wurden wieder drei zehnminütige Waschschrritte in TBST durchgeführt. Detektiert wurde mittels Chemilumineszenz, erzeugt durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol der aufgetragenen Detektionslösung (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific, Rockford, USA). Die benetzte Membran wurde in Folie eingeschweißt und bei einer 10 sekündigen bis 5 minütigen Expositionszeit per Chemilumineszenz-Film (Kodak Biomax XAR, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) detektiert.

Tris Buffered Sodium Tween (TBST)

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
0,1 %	Tween 20

2.7 Rekombinantes Prion-Protein

Das rekombinante humane PrP (rek huPrP) in Volllänge (23–230) wurde nach dem Protokoll von Mehlhorn und Kollegen (Mehlhorn *et al.* 1996) von Lars Lueers hergestellt und gereinigt. Gelagert wurde die Proteinlösung in 10 mM NaPi und 0,2 % SDS mit einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml und bei -70°C eingefroren. Für die Präparation von aggregiertem rek huPrP wurde die Stock-Lösung auf 250 ng/µl rek huPrP, 0,01 % SDS in 10 mM NaPi verdünnt und für 7 d bei 37°C und 650 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der aggregierte Zustand des rek huPrP wurde mittels Ultrazentrifugation (100.0000 x g, 1h, 4°C) und der Analyse des Überstandes und Pellet bestätigt. PrP wurde dabei nur im Pellet detektiert.

2.8 Humane Hirnproben

Alle hier verwendeten Hirnproben (siehe Tabelle 2.8-1) wurden über das nationale TSE-Forum freundlicherweise von Herrn Arzberger zur Verfügung gestellt (Referenzzentrum für Neurodegenerative Krankheiten, European NeuroBiobank, BrainNet/Europe, München). Außerdem wurden weitere Hirn- und Liquorproben aus dem Labor von S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) bereitgestellt. Die weiterführenden Studien wurden von der lokalen Ethikkommission der Universität genehmigt.

Tabelle 2.8-1 Verwendete humane Hirnproben

Patient	Klinische Diagnose	Alter	Geschlecht	Bezeichnung
RZ59	Neurolog. Kontrolle	75	M	Negativ 1 (N1)
RZ79	Neurolog. Kontrolle	75	F	N2
RZ81	Neurolog. Kontrolle	76	F	N3
RZ92	Neurolog. Kontrolle	71	M	N4
RZ58	Neurolog. Kontrolle	77	F	N5
RZ85	Neurolog. Kontrolle	63	M	N6
R2285	sCJD	60	M	Positiv 1 (P1)
R2288	sCJD	58	F	P2
R2360	sCJD	75	M	P3
R2294	sCJD	64	F	P4
R2322	sCJD	79	F	P5
R2382	sCJD	67	M	P6

2.9 Homogenisierung von humanen Hirngewebe

Das Hirngewebe (*Cortex*) wurde auf 30 % (w/v) mit PBS inklusive Proteinase-Inhibitor-Mix (1 Tablette wurde in 10 ml PBS aufgelöst; complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) eingestellt und 10-30 Sekunden mittels Homogenisator (PowerGen 125, Fisher Scientific, Schwerte) auf der niedrigsten Leistungsstufe homogenisiert. Die Proben wurden anschließend auf 15 % (w/v) mit PBS (pH 7,4; 8 % Sarkosyl (w/v)) eingestellt und zweimal 10-30 Sekunden auf der höchsten Leistungsstufe homogenisiert. Abschließend erfolgte eine letzte Verdünnung des Hirnhomogenats (HH) auf 5 % (w/v) mit PBS (pH 7,4; 4 % Sarkosyl (w/v)) und ein bis drei weitere Homogenisierungsschritte für 30 Sekunden auf der höchsten Leistungsstufe des PowerGen-Homogenisators. Das Hirnhomogenat wurde in 700 µl Fraktionen aliquotiert. Die Homogenate wurden entweder direkt verwendet oder bei -70°C gelagert. Als einheitliche Größe zur Bestimmung der eingesetzten Hirnmenge wird die Einheit Gramm-Äquivalent (gÄ) benutzt. Ein Gramm-Äquivalent entspricht der Menge, welche zuvor äquivalent zu einem Gramm Hirngewebe war.

2.10 Reinigung von PrP^{CJD} aus Hirngewebe

PrP^{CJD} kann selektiv aus Hirngewebe mit dem wasserlöslichen Salz der Phosphor-Wolframat-Säure gefällt werden. Die Fällung von PrP^{Sc} mittels NaPTA (Phosphotungstic acid sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) erfolgte nach dem Protokoll von Safar und Kollegen (1998). Die Methode setzt sich aus mehreren Zentrifugationsschritten zusammen, wobei die Überstände jeweils vom Pellet getrennt werden. Im Folgenden werden zwei verschiedene Möglichkeiten dieser Methode dargestellt.

2.10.1 NaPTA-Fällung mit Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Das ursprüngliche Protokoll der NaPTA-Fällung wurde mit einem DNA/RNA Verdauungsschritt durch den Zusatz von Benzonase, sowie zwei Waschschritten zur Erhöhung des Reinigungsgrades der PrP-Aggregate erweitert (Birkmann *et al.* 2006).

700 µl Fraktionen des Hirnhomogenats wurden aufgetaut. Mit einer kurzen Zentrifugation von 5 Minuten bei 5.000 x g wurden größere Gewebefragmente entfernt.

500 µl vom Überstand wurden auf 50 U/ml Benzonase (Merck, Darmstadt) und 2 mM MgCl₂ eingestellt und für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat auf 0,32 % NaPTA und 13,6 mM MgCl₂ eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 1 h in einem Schüttler 650 rpm bei 37°C. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g für 30 min bei RT, woraufhin Überstand und Pellet getrennt wurden. Das Pellet wurde mit 200 µl PBS, 250 mM EDTA, pH 8 bei 37°C für 30 min geschüttelt und anschließend bei 14.000 x g für 30 min bei RT zentrifugiert. Mit PBS, 50 mM EDTA, 0,1 % Sarkosyl kann dieser Waschschrift wiederholt werden. Die Pellets wurden während der Waschschriffe in einem Ultraschallbad (Sonicator 3000, Misonix, Farmingdale, NY, USA) 20 s bei 40 Watt gelöst. Zum Schluss wurde das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen, für 40 s mit ca. 80 Watt im Wasserbad ultrabeschallt und zusätzlich 2 s mit der Ultraschallsonde bei ca. 25 Watt behandelt.

2.10.2 NaPTA-Fällung ohne MgCl₂

Die NaPTA-Fällung ohne MgCl₂ erfolgte nach (Wille *et al.* 2009). Diese unterscheidet sich hauptsächlich durch zwei aufeinander folgende Fällungen mit 2 % NaPTA von der vorher beschriebenen Methode. Auf den Benzonase-Schritt wurde hier verzichtet. Das aufgetaute Hirnhomogenat wird auch hier für 5 Minuten bei 5.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird auf 2 % Sarkosyl und 2 % NaPTA eingestellt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 14.000 x g wird das Pellet nochmals in 2 % NaPTA und 2 % Sarkosyl aufgenommen und für mindestens eine halbe Stunde geschüttelt. Die Prozedur endete mit einem Waschschrift in 0,2 % Sarkosyl in PBS. Die weitere Behandlung des Pellets erfolgte wie in 2.10.1 beschrieben. In Abbildung 2.10-1 sind beide Fällungsvarianten nochmals schematisch gegenübergestellt.

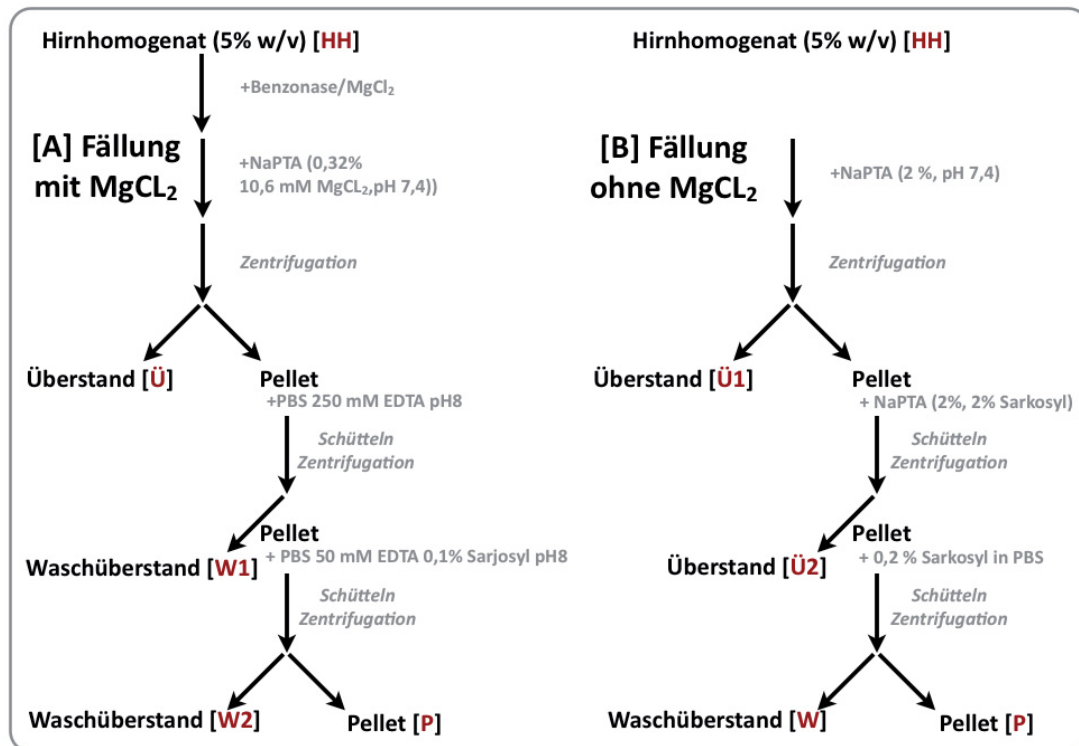


Abbildung 2.10-1 Schematische Darstellung der NaPTA-Fällungen

NaPTA-Fällung des PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat [A] mit MgCl₂ und [B] ohne MgCl₂

2.11 Proteolyse mit Proteinase K

Die Proben, deren Anteil an Proteinase K-resistentem PrP bestimmt werden sollte, wurden jeweils auf eine Proteinase K-Konzentration von 50 ng/μl eingestellt. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C und 650 rpm auf dem Schüttler, wurde die Proteolyse durch die Zugabe von Auftragspuffer und zehnminütigem Kochen gestoppt.

2.12 Kovalente Bindung von Antikörpern

Für die Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten wurden 384er Microtiterplatten von Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich): SensiPlate™ Plus verwendet. Die Platten zeichnen sich durch eine geringe Eigenfluoreszenz und eine geringe Biegung der 175 μm dicken Borosilikat-Glasbodenplatte von weniger als 100 μm aus, und sind somit für den Einsatz in der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie geeignet. Der Klebstoff mit dem der Polystyrolrahmen befestigt ist, ist beständig gegenüber DMSO.

Die chemische Modifizierung der Glasoberfläche zur kovalenten Verknüpfung des Captures (spezifischer PrP-Antikörper) erfolgte nach dem Protokoll von Janissen und

Kollegen (2009) und wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf die Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten optimiert.

2.12.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

ETHANOL uvasol	Merck, Darmstadt
Molekularsieb 3Å	Roth, Karlsruhe
DMSO for Spectroscopy (99,9 %)	Acros, Geel, Belgien
Salzsäure 2N	Merck, Darmstadt
Ethanolamine Hydrochlorid	Aldrich, St. Louis, MO, USA
NHS-PEG-COOH MW 3.400	Laysan Bio, Arab, AL, USA
Triethylamin	Fluka, Basel, Schweiz
N-Hydroxysuccinimid 98 %	Aldrich, St. Louis, MO, USA
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) low moisture content ≥ 99 %	Sigma, St. Louis, MO, USA
EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid) ≥ 98 %	Fluka, Basel, Schweiz
BSA (Bovines Serum Albumin) Cohn Fraction V ≥ 98 % pH7	Sigma, St. Louis, MO, USA
TWEEN20 <i>ultra</i>	Sigma, St. Louis, MO, USA
TRITONX100	Fluka, Basel, Schweiz

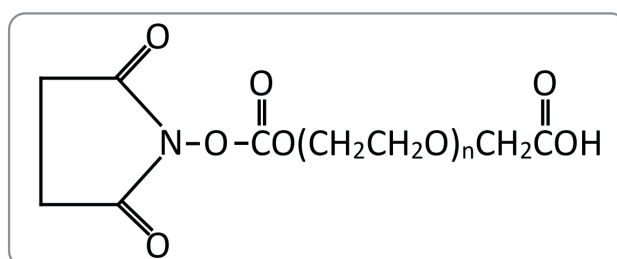


Abbildung 2.12-1 Spacer NHS-PEG-COOH

Heterobifunktioneller Spacer Polyethylenglykol mit einer N-Hydroxysuccinimidgruppe (NHS) links und der Carboxylgruppe (COOH) rechts.

Phosphatpuffer (PBS)

0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
8 g/l	NaCl
1,15 g/l	Na ₂ HPO ₄

PBS wurde von der Firma PAA Laboratories bezogen.

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurepuffer (MES, 1x)

100 mM MES

wurde durch Titration auf einen pH-Wert von 4,75 eingestellt.

PBSTT (0,05 % Tween20, 0,2 % TritonX100)

0,05 % Tween20

0,2 % TritonX100 in PBS

Die verwendeten Lösungen, wurden mit Filtern (Sarstedt, Nümbrecht) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert.

2.12.2 Protokoll zur kovalenten Bindung von Proteinen an Glasoberflächen

1. Vorbehandlung

- ⇒ 15 min NaOH (5M) 100 µl/Well
- ⇒ 3x H₂O
- ⇒ 15 min HCl (1M) 100 µl/Well
- ⇒ 3 x H₂O
- ⇒ mit Ethanol spülen und mit Stickstoff trocknen

2. Glas-Aktivierung (Aminogruppen)

- ⇒ 20 µl Ethanolamin (5,6 M in DMSO bei 70°C lösen und Benutzung von Molekularsieb 3Å)/Well und Inkubation ÜN
- ⇒ 4 x DMSO
- ⇒ mit Ethanol spülen und mit Stickstoff trocknen

3. Bindung des PEG-Spacer

- ⇒ 3,4 mg PEG in 500 µl DMSO lösen + 10 µl Triethylamin
- ⇒ 30 µl PEG (2 mM)/Well und Inkubation mindestens 1 h
- ⇒ 5 x H₂O

4. PEG-Aktivierung

- ⇒ NHS/EDC(50mM) in MES
- ⇒ 30 µl/ Well Inkubation: 30 min – max. 1 h
- ⇒ zügig 3x MES

5. Bindung des Antikörpers

- ⇒ Antikörper in PBS:MES 1:1 verdünnen (0,5 µg/µl)
- ⇒ 20 µl/Well Inkubation: 1 - 2 h
- ⇒ 4 x PBS

6. F(ab')-633 (goat anti mouse Alexa fluor 633 siehe Tabelle 2.14-1)

- ⇒ 0,5 µg/µl in PBS mit 1,5 % BSA
- ⇒ 20 µl/Well und Inkubation 1- 2 h
- ⇒ 4 x PBSTT & 3 x PBS

(Alle Waschschritte erfolgen mit 100 µl/Well.)

2.13 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Standardmäßig werden 50 - 100 µg Protein (mormalerweise: IgG-Antikörper) in einem Ansatz fluoreszenzmarkiert. Die Markierung mit Alexa Fluor 488 erfolgte mit dem Protein Labeling Kit A20181 und die Markierung mit Alexa Fluor 633 mit dem Kit A20170 von Invitrogen (Carlsbad, C, USA). Die Farbstoffe sind mit einem Tetraphenylester gekoppelt und reagieren deshalb mit den frei zugänglichen Aminogruppen der Proteine zu stabilen Farbstoff-Protein-Verbindungen.

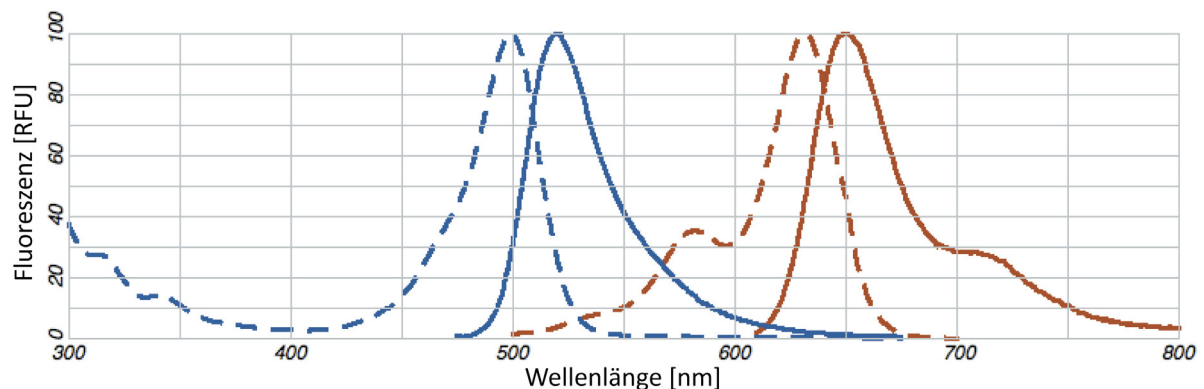


Abbildung 2.13-1 Excitations- und Emissionsspektrum von Alexa Fluor Farbstoffen

In blau ist das Fluoreszenz Excitations- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von Alexa Fluor 488 markiertem goat anti mouse IgG Antikörper in pH 8 Puffer dargestellt. Das Fluoreszenz Excitations- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von Alexa Fluor 633 markiertem goat anti mouse IgG Antikörper in pH 7,2 Puffer ist in rot dargestellt. (Quelle: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>)

Das Labeling Kit ist für 1 mg Protein ausgelegt. Der Farbstoff wurde entsprechend aliquotiert. Der Farbstoff wird in 100 µl H₂O_{deion} aufgenommen und 10 µl davon unverzüglich für den *Markierungsansatz* eingesetzt:

10 µl	Farbstoff (Component A)
10 µl	Natriumcarbonat (1M) (Component B)
50 - 100 µg	Antikörper
ad 100 µl	H ₂ O _{deion}

Die Inkubation findet 1 - 2 h bei RT im Dunkeln statt. Das Reaktionsgefäß wird alle 10 - 15 min invertiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In dieser Zeit wird eine Spincolumn (Component D, Ausschlussvolumen < MW 30.000) mit 1 ml Component C bei 4°C, 1100 x g für 3 min equilibriert. Danach wird der Markierungsansatz aufgetropft und für 5 min bei 1100 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthält der Durchlauf das Farbstoff-markierte Protein in ungefähr 100 µl PBS, pH 7,2 mit 2 mM Natriumazid. Der freie Farbstoff verbleibt in dem Säulenbett. Die Ausbeute liegt bei etwa 50 – 60 % an eingesetztem Antikörper. Nach der Zentrifugation wird die Absorption bei 280 nm (Protein) und entweder bei 494 nm (Alexa 488) oder 632 nm (Alexa 633) gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes wird die Proteinkonzentration nach Gleichung 1 bestimmt und der Markierungsgrad (Farbstoffmoleküle pro Proteinmolekül) kann nach Gleichung 2 berechnet werden. Für die Lagerung der fluoreszenzmarkierten Antikörper wird die Proteinlösung auf 25 % Glycerin und 1,5 % BSA eingestellt.

Gleichung 1: Bestimmung der Proteinkonzentration

$$\text{Proteinkonzentration [M]} = \frac{\left[A_{280nm} - \left(A_{494nm/632nm} \cdot 0,11 \right) \right]}{\epsilon}$$

203.000 cm ⁻¹ M ⁻¹	...	molarer Extinktionskoeffizient (ε) IgG
0,11	...	Korrekturfaktor für die Absorption des Farbstoffes bei 280 nm

Gleichung 2: Bestimmung des Markierungsgrades

$$\text{Farbstoffe pro Molekül} = \frac{A_{494/632nm}}{\epsilon \cdot \text{Proteinkonzentration[M]}}$$

71.000 cm ⁻¹ M ⁻¹	...	molarer Extinktionskoeffizient (ε) Alexa Fluor 488
100.000 cm ⁻¹ M ⁻¹	...	molarer Extinktionskoeffizient (ε) Alexa Fluor 633

2.14 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.14-1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifität	Epitop	Bereitstellung/ Firma	Verwendung	Typ
Saf32	Mensch, Hamster, Rind, Schaf, Maus	59 – 89 PrP	SpiBio, Montigny- le-Bretonneux, Frankreich	Capture und Detektionssonde im Assay	IgG
Saf61	Mensch, Hamster, Rind, Schaf, Maus	142 – 160 PrP	SpiBio, Montigny- le-Bretonneux, Frankreich	Detektionssonde im Assay	IgG2b
12F10	Mensch, Rind, Schaf	142 – 179 PrP	SpiBio, Montigny- le-Bretonneux, Frankreich	Detektionssonde im Assay	IgG2a
Pri308	Mensch, Hamster	106 – 126 PrP	CEA, Frankreich	Detektionssonde im Assay	
Pri917	Mensch, Hamster	214 – 230 PrP	CEA, Frankreich	Detektionssonde im Assay	
3F4	Mensch, Hamster	109 – 112 PrP	UCSF, San Francisco, USA	Immunolog. Proteinnachweis, 1:5.000 in TBST	IgG
F(ab')-633	Sekundärer Antikörper	Anti Maus	Invitrogen, Carlsbad, C, USA	Analyse der kovalenten Bindung von Antikörpern an die Glasoberfläche	F(ab') 2 Fragm ent
IgG Rabbit	Unspezi- fischer Antikörper	-	Sigma, St. Louis, MO, USA	Analyse der kovalenten Bindung von Antikörpern an die Glasoberfläche	IgG

2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der kovalenten Bindung von Proteinen an die Glasoberfläche wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden Antikörper mit einem 633 Alexa Fluorophor (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA) markiert. Die Messung erfolgte unter Benutzung eines inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX71, Hamburg) mit einer ECCD Kamera (IXON, 512 x 512 Pixel, Belfast, Irland). Die Excitation wurde durch eine 150 Watt Xenon-Lampe mit den entsprechenden Filtersets (AHF, Tübingen) ermöglicht. Ein Bild entspricht 512 X 512 Pixel und ein Pixel 260 nm. Damit wird mit einem Bild eine Fläche von ca. 0,04 mm² repräsentiert. Die Bilder wurden mit

einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden quantifiziert (in counts/s), indem der Durchschnitt der Fluoreszenz-Intensitäten von einem Bild gemessen wurde.

2.16 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wurde (1974) von Magde und Kollegen entwickelt. Die Methode dient der Bestimmung von Molekülparametern wie Diffusionszeiten oder Diffusionskoeffizienten und kann zur Beobachtung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen herangezogen werden.

2.16.1 Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Im Falle von klassischen Fluoreszenzmessungen werden viele Moleküle beobachtet und damit wird eine gemittelte Fluoreszenz gemessen. Der FCS-Aufbau basiert auf der konfokalen Optik. Das ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzen in einem sehr kleinen Volumen von einem Femtoliter, was der Größenordnung eines *E. coli*-Bakteriums entspricht. Es werden nur geringe Konzentrationen des zu untersuchenden Moleküls benötigt. Aufgrund der Brownschen Bewegung diffundieren die Moleküle zufällig durch den Laserfokus und es werden Fluoreszenzfluktuationen detektiert (Idealfall: Einzelmolekülmessung).

Bei einer FCS-Messung werden diese Fluoreszenzfluktuationen über die Zeit gemessen. Mit Hilfe einer statistischen Auswertung lässt sich so die mittlere Aufenthaltsdauer, die Diffusionszeit τ_{diff} des Moleküls im Fokus bestimmen. Diese Auswertung erfolgt mittels einer Autokorrelationsfunktion. Die Korrelationskurve wird, wie in Abbildung 2.16-1 unter 3 dargestellt, gegen die Korrelationszeit τ aufgetragen.

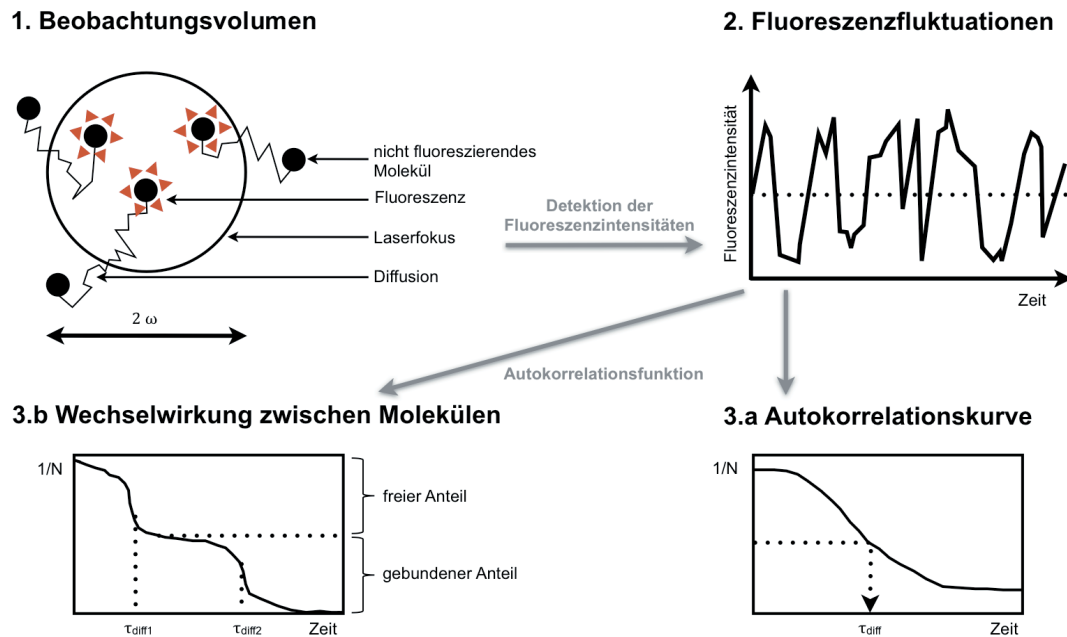


Abbildung 2.16-1 Schematische Darstellung einer FCS- Messung und Auswertung

Wenn fluoreszierende Moleküle das ausgeleuchtete Volumenelement [1.] passieren, werden Fluoreszenzintensitäten in Form von Fluoreszenzfluktuationen über die Zeit detektiert [2.]. Da die Moleküle zufällig in der Lösung diffundieren, kann über eine stochastische Auswertung die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus berechnet werden [3.a]. Außerdem sind Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung möglich [3.b].

2.16.2 Zweifarbenanalysen

Bei der Zweifarbenanalyse (Schwille *et al.* 1997) kann die Fluoreszenzfluktuation zweier Fluorophore simultan untersucht werden. Wenn zwei Molekülspezies mit je einem dieser Fluorophore aneinander oder an einen gemeinsamen Interaktionspartner binden, entsteht eine Molekülspezies, die beide Fluorophore trägt. Bei der Zweifarbenanalyse geht nur diese Spezies in die Kreuzkorrelation ein. Zudem ist der Übergang zweier Fluoreszenzphotonen in den Tripletzustand auch dann voneinander unabhängig, wenn diese an dasselbe Molekül gebunden sind. Somit enthält das Kreuzkorrelationssignal keinen Tripletanteil (Schwille *et al.* 1997). Auch die durchgeführten 2-Strahlmessungen sind mit einer Zweifarbenanalyse auswertbar. Im diagnostischen Ansatz kann so die Spezifität erhöht werden, da nur pathologische Aggregate in die Auswertung eingehen an die zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Sonden gebunden sind (Schäfer 2002).

2.16.3 Imaging mit der FCS-Apperatur

Alle FCS-Messungen wurden mit einem Insight Cell FCS der Firma Evotec (Hamburg), mit einem integriertem Olympus IX50 Mikroskop, durchgeführt. Die Einkopplung eines Argon-Ionen-Lasers (verwendete Laserlinie 488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers

(verwendete Laserlinie 633 nm) lässt 2-Strahlmessungen zu. Aufgrund einer integrierten Imaging-Einheit mit einem 2D (xy) Neigungs-Piezo (Beams Scanner) ist es möglich die Probe mit dem sehr kleinen Laserfokus, unter FCS-Einstellungen, abzuscanen. Ein Piezo direkt unter dem Mikroskopobjektiv erlaubt zusätzlich die Bewegung in z-Richtung, womit 3D-Analysen von der zu untersuchenden Probe gemacht werden können. Aufgrund der Immobilisierung der Proteinaggregate durch die Capture-vermittelte Bindung an die Glasoberfläche, resultieren die Fluoreszenzfluktuationen aus der Bewegung des Laserfokuses. Die detektierten Fluoreszenzintensitäten werden in einem Bild zusammengesetzt und eine genaue Charakterisierung der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten kann erfolgen. Die Auswertung der Bilddaten wird ausführlich in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben.

Standardmäßig wurde die Laserstärke vor jeder Messung für die Excitation bei 488 nm auf 60 μ W und für die Excitation bei 633 nm auf 200 μ W eingestellt. Für die Einstellungen des Beams Scanners wurden eine x- und y-Amplitude von 50 μ m und eine x- und y-Frequenz von 10 Hz gewählt. Von jeder Probe wurden vier Bilder, mit einer Größe von 200 x 200 μ m, aufgenommen. 1 Pixel entsprach dabei einer Ausdehnung von 500 x 500 nm, und die Pixeltime ('Belichtung eines Pixels') betrug 500 μ s. Für die z-Position wurden 2 μ m über der Glasoberfläche gewählt.

2.16.4 Auswertung der Bilddaten

Die Auswertung der Bilddaten der FCS-Messungen erfolgte mit dem open source Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Dieses Programm hat die Vorteile, dass es vom Betriebssystem unabhängig ist und benutzerdefiniert angepasst werden kann. In Zusammenarbeit mit Oliver Bannach und Fabian Dreßen wurden Auswerteskripte zur automatisierten Bearbeitung der Bilddaten entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen an 4 verschiedenen Positionen von jedem Well und damit von jeder Probe durchgeführt. Nach der Messung wurden die Bilder, mit den Informationen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten als 16-bit Graustufen-Bilder exportiert. Mittels ImageJ werden die 4 Bilder zu Montagen zusammengesetzt und können ausgewertet werden. In den Bildern nimmt die Helligkeit von links nach rechts ab. Dieses Artefakt ist mit der Auslenkung des Laserfokus während der Messung zu erklären. Mit der Funktion „rolling ball radius“ wird dieses Messartefakt in der Messung eliminiert.

In der Intensitätsauswertung werden alle Fluoreszenzintensitäten über einem bestimmten Wert (Cutoff) aufsummiert. Dabei wird von jedem Pixel-Wert der Bildmontagen eines Kanals dieser Cutoff mit der mathematischen Funktion „*subtract*“ abgezogen. Danach werden die Häufigkeiten aller Fluoreszenzintensitäten pro Pixel mittels eines „*Histogramms*“ ausgegeben. So können benachbarte Pixel eines Kanals, mit einer Intensität größer Null, mit der Addition ihrer Intensitäten analysiert werden

In der Kolokalisationsanalyse werden nur Fluoreszenzintensitäten gewertet, die in beiden Kanälen gleichzeitig detektiert wurden. Dazu wird von jedem Pixel-Wert der Bildmontagen beider Kanäle ein Cutoff mit der mathematischen Funktion „*subtract*“ abgezogen. Dann werden die Intensitäten beider Bildmontagen mit Hilfe der Funktion „*Image Calculator*“ miteinander multipliziert. Daraufhin können benachbarte Pixel mit Intensitäten größer Null, resultierend aus den kolokalisierten Bilddaten beider Kanäle, durch die Addition ihrer Intensitäten analysiert werden.

3 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war es eine molekulare Diagnostik für die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zu entwickeln. Dazu sollte auf die Methode der Surface-FIDA von Birkmann *et al.* (2007) zurückgegriffen werden, welche die Detektion einzelner Prion-Proteinaggregate aus Hirngewebe ermöglicht. Zudem sollte der Ansatz im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität optimiert werden, da sich in Vorexperimenten herausgestellt hat, dass die bekannte Methode nicht ausreichend ist. Aus diesem Grund wurde jeder einzelne Schritt des Surface-FIDA Protokolls systematisch untersucht und optimiert. Die Optimierungen wurden in Reihenfolge der Durchführung der Experimente vorgenommen: (i) Bindung des Capture-Antikörpers an die Glasoberfläche einer Microtiterplatte, (ii) Bindung des Targets über den Capture-Antikörper und (iii) Nachweis des Targets mittels Detektionsantikörper.

Weiterhin sollten grundlegende Optimierungen durchgeführt werden. Dazu gehört die kovalente Verknüpfung des Captureantikörpers mit der Glasoberfläche der Microtiterplatte. Eine zweite grundlegende Optimierung sollte darin bestehen, die zuvor auf Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse beruhende Methodik auf ein bildgebendes Verfahren umzustellen, um weitere Parameter wie der Partikelverteilung sowie der Partikelgröße bestimmen zu können und als diagnostische Parameter zu evaluieren.

3.1 Kovalente Bindung des Capture-Antikörpers an den Glasboden der Microtiterplatte

Der diagnostische Ansatz Surface-FIDA beinhaltet die Immobilisierung von PrP-Aggregaten auf dem Glasboden einer Microtiterplatte. Dazu wird die Glasoberfläche der Microtiterplatte mit Poly-D-Lysin beschichtet und ein PrP-spezifischer Antikörper (Capture) bindet adhäsiv. Ziel dieses Teils meiner Arbeit war es, die adhäsive Bindung des Captures an die Glasoberfläche durch eine kovalente Bindung zu ersetzen, sodass in nachfolgenden Waschschritten der Capture nicht mehr gelöst wird. Die kovalente

Bindung des Captures an die Glasoberfläche erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Janissen und Kollegen (2009), welches auf der Verwendung eines heterobifunktionellen Polyethylenglykol (PEG)-Spacers beruht. Zuerst erfolgt die kovalente Verknüpfung des Spacers mit der Glasoberfläche und in einem zweiten Schritt wird der Spacer über eine Peptidbindung mit dem Capture verbunden.

Um den Spacer kovalent an die Glasoberfläche zu binden, muss diese mit Aminogruppen aktiviert werden. Für die Aktivierung ist es essentiell, dass die Glasoberfläche eine hohe Dichte an Silanolgruppen aufweist. Somit beginnt der erste Schritt zur Modifizierung der Glasoberfläche mit einem Reinigungsschritt. Aufgrund des Polystyrol-Rahmentails der Microtiterplatten musste bei der Reinigung der Glasoberfläche auf Hellmanex II, Aceton oder Chloroform verzichtet werden. Daher wurde der Reinigungsschritt durch eine 20minütige Inkubation mit 5 M Natronlauge und anschließend mit 1 M Salzsäure ersetzt. Zwischen diesen Reinigungsschritten wurde mehrmals mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gespült. Die Glasoberfläche wurde dann zweimal mit Ethanol gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Die Aktivierung der Glasoberfläche mit Aminogruppen erfolgte mit Ethanolamin Hydrochlorid. Nach der ÜN-Inkubation von einer 5,6 M Ethanolamin Hydrochlorid-Lösung in wasserfreiem DMSO folgte die Bindung des NHS-PEG-COOH (Vergl. Kap. 2.12.1). Die N-Hydroxysuccinimid-Gruppe (NHS) reagiert unter Abspaltung von Wasser mit den Aminogruppen der aktivierten Glasoberfläche (Abbildung 3.1-1). Zur Aktivierung der COOH-Gruppe des Spacers wurde die Glasoberfläche in zwei Stufen, wie von Walsh und Kollegen (2001) beschrieben, behandelt. Zuerst wird die Oberfläche in einer äquimolaren Lösung bestehend aus 50 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) und NHS inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit MES (pH 4,75) wird der zu bindende Antikörper in PBS:MES 1:1 pH 5,5 zugegeben, was zu einer Peptidbindung führt. Durch abschließende Waschschrritte mit PBS wurde ungebundener Antikörper entfernt.

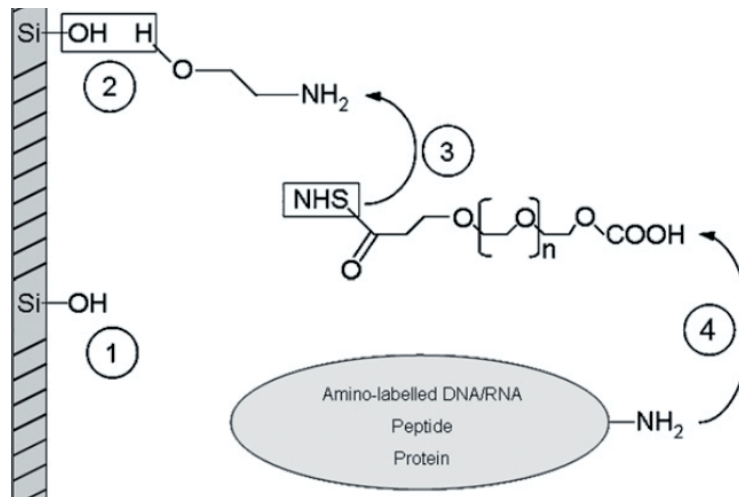


Abbildung 3.1-1 Schema der kovalenten Bindung von Biomolekülen an Glas

Nach der Reinigung der Glasoberfläche [1] folgt die Veresterung des Ethanolamins mit den freien Silanolgruppen [2]. Durch Zugabe des NHS-PEG-COOH erfolgt die Bindung der NHS-Gruppe an die verfügbaren Aminogruppen auf der Oberfläche [3]. Durch Zugabe des Crosslinkers EDC und NHS erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppe des PEGs zur kovalenten Bindung mit freien Aminogruppen des gewünschten Biomoleküls [4] (Janissen *et al.* 2009).

3.1.1 Bestimmung der einzusetzenden Capturemenge

Um zu bestimmen, welche Menge des Capture-Antikörpers für die kovalente Bindung auf der Glasoberfläche eingesetzt werden soll, wurde die Bindung des Capture-Antikörpers in einer Verdünnungsreihe quantifiziert. Ziel war es möglichst viel Antikörper zu immobilisieren und somit die Oberfläche möglichst zu sättigen. Als Capture-Antikörper wurde der anti-PrP-Antikörper Saf32 eingesetzt, ein spezifischer monoklonaler Antikörper, der auch später im Assay zur Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten als Capture eingesetzt werden sollte. Zum Nachweis des Saf32 diente ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper, des Weiteren als F(ab')-633 bezeichnet (siehe Tabelle 2.14-1). Die Wells der Microtiterplatte wurden nach dem vorher beschriebenen Protokoll (Kapitel 3.1) vorbehandelt. Zur Abschätzung der Capturekonzentration, welche eingesetzt werden kann, um die Oberfläche abzusättigen, erfolgte die Zugabe des Saf32 in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,5 pg/μl bis 1 μg/μl. Dabei wurden jeweils 15 μl der Antikörperlösungen für 1 h inkubiert. Mit vier PBS-Waschschritten wurde ungebundener Saf32 entfernt. Für eine weitere Stunde wurde der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper F(ab')-633 (125 ng/μl mit 1,5 % BSA (w/v)) inkubiert und wiederum viermal mit PBSTT und dreimal mit PBS gewaschen. Mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops mit CCD-Kamera wurden Bilder der vorbehandelten Oberflächen aufgenommen (Vgl. Kapitel 2.15) und die Fluoreszenzintensitäten in counts/s dargestellt (Abbildung 3.1-2).

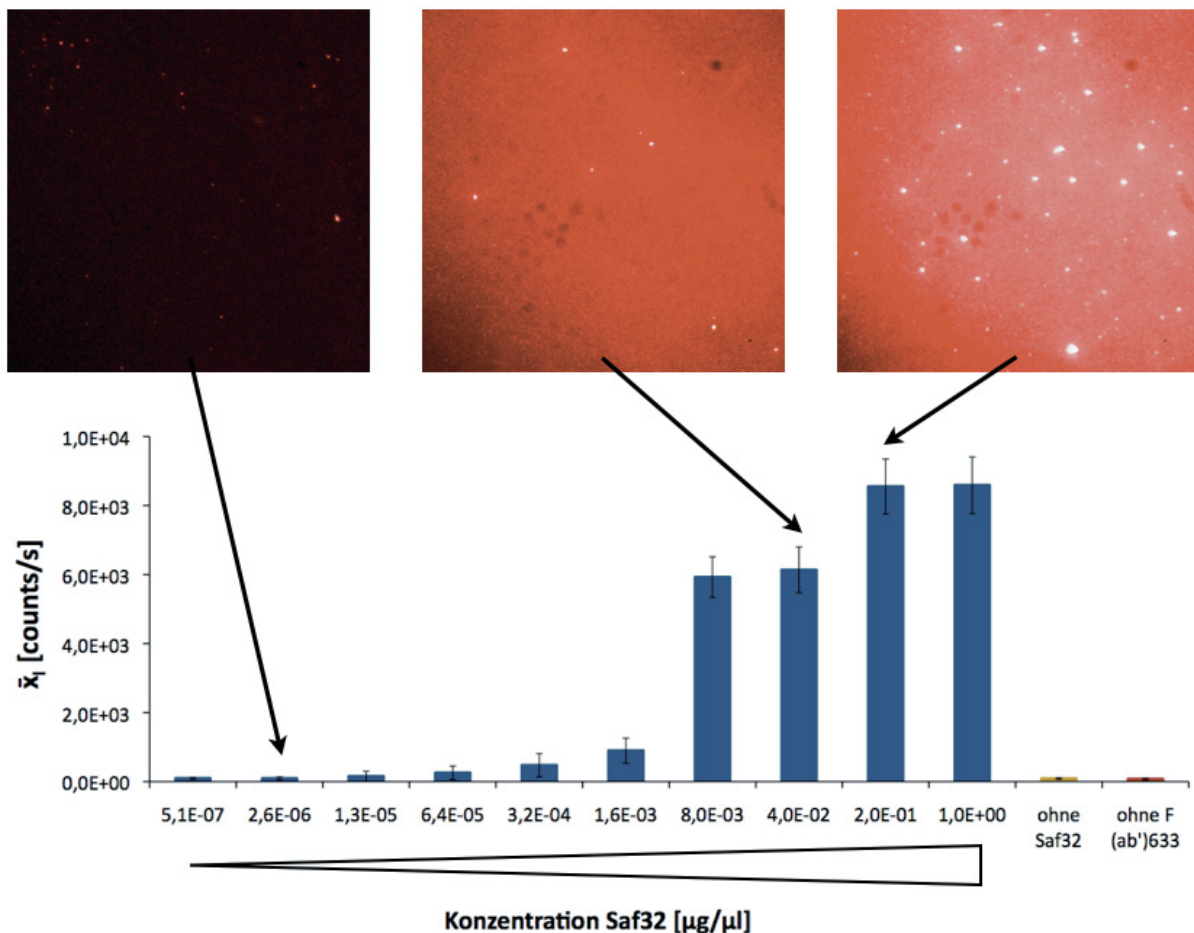


Abbildung 3.1-2 Kovalente Immobilisierung des Capture-Antikörpers Saf32

Fluoreszenzintensitäten des F(ab')-633, der den kovalent immobilisierten Capture-Antikörper Saf32 erkennt. Ein Balken repräsentiert den Mittelwert aller Intensitäten ($\bar{x}_i$) eines Bildes von 512 x 512 Pixel. aufgenommen mit dem Fluoreszenzlichtmikroskop. Zu den Konzentrationen 2,6E-06; 4,0E-02 und 2,0E-01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sind beispielhaft die Originalbilder dargestellt.

Die Originalbilder der Messung entsprechen dem jeweils gekennzeichneten Balken im Diagramm. Je heller das Bild, umso höher ist das Fluoreszenzsignal, da mehr F(ab')-633 gebunden wurde. Dies lässt einen direkten Rückschluss auf die gebundene Menge des Capture-Antikörpers Saf32 zu. Die Bindung von Saf32 konnte somit durch den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Wie erwartet nimmt der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mit der Konzentration an Capture-Antikörper zu (Abbildung 3.1-2). In allen Bildern sind auch heller leuchtende größere Artefakte zu beobachten, die womöglich auf eine Aggregatbildung des Nachweisantikörpers zurückzuführen sind. Nach der Konzentration von etwa 1,6 ng/ μl steigt die Fluoreszenzintensität stark an. Sowohl die Kontrolle ohne Saf32, aber mit F(ab')-633, und die Kontrolle mit Saf32, aber ohne den sekundären Antikörper F(ab')-633, zeigten wie erwartet eine sehr geringe Fluoreszenzintensität.

Um soviel Prion-Proteinaggregate wie möglich auf der Glasoberfläche zu immobilisieren, sollte die Oberfläche möglichst dicht mit dem Capture-Antikörper

bedeckt werden. Im Folgenden wurden 0,1 µg/µl Capture in einem Volumen von 10 µl eingesetzt.

3.1.2 Kovalente Bindung des Captures in Abhängigkeit vom pH-Wert

Carboxylgruppen können in Anwesenheit eines Carbodiimids, wie EDC, mit NHS zu einem semi-stabilen NHS-Ester reagieren. Abhängig vom pH-Wert und Wassergehalt, hydrolysiert die Carboxylgruppe im Minuten bis Stundenbereich. Je höher der pH-Wert, desto schneller die Hydrolyse. Nach Zugabe von äquimolaren Mengen an EDC und NHS in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) pH 4,75 findet die Veresterung mit der Carboxylgruppe des PEG's statt. Die COOH-Gruppe des PEG's ist nun aktiviert und bindet über eine Peptidbindung an freie Aminogruppen des Capture-Antikörpers. Standardmäßig wurde der Antikörper in einem 1:1-Gemisch aus PBS und MES (pH 5,5) hinzugegeben.

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungsreaktion des Antikörpers mit dem aktivierten PEG untersucht. Dazu wurde der Antikörper, neben dem Standardpuffergemisch von PBS und MES, zum Einen in MES pH 4,75 und zum Anderen in PBS pH 7,5 aufgenommen. Bei einem niedrigerem pH als pH 4,75 besteht die Gefahr, dass der Antikörper seine Spezifität verliert. Alle drei Antikörperlösungen wurden auf der PEG-aktivierten Glasoberfläche inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung der Glasoberfläche nach dem zuvor beschriebenen Protokoll, wobei nach der Aktivierung der Carboxylgruppe des PEG's 1 h mit PBS inkubiert wurde. Somit hydrolysiert die aktivierte Carboxylgruppe und eine kovalente Bindung des Antikörpers kann nicht mehr stattfinden. Anschließend wurde der Antikörper standardmäßig bei pH 5,5 hinzugegeben. Immobilisierter Antikörper wurde mittels Fluoreszenzmessung direkt nachgewiesen, da er mit Alexa Fluor 633 markiert wurde (siehe Kapitel 2.13).

Die Ansätze bei denen markierter Antikörper direkt nach der Aktivierung der Carboxylgruppen zugegeben wurde, zeigen signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten als die Kontrollen, bei denen die Carboxylgruppe vorher hydrolysiert wurde. Eine kovalente Bindung des Antikörpers Saf32-633 konnte sowohl bei niedrigem als auch bei neutralem pH-Wert gezeigt werden. Außerdem wurde ein zweiter fluoreszenzmarkierter IgG immobilisiert. Beide Antikörperansätze zeigen die höchsten

Fluoreszenzwerte, wenn die Bindungsreaktion bei einem pH-Wert von 7,5 erfolgte, welches die Schlussfolgerung zulässt, dass die größte Menge an Antikörper in PBS pH 7,5 gebunden wurde. Im Folgenden wurde der Capture-Antikörper im Assay in PBS verdünnt und die Bindungsreaktion erfolgte bei pH 7,5.

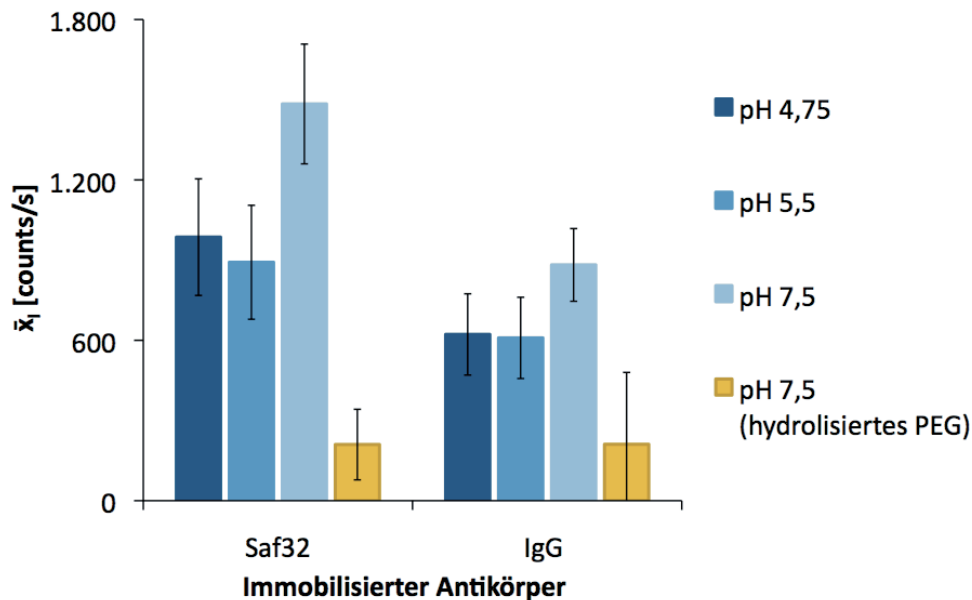


Abbildung 3.1-3 Bindung von Capture-Antikörpern in Abhängigkeit von dem pH-Wert

Bindung von fluoreszenzmarkiertem Saf32-633, mit einem Markierungsgrad (MG) von 2,4, und IgG-633, mit einem MG von 2,8. Die Verdünnung der Antikörper auf 50 ng/μl erfolgte in MES (pH 4,75), in einem 1:1 Gemisch aus MES und PBS (pH 5,5) und PBS (pH 7,5). Als Kontrolle (in gelb) wurde das PEG mit PBS 1 h inkubiert, sodass die vorher aktivierte NHS-Gruppe des PEG's zu einer COOH-Gruppe hydrolisiert. Danach folgte die Zugabe des jeweiligen markierten Antiköpers mit einer Konzentration von 50 ng/μl. Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($\bar{x}_i$) sind dargestellt.

3.1.3 Kovalente Bindung des Captures in Abhängigkeit von der Spacerkonzentration

Um die kovalente Bindung des Capture-Antikörpers nachzuweisen wurde die Bindung des PEG's an die Aminogruppen-aktivierte Glasoberfläche analysiert. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an PEG eingesetzt. Ziel war es die Glasoberfläche mit so viel PEG wie möglich zu beschichten und damit eine hohe Capture-Antikörperdichte zu ermöglichen. Wieviel Antikörper tatsächlich bindet, wurde mit markierten IgG-633 (Vergl. Tabelle 2.14-1) untersucht. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit dem IgG-633 können so später auf den als Capture eingesetzten Saf32 übertragen werden. Die Oberfläche wurde wie zuvor beschrieben nach dem Protokoll von Janissen (2009) behandelt. Der Spacer wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,5 mM, 5 mM, 50 mM und 100 mM. Ein Well wurde als Kontrolle nur mit DMSO behandelt. Die Zugabe

des IgG-633 (50 ng/ μ l, MG 1,9) fand in PBS statt (Vgl. Kapitel 3.1.2). Die Messung wurde mit dem Insight Cell der Firma Evotec mit einem integriertem Olympus IX50 Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm durchgeführt. Die Bildauswertung erfolgte mit dem Computerprogramm ImageJ zur Bearbeitung und Analyse von Bildern (siehe Kapitel 3.2.1). Bei diesem Experiment wurden die Mittelwerte der Intensitäten von jeweils einem Bild ausgewertet. Damit erfolgte die Auswertung der Originaldaten, analog zu den Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden Bilder mit 301 x 301 Pixel aufgenommen, wobei ein Pixel 1 μ m² entsprach und damit eine Fläche von 0,09 mm² ausgewertet wurde. Nach der Messung folgte eine Inkubation mit 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung (GdnHCl) für 1 h, einem Denaturierungsmittel für Proteine. Nach der GdnHCl-Behandlung wurde mit PBSTT und PBS abgewaschen. Somit sollte mit einer zweiten Messung nur noch die Menge an kovalent gebundenem Antikörper IgG-633 nachgewiesen werden, da adhäsiv anhaftender Antikörper durch diese Behandlung entfernt werden sollte.

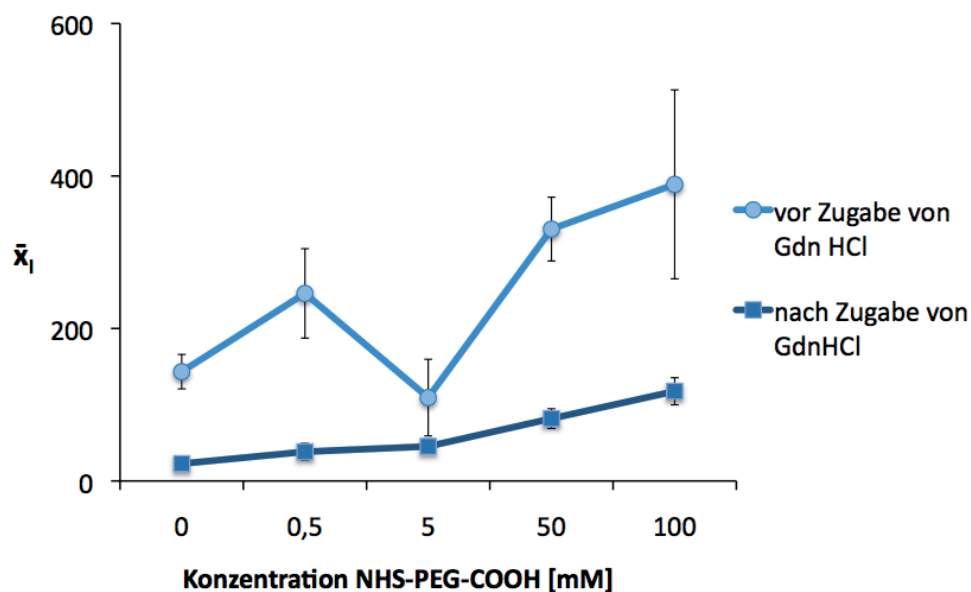


Abbildung 3.1-4 Nachweis der kovalenten Bindung des Capture-Antikörpers

Immobilisierung von IgG-633 in Abhängigkeit von der PEG-Konzentration. Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($\bar{x}$) sind dargestellt.

In Abbildung 3.1-4 ist die Auswertung der Messung sowohl vor der Zugabe von GdnHCl als auch danach dargestellt. Je mehr Spacer eingesetzt wurde, desto höhere Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten wurden erreicht. Dies lässt den Schluss zu, dass bei Einsatz höherer PEG-Konzentrationen mehr Antikörper gebunden wurde. Nur bei der Verwendung von 5 mM PEG wurde ein Signal gemessen, was dem ohne PEG in etwa entspricht. Nach der Zugabe von GdnHCl nimmt das Signal des IgG-633 ab. Die

Fluoreszenzintensitäten in dem Well, welches nur mit DMSO und damit ohne PEG-Spacer behandelt wurde, ist sehr gering. Eine Erklärung für die gemessenen Fluoreszenzintensitäten könnten Rückstände von EDC und NHS sein, welche Peptidbindungen zwischen freien COOH-Gruppen des IgG's und Aminogruppen auf der Glasoberfläche ausgebildet haben. Mit diesem Experiment wurde die kovalente Bindung des Capture-Antikörpers an die Glasoberfläche der Microtiterplatte nachgewiesen. Im Folgenden wurde 5 mM PEG als Spacerkonzentration eingesetzt.

3.2 Adaption und Optimierung von Surface-FIDA zum Nachweis einzelner PrP^{CJD}-Partikel

Zur Etablierung eines diagnostischen Ansatzes für die humane Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), sollten einzelne PrP^{CJD}-Aggregate als Krankheitsmarker nachgewiesen werden. Mit dem Ziel Surface-FIDA zum Nachweis von PrP^{CJD}-Aggregaten einzusetzen, wurden alle Schritte zur Funktionalisierung der Glasoberfläche der Microtiterplatte (siehe Kap. 3.1), der Probenvorbehandlung und der Detektion der Prion-Proteinaggregate nacheinander optimiert.

Nach der Optimierung der Capture-Bindung an die Glasoberfläche erfolgte die Funktionalisierung der Glasoberfläche zur kovalenten Bindung des Capture-Antikörpers standardmäßig nach dem unter Kapitel 3.1 beschriebenen Protokoll. Als PrP-spezifischer Antikörper (Capture) wurde der monoklonale IgG Saf32 verwendet. Nach der Zugabe von etwa 10 µl 0,1 ng/µl Saf32 in PBS (Vergl. Kapitel 3.1.1) für mindestens 1 h und 4 Waschschritten mit PBS, folgte ein Blockschritt mit 3 % Bovinem Serum Albumin (BSA) und 30 mM Triethylamin (TEA) in PBS für 1 h. Anschließend wurde 4 mal mit PBST und 3 mal mit PBS gewaschen. Damit war die Funktionalisierung der Glasoberfläche mit einem kovalent gebundenen Capture-Antikörper abgeschlossen und es folgte die Bindung des Targets, den Prion-Proteinaggregaten.

Zur Etablierung einer molekularen Diagnostik für CJD mit der neu funktionalisierten Oberfläche wurde Hirngewebe von sCJD-Patienten und zur Kontrolle von nicht an sCJD erkrankten Kontrollpatienten verwandt. Mittels der NaPTA-Fällung mit MgCl₂ (siehe Kapitel: 2.10.1) wurde PrP^{CJD} aus Hirngewebe vorgereinigt, wobei sCJD-positive Proben und sCJD-negative Proben gleich behandelt wurden. Das resultierende Pellet der NaPTA-Fällung wurde in 200 µl PBS aufgenommen und für 40 s im

Ultraschallbad (Stufe 7) und 2 s mit der Ultraschallsonde (25 W) behandelt. 20 µl des resuspendierten Pellets wurden pro Well ÜN inkubiert. Zur Detektion der Prion-Proteinaggregate wurde zunächst nur Saf32 eingesetzt. Die Detektionssonde Saf32 wurde zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert (siehe Kapitel 2.13). Nach der Inkubation des Targets und der Detektionssonde Saf32, folgten jeweils sechs Waschschrte mit PBST und fünf mit PBS.

Der Ablauf zur Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten und dessen Nachweis ist in Form eines vereinfachten Schemas in Abbildung 3.2-1 dargestellt. Jeder Schritt wurde optimiert, um die Unterscheidbarkeit der sCJD-positiven Proben zu den gleichbehandelten Negativkontrollen zu maximieren.

1. Reinigung der Glasoberfläche		
2. Glas-Aktivierung (<i>Aminogruppen</i>)	Tag 1	
3. Bindung des PEG-Spacer		Kapitel 3.2.2
4. PEG-Aktivierung (<i>mit EDC/NHS</i>)		Kapitel 3.2.3
5. Zugabe des Capture-Antikörpers (<i>Saf32</i>)		Kapitel 3.2.4
6. Blockschrift (<i>BSA/TEA</i>)		
7. Targetinkubation (<i>NaPTA-Pellet</i>)	Tag 2	Kapitel 3.2.5
8. Detektion (<i>Saf32-488</i>)	Tag 3	Kapitel 3.2.6

Abbildung 3.2-1 Ablaufschema: Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten

3.2.1 Single particle counting – Messung und Auswertung

Das Prinzip des Aggregatnachweises Surface-FIDA wurde bereits von Birkmann *et al.* (2007) beschrieben. Mit Hilfe des Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometers und einem integriertem Beams Scanner wurde die Oberfläche der Microtiterplatte abgescannet und die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten über den Ort detektiert. Die Bindung mehrerer fluoreszenzmarkierter Detektionsantikörper an die immobilisierten Pathogen-assoziierten Aggregate führten zu Fluoreszenzpeaks und erlaubten damit das Zählen einzelner Prion-Proteinaggregate (Single Particle Counting).

Während dieser Arbeit wurde das FCS um eine Imaging-Einheit erweitert. Damit wurden die detektierten Fluoreszenzintensitäten während der Messung in Bilddaten

umgewandelt. Dies hat den Vorteil, dass die linear gemessenen Fluoreszenzintensitäten durch eine zweidimensionale Ortsinformation ersetzt wird. Die Bilder enthalten zusätzliche Informationen wie die Größe und die Form der detektierten Partikel. Im Folgenden wird Imagingansatz und der Auswertung der Bilddaten beschrieben.

3.2.1.1 Erweiterung des FCS mit einer Imaging-Einheit

In den Strahlengang des FCS wurde ein Beams Scanner eingebaut, welcher aus einem 2D-Piezoelement mit einem Spiegel besteht. Mittels dieser Beams Scannereinheit kann die Position des Laserfokuses und damit des Detektionsvolumens erfasst werden und der Laserfokus in einer bestimmten Höhe über der Glasoberfläche der Microtiterplatte bewegt werden. Die detektierten Fluoreszenzintensitäten werden in Bildinformationen umgewandelt. Somit wird die Verteilung der Intensitäten orts aufgelöst und in einem Bild dargestellt, was das Zählen von Partikeln sowie die Bestimmung von Partikelgrößen ermöglicht. Mit einem weiteren Piezoelement kann die z-Position im Nanometer-Bereich genau eingestellt und 3D-Messungen vorgenommen werden. In dieser Arbeit werden ausschließlich 2D-Messungen auf einer spezifischen Höhe über dem Glasboden durchgeführt.

Wie in Kapitel 2.12 beschrieben, wurden 384er Wellplatten zur Immobilisierung der Prion-Proteinaggregaten eingesetzt. Diese wurden speziell für FCS-Messungen entwickelt (Vergl. Kapitel 2.12) und weisen eine sehr geringe Krümmung der Glasplatte auf. Jedes Well besitzt eine Glasbodenfläche von 3 x 3 mm. Von jedem Well, und somit von jeder Probe, wurden vier Bilder mit einer Fläche von $(0,2 \text{ mm})^2$ an verschiedenen Positionen aufgenommen. Ein Pixel entsprach dabei standardmäßig $(500 \text{ nm})^2$. Die Pixeltime entsprach 500 μs .

Bei 2-Farb-Messungen wurden die Messungen der beiden Kanäle nacheinander durchgeführt, um ein optisches Übersprechen (*bleed through*) zu vermeiden. Wenn die Emissionsspektren der beiden verwendeten Fluorophore sich überschneiden, wäre es möglich, dass bei gleichzeitigem Messen die Fluoreszenz-Emission eines Kanals auch auf dem anderen Kanal detektiert wird. Nach der Messung wurden die Bilder mit den Informationen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten als 16-bit Graustufen-Bilder exportiert. Die Auswertung dieser Bilder erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Vergl. 2.16.4).

3.2.1.2 Auswertung der Messungen

Intensitätsauswertung: Alle Fluoreszenzintensitäten der aufgenommenen Bilder eines Detektionskanals werden aufsummiert. Es ist möglich nur die Werte, die einen bestimmten Schwellenwert (Cutoff) überschreiten, zu werten und damit den Hintergrund zu minimieren. Die Cutoffwerte sind kanalspezifisch änderbar. Im Hinblick auf das Verhältnis von Positivproben zu Negativkontrollen hat sich empirisch ein Cutoff von 250 als geeignet herausgestellt. In Abbildung 3.2-2A sind beispielhaft die Ergebnisse von einer Positivprobe (in rot) und Negativkontrolle (in grün) in einem Diagramm dargestellt. Werden zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Sonden zur Detektion eingesetzt, können die Fluoreszenzintensitäten der beiden Messkanäle über dem Cutoff kolokalisiert werden. Zur Kolokalisation werden die Fluoreszenzintensitäten identischer Pixelpositionen multipliziert. Um die Intensitäten in beiden Kanälen anzugleichen, wurde der Markierungsgrad der Detektionssonden mit Fluorophoren eingerechnet und somit normiert.

Multiparameteranalyse: Nach der Kolokalisationsanalyse werden die Bilddaten wie in der Intensitätsanalyse Cutoff-korrigiert und auf den Markierungsgrad normiert. Als weiterer Parameter wird die Partikelgröße einbezogen. Um die Verteilung der Partikelgrößen zu veranschaulichen, werden die Intensitäten in Abhängigkeit von der Partikelgröße dargestellt (Vergl. Abbildung 3.2-2B). Jeder Strich entspricht einem gezählten Partikel.

Alle Messungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in der Intensitätsauswertung mit einem Cutoff von 250 ausgewertet. Dabei sind die sCJD-positiven Proben in rot und die sCJD-negativen Proben in grün dargestellt.

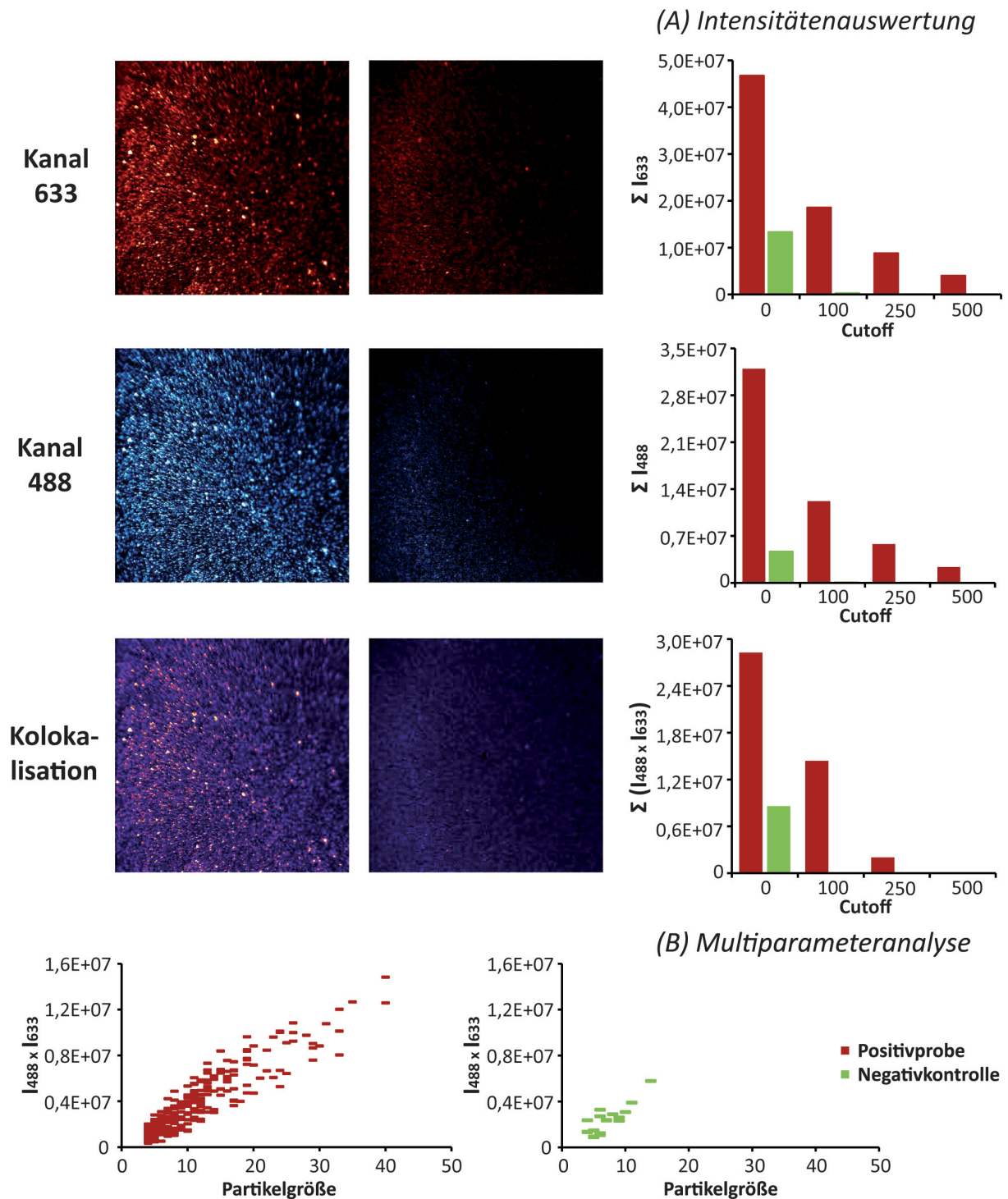


Abbildung 3.2-2 Auswertung der Bilddaten

(A) Für jede Probe werden vier nebeneinanderliegende Bilder mit $201 \times 201 \mu\text{m}$ für beide Kanäle gemessen. Die Bilder werden mit ImageJ in Montagen zusammengesetzt (B). Eine Auswertungsmöglichkeit ist alle Intensitäten über einem bestimmten Schwellenwert (Cutoff) für jeden Kanal aufzusummieren (B1). Danach ist eine Kolokalisationsanalyse möglich. Alle Intensitäten über einem Cutoff, die in beiden Kanälen am gleichen Ort vorkommen werden multipliziert (B2). Eine weitere Auswertungsmöglichkeit ist eine Multiparameteranalyse (B3), die eine Kombination aus den Intensitäten, den Partikelgrößen und der Häufigkeit an Partikeln über einem bestimmten Cutoff darstellt.

3.2.1.3 Ermittlung der optimalen Messhöhe über dem Glasboden der Microtiterplatte

Vor der Optimierung der Immobilisierung der Prion-Proteinaggregate und dessen Nachweis wurde die optimale Messhöhe über dem Glasboden der Microtiterplatte ermittelt. Dazu wurden die Glasoberflächen zweier Wells wie unter Kapitel 3.1 beschrieben mit jeweils einer sCJD-positiven Probe und einer Negativkontrolle vorbereitet. Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten im 488-Kanal, da nur 488-fluoreszenzmarkierter Saf32 als Sonde eingesetzt wurde. Mit Hilfe des Brechungsreflex des Laserstrahls an der Glasoberfläche wurde der Laserfokus vor jeder Messung mit dem z-Piezo auf die Ausgangshöhe (0 μm) geeicht. Die Messungen wurden dann bei 0, 1, 2, 3, 4 und 5 μm durchgeführt. Ein Bild jeder Probe der verschiedenen Messhöhen von 1 bis 4 μm über der Glasoberfläche ist in Abbildung 3.2-3A gezeigt. Die Bilder wirken mit zunehmender Höhe unschärfer. Aus der Intensitätenauswertung (Abbildung 3.2-3B) wird ersichtlich, dass der unspezifische Hintergrund aus der Negativkontrolle geringfügig mit zunehmender Messhöhe abnimmt. Die deutlichste Unterscheidung von Positivprobe und Negativkontrolle wurde bei einer Messhöhe von 2 μm über der Glasoberfläche erreicht. Die z-Position wurde somit für alle weiteren Messungen auf 2 μm über dem Glasboden der Microtiterplatte eingestellt.

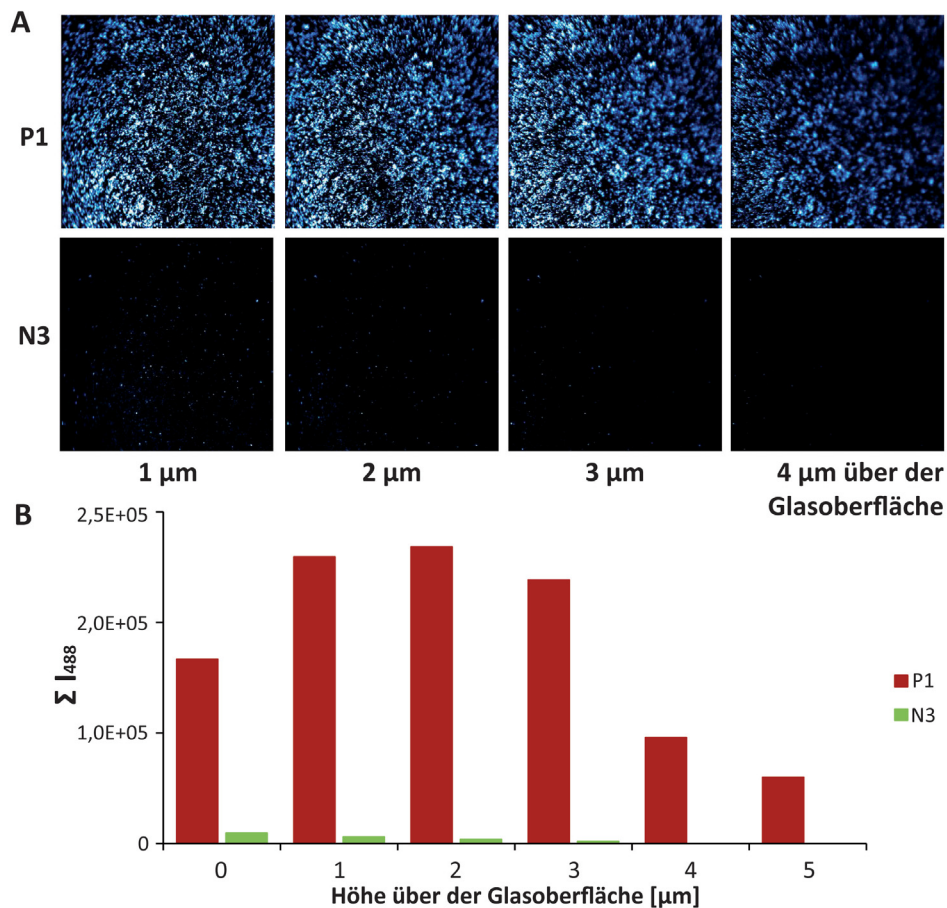


Abbildung 3.2-3 Bestimmung der Scanposition in z-Richtung

[A] Messung einer sCJD-positiven Probe (P1)- und einer Negativkontrolle (N1) in verschiedenen Höhen über der dem Glasboden der Microtiterplatte. **[B]** Intensitätsauswertung ohne Cutoff.

3.2.2 Erhöhung der Spacerkonzentration

Der Capture-Antikörper wird mittels des Spacers NHS-PEG-COOH kovalent an die Glasoberfläche der Microtiterplatte gebunden. Aus dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Experiment geht hervor: je höher die Spacerkonzentration desto mehr Antikörper wird auf der Glasoberfläche gebunden. Mit dem Ziel die Glasoberfläche mit Capture-Antikörper abzusättigen wurde die Spacerkonzentration bei der Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten erhöht. Dabei wurden zwei Spacerkonzentrationen, 5 mM und 50 mM, miteinander verglichen. Die Lösung mit der höheren Konzentration an NHS-PEG-COOH musste kurz auf 70°C erhitzt werden, um den Spacer in DMSO zu lösen. PrP^{CJD} wurde aus Hirnhomogenat, stammend von je 2 verschiedenen sCJD-Patienten und nicht an sCJD erkrankten Patienten, mit der NaPTA-Fällung gereinigt. Alle Proben wurden jeweils in Wells, die zuvor mit einer Spacerkonzentration von 5 und 50 mM funktionalisiert wurden, inkubiert. Saf32 wurde als Capture und als Sonde eingesetzt, um den Nachweis von PrP-Monomeren auszuschließen.

Aus der Intensitätsauswertung in Abbildung 3.2-4 wird deutlich, dass beide sCJD-negativen Proben bei der Verwendung von 50 mM Spacer nur etwa die Hälfte der Fluoreszenzsumme zeigen als bei der Verwendung von 5 mM. Auch wenn sich nicht in beiden sCJD-positiven Proben ein Anstieg der aufsummierten Fluoreszenzintensitäten zu beobachten ist, so erhöht sich das Verhältnis der sCJD-Proben zu den nicht sCJD-Proben (Abbildung 3.2-4B). Um unspezifischen Hintergrund zu blocken und mehr Capture kovalent zu binden (Vergl. Kapitel 3.1.3) wurde für alle weiteren Experimente 50 mM PEG eingesetzt.

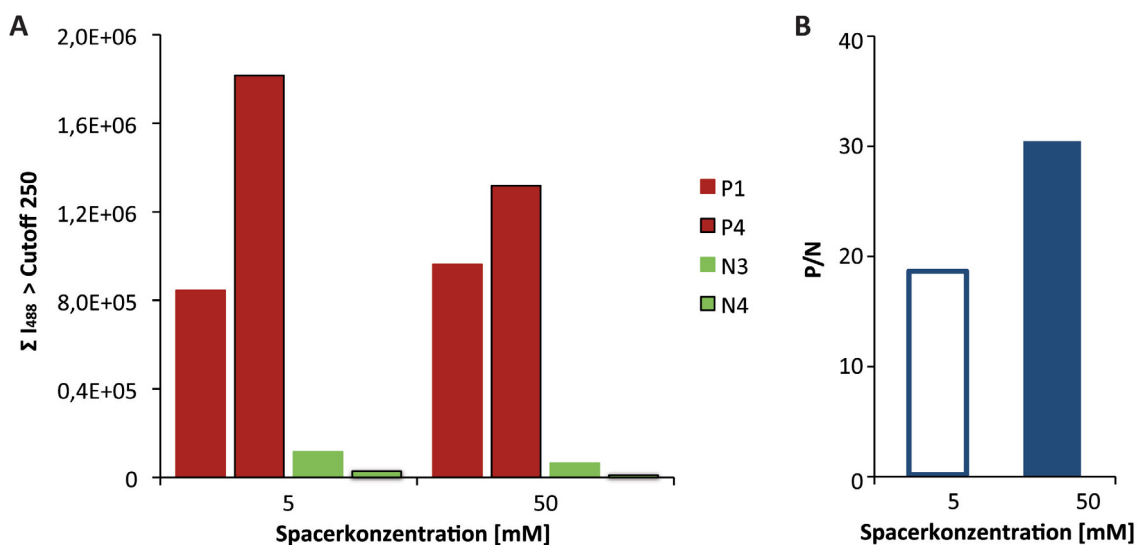


Abbildung 3.2-4 Erhöhung der Spacerkonzentration

[A] Surface-FIDA von 2 verschiedenen sCJD-Proben (P1, P4) und sCJD-negativen Proben (N3, N4). Die kovalente Bindung des Capture-Antikörpers erfolgte mit 5 mM und 50 mM Spacer NHS-PEG-COOH. **[B]** Verhältnis der Mittelwerte der sCJD-Proben und der sCJD-negativen Proben aus der Intensitätsauswertung.

3.2.3 Analyse der Spaceraktivierung

Durch die Aktivierung der Carboxylgruppe des Spacers erfolgt die Bindung an freie Aminogruppen des Capture-Antikörpers. Nach dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Protokoll erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppe mit NHS und dem Carbodiimid EDC zu einem semi-stabilen NHS-Ester. Dadurch wird eine freie Aminogruppe des Capture mit dieser NHS-Estergruppe zu einer stabilen Peptidbindung verknüpft. Um die Aktivierung der COOH-Gruppe des PEGs mit EDC zu optimieren, wurde die Verwendung von NHS und Sulfo-NHS analysiert. Die geladene Sulfonatgruppe des Sulfo-NHS (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) steigert die Wasserlöslichkeit des Carboxyl-modifizierten PEGs. Außerdem reagiert Sulfo-NHS-aktiviertes PEG bei einem pH von 7 – 8 (PBS). Durch die Verwendung von Sulfo-NHS sollte untersucht werden, ob mehr Capture

kovalent gebunden wird und dadurch auch mehr PrP^{CJD}-Partikel immobilisiert werden können. Dazu wurden eine sCJD-positive und eine sCJD-negative Proben unter Verwendung von NHS bzw. Sulfo-NHS mittels Surface-FIDA untersucht.

Die sCJD-positiven Proben (P2) zeigt unter Verwendung von Sulfo-NHS, wie erwartet, eine höhere Summe der Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 3.2-5A). Aber auch in der Negativkontrolle (N3) ist eine geringe Zunahme der aufsummierten Fluoreszenzintensitäten zu verzeichnen. Dies lässt den Schluss zu, dass durch die verbesserte Aktivierung der COOH-Gruppe des PEG's nicht nur der Capture-Antikörper, sondern auch Moleküle aus dem Hirngewebe gebunden werden. Möglicherweise ist der Blockschritt vor der Targetzugabe mit BSA und TEA nicht ausreichend um die mit Sulfo-NHS aktivierte PEG-Oberfläche abzublocken. Als Folge wurde das Protokoll zur Immobilisierung von PrP^{CJD}-Partikeln im Hinblick auf die Aktivierung des Spacers durch die weitere Verwendung von NHS nicht verändert.

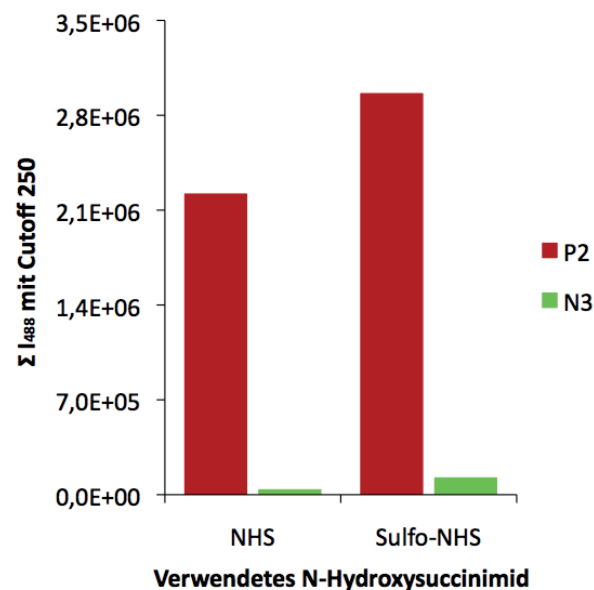


Abbildung 3.2-5 Analyse der Spaceraktivierung

Surface-FIDA einer sCJD-Probe (P2) und einer sCJD-negativen Probe (N3) auf einer PEG-funktionalisierten Glasoberfläche. Vergleich der Aktivierung der COOH-Gruppe des PEG-Spacers mit NHS und Sulfo-NHS.

3.2.4 Capture-vermittelte Bindung der Prion-Protein-aggregate

Aufgrund der Tatsache, dass Proteine an Oberflächen, wie Glas, adhären, wurde untersucht, ob die Immobilisierung der Prion-Proteinaggregate Capture-vermittelt ist oder eventuell eine unspezifische Adhäsion darstellt. Dazu wurden die Glasoberflächen der Messwells mit dem Capture Saf32 und ohne, wie in Kapitel 3.1 beschrieben,

vorbereitet. Das bedeutet alle Oberflächen wurden bis zur Aktivierung des Spacer PEG gleichbehandelt und bei der Zugabe des Capture wurde zum Vergleich nur mit PBS inkubiert. Danach wurden die Wells mit und ohne gebundenem Capture-Antikörper mit je einer sCJD-Probe (P6) und einer sCJD-negativen Probe (N6) inkubiert.

Ohne Capture zeigt die sCJD-positive Probe nur etwa ein Drittel der Fluoreszenzsumme im Vergleich zur sCJD-Probe, die mit Capture immobilisiert wurde. Prion-Proteinaggregate werden also über den Capture weit besser gebunden als sie nur an die Glasoberfläche adhären. Die Negativkontrolle (N6), die ohne Capture inkubiert wurde, zeigt eine höhere Fluoreszenzsumme als N6, die mit Capture inkubiert wurde. Es ist möglich, dass der Capture Saf32 unspezifische Adhäsion blockt. Damit konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil der Prion-Proteinaggregate über den Capture Saf32 gebunden wurde.

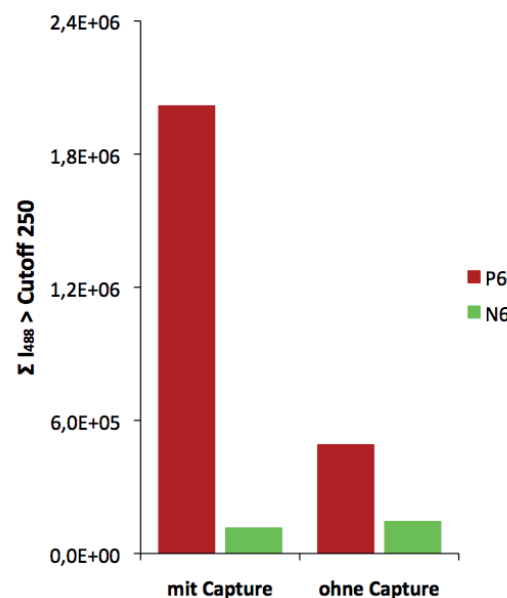


Abbildung 3.2-6 Capturevermittelte Bindung von Prion-Proteinaggregaten

Surface-FIDA einer sCJD-Probe (P6) und einer sCJD-negativen Probe (N6) auf einer PEG-funktionalisierten Glasoberfläche mit und ohne kovalent gebundenen Capture Saf32.

3.2.5 Optimierungen zur Targetbindung

Für die schrittweise Optimierung des diagnostischen Ansatzes wurden Prion-Proteinaggregate aus humanem Hirnhomogenat (siehe auch Kapitel 2.9) als Target gereinigt. Mit dem Ziel das pathologische PrP (i) zu konzentrieren, (ii) zu reinigen, (iii) nicht proteolytisch zu behandeln und von PrP^C zu trennen, wurde das Hirnhomogenat mit Phosphor-Wolframat (NaPTA) gefällt (Vergl. Kapitel 2.10). Durch mehrere Zentrifugationsschritte werden die PrP-Aggregate von löslichem PrP^C und anderen

löslichen Proteinen getrennt. Dabei wurden sCJD-positive Proben und nicht sCJD-positive Proben als Negativkontrollen gleich behandelt. Standardmäßig wurde das aus 25 mg Hirngewebe resultierende Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und im Wasserbad für 40 s bei Stufe 7 (ca. 80 W) und zusätzlich für 2 s bei 25 W mit der Nadelsonde ultrabeschallt. Auf der funktionalisierten Oberfläche wurden dann 20 µl des resuspendierten Pellets ÜN inkubiert und sechsmal mit PBST und fünfmal mit PBS gewaschen.

3.2.5.1 Reinigung von PrP^{CJD}-Partikeln mittels PTA-Fällung mit MgCl₂

Standardmäßig wurde die NaPTA-Fällung mit Magnesiumchlorid (MgCl₂) nach dem Protokoll von Birkmann *et al.* (2006) durchgeführt. Diese beinhaltet einen Benzonase-Schritt vor der Fällung mit 0,32 % NaPTA und 13,6 mM MgCl₂, und zwei Waschschrte (W1, W2) mit 250 mM EDTA in PBS und 50 mM EDTA mit 0,1 % Sarkosyl in PBS nach der Fällung. Die Überstände (Ü, W1, W2) nach den Zentrifugationsschritten bei 14.000 x g (30 min), das Ausgangshirnhomogenat (HH) und das resultierende Pellet (P) wurden mittels Western-Blot (Abbildung 3.2-7A) und Coomassie-gefärbter PAGE (Abbildung 3.2-7B) analysiert. Um die Anteile PK-resistentem PrP^{CJD} zu bestimmen, wurde jede Probe in zwei Teile geteilt und ein Teil mit 50 ng/µl Proteinase K (PK) behandelt.

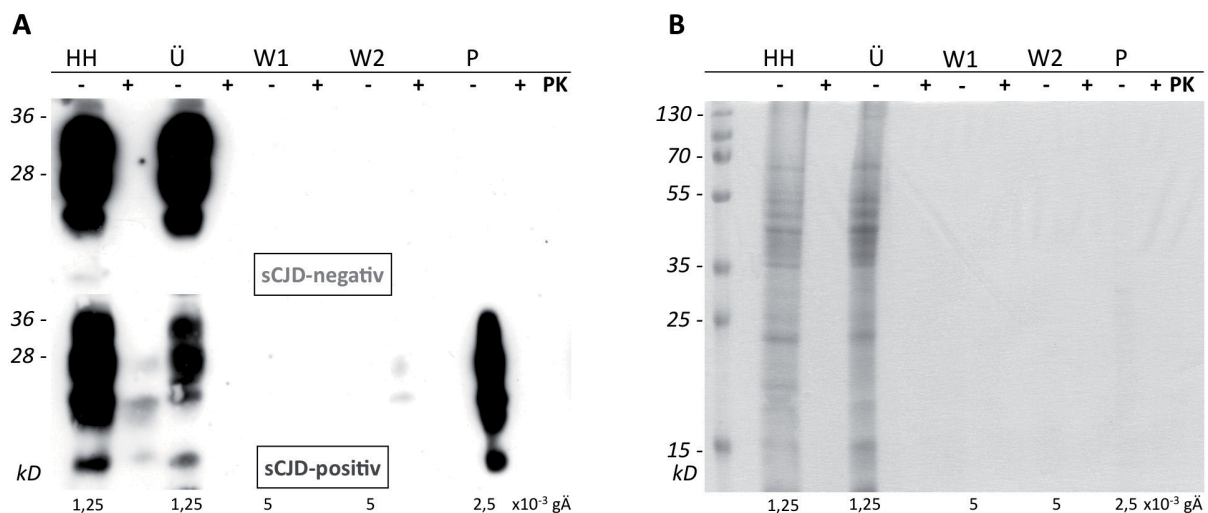


Abbildung 3.2-7 PTA-Fällung mit MgCl₂

[A]: Western-Blot-Analyse der NaPTA-Fällung einer sCJD-negativen Probe, sowie darunter einer sCJD-positiven Probe. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte mit 3F4. Von links nach rechts wurde das Hirnhomogenat (HH), der Überstand nach der Fällung mit NaPTA (Ü), die Überstände nach den Waschschrten (W1 und W2) und das resultierende Pellet aufgetragen. Jede Probe wurde zusätzlich mit 50 ng/µl Proteinase K (PK) behandelt. Die eingesetzten Hirnmengen sind jeweils unter dem Bild in gÄ angegeben. **[B]** Die Proben der sCJD-positiven Fällung wurden des Weiteren mittels SDS-Page aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Aus der Western-Blot-Analyse geht hervor, dass während der Fällung mit NaPTA des sCJD-negativen Hirnhomogenats das lösliche PrP^C im Überstand (Ü) verblieben ist und damit vom Pellet getrennt werden konnte. Im resultierenden Pellet ist kein PrP^C detektiert worden. Im Hirnhomogenat, den Überständen (Ü, W1, W2) und dem Pellet ist, wie erwartet, kein PK-resistentes PrP detektierbar. Im Gegensatz zur Negativkontrolle konnte mit der NaPTA-Behandlung PrP^{CJD} aus dem sCJD-positiven Hirnhomogenat gefällt werden. Der verwendete Erstantikörper 3F4 erkennt auch das N-terminal verkürzte PrP^{CJD} nach der partiellen N-terminalen Proteolyse. Das geringe Signal des PK-behandelten Hirnhomogenats weist auf einen geringen Anteil an resPrP^{CJD} hin. Im gereinigten Pellet ist kein Signal an PK-resistentem Material zu erkennen. Wobei sich herausgestellt hat, dass diese PK-Sensitivität einen Ausnahmefall darstellt. Der Überstand nach der Fällung zeigt das typische 3-Bandenmuster von di-, mono- und nicht glykosiliertem PrP. Die zweite Analyse des sCJD-positiven Proben mittels SDS-Page (Abbildung 3.2-7B) zeigt, dass das Pellet (P) nach der Fällung mit NaPTA von einem sehr großen Anteil an Proteinen des Zellmaterials aus dem Hirnhomogenat (HH) getrennt wird. Auf der Höhe von ca. 30 kDa ist eine geringe Färbung in der Spur des Pellets zu erkennen, die das gefällte PrP^{CJD} repräsentieren könnte. Aber auch eine leichte Färbung über die gesamte Spur weist auf die Fällung weiterer Proteine hin. Da die Fällung ursprünglich zur Fällung von Membranproteinen entwickelt wurde, ist ein Verbleib weiterer Proteine im resultierenden Pellet möglich.

Nachweis von PrP^{CJD}-Partikeln vor PrP^C-Hintergrund

In seltenen Fällen wird bei der NaPTA-Fällung von Hirnproben neben PrP^{Sc} auch PrP^C gefällt. So wurde bei der NaPTA-Fällung von einer nicht sCJD-positiven Probe PrP^C gereinigt (Abbildung 3.2-8A). Das Pellet beider Proben wurde jeweils auf der Capture-aktivierten Glasoberfläche einer Microtiterplatte inkubiert und auf vorhandene Prion-Proteinaggregate untersucht. Dazu wurde Saf32 als Capture und Sonde eingesetzt. Dabei sind in den Bilddaten der sCJD-positiven Probe sehr viel mehr und hellere Partikel zu sehen, als in der sCJD-negativen Probe (Abbildung 3.2-8B). Wie auch aus der Intensitätsauswertung in Abbildung 3.2-8BC hervorgeht, konnte die sCJD-positive Probe (P5) eindeutig von der Negativkontrolle (N4) unterschieden werden. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Saf32 als Capture und als Sonde die Detektion von monomeren PrP^C ausgeschlossen werden kann.

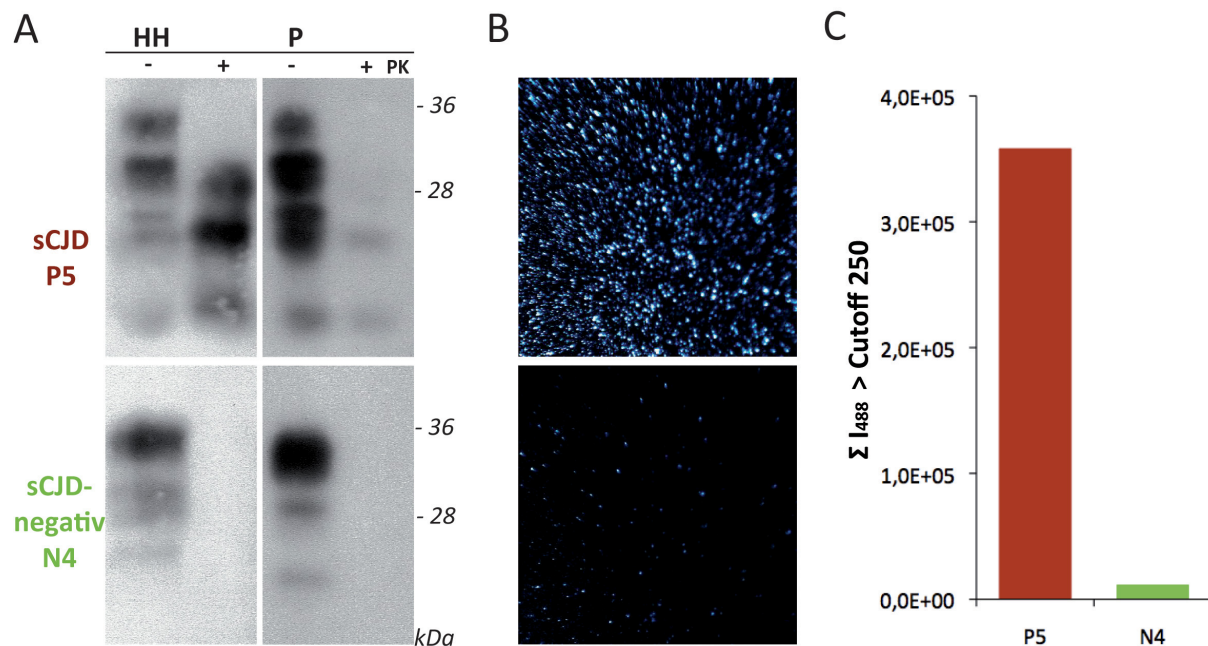


Abbildung 3.2-8 Detektion von PrP^{CJD}-Partikeln vor PrP^C-Hintergrund

[A] Western-Blot-Analyse der NaPTA-Fällung einer sCJD-negativen und einer sCJD-positiven Probe. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte mit 3F4. Aufgetragen wurde das Ausgangshirnhomogenat (HH) und das resultierende Pellet. Jede Probe wurde zusätzlich mit 50 ng/μl Proteinase K (PK) behandelt. Die eingesetzten Hirnmengen sind 1,25 mgÄ an HH und 2,5 mgÄ an P. **[B]** Bilddaten der mittels Surface-FIDA analysierten NaPTA- Pellets. Gezeigt sind die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten resultierend von der Bindung der Sonde Saf32. **[C]** Intensitätsauswertung der mittels Surface-FIDA analysierten Proben.

3.2.5.2 Reinigung von PrP^{CJD}-Partikeln mittels PTA-Fällung ohne MgCl₂

Zur Optimierung der Reinigung der PrP-Aggregate aus humanem Hirnhomogenat wurde auch die NaPTA-Fällung ohne MgCl₂ (Vergl.: Kapitel 2.10.2) analysiert. Die NaPTA-Fällung ohne MgCl₂ wurde nach dem Protokoll von Wille und Kollegen (2009) ohne eine Benzonase-Behandlung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Protokoll mit zwei hintereinandergeschalteten Fällungen und einem Waschschrift. Das Ausgangsmaterial (HH), der Überstand nach der 1. und 2. Fällung (Ü1, Ü2) und das resultierende Pellet (P) der Fällung von einer sCJD-positiven und einer sCJD-negativen Probe wurden gleichermaßen untersucht, wie die Proben der NaPTA-Fällung mit MgCl₂ (Vergl. Kapitel 3.2.5.1).

HH und Ü1, der sCJD-positiven Probe, weisen nach der Behandlung mit PK einen Anteil an PK-resistentem PrP auf (Abbildung 3.2-9A). Im Pellet hingegen, ist so gut wie gar kein Anteil an resPrP zu erkennen. Aufgrund der Tatsache, dass in der Negativkontrolle kein Signal im Pellet auftritt, lässt sich ableiten, dass das gefällte PrP in der sCJD-Probe krankheitsassoziiertes PrP darstellt. Sowohl in der Western-Blot-Analyse als auch in der SDS-PAGE (Abbildung 3.2-9B) zeigt HH und Ü1 ein Signal. Somit ist neben dem Reinigungseffekt ein Verlust an PrP zu verzeichnen. Auch in dem Pellet der

Reinigung deutet eine leichte Blaufärbung in Abbildung 3.2-9B auf eine Verunreinigung mit anderen Proteinen hin. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass es möglich ist auch mit der NaPTA-Fällung ohne MgCl_2 PrP^{CJD} aus Hirnhomogenat zu fällen.

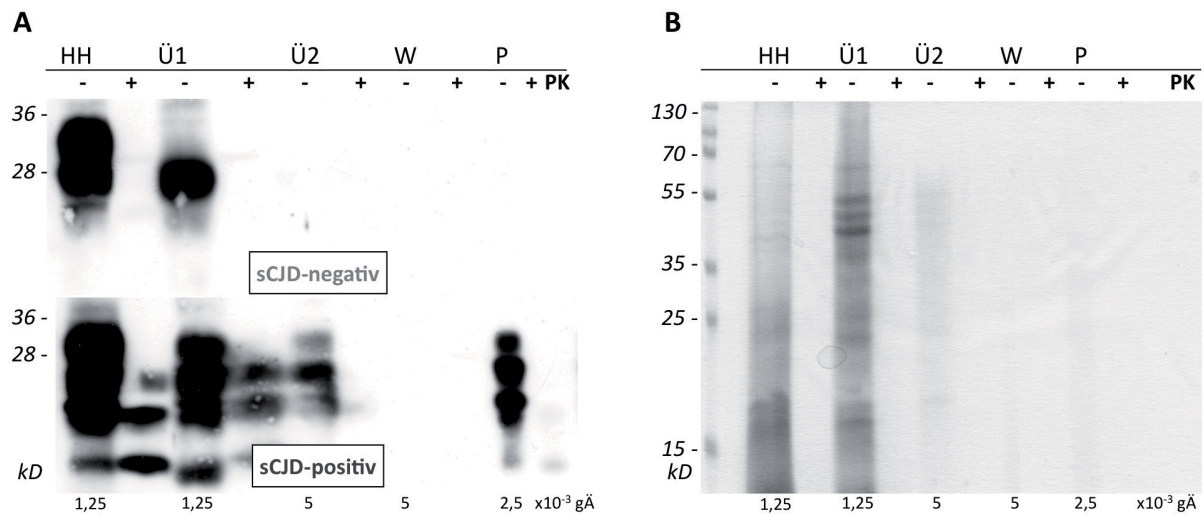


Abbildung 3.2-9 Fällung ohne MgCl_2

[A] Western-Blot-Analyse der NaPTA-Fällung einer sCJD-negativen und einer sCJD-positiven Probe. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte mit 3F4. Von links nach rechts wurde das Ausgangshirnhomogenat (HH), der Überstand nach den Fällungen mit NaPTA (Ü1, Ü2), der Überstand nach dem Waschschriff (W) und das resultierende Pellet (P) aufgetragen. Jede Probe wurde zusätzlich mit 50 ng/ μl Proteinase K (PK) behandelt. Die eingesetzten Hirnmengen sind jeweils unter dem Bild in gÄ angegeben. **[B]** Die Proben der sCJD-positiven Fällung wurden noch einmal mittels SDS-Page aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Nach der Analyse beider Fällungsvarianten wurden alle gereinigten Proben ebenfalls mittels Surface-FIDA verglichen (siehe Abbildung 3.2-10). Dazu wurde, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, die Glasoberfläche einer Microtiterplatte mit kovalent gebundenem Saf32 vorbereitet. Die Pellets der sCJD-positiven Probe und der sCJD-negativen Proben, vorher mit und ohne MgCl_2 NaPTA-gefällt, wurden über Nacht inkubiert und mit 488 fluoreszenzmarkiertem Saf32 nachgewiesen.

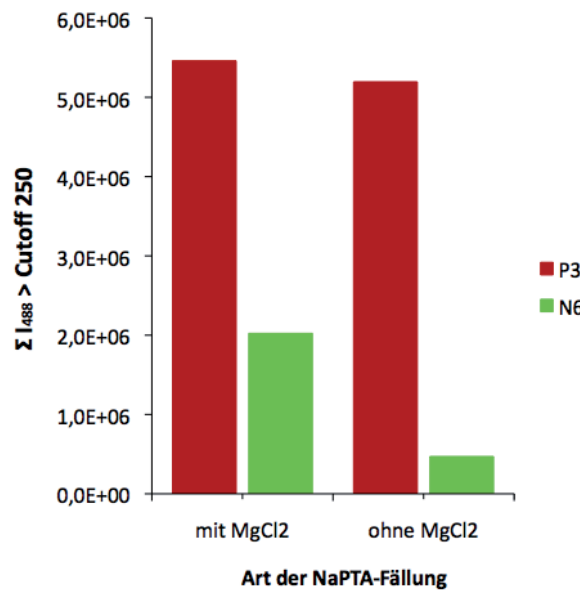


Abbildung 3.2-10 Vergleich der NaPTA-Fällungen von Pr^{P^{CJD}}

Vergleich verschieden gereinigter Hirnproben. Surface-FIDA einer mittels NaPTA-Fällung mit MgCl₂ und ohne MgCl₂ gereinigten sCJD-Probe (P3) und einer sCJD-negativen Probe (N6).

Die aufsummierten Fluoreszenzintensitäten von P6 vorbehandelt mit der Fällung mit MgCl₂ und ohne MgCl₂ sind ähnlich. Hingegen nimmt die Fluoreszenzsumme der Negativkontrolle (N6) vorbehandelt ohne MgCl₂ signifikant gegenüber der Vorbehandlung mit MgCl₂ ab. Daraus resultierte die weitere Vorbehandlung der zu analysierenden Hirnproben mit der NaPTA-Fällung ohne MgCl₂.

3.2.5.3 Resuspendierung und Inkubation des Targets

Standardmäßig wurde das NaPTA-Pellet aus 25 mg Hirngewebe in 200 µl PBS aufgenommen und im Wasserbad (Sonicator) für 40 s bei etwa 80 W resuspendiert. Eine weitere Ultraschallung erfolgte zusätzlich mit der Nadelsonde für 2 s bei etwa 25 W. Das bedeutet, dass in diesem zweiten Resuspendierungsschritt des Pellets das Probengefäß geöffnet wird, um die Nadelsonde einzutauchen. Es wurde überprüft, ob eine Ultraschallung des Targets im Wasserbad für 60 s ausreichend ist. In einem zweiten Schritt wurde die Targetinkubation analysiert. Nach dem in Kapitel 3.2 beschriebenen Standard-Protokoll zur Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten erfolgte die Inkubation des Targets ÜN bei 4°C. Mit dem Ziel ein Anhaften von Verunreinigungen aus dem Hirngewebe zu minimieren wurde die Inkubation des Targets auf 2 h bei RT verkürzt.

Je zwei verschiedene sCJD-positive und sCJD-negative Proben wurden mittels Surface-FIDA analysiert. Dazu wurden die resultierenden Pellets der NaPTA-Fällung zuerst für 60 s auf Stufe 7 in PBS resuspendiert und ÜN bei 4°C inkubiert. Desweiteren

wurden gleichbehandelte Proben für 40 s im Ultraschallbad auf Stufe 7 und mittels Nadelsonde nochmals für 2 s bei 25 W beschallt. Die Targetinkubation erfolgte jeweils ÜN bei 4°C und für 2 h bei RT (Abbildung 3.2-11). Saf32-488 wurde als Detektionsantikörper eingesetzt.

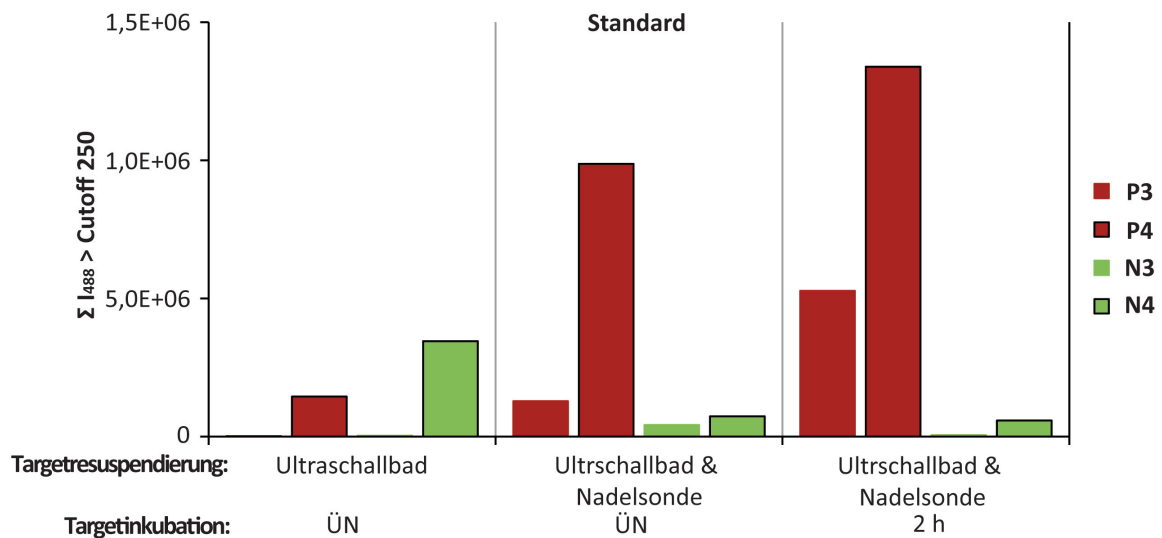


Abbildung 3.2-11 Vergleich der Targetresuspendierung und -inkubation

Surface-FIDA von je 2 verschiedenen sCJD-positiven und sCJD-negativen Proben. Zum Einen wurde die Resuspendierung des NaPTA-Pellets mittels Ultraschallbad und mittels Ultraschallbad und Nadelsonde verglichen. Zum Anderen erfolgt ein Vergleich der Inkubationsdauer des Targets ÜN und 2 h.

Eine Unterscheidung beider sCJD-Proben und den Negativkontrollen ist nur bei einer Resuspendierung des Pellets mit dem Ultraschallbad und Nadelsonde möglich. Eine Ultraschallbehandlung ausschließlich im Wasserbad ist nicht ausreichend, um die PrP-Aggregate hinreichend zu suspendieren. Hingegen konnte durch eine kürzere Inkubationszeit des Targets das Verhältnis der sCJD-Proben P3 und P4 zu den Negativkontrollen N3 und N4 deutlich erhöht werden. Eine Inkubationszeit des Targets von 2 h ist demnach ausreichend für die Bindung der Prion-Proteinaggregate und um ein unspezifisches Anhaften anderer Proteine aus dem Hirnmaterial zu minimieren. Die vorher als Standard angesehene Prozedur hat sich also nicht als günstigste erwiesen. Daraufhin wurde im Folgenden das NaPTA-Pellet weiterhin mittels Ultraschallbad und Nadelsonde in PBS resuspendiert und für 2 h bei RT auf der mit dem Capture-Antikörper modifizierten Glasoberfläche inkubiert.

3.2.5.4 Immobilisierung verschiedener Mengen an PrP^{CJD}

Bei Versuchen mehr Target zu binden, wurde festgestellt, dass das Probenvolumen keinen Einfluss auf die Bindung des Target hatte. Um zu analysieren, ob der Capture

möglichweise mit der zugegebenen Menge an PrP^{Sc} abgesättigt wurde, erfolgte eine Verdünnung des NaPTA-Pellet der sCJD-positiven Probe P4 und der sCJD-negativen Probe N3 mit PBS. Zusätzlich konnte so untersucht werden, ob das Hintergrundsignal in den sCJD-negativen Proben durch das Anhaften von Verunreinigungen durch die Verdünnung mit PBS minimiert werden kann. Nach dem Standard-Protokoll wird das resultierende NaPTA-Pellet in 200 µl PBS mittels Ultraschall resuspendiert und 20 µl mittels Surface-FIDA analysiert. Die sCJD-positiven und sCJD-negativen Proben wurden je dreimal in einem Verhältnis von 1:2 in PBS verdünnt. Die Ausgangsprobe mit 2,5 mgÄ und die drei Verdünnungen mit 0,8; 0,3 und 0,1 mgÄ der sCJD-positiven und sCJD-negativen Probe wurden mittels Surface-FIDA analysiert. Dabei wurden alle Fluoreszenzintensitäten ohne einen Cutoff aufsummiert, um die Hintergrundsignale in den verdünnten Negativkontrollen analysieren zu können (Abbildung 3.2-12A). In einem zweiten Schritt wurden die Verdünnungen der sCJD-positiven Probe P4 mittels Western-Blot analysiert. Außerdem wurden die Suspensionen nach der Inkubation auf der Capture-modifizierten Glasoberfläche abgenommen und mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 3.2-12B).

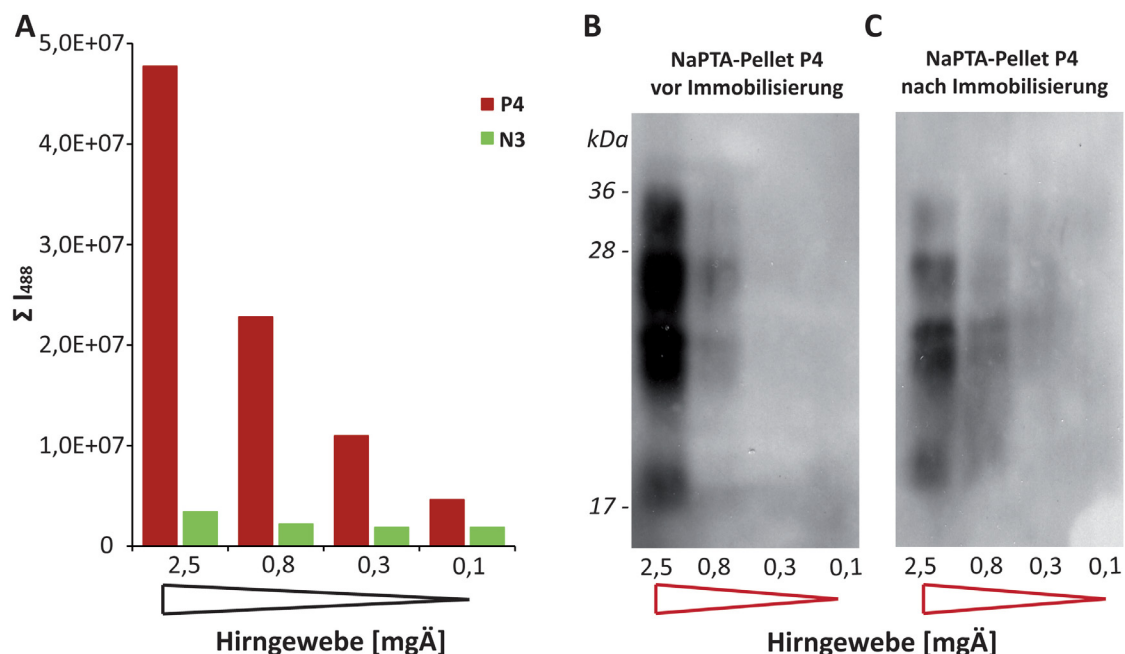


Abbildung 3.2-12 Analyse verschiedener Mengen an Hirngewebe

[A] Surface-FIDA von je 4 Verdünnungen (2,5; 0,8; 0,3 und 0,1 mgÄ) einer sCJD-positiven (P4) und einer sCJD-negativen Probe (N3). Alle Fluoreszenzintensitäten wurden ohne Cutoff aufsummiert. **[B]** Western-Blot-Analyse des verdünnten NaPTA-Pellets von P4 und dem Überstand der Proben der Verdünnungen von P4 nach der Immobilisierung mittels Surface-FIDA.

Die Fluoreszenzsumme der sCJD-positiven Proben nimmt mit der Menge an untersuchten Hirngewebe ab (Abbildung 3.2-12A). Dass diese Abnahme mit der PrP-

Menge korreliert, wird in der Western-Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 3.2-12B). Wenn der Capture mit PrP^{Sc} abgesättigt gewesen wäre, hätten die Fluoreszenzsumme in den ersten Verdünnungsschritten konstant bleiben müssen. Das Hintergrundsignal fällt nur leicht bei der ersten Verdünnung ab und entsteht demnach nicht ausschließlich durch das Anhaften von Verunreinigungen aus dem Hirngewebe.

Nach der Inkubation der sCJD-Proben wurden diese Targetsuspension nicht verworfen, sondern mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 3.2-12C). Hieraus geht hervor, dass nur ein geringer Anteil des PrP^{CJD} nicht gebunden wurde.

3.2.5.5 Sedimentation der PrP^{CJD}-Partikel mittels Zentrifugation

Da nach der Inkubation des Targets ein Teil des eingesetzten PrP^{CJD} nicht gebunden wurde (Vergl. Kapitel 3.2.5.4), wurde untersucht, ob es möglich ist, dem entgegenzuwirken. Mit dem Ziel das PrP^{CJD} zu sedimentieren, wurde ein Zentrifugationsschritt während der Inkubation des Targets eingeführt. Um die verschiedenen Inkubationsbedingungen vergleichen zu können, wurden zwei Microtiterplatten für die Immobilisierung zwei verschiedener sCJD-positiver und zwei sCJD-negativer Proben verwendet. Dabei wurde eine Microtiterplatte während der Inkubation des Targets für 1 h bei ca. 1.300 x g zentrifugiert, währenddessen die Inkubation des Targets auf der anderen Platte für 2 h bei RT standardmäßig ohne Zentrifugation erfolgte.

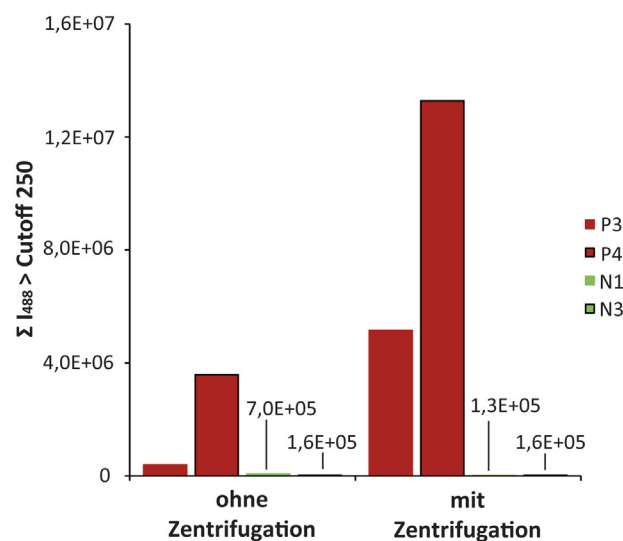


Abbildung 3.2-13 Sedimentation des Targets mittels Zentrifugation

Surface-FIDA zwei verschiedener sCJD-positiver und sCJD-negativer Proben. Verglichen wurde die Targetinkubation ohne und mit Zentrifugationsschritt. Die Zentrifugation erfolgte bei 1.300 x g für 1 h.

Im Vergleich zu den Fluoreszenzsummen der sCJD-positiven Proben, die 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden, ist ein signifikanter Anstieg in den sCJD-positiven Proben, die zentrifugiert wurden zu verzeichnen. Die Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen N1 und N3 hingegen verändern sich nicht. Somit konnte durch den Zentrifugationsschritt während der Inkubation des Targets, PrP^{CJD}-Aggregate konzentriert und gebunden werden. Infolgedessen wurde das Protokoll zur Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten um einen Zentrifugationsschritt für 1 h bei 1.300 x g während der Targetinkubation erweitert.

3.2.5.6 Einführung stringenter Waschschrte

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz mit denaturierenden Eigenschaften. Es erhöht die Löslichkeit von PrP (Post *et al.* 1998). In diesem Versuchsteil wurde SDS getestet, ob SDS im Waschpuffer, die Hintergrundsignale reduzieren kann. Aufgrund der Verwendung des PEG-Spacers wird der Capture kovalent an die Glasoberfläche gebunden und somit die Einführung harter Waschschrte mit z.B. SDS ermöglicht. So wurden nach der Inkubation des Targets sechs Waschschrte mit PBST und fünf Waschschrte mit PBS sechs weitere Waschschrte mit 0,2 % SDS in PBS eingefügt. Dazu wurde eine sCJD-positive Probe und eine sCJD-negative Probe einmal ohne SDS und mit SDS nach der Inkubation auf der Capture-modifizierten Glasoberfläche behandelt.

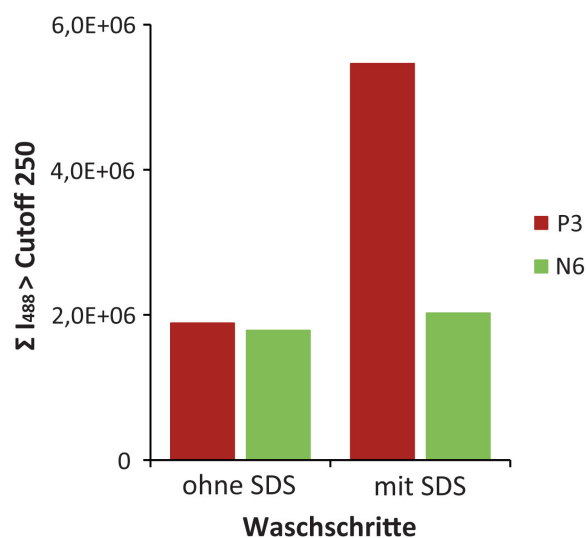


Abbildung 3.2-14 Waschschrte mit SDS nach Targetinkubation

Surface-FIDA einer sCJD-positiven Probe (P3) und einer sCJD-negativen Probe (N6). Erweiterung der Waschschrte nach der Inkubation des Targets um sechs Waschschrte mit 0,2 % SDS in PBS.

Nach der Analyse der Proben P3 und N6 mittels Surface-FIDA ist es nicht möglich die Fluoreszenzsummen beider Proben ohne die Waschschrte mit SDS zu unterscheiden. In diesem Experiment wurde die Targteinkubation noch nicht mit einem Zentrifugationsschritt kombiniert, was die Unterscheidbarkeit der Proben deutlich herabsetzt. Hingegen durch die Einführung der Waschschrte mit 0,2 % SDS nach der Targetinkubation konnte eine signifikante Unterscheidung zwischen der sCJD-positiven Probe P3 und Negativkontrolle N6 erfolgen. Somit wurden die Waschschrte nach der Targetinkubation für alle weiteren Untersuchungen um sechs Waschschrte mit 0,2 % SDS erweitert. Die Erhöhung des Signals in der positiv-Probe, welche mit SDS gewaschen wurde, könnte damit zu erklären sein, dass SDS die PrP^{CJD}-Aggregate leicht denaturiert (Post *et al.* 1998) und somit die Zugänglichkeit für die Bindung der Detektionsantikörper erhöht.

Alle zuvor beschriebenen Entwicklungen und Evaluierungen führten zu dem in Abbildung 3.2-15 zusammengefassten Protokoll zum Nachweis einzelner Prion-Proteinaggregate.

1. Reinigung der Glasoberfläche	
• 15 min NaOH (5M) • 3 x H₂O • 15 min HCl (1M) • 3 x H₂O • mit EtOH spülen und mit N₂ trocknen	
2. Glas-Aktivierung (Aminogruppen)	
• 20 µl Ethanolamin (5,6 M)/Well <i>Inkubation: ÜN</i>	Tag 1
• 4 x DMSO • mit EtOH spülen und mit N₂ trocknen	
3. Bindung des PEG-Spacer	
• 50 mM PEG in DMSO + 2 % (v/v) TriEthylAmin (TEA) • <i>Inkubation:</i> mind. 1 h • 5 x H₂O	
4. PEG-Aktivierung	
• NHS/EDC(je 50mM) in MES • <i>Inkubation:</i> 30 min – max. 1 h • zügig 3 x MES	
5. Zugabe des Capture-Antikörpers Saf32	
• Capture: 100 ng/µl in PBS • <i>Inkubation:</i> mind. 1h • 4 x PBS	
6. Blockschrift	
• 3% (w/v) BSA, 30 mM TEA • <i>Inkubation:</i> 1h (optional ÜN) • mind. 4 x PBST + 3x PBS	
7. Targetinkubation	
• 20 µl NaPTA-Pellet • <i>Inkubation:</i> 2 h bei RT oder optional: Zentrifugation bei ca. 1.300 x g • 6 x 0.2% SDS in PBS + 6 x PBST + 5 x PBS	
8. Detektion	
• ca. 1 ng/µl Alexa Fluor 488 markierter Saf32 (1,5% BSA) • Inkubation: ca. 2h • 6 x PBST + 5 x PBS	Tag 2

Abbildung 3.2-15 Protokoll zur Immobilisierung und Detektion von Prion-Proteinaggregaten
 Endversion des Protokolls zur Immobilisierung und Nachweis von Prion-Proteinaggregaten, gereinigt aus Hirnproben. Alle vorher beschriebenen Optimierungen sind in rot dargestellt.

3.2.6 Optimierung der Detektion von PrP^{CJD}

Im Folgenden wird der Detektionsschritt des diagnostischen Ansatzes zum Einzelpartikelnachweis von Prion-Proteinaggregaten analysiert. Eine zweite Detektionssonde sollte evaluiert werden, um die Detektion mittels zwei verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper zu ermöglichen. Als ein Detektionsantikörper wurde Saf32, der sich während der vorherigen Optimierungen im Hinblick auf den Nachweis von Prion-Proteinaggregaten bewährt hatte, eingesetzt.

3.2.6.1 Ermittlung eines zweiten Detektionsantikörpers

Um die Spezifität im Hinblick auf die Detektion von Prion-Proteinaggregaten zu erhöhen, sollte ein weiterer Detektionsantikörper eingesetzt werden. Nur Partikel, an welche beide Antikörper binden, sollten so durch Kolokalisationsanalysen in die Auswertung eingehen. Um eine zweite Sonde zu evaluieren, wurden je zwei verschiedene sCJD-positive und sCJD-negative Proben wie zuvor beschrieben immobilisiert (Vergl. Abbildung 3.2-15). Mehrere Prion-Protein-spezifische Antikörper wurden mit Alexa Fluor 633 markiert. Dazu gehörten Pri308, Saf61, Pri917 und 12F10 (siehe auch Tabelle 2.14-1). Zur Kontrolle wurde ein Antikörper eingesetzt, der keine Prion-Protein-Spezifität besitzt (Vergl. Kapitel 3.2.1.3). Die Konzentration der Antikörper wurde auf 1 ng/μl eingestellt, 1,5 % BSA zugegeben und anschließend 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. 10 μl des Überstandes wurden für 1 h in dem jeweiligen Well inkubiert. Danach folgten sechs Waschschrte mit PBST und fünf mit PBS.

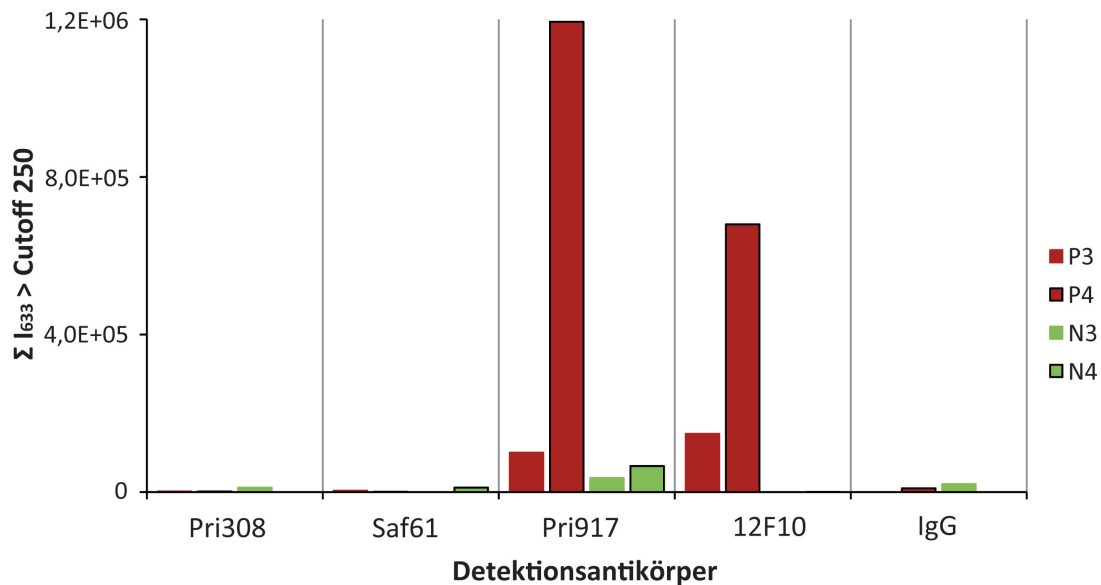


Abbildung 3.2-16 Test verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper als Sonden

Analyse zwei verschiedener sCJD-positiver (P3, P4) und sCJD-negativer Proben (N3, N4) mittels Surface-FIDA. Verglichen wurden fünf verschiedene Alexa Fluor 633-markierter Sonden: die Anti-PrP Antikörper Pri308, Saf61, Pri917 und 12F10 sowie ein nicht-PrP-spezifischer IgG. Aufsummiert wurden alle Fluoreszenzintensitäten im Kanal 633 über einem Cutoff von 250.

Mittels den verwendeten Antikörpern Pri308 und Saf61, sowie des nicht-PrP-spezifischen IgGs, ist es nicht möglich die sCJD-positiven von den sCJD-negativen Proben zu unterscheiden (Abbildung 3.2-16). Mit Pri917 kann die sCJD-positive Probe P4 von beiden sCJD-negativen Proben unterschieden werden. Jedoch tritt ein hohes Hintergrundsignal in den sCJD-negativen Proben auf, so dass es nicht möglich ist, die sCJD-positive Probe P3 von beiden sCJD-negativen Proben zu unterscheiden. Mit 12F10 können beide sCJD-positiven Proben eindeutig von den sCJD-negativen Proben unterschieden werden. 12F10 erkennt das Prion-Protein an der Aminosäuresequenz 142 – 179. Saf32, der als Capture und eine Sonde weiterhin eingesetzt wird, erkennt das Prion-Protein am N-Terminus (PrP-Epitop: 59 – 89). Somit wurde 12F10 als zweite Detektionssonde für den Nachweis der Prion-Proteinaggregate gewählt.

3.2.6.2 Nachweis von Prion-Proteinaggregaten mittels zwei Detektionssonden in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen der Sonden

Saf32 liefert ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis beim Nachweis von Prion-Protein-Aggregaten als der 12F10. Um zu evaluieren, ob Saf32 ggf. die Prion-Protein-Aggregate absättigt und damit 12F10 an einer Bindung hintert, wurde die Bindung des 12F10 an Prion-Proteinaggregate in Abhängigkeit von der Konzentration des Saf32 untersucht. Dazu wurden eine sCJD-positive Probe und eine sCJD-negative Probe mittels Surface-

FIDA immobilisiert und mit einem Gemisch aus beiden Detektionssonden analysiert. Vier verschiedene Mischungsverhältnisse von Saf32 und 12F10 wurden untersucht. Saf32 wurde in den Konzentrationen 1; 0,33; 0,11 und 0,04 ng/μl bei einer konstanten Konzentration von 12F10 von 2 ng/μl eingesetzt und verglichen. Auch hier wurden die Antikörperlösungen einer Ultrazentrifugation bei 100.000 x g unterzogen und 20 μl des Überstandes pro Well eingesetzt.

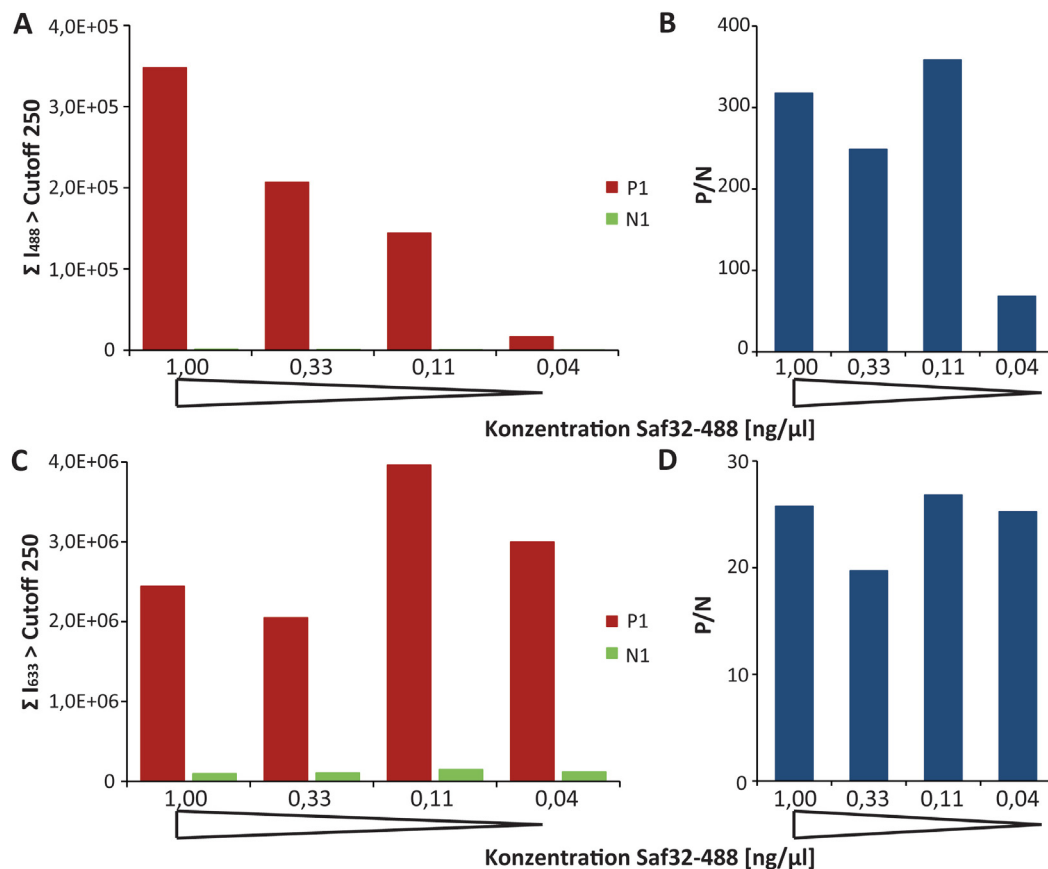


Abbildung 3.2-17 Detektion von Prion-Proteinaggregaten mittels Saf32 und 12F10

Surface-FIDA einer sCJD-positiven und einer sCJD-negativen Probe mittels Alexa Fluor 488 markiertem Saf32 und Alexa Fluor 633 markiertem 12F10, welche in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen eingesetzt wurden. Konzentration 12F10: 2ng/μl, Konzentration Saf32 in der Abb. vermerkt. **[A]** Alle Fluoreszenzintensitäten des 488-Kanals, über einem Cutoff von 250 wurden aufsummiert. **[B]** Verhältnisse der aufsummierten Fluoreszenzintensitäten der sCJD-positiven und sCJD-negativen Probe aus A **[C]** Alle Fluoreszenzintensitäten des 633-Kanals über einem Cutoff von 250 wurden aufsummiert. **[D]** Verhältnisse der aufsummierten Fluoreszenzintensitäten der sCJD-positiven und sCJD-negativen Probe aus C.

In der Intensitätenauswertung in Abbildung 3.2-17A ist eine proportionale Abnahme der Fluoreszenzsummen mit der Konzentration an eingesetztem 488-fluoreszenzmarkiertem Saf32 in der sCJD-positiven Probe zu erkennen. Das Verhältnis der Fluoreszenzsummen der sCJD-positiven zur sCJD-negativen Probe fällt erst bei der Verwendung von 0,04 ng/μl ab (Abbildung 3.2-17B). Durch den Einsatz von geringeren Konzentrationen an Detektionsantikörpern kann das negative Hintergrundsignal

minimiert werden. Die Fluoreszenzsummen des 12F10 in den sCJD-positiven Proben zeigen keinen Anstieg in Abhängigkeit von geringeren Konzentrationen an Saf32 (Abbildung 3.2-17C). Dies wird durch die konstanten Verhältnisse der jeweiligen Fluoreszenzsummen von P1 zu N1 deutlich.

3.2.6.3 Serielle Inkubation der Sonden

Bei der parallelen Verwendung von Saf32 und 12F10 als Sonden, zeigt Saf32 höhere Signale bei der Detektion der Prion-Proteinaggregate als 12F10. Nachdem die Bindung des 12F10 an Prion-Proteinaggregate keine Abhängigkeit von der Saf32-Konzentration zeigte, erfolgte eine serielle Zugabe der Sonden. Nach der Immobilisierung zwei verschiedener sCJD-positiver und nicht sCJD-positiver Proben erfolgte die Zugabe von Saf32 und 12F10 zum Einen parallel und zum Anderen nacheinander (seriell). Im Fall der seriellen Inkubation, wurde die Probe zunächst für 45 min mit 12F10 inkubiert und dann Saf32 zugegeben und für weitere 45 min inkubiert. Alexa Fluor 488 markierter Saf32 wurde mit 0,5 ng/ μ l und Alexa Fluor 633 markierter 12F10 wurde mit 2 ng/ μ l eingesetzt.

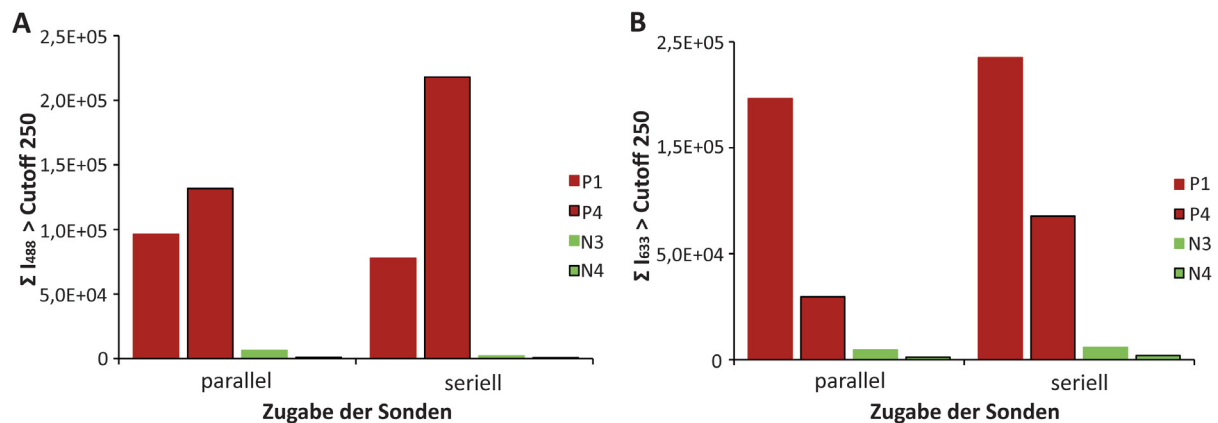


Abbildung 3.2-18 Parallele und serielle Inkubation der Sonden

Surface-FIDA einer sCJD-positiven und einer sCJD-negativen Probe mittels Alexa Fluor 488 markiertem Saf32 und Alexa Fluor 633 markiertem 12F10. **[A]** Alle Fluoreszenzintensitäten des 488-Kanals über einem Cutoff von 250 wurden aufsummiert. **[B]** Alle Fluoreszenzintensitäten des 633-Kanals über einem Cutoff von 250 wurden aufsummiert.

Bei dem Vergleich der parallelen und seriellen Inkubation der Sonden in Bezug auf die Bindung des Saf32 (Abbildung 3.2-18A), ist eine Abnahme der Fluoreszenzsumme von der sCJD-positiven Probe P1 und eine Zunahme der Probe P4 zu verzeichnen. Außerdem nimmt das Hintergrundsignal in beiden Negativkontrollen bei der seriellen Inkubation der Sonden etwas ab. Die Fluoreszenzsummen aus Kanal 633 beider sCJD-positiver Proben steigen an (Abbildung 3.2-18B). Daraus lässt sich schließen, dass durch

verlängerte Inkubation der Sonde 12F10 im Gegensatz zu Saf32 eine vermehrte Bindung des 12F10 an Prion-Proteinaggregate erfolgen konnte. Aus diesem Grund erfolgte die Zugabe der Detektionsantikörper Saf32 und 12F10 im Folgenden seriell.

Mit der Analyse der Sondenzugabe und -inkubation, wurde die Optimierung des diagnostischen Ansatzes Surface-FIDA in Bezug auf die Immobilisierung und die Detektion von Prion-Proteinaggregaten aus Hirnproben abgeschlossen.

3.3 Detektion von PrP^{CJD} in Hirngewebe

Um zu überprüfen, ob mit dem neu etablierten Protokoll (Abbildung 3.2-15) PrP^{CJD} gereinigt aus Hirnproben nachgewiesen werden kann, folgte die parallele Untersuchung von sechs verschiedenen sCJD-positiven und fünf verschiedenen sCJD-negativen Proben nach diesem Protokoll. Bei der Messung wurden, je 4 Bilder (200 x 200 Pixel) mit einer Ausdehnung von 350 x 350 nm und einer Pixeltime auf 400 µs gemessen. Alle Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 250 wurden nach einer Kolokalisationsanalyse der Bilder aufsummiert. Damit wurden nur die Signale gewertet, die von beiden Sonden dem Saf32 und dem 12F10 detektiert wurden.

Die Detektion mit Saf32 und 12F10 erlaubt eine eindeutige Unterscheidung aller sCJD-positiven von den sCJD-negativen Proben (Abbildung 3.3-1A). Die exemplarisch gezeigten Bilddaten der Proben P2, P3, P6 und N3, N4, N5 (Abbildung 3.3-1B) zeigen die Detektion von einzelnen Prion-Partikeln in den sCJD-positiven Proben. Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mittels der Anwendung des etablierten Protokolls (Abbildung 3.2-15) einzelne PrP^{CJD} - Aggregate aus humanen Hirnproben zu detektieren. Somit konnte eine molekulare Diagnostik erfolgreich für CJD etabliert werden. Auffällig sind die Variationen in den Fluoreszenzsummen der sCJD-positiven Proben. Diese lassen darauf schließen, dass die Anzahl der Prion-Proteinaggregaten in den Hirnproben enorm variiert.

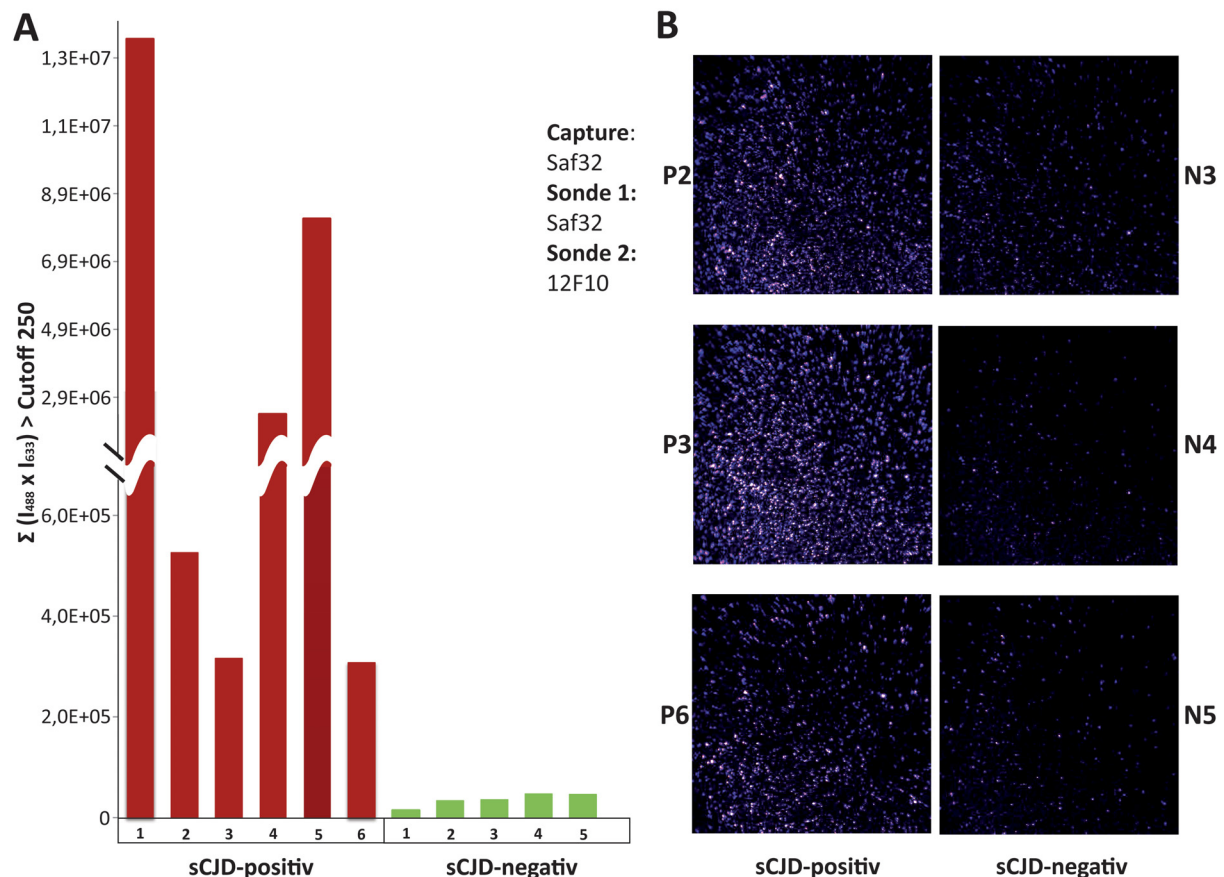


Abbildung 3.3-1 Detektion von PrP^{CJD} in Hirnproben

[A] Surface-FIDA von sechs verschiedenen sCJD-positiven und fünf sCJD-negativen Proben, wobei Saf32 als Capture und Sonde 1 eingesetzt wurde. Als Sonde 2 wurde 12F10 eingesetzt. Alle kolokalisierten Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 250 wurden aufsummiert. **[B]** Bilddaten der mittels Surface-FIDA analysierten Proben P2, P3, P6 und N3, N4, N5 resultierend aus der Bindung des Saf32 und des 12F10.

3.3.1 Sensitivitätsbestimmungen

Nachdem der Nachweis von Prion-Proteinaggregaten gereinigt aus humanem Hirngewebe mittels des für CJD-Proben etablierten und optimierten Protokolls von Surface-FIDA gezeigt werden konnte, wurden Untersuchungen im Hinblick auf die Sensitivität durchgeführt.

In einem ersten Schritt erfolgte eine Sensitivitätsbestimmung von rekombinaten huPrP-Aggregaten (Vergl. Kapitel 2.7). Die Aggregate wurden mit PBS verdünnt und mittels Surface-FIDA analysiert. Da eine Quantifizierung der eingesetzten PrP-Aggregatmenge schwierig war, wurden die eingesetzten PrP-Mengen mittels einer Eichreihe von rek huPrP mit bekannter Konzentration bestimmt. Sowohl das rek huPrP und die rek huPrP-Aggregate wurden mit Hilfe eines Dot-Blots direkt auf eine PVDF-Membran transferriert und mit dem anti-PrP Antikörper 3F4 nachgewiesen (Abbildung 1.2-1A). Somit konnte die Menge an aggregiertem rek huPrP bestimmt werden. Hu

rekPrP-Aggregate von 2.000 bis 20 pg und PBS als Kontrolle wurden mittels Surface-FIDA analysiert (Abbildung 1.2-1B). Als Capture wurde Saf32 und als Sonde 12F10 eingesetzt. Neben der Intensitätenauswertung wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten auch mittels der Multiparameteranalyse ausgewertet. Dabei wurden alle Partikel in Abhängigkeit von einer Partikelgröße von 1 bis 40 Pixeln ausgewertet (Abbildung 3.3-2C). Mit Surface-FIDA ist es möglich 63 pg an rek huPrP-Aggregaten nachzuweisen. Aufgrund der Multiparameteranalyse kann rückgeschlossen werden, dass Antikörper alleine Signale bis zu Partikelgrößen über 25 Pixel hervorrufen können.

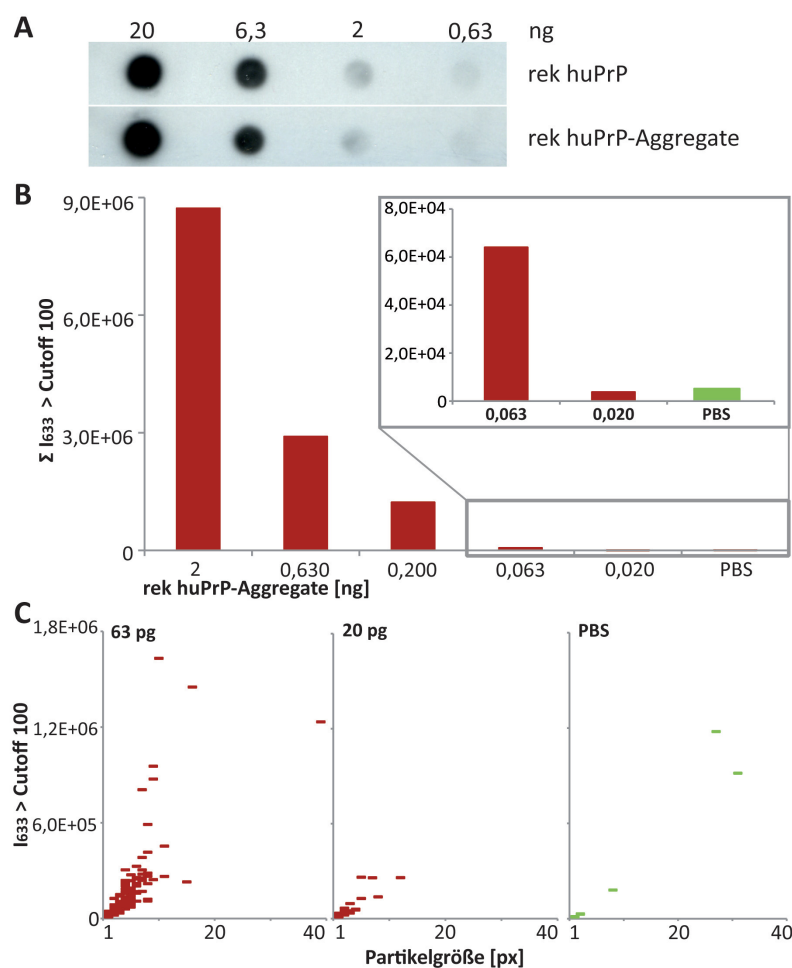


Abbildung 3.3-2 Nachweis von rek huPrP

[A] Dot-Blot-Analyse von rek huPrP zur Mengenabschätzung von aggregiertem rek huPrP. **[B]** Surface-FIDA von aggregiertem rek huPrP mit Saf32 als Capture und 12F10 als Sonde. In der Intensitätenauswertung wurden alle Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 100 aufsummiert. Dabei wurden Bilder mit einer Ausdehnung von 335 x 335 nm und einer Pixeltime von 200 μ s aufgenommen. **[C]** Multiparameteranalyse der Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 100 in Abhängigkeit von der Partikelgröße.

In einem zweiten Ansatz wurde untersucht inwiefern Pathogen-assoziiertes PrP^{CJD} verdünnt in sCJD-negativen Material mittels Surface-FIDA detektierbar ist. Dazu wurde

das NaPTA-prezipitierte Pellet einer sCJD-positiven Probe in gleichbehandeltem NaPTA-Pellet einer sCJD-negativen Probe verdünnt. Alle Verdünnungen, die 4.000 bis 40 μg an sCJD-positiven Hirngewebe entsprachen wurden mittels Surface-FIDA analysiert. Dabei wurden alle Proben auf 4.000 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ mit der sCJD-negativen Probe eingestellt. Zur Kontrolle wurden 4.000 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ der sCJD-negativen Probe analysiert (Abbildung 3.3-3). Als Capture und Sonde wurde Saf32 und als zweite Sonde 12F10 eingesetzt.

Aus der Intensitätenauswertung (Abbildung 3.3-3A) geht hervor, dass 130 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ der sCJD-positiven Probe verdünnt in der sCJD-negativen Probe von der sCJD-negativen Probe unterschieden werden. Pr^{PCJD} ist demnach auch noch stark verdünnt in gesundem Hirngewebe nachweisbar. Aus der Multiparameteranalyse lässt sich ableiten, dass die Fluoreszenzintensitäten proportional zur Partikelgrößen steigt (Abbildung 3.3-3B). Dies zeigt, dass die Aggregate gleichmäßig von Antikörpern gebunden werden.

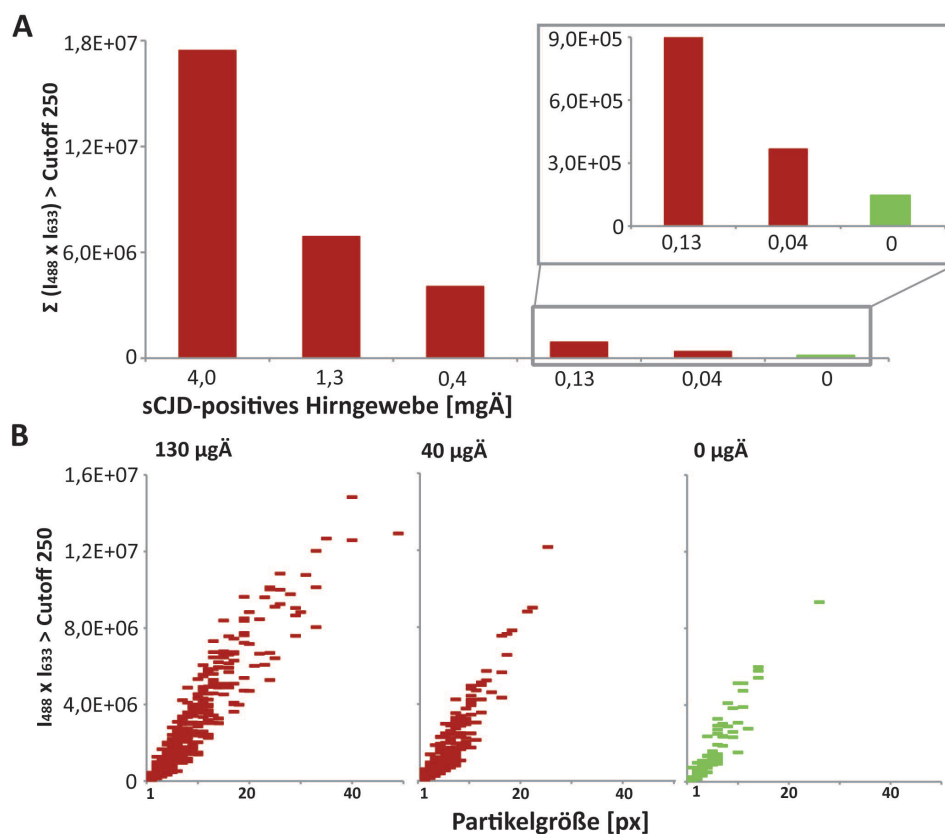


Abbildung 3.3-3 Nachweis von Pr^{PCJD} verdünnt in sCJD-negativen Hirngewebe

Surface-FIDA von einer sCJD-positiven Probe (P1) verdünnt in einer sCJD-negativen Probe (N1). **[A]** In der Intensitätenauswertung wurden alle kolokalisierten Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 250 aufsummiert. Auch hier wurden 4 Bilder mit einer Ausdehnung von 335 x 335 nm und einer Pixeltime von 200 μs aufgenommen. **[B]** Multiparameteranalyse der kolokalisierten Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 250 in Abhängigkeit von der Partikelgröße.

4 DISKUSSION

4.1 Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose von humanen Prionkrankheiten

Die historische Entwicklung der Erforschung der Prionkrankheiten hat gezeigt, dass Menschen schon seit langer Zeit in Kontakt mit domestizierten Tieren stehen, die an Prionkrankheiten erkranken können (Vergl. Kapitel 1.2). Doch seit der ersten Beschreibung von Scrapie beim Schaf im 18. Jahrhundert, sind bisher keine ersichtlichen Probleme für den Menschen bezüglich dieser Form der Prionkrankheiten beschrieben worden. Erst durch das vermehrte Auftreten der BSE bei Rindern und der damit verbundenen BSE-Krise in 1990ern stieg das öffentliche Interesse an der Krankheit enorm. Inzwischen gilt es als belegt, dass durch den Verzehr von BSE kontaminierten Nahrungsmitteln BSE auf den Menschen übertragen wurde und zu einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) führte (Bruce *et al.* 1997; Brown *et al.* 2001). Da die Zahlen der BSE-Fälle und vCJD-Fälle in Großbritannien rückläufig sind (Ghani *et al.* 2003), ist nicht davon auszugehen, dass eine vCJD-Epidemie folgt. Alle bisher bekannten Fälle der vCJD betrafen Patienten, welche eine Homozygotie Methionin/Methionin an Codon 129 des Prion-Proteins aufwiesen.

Neben der Übertragung der Prionkrankheiten von Tier auf Mensch besteht auch das Risiko der Übertragung der vCJD oder gar CJD von Mensch zu Mensch. So wurde mittlerweile von vier Fällen berichtet, in denen die Übertragung der vCJD mit Bluttransfusionen in Verbindung gebracht wurde (Llewelyn *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004; Wroe *et al.* 2006; HealthProtectionAgency 2007). Der erste klinische Fall von vCJD, der mit einer Bluttransfusion assoziiert wurde, wurde Ende 2003 identifiziert. Der Patient verstarb 6 ½ Jahre nachdem er eine Bluttransfusion erhalten hatte, an vCJD. Eine dieser Blutkonserven stammte von einem Spender, der ebenfalls 3 ½ Jahre nach der Transfusion verstarb. Daraus folgt, dass der Erreger über mehrere Jahre im Blut überdauern kann, ohne seine Infektiosität zu verlieren. Somit besteht das Risiko der Übertragung der CJD, da CJD eine lange asymptomatische Inkubationsphase aufweist.

Der zweite Fall der Übertragung des vCJD-Erregers durch Blut, trat bei einem Patienten auf, der heterozygot im *PRNP*-Gen an Codonposition 129 war. Der Patient ist zwar an einer gerissenen Blutgefäßerweiterung verstorben, aber es wurde resPrP^{Sc} in der Milz detektiert. Damit ist die Übertragbarkeit nicht auf eine Homozygotie auf dem Codon 129 im Prion-Gen begrenzt.

Fälle der iatrogenen Übertragung der CJD wurden bereits in den 1970er Jahren beschrieben. So erfolgte die Übertragung nach der Transplantation der Augenhornhaut (*Cornea*) (Duffy *et al.* 1974) oder harter Hirnhaut (*Dura mater*) (Thadani *et al.* 1988), sowie der Anwendung nicht ausreichend dekontaminierter stereotaktischer Elektroden (Bernoulli *et al.* 1977). Die meisten Fälle der iCJD sind durch die Verabreichung von Sexualhormonen (Lazarus 1985; Cochius *et al.* 1990) und Wachstumshormonen (Brown *et al.* 1985; Gibbs *et al.* 1985; Koch *et al.* 1985; Lazarus 1985; Fradkin *et al.* 1991) bekannt, die zu dieser Zeit noch aus Hypophysen von Leichen gewonnen wurden.

Im Moment gibt es keine Möglichkeit humane Prionkrankheiten vor der symptomatischen Phase und damit frühzeitig zu diagnostizieren. Aufgrund der langen präsymptomatischen Phase der CJD, besteht die Gefahr der weiteren iatrogenen Verbreitung der Krankheit. Eine frühzeitige Diagnose ist auch im Hinblick auf eine effektive Behandlung von CJD-Patienten sehr wichtig. So wäre es möglich mit einer Therapie vor dem Auftreten von klinischen Symptomen und damit vor der irreversiblen Zerstörung von Nervenzellen, zu beginnen. Die Wirkung einer frühen Therapie konnte mit Untersuchungen mit Tiermodellen belegt werden. Dabei konnte durch den Einsatz verschiedener Therapeutica der Ausbruch der Krankheit verzögert werden. Wurde die Behandlung jedoch im klinischen Stadium gestartet, konnte kein positiver Effekt erzielt werden (Aguzzi *et al.* 2001; Dormont 2003; Rossi *et al.* 2003). Da es bisher keine Therapie für CJD gibt, ergeben sich mit einer verfügbaren Diagnose dieser lethalen Krankheit ethische Bedenken. Aber mit einer präklinischen Diagnose, wären die im Tiermodell belegten Therapieansätze eventuell auch auf den Menschen übertragbar. Bereiche, die von einer frühzeitigen Diagnose der Prionkrankheiten profitieren würden, sind in Abbildung 4.1-1 zusammengefasst.

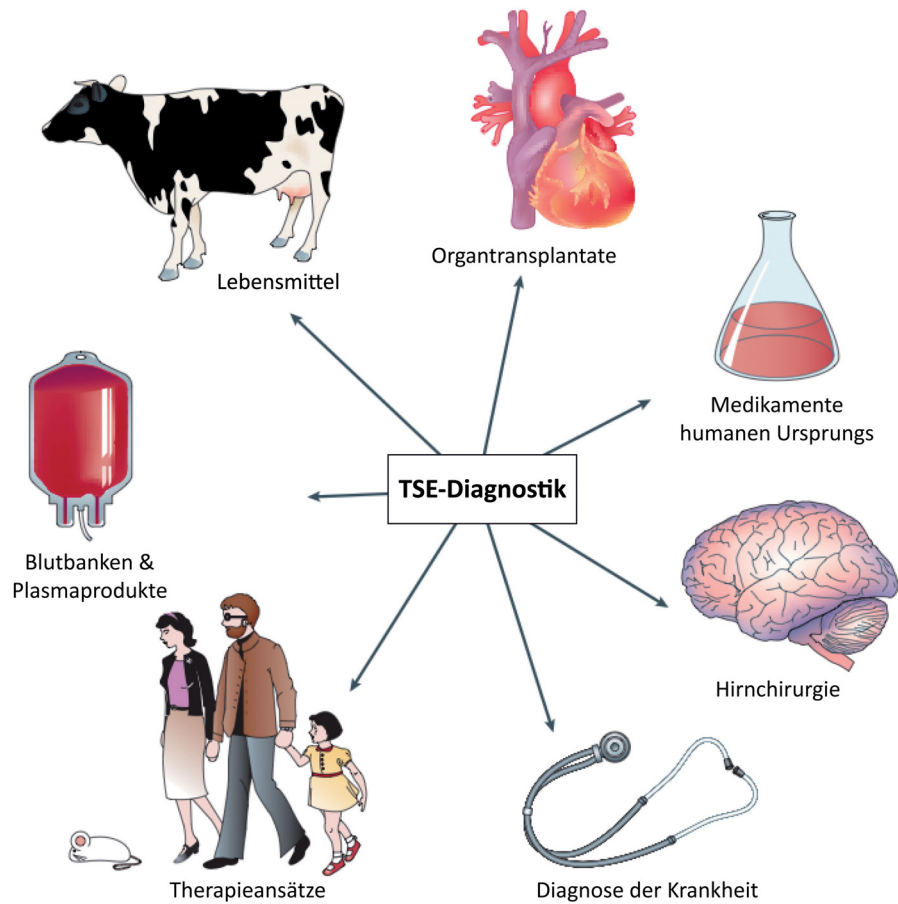


Abbildung 4.1-1 Bereiche, die von einer frühzeitigen Diganose der TSE profitieren

Mit einer Methode zur frühzeitigen Diagnose von Prionkrankheiten würde die Sicherheit von Blutbanken, Plasmaprodukten und Medikamenten, die aus humanen Gewebematerial gewonnen werden, erhöhen. Außerdem wäre der chirurgische Umgang mit Nervengewebe (z. B. in der Hirnschirurgie und die Benutzung von Gehirnelektroden) und Organtransplantationen sicherer. Letztendlich könnten mit einer Diagnose auch Therapieansätze früher angewandt, verbessert und damit eventuell beim Menschen angewandt werden.

Die chronisch zehrende Krankheit (CWD), ist eine Prionkrankheit, die bei verschiedenen Hirscharten auftritt. Die CWD gewinnt, durch ihr vermehrtes Auftreten in Nordamerika immer mehr an öffentlicher Aufmerksamkeit. In einer aktuellen Studie wurde Infektiosität in den Exkrementen von präsymptomatischen CWD-infizierten Hirschen gefunden (Tamguney *et al.* 2009), was die weite Verbreitung unter den freilaufenden Hirschen in Nordamerika erklären könnte. Wie hoch hierbei das tatsächliche Risiko für den Endverbraucher von Wildfleisch ist, ist derzeit noch unklar (Belay *et al.* 2004), wenn auch mittlerweile krankheits-assoziiertes PrP im Fleisch infizierter Hirsche nachgewiesen werden konnte (Angers *et al.* 2006).

4.2 Anforderungen an eine Methode zur frühzeitigen Diagnose von humanen Prionkrankheiten

Seitdem bekannt ist, dass vCJD durch Bluttransfusionen übertragbar ist, ist die Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose von humanen Prionkrankheiten gestiegen. Zur Zeit stellen Infektionsstudien im Tiermodell (Bioassays) die sensitivste und spezifischste Methode dar, um Prionkrankheiten zu diagnostizieren (Grassi *et al.* 2008). Allerdings ist diese Methode zeitintensiv und kann aufgrund der Tierversuche nicht routinemäßig eingesetzt werden. Auch die Suche nach Surrogatmarkern wie dem 14-3-3 Protein (Vergl. Kapitel 1.5.1) hat sich als nicht ausreichend spezifisch für eine frühzeitige Diagnose erwiesen (Wildemann *et al.* 2006). Eine Immunantwort bleibt bei einer Infektion weitestgehend aus, da der Erreger keine körperfremden Substanzen aufweist, sondern zum Großteil aus der abnorm gefalteten Form eines körpereigenen Proteins besteht. Die Replikation erfolgt durch die Umfaltung von hauptsächlich α -helikalem PrP^C zu aggregiertem PrP^{Sc} mit β -Flatblatt dominierender Struktur. Da PrP^{Sc} der Hauptbestandteil des infektiösen Erregers ist, eignet sich der Nachweis des Aggregationszustandes des PrP^{Sc}s besonders als Marker für Prionkrankheiten. Es ist bekannt, dass ein nicht unerheblicher Teil des Pathogen-assoziierten PrP PK-sensitiv (senPrP^{Sc}) ist (Tzaban *et al.* 2002; Safar *et al.* 2005; Birkmann *et al.* 2006). Deswegen ist eine Diagnostik, die resPrP^{Sc} nachweist in ihrer Sensitivität limitiert.

Ein Test sollte minimalinvasiv sein und somit auf Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin anwendbar sein. Infektionsstudien haben gezeigt, dass Prionen in frühen symptomlosen Stadien der Krankheit, wenn auch nur in geringen Mengen, im Blut zu finden sind (Aguzzi 2000; Brown 2000). Die Konzentration an Infektiosität ist sehr viel geringer als im ZNS. Es wird angenommen, dass die Konzentration an PrP^{Sc} im Blut in einem Bereich von pg/ml liegt (Brown *et al.* 2001; Brown 2005). Im Hinblick auf das Risiko einer Infektion mit vCJD über eine Bluttransfusion ist ein Test mit hoher Spezifität und Sensitivität nötig, da eine sehr geringe Inzidenz der Krankheit angenommen wird. Ein diagnostischer Test muss in der Lage sein alle Ätiologien der CJD zu erkennen. Da die sporadische Form der CJD (sCJD) mit 80 bis 90 % der Fälle am häufigsten auftritt, wurde zur Optimierung und Adaption von Surface-FIDA als diagnostischer Ansatz für humane Prionkrankheiten mit Hirngewebe von sCJD-Patienten gearbeitet.

4.3 Nachweis von Prion-Proteinaggregaten mittels Surface-FIDA

Mit der Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist es möglich die Wechselwirkung einzelner Moleküle zu analysieren. Der diagnostische Ansatz Surface-FIDA, der in unserem Institut entwickelt wurde, basiert auf dem Messprinzip der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA). Mittels Surface-FIDA werden Prion-Proteinaggregate auf der Glasoberfläche einer Microtiterplatte immobilisiert und durch zwei verschieden fluoreszenzmarkierte Sonden detektiert. Die Immobilisierung der Prion-Proteinaggregate erfolgt durch einen Capture-Antikörper, der vorher über eine Pol-D-Lysin-Schicht adhäsiv mit der Glasoberfläche verknüpft wurde. Da nur aggregiertes PrP und nicht PrP²⁷⁻³⁰ nachgewiesen wird, ist der Ansatz nicht auf die Verwendung von Proteinasen angewiesen. Somit können mit Surface-FIDA beide Formen an krankheits-assoziiertem PrP, resPrP^{Sc} und senPrP^{Sc}, nachgewiesen werden. Der Geräteaufbau ermöglicht es, die Glasoberfläche der Microtiterplatte systematisch abzuscanen. Prion-Proteinaggregate können von mehreren fluoreszenzmarkierten Sonden gebunden werden. Dies führt zu hochfluoreszenten Peaks. Während dieser Arbeit wurde das FCS mit einer Imaging-Einheit erweitert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einzelaggregatnachweis als Imaging-Verfahren etabliert werden.

In dieser Arbeit wurden im Hinblick auf den Nachweis von Prion-Proteinaggregaten mittels Surface-FIDA drei wesentliche Aspekte etabliert und weitere optimiert (s. auch Abbildung 4.3-1):

1. Ersatz der adhäsiven Bindung des Capture-Antikörpers an die Glasoberfläche der Microtiterplatte durch eine kovalente Bindung
2. Optimierung der Präparation der CJD-Proben
3. Messung und Auswertung von Bilddaten
4. Prüfung des diagnostischen Ansatzes für CJD unter Verwendung von humanem Hirngewebe

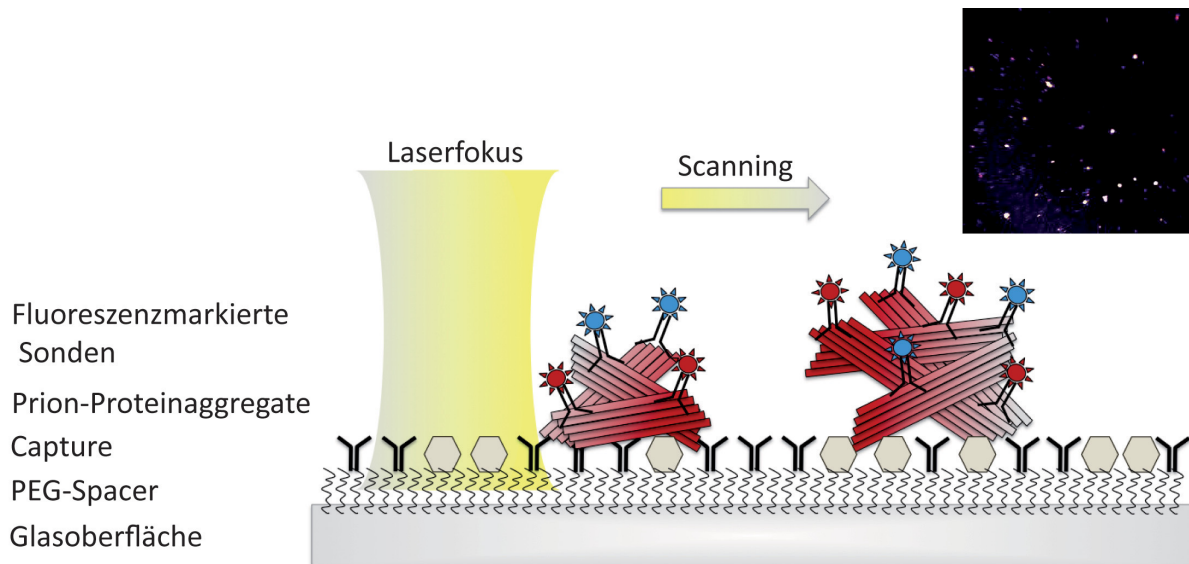


Abbildung 4.3-1 Modell: Surface-FIDA nach Optimierung

Der Capture-Antikörper wird kovalent über einen PEG-Spacer an die Glasoberfläche der Microtiterplatte gebunden. Daraus resultiert eine feste Capture-vermittelte Immobilisierung der Prion-Proteinaggregate. Dabei ist auch die Präparation und Reinigung der Prion-Proteinaggregate optimiert. Die Detektion der Prion-Proteinaggregate erfolgt mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Die Erweiterung des FCS mit einer Imaging-Einheit ermöglicht die Umwandlung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Bilddaten. Die detektierten Prion-Proteinaggregate erscheinen aufgrund der Mehrfachbindung der Sonden als helle Partikel in den Bildern.

4.3.1 Verwendung eines PEG-Spacers zur kovalenten Bindung des Capture mit der Glasoberfläche

Die kovalente Bindung des Capture-Antikörpers an die Glasoberfläche der Microtiterplatte erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines PEG-Spacers mit einem Molekulargewicht von 3.400 g/mol. Die Bindung des Antikörpers ist so mit einem gewissen Abstand zur Glasoberfläche möglich und verleiht dem Antikörper damit eine Flexibilität, welche die Antigenerkennung durch die Ausrichtbarkeit des Antikörpers erhöhen kann. Die Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten könnte damit durch die Bindung mehrerer Capture-Antikörper erfolgen. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von PEG als Spacer ist die Ausbildung einer hydrophilen Polymer-Schicht auf der Glasoberfläche, womit eine unspezifische Adsorption von Verunreinigungen minimiert werden kann. Es ist bekannt dass, gerade durch unspezifische Bindungen von Proteinen Immunoassays und Microassays in ihrer Sensitivität begrenzt werden (Butler 2000; Kusnezow and Hoheisel 2003). Aufgrund dieser Vorteile und der großen Variation der möglichen chemischen Modifikation der Endgruppen des Polymers, gewinnt die Verwendung von PEG bei der Funktionalisierung von Oberflächen immer mehr an Bedeutung (Roberts *et al.* 2002).

Mit der kovalenten Bindung von Biomolekülen an Glasoberflächen mittels NHS-PEG-COOH von Janissen und Kollegen (2009) stand ein geeignetes Protokoll zur Verfügung, um den Capture-Antikörper kovalent mit der Glasoberfläche der Microtiterplatte zu verknüpfen (Abb. 4.2-2). Dabei ist der günstigste Fall aufgezeigt, dass alle Capture-Antikörper auf der Oberfläche ausgerichtet sind. Da für den diagnostischen Ansatz 384er Well-Microtiterplatten mit einem Polystyrolrahmen benutzt wurden, musste das Protokoll angepasst werden. Zu den angepassten Schritten gehörten zum Einen die Reinigung der Glasoberfläche mit weniger aggressiven Chemikalien und die Lösung des PEGs in DMSO anstatt in Chloroform (Vergl. Kapitel 3.1).

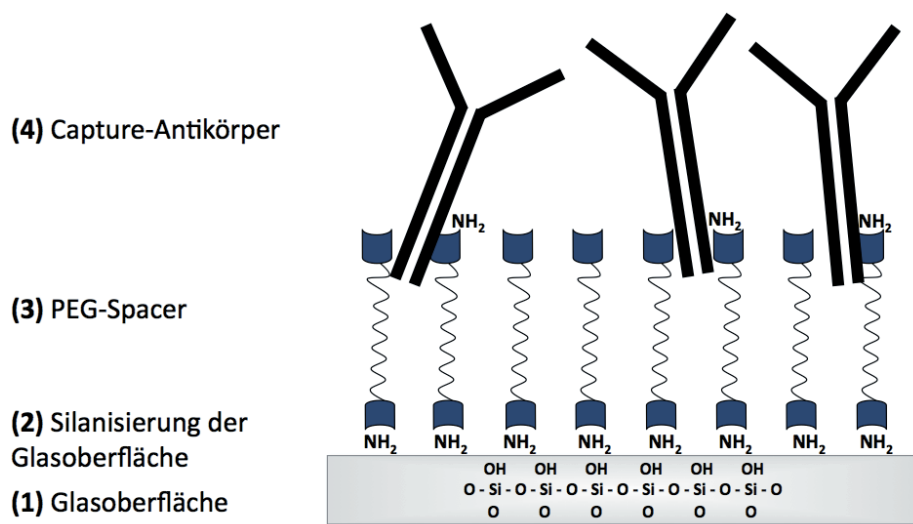


Abbildung 4.3-2 Kovalente Bindung des Captureantikörpers an die Glasoberfläche

Mit der Reinigung der Glasoberfläche werden Silanolgruppen des Borosilikatglases aktiviert. Danach wird die Glasoberfläche mittels einer Silanisierung mit Aminogruppen funktionalisiert. Die NHS-Gruppe des PEGs bindet an die Aminogruppen der Glasoberfläche. Aufgrund der Aktivierung der endständigen COOH-Gruppe des PEGs mit dem Crosslinker EDC wird der Capture-Antikörper über eine Peptidbindung mit dem Spacer verknüpft.

Die Anwendung der kovalenten Bindung des Captures sowie die Beschichtung der Glasoberfläche mit PEG zeigte, dass bei der Verwendung von höheren Konzentrationen an PEG in sCJD-negativen Proben das unspezifische Hintergrundsignal reduziert werden konnte (s. Abbildung 3.2-4). Die Störsignale basieren höchstwahrscheinlich auf einer Eigenfluoreszenz der Verunreinigungen aus dem Hirngewebe (Henke 2005).

Da aber ein Anhaften von Verunreinigungen trotz der Oberflächenbehandlung mit PEG nicht komplett verhindert werden konnte, stellte sich die Frage, ob nicht auch die Prion-Proteinaggregate unspezifisch an die Glasoberfläche adhären, anstatt über den PrP-spezifischen Capture-Antikörper immobilisiert zu werden. Ein Vergleich einer Capture-vermittelten mit einer nicht-Capture-vermittelten Bindung zeigte (s. Kapitel 3.2.4), dass Capture-vermittelt viermal mehr PrP^{CJD} detektiert werden konnte als in der

Probe, die ohne Capture inkubiert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass der größte Teil an PrP^{CJD}, in diesem Fall drei Viertel der Gesamtmenge an PrP^{CJD}, spezifisch von dem Capture gebunden und somit immobilisiert wurde. Da aber auch PrP^{CJD} unspezifisch an der Oberfläche haftet, ist davon auszugehen, dass auch Verunreinigungen aus dem untersuchten Hirngewebe an der Glasoberfläche adhärieren.

Neben der Erhöhung der Flexibilität des Capture-Antikörpers stellt die kovalente Bindung mittels eines Spacers vor allem eine feste Bindung des Antikörpers mit der Glasoberfläche dar. Mit dem Ziel unspezifischen Hintergrund zu entfernen, konnten somit stringendere Waschschriffe eingeführt werden. Nach der Inkubation des Targets wurden den Waschschriffen mit PBST und PBS, 6 weitere Waschschriffe mit 0,2 % SDS vorangestellt (Vergl. Kap. 3.2.5.6). Erst durch die zusätzlichen Waschschriffe mit SDS konnten die sCJD-positiven Proben von den sCJD-negativen Proben unterschieden werden. Aufgrund der leicht denaturierenden Eigenschaften von SDS könnten so unspezifisch gebunden Proteine oder auch monomeres PrP^C besser entfernt worden sein. Das erhöhte Signal in der Positivprobe, welche mit SDS gewaschen wurde, könnte auf die leicht denaturierende Wirkung von SDS auf die PrP^{CJD}-Aggregate zurückzuführen sein (Post *et al.* 1998), was die Zugänglichkeit für die Bindung der Detektionsantikörper erhöht.

4.3.2 Einzelpartikelnachweis (single particle counting)

Der diagnostische Ansatz Surface-FIDA beruht auf der Bindung von vielen fluoreszenzmarkierten Sonden an Prion-Proteinaggregate, welche zu hochfluoreszenten Signalen führt und somit den Nachweis einzelner Partikel erlaubt. Durch die Erweiterung des FCS mit einer Imaging-Einheit werden die detektierten Fluoreszenzintensitäten in Bilddaten überführt (s. Kapitel 3.2.1). Die Auswertung mit dem Programm ImageJ (s. Kapitel 2.16.4) erlaubt es, nur die Fluoreszenzintensitäten über einem bestimmten Cutoff aufzusummieren. Damit werden Hintergrundsignale, die durch freien Fluoreszenzfarbstoff oder die Eigenfluoreszenz von Verunreinigungen entstehen, nicht einbezogen. Somit ist es möglich mittels Surface-FIDA einzelne Partikel zu quantifizieren (single particle counting). Surface-FIDA besitzt damit einen Vorteil gegenüber Auswertungen anderer Immunoassays, die das Integral über das gesamte Signal einer Probe aufnehmen (siehe auch Abbildung 4.3-3), wobei spezifische Einzelsignale nicht vom Hintergrundsignal unterschieden werden können. Durch die

Aufnahme von Bilddaten gibt es die Möglichkeit eine weitere Information über die Größe der Partikel in die Auswertung mit einzubeziehen. So lassen sich Partikel auch in Abhängigkeit von ihrer Größe quantifizieren. Mit der Evaluation vieler Daten lassen sich so möglicherweise in näherer Zukunft Partikel mit einer bestimmten Größe für den Nachweis von Prion-Proteinaggregaten spezifizieren.

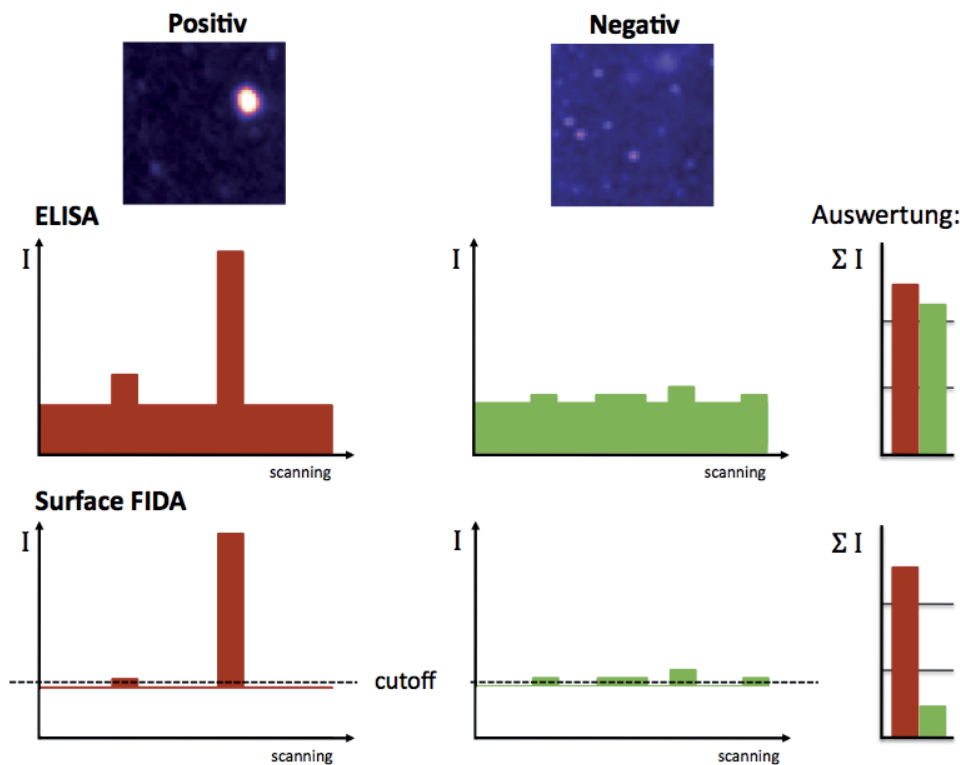


Abbildung 4.3-3 Vergleich der Auswertung von Immunoassays

Schematische Darstellung der Auswertung von Surface-FIDA im Vergleich zu der Auswertung eines ELISA. Mittels eines handelsüblichen ELISA werden alle aufgenommenen Signale einer Probe zu einem Wert integriert. Die Auswertung der Bilddaten von Surface-FIDA-Ansätzen ermöglicht das Quantifizieren von einzelnen Partikeln, indem nur Signale über einem bestimmten Cutoff gewertet werden, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt und damit sensitiver ist.

4.3.3 Optimierung von Präparation und Nachweis von PrP^{CJD}

Die optimierte und auf Imaging erweiterte Methode Surface-FIDA sollte auf die Anwendung zur Diagnose von CJD adaptiert und evaluiert werden, um eine Basis für eine molekulare Diagnostik zu schaffen. Zur Adaption der Methode wurde Hirngewebe von sCJD-Patienten und von Patienten, die nicht an sCJD erkrankt waren, gearbeitet, da bekannt ist, dass die Konzentration an PrP^{CJD} im Hirngewebe am höchsten ist. Jedoch stellt die Verwendung von Hirngewebe besonders hohe Ansprüche an die Spezifität des

Testsystemen, da in Geweben eine Vielfalt an Faktoren vorliegt, welche Hintergrundsignale verursachen können.

Für die Präparation des PrP^{CJD}s aus humanen Hirnproben wurde das Hirngewebe homogenisiert und mittels einer Proteinaggregat-spezifischen Fällung vorgereinigt (Vergl. Kapitel 2.10). Phosphorwolframat bildet bei einem neutralem pH-Wert Komplexe mit krankheits-assoziierten PrP-Oligomeren sowie PrP-Polymeren (Safar *et al.* 1998). Mit Hilfe von moderaten Zentrifugationsschritten lässt sich PrP^{Sc} so aus Hirnhomogenat reinigen und kann mittels Surface-FIDA analysiert werden. Dabei konnte auf die Verwendung von Proteinase K verzichtet werden, um nicht an Sensitivität zu verlieren (siehe auch Abbildung 4.3-4). Gerade bei PrP^{CJD} ist der größte Teil PK-sensitiv (Safar *et al.* 2005).

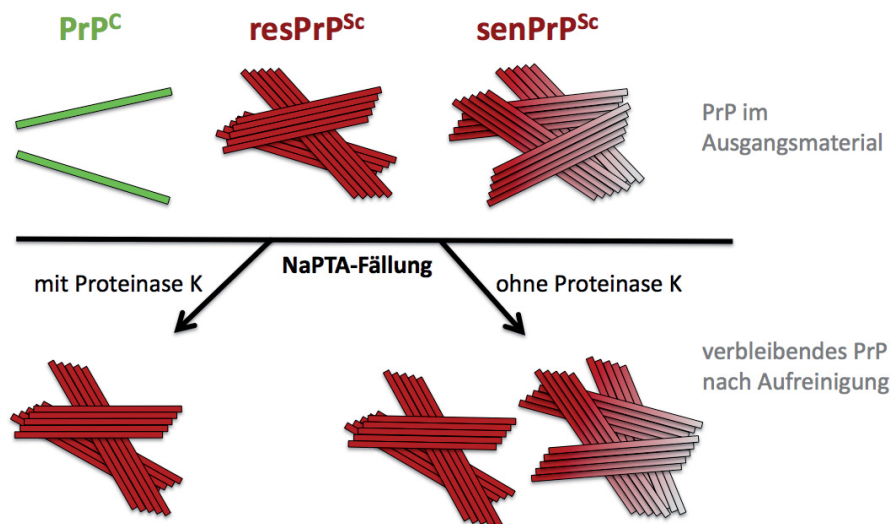


Abbildung 4.3-4 Vergleich der NaPTA-Fällung von PrP^{Sc} mit und ohne PK

Detektion von PrP^{Sc} vor PrP^C Hintergrund

PrP^{Sc} kann mit der NaPTA-Fällung aus Hirnhomogenat konzentriert werden. Dabei wird aggregiertes PrP^{Sc} mehr oder weniger effektiv von monomeren PrP^C getrennt. Der Anteil des PrP^Cs, welches ebenfalls in der Pelletfraktion verbleibt variiert z.T. stark. In Kapitel 3.2.5.1 ist ein Fall gezeigt, in dem bei der NaPTA-Fällung von sCJD-negativen Hirnhomogenat ein großer Anteil an PrP^C pelletiert wurde (Abbildung 3.2-8). Eine Ursache dafür könnte eine zu lange Lagerungsdauer der NaPTA-Stocklösung gewesen sein. Trotz allem wurde sowohl das NaPTA-Pellet der sCJD-positiven und der sCJD-negativen Probe mittels Surface-FIDA analysiert. Dabei war es möglich die Fluoreszenzsummen der sCJD-Probe eindeutig von der sCJD-negativen Probe zu unterscheiden. Somit konnte die Detektion von monomeren PrP^C als Hintergrundsignal

ausgeschlossen werden. Dies zeigt, dass mit Surface-FIDA spezifisch PrP^{Sc} detektiert werden kann, auch wenn ein großer Anteil an PrP^C in der zu untersuchenden Probe vorhanden wäre.

Erhöhung der Spezifität durch Reduzierung des unspezifischen Hintergrundsignals

Die Spezifität des Ansatzes kann durch eine Reduktion des Hintergrundsignals verbessert werden. Unspezifischer Hintergrund lässt sich entweder dadurch reduzieren, dass die Proben bereits einen höheren Reinheitsgrad besitzen, so dass es nicht zu unspezifischen Anhaften von Verunreinigungen kommen kann, oder durch stringente Waschschrte. Beide Ansätze wurden verfolgt. Um einen höheren Reinigungseffekt zu erreichen, wurde ein alternatives NaPTA-Fällungsprotokoll mit einer erhöhten NaPTA-Konzentration, mit zwei aufeinanderfolgenden Fällungsschritten und ohne MgCl₂ herangezogen. Damit konnte das unspezifische Hintergrundsignal in der sCJD-negativen, deutlich reduziert werden (Abbildung 3.2-9)

Des Weiteren konnten mit der Anpassung der Targetinkubation Hintergrundsignale deutlich reduziert werden (Vergl. Kap. 3.2.5.3). Standardmäßig erfolgte die Inkubation des Targets ÜN (mindestens 15 h). Nach Verkürzung der Targetinkubation auf 2 h wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsummen der sCJD-positiven Proben zu den sCJD-negativen Proben deutlich verbessert. Möglicherweise erfolgte durch die lange Inkubationsdauer ÜN ein vermehrtes Adhären von unspezifischen Proteinen.

Konzentrierung der Prion-Proteinaggregate mittels Zentrifugation

Nach der Inkubation des Targets auf der Capture-modifizierten Oberfläche wurde die Lösung abpipettiert und mittels Western-Blot analysiert (Vergl. Abbildung 3.2-12). Dabei zeigte sich, dass ein Teil der PrP^{CJD}-Aggregate nicht immobilisiert wurden. Durch eine Verdünnungsreihe der sCJD-positiven Probe konnte gezeigt werden, dass dies nicht mit einer Absättigung der Capture-modifizierten Glasoberfläche mit PrP^{CJD} zu erklären ist (Vergl. Abbildung 3.2-12). Die Probengefäße (Well) der Microtiterplatte sind sehr schmal wodurch Molekülbewegungen innerhalb der Wells sehr gering sind. Dies sprach dafür, dass nicht alle Prion-Proteinaggregate mit dem Capture in Berührung kommen und somit nicht gebunden werden können.

Um mehr Prion-Proteinaggregate auf der Capture-modifizierten Oberfläche aufzukonzentrieren wurde ein Zentrifugationsschritt während der Inkubation des

Targets eingeführt und mit der herkömmlichen Inkubation ohne Zentrifugation verglichen (s. Kapitel 3.2.5.5). Die Fluoreszenzsignale der sCJD-positiven Proben konnten mit der Zentrifugation während der Inkubation des Targets erhöht werden. Durch die seichte Zentrifugation bei 1.300 x g kommen die Prion-Proteinaggregate in näheren Kontakt mit der Capture-modifizierten Oberfläche, so dass die Möglichkeit der Bindung besteht.

Detektion von Prion-Proteinaggregaten

Zur Erhöhung der Spezifität wurden mehrere Antikörper als Detektionsantikörper im direkten Vergleich getestet. Saf32, der bereits als Capture eingesetzt wurde, liefert auch als Detektionsantikörper ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Saf32 erkennt das Prion-Protein in der Oktarepeatregion des N-Terminus. Mittels Surface-FIDA ist es möglich 2 verschiedene PrP-spezifische Antikörper als Sonden einzusetzen, um die Spezifität zu erhöhen. So können mittels Koloalisation der Fluoreszenzsignale, nur solche gewertet werden, die in beiden Kanälen auftreten. Als zweiter Detektionsantikörper wurde 12F10 gewählt (Vergl. Kapitel 3.2.6.1), der das Prion-Protein an der Aminosäuresequenz 142 – 179 erkennt. Empirisch konnte ermittelt werden, dass Saf32 ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis als der 12F10 liefert. Dies könnte mit einer höheren Affinität zum Prion-Protein erklärt werden, da der N-Terminus des Prion-Proteins weitgehend unstrukturiert und damit relativ frei zugänglich ist. Zudem besitzt das Prion-Protein aufgrund der Sequenzwiederholungen (Oktarepeat) mehrere Bindestellen für Saf32. Um einer Absättigung der Prion-Proteinaggregate mit Saf32 und damit einer möglichen Beeinträchtigung der 12F10-Bindung entgegenzuwirken, erfolgte die Inkubation der beiden Detektionsantikörper seriell (s. auch Kapitel 3.2.6.3).

4.3.4 Sensitivitätsbestimmungen mit Surface-FIDA

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem optimierten Protokoll von Surface-FIDA 6 verschiedene sCJD-positive Proben von 5 verschiedenen sCJD-negativen Proben eindeutig unterschieden werden konnten (siehe Kapitel 3.3). Dabei zeigte sich, dass die Variationsbreite an detektierten Prion-Proteinaggregaten innerhalb der sCJD-positiven Gruppe sehr groß ist.

Um abzuschätzen in wie weit es möglich ist PrP^{Sc} in geringeren Konzentrationen mittels Surface-FIDA zu detektieren, wurde in einem ersten Ansatz eine Verdünnungsreihe von rekombinanten humanen PrP (rek huPrP) mittels Surface-FIDA analysiert (Vergl. Kap. 3.3.1). Da der diagnostische Ansatz zum Nachweis von Prion-Proteinaggregaten dient, wurde zur Sensitivitätsbestimmung rek huPrP-Aggregate verwandt. Saf32 wurde dabei als Capture und 12F10 als Sonde eingesetzt. Indem alle Fluoreszenzintensitäten über einem Cutoff von 100 aufsummiert wurden, konnten 60 pg an rek huPrP-Aggregaten nachgewiesen werden. Außerdem wurden mittels der Multiparameteranalyse alle Partikel mit einer Größe von 1 bis 40 Pixeln quantifiziert. Dabei ist davon auszugehen, dass eine Partikelgröße über 25 Pixel für rek huPrP-Aggregate unspezifisch ist. Durch die Verifizierung spezifischer Partikelspezien könnte so die Sensitivität von Surface-FIDA noch erhöht werden. Ein weiterer Punkt bei der Betrachtung der Sensitivität von Surface-FIDA, ist die Messfläche. Bei der Messung der Ansätze werden an je vier Positionen des Wells der Microtiterplatte Flächen von 200 x 200 µm aufgenommen. Da die Glasoberfläche eines Wells aber 9 mm² umfasst, wird im Moment nur etwa ein Fünfzigstel der Gesamtfläche durch die vier aufgenommenen Flächen repräsentiert (s. Abbildung 4.3-5).

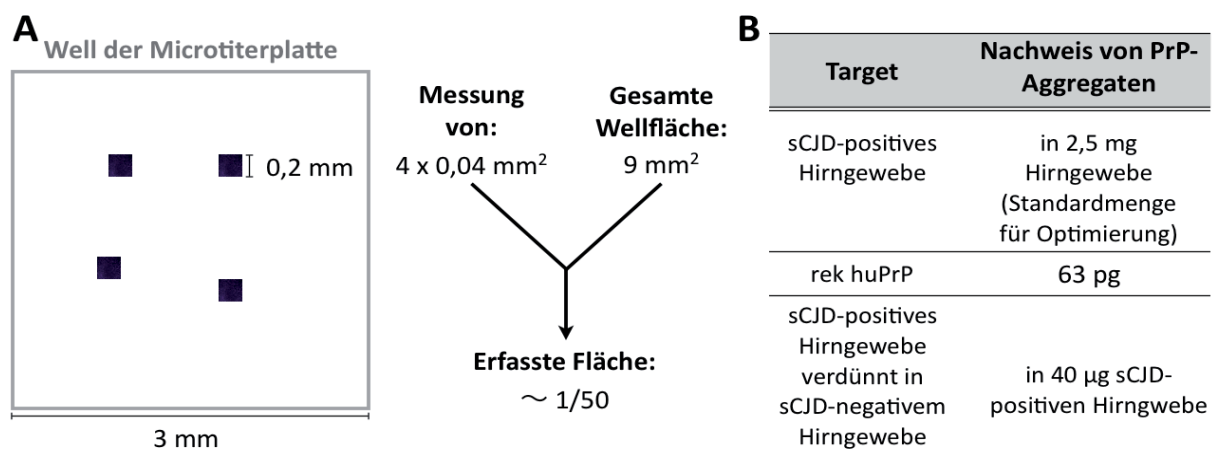


Abbildung 4.3-5 Flächenerfassung bei einer Messung

[A] Während der Messung der Surface-FIDA Ansätze wird die Glasoberfläche an vier verschiedenen Positionen innerhalb eines Wells abgescannt. Die aufgenommenen Bilddaten umfassen jeweils eine Fläche von 0,04 mm² und repräsentieren damit nur etwa ein Fünfzigstel der gesamten Wellfläche. **[B]** Trotz der Flächenerfassung von einem Fünfzigstel der Gesamtfläche ist es möglich 63 pg rek hu PrP-Aggregate und Prion-Proteinaggregate in 40 µg Hirngewebe mittels Surface-FIDA zu detektieren.

Neben der Verdünnungsreihe mit rek hu PrP wurde auch eine Verdünnungsreihe einer sCJD-positiven Probe mittels Surface-FIDA analysiert. Dazu wurde das NaPTA-Pellet der sCJD-negativen Probe verwendet, um das gleichbehandelte NaPTA-Pellet der sCJD-positiven Probe zu verdünnen. Die sCJD-Probe wurde immer mit der sCJD-negativen

Probe auf 4000 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ ergänzt. Zur Kontrolle wurden 4000 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ der sCJD-negativen Probe analysiert. 40 $\mu\text{g}\ddot{\text{A}}$ des sCJD-positiven Hirngewebes reichten aus, um eine erhöhte Partikelzahl im Vergleich zur Negativkontrolle nachzuweisen, obwohl die Kontrolle einen 100fachen berschuss an sCJD-negativen Hirngewebe enthält. Auch hier wurden alle detektierten Partikel mittels ihrer Grössenverteilung von 1 bis 50 Pixel verglichen (Vergl. Abbildung 3.3-3). Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität mit der Partikelgröße zu. Das zeigt, dass die Aggregate gleichmäßig mit Detektionssonden markiert sind.

4.4 Surface-FIDA als diagnostischer Ansatz zur Diagnose humaner Prionkrankheiten

Zurzeit gibt es keine eindeutige molekulare *ante mortem* Diagnostik für die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen. Folgende diagnostische Ansätze haben Pathogen-assoziiertes Prion-Protein in menschlichem Gewebe nachgewiesen. Mit dem CDI ist es möglich sowohl $\text{senPrP}^{\text{Sc}}$ und $\text{resPrP}^{\text{Sc}}$ im Hirngewebe von CJD-Erkrankten nachzuweisen (Safar *et al.* 2005). Dieser Immunoassay beruht auf der Erkennung eines Struktur-spezifischen Epitops, welches bei Denaturierung des PrP^{Sc} zugänglich wird. Die Sensitivität des CDI wird mit der von Bioassays verglichen. Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der in 10^{-7} verdünntem Hirnhomogenat von vCJD-Patienten $\text{resPrP}^{\text{Sc}}$ detektiert wurde (Orriu *et al.* 2009). Dieser Ansatz beruht auf einer keim-induzierten Konversion von rek PrP . Die Möglichkeit der spontanen Konversion von rek PrP limitiert die Spezifität dieses Ansatzes (Deleault *et al.* 2007). Des Weiteren konnten mit der SIFT-Methode (scanning for intensely targets) PrP^{Sc} -Aggregate im CSF einer CJD-Patienten-Gruppe detektiert werden (Bieschke *et al.* 2000). Die Sensitivität dieses Ansatzes beträgt 20 %.

In dieser Arbeit konnte surface-FIDA methodisch dahingehend optimiert werden, dass Prion-Proteinaggregate im Hirngewebe von sCJD-Patienten nachgewiesen wurden. Es erfolgte eine Unterscheidung der sCJD-positiven Proben von einer sCJD-negativen Kontrollgruppe mit 100 %iger Sensitivität und Spezifität. Im Hinblick auf die Sensitivität ist es möglich Prion-Proteinaggregate in 40 μg von sCJD-positiven Hirngewebe nachzuweisen, wobei dieses in gleichbehandeltem sCJD-negativen Hirn verdnnnt wurde.

Surface-FIDA beruht darauf, den Aggregationszustand des Prion-Proteins nachzuweisen und verzichtet dabei auf die Verwendung von Proteinasen, um nicht an

Sensitivität zu verlieren. Durch den möglichen Einsatz von drei verschiedenen Antikörpern, einen als Capture und zwei als Sonden, ist eine hohe Spezifität erreichbar. Die Spezifität wurde in dieser Arbeit durch die kovalente Bindung des Capture-Antikörpers, und der damit verbundenen Möglichkeit stringente Waschschrte einzuführen, weiter erhöht. Eine Sensitivitätserhöhung konnte durch die Einführung eines Zentrifugationsschrittes während der Inkubation des Targtes erreicht werden. Die Messungen wurden an einem benutzerspezifisch umgebauten FCS-Instrument durchgeführt. Das Messprinzip basiert dabei auf konfokaler Mikroskopie und kann somit auch auf ein handelsübliches Laser Scanning Mikroskop übertragen werden.

Damit besitzt Surface-FIDA ein großes Potential als diagnostische Methode für humane Prionkrankheiten eingesetzt zu werden. Die Vorteile des diagnostischen Ansatzes Surface-FIDA im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität, sowie die in dieser Arbeit etablierten Entwicklungen sind in Tabelle 4.4-1 zusammengefasst dargestellt. Weiterhin ist ein Ausblick auf das Potential des Ansatzes aufgezeigt.

Tabelle 4.4-1 Vorteile von Surface-FIDA im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität

	Spezifität	Sensitivität
Methodischer Ansatz	• Reinigung von PrP^{Sc} mittels spezifischer NaPTA-Fällung • Nachweis des Aggregationszustandes von PrP^{Sc} • Einsatz von drei PrP-spezifischen Sonden möglich (Capture und Detektionssonden)	• Konzentrierung mittels NaPTA-Fällung • Kein Verlust an Pathogen-assoziierten Material durch Verzicht auf PK-Vorbehandlung • Einzelpartikelnachweis durch Auswertung
Experimentelle Verbesserungen dieser Arbeit	• Kovalente Bindung des Captures erhöht Flexibilität und • Ermöglicht Einführung stringenter Waschschrte • Imaging und damit Möglichkeit der Auswertung von Partikelgröße und Form als Pathogen-Charakteristika	• Konzentrierung der PrP^{Sc}-Aggregate auf der Glasoberfläche durch Zentrifugation
Potenzial	• Charakterisierung spezifischer Partikel	• Messung von mehr Flächen möglich

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Ansatz zum Nachweis einzelner PrP^{CJD}-Aggregate als molekulare Diagnostik von CJD entwickelt. Im Hinblick auf den Assay könnte die Spezifität durch den Einsatz von PrP^{Sc}-spezifischen Antikörpern oder Peptiden als Sonden erhöht werden. Bisher wurde als Capture und Sonde derselbe Antikörper eingesetzt, um die Detektion von PrP^C auszuschließen. Eine Sonde, die PrP^{CJD} ebenso gut oder sogar mit einer höheren Affinität bindet als die eingesetzten Antikörper, könnten im Zusammenhang mit der Koloalisationsanalyse die Sensitivität und Spezifität steigern. Bei der Verwendung von zwei Antikörpern als Sonden besteht die Gefahr, dass die konservierte Region der Antikörper an die gleichen Verunreinigung adhärirt. Beide eingesetzten Antikörper binden an ein lineares Epitop von PrP und binden somit sowohl monomeres als auch aggregiertes PrP. Somit könnte die Spezifität des Assays durch die Anwendung einer Struktur-spezifischen anti-PrP Sonde verbessert werden.

Des Weiteren könnte die Sensitivität des diagnostischen Ansatzes durch die Kombination mit einem Amplifikationsschritt gesteigert werden. In unserem Institut wurde ein Ansatz zur keiminduzierten Konversion von rek PrP entwickelt. Wenn es möglich wäre die spontane Konversion von rek PrP auszuschließen, könnten so minimale Mengen amplifiziert und mittels Surface-FIDA detektiert werden. Da auch Surface-FIDA sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet wären nur wenige Amplifikationsschritte ausreichend, was eine *de novo* Konversionen minimieren könnte. Während der Messung werden die detektierten Fluoreszenzintensitäten in Bilddaten umgewandelt. Das hat den Vorteil, dass Informationen zur Partikelgröße, -form und -verteilung erhoben werden können. Mittels der Multiparameteranalyse ist es möglich die detektierten Partikel in Abhängigkeit von ihrer Größe zu quantifizieren. Mit dieser Auswertung und empirischen Messreihen könnten so spezifische Partikel charakterisiert werden. Somit wäre eine weitere Optimierung des diagnostischen Ansatzes im Hinblick auf die Spezifität möglich.

Bezüglich der Entwicklung von Surface-FIDA zu einer *ante mortem* Diagnose von Prionkrankheiten muss die Übertragung auf Körperflüssigkeiten, wie CSF oder Blut, erfolgen, denn die Verwendung von Hirngewebe ist nicht praktikabel. Da die angenommene Konzentration an Prion-Proteinaggregaten in Körperflüssigkeiten sehr gering ist, sollte auch besonders Wert auf die Vorbehandlung der Körperflüssigkeiten gelegt werden, um gegebenenfalls Prion-Proteine aus einem größeren Volumen

aufzukonzentrieren und danach mittels Surface-FIDA analysieren zu können. Zur Abschätzung der Sensitivität sollte auf Proben präsymptomatischer Tiere geeigneter Tiermodelle zurückgegriffen werden, um zu bestimmen welches Krankheitsstadium diagnostiziert werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) ist eine übertragbare neurodegenerative Krankheit. Der Erreger besteht hauptsächlich aus dem fehlgefalteten körpereigenen Prion-Protein (PrP^{CJD}), welches in aggregierter Form vorliegt. Derzeit gibt es keine molekulare Diagnostik für CJD, die in der Lage ist, den Erreger im präsymptomatischen Stadium nachzuweisen. Die meisten Schnelltests zur Diagnose von Prionkrankheiten bei Tieren beruhen auf der Proteinase K (PK)-Resistenz des Erregers. Seitdem bekannt ist, dass der größte Anteil des PrP^{CJD} PK-sensitiv ist, sollte in Bezug auf Sensitivität auf einen Proteolyseschritt verzichtet werden.

Ziel dieser Arbeit war es eine molekulare Diagnostik für CJD zu entwickeln. Da sich das zelluläre PrP (PrP^{C}) chemisch nicht von PrP^{CJD} unterscheidet, musste eine krankheits-assoziierte Eigenschaft herangezogen werden. Der Aggregationszustand wurde als diagnostischer Marker gewählt. Zum Aggregatnachweis eignete sich die Methode Surface-FIDA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Surface-FIDA grundlegend methodisch optimiert und im Hinblick auf eine molekulare Diagnostik für CJD angewandt. Der Ansatz beinhaltet die Immobilisierung von Prion-Proteinaggregaten auf einer Glasoberfläche. In einem ersten Optimierungsschritt wurde der Capture-Antikörper mittels eines heterobifunktionellen Spacers kovalent an die Glasoberfläche einer Microtiterplatte gebunden. Nach der Reinigung von PrP^{CJD} aus Hirngewebe von CJD-Patienten konnte so eine Capture-vermittelte Bindung von PrP^{CJD} nachgewiesen werden. Viele fluoreszenzmarkierte Sonden können an die PrP^{CJD} -Aggregate binden, woraus hochfluoreszente Partikel resultieren. Diese wurden mittels Laserscanning-Mikroskopie visualisiert. Mit einer neu etablierten Auswertung der Bilddaten konnten einzelne fluoreszente Partikel quantifiziert werden. Nach der systematischen Optimierung des Protokolls zur Immobilisierung und Detektion von PrP^{CJD} , konnten CJD-positive Proben von CJD-negativen Proben mit 100-prozentiger Sensitivität und Spezifität unterschieden werden. Erste Sensitivitätsbestimmungen zeigen, dass 40 μg an CJD-positiven Hirngewebe verdünnt in CJD-negativem Hirngewebe ausreichen, um PrP^{CJD} zu detektieren.

6 SUMMARY

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a transmissible neurodegenerative disease. The causative agent consists mainly of the host-encoded misfolded prion protein (PrP^{CJD}) and is present in form of insoluble aggregates. Currently, no molecular presymptomatic diagnostic test for CJD is available, which is based on the detection of the pathogen itself as unequivocal biomarker. Most rapid tests for diagnosis of prion diseases in animals are based on the proteinase K (PK)-resistance of PrP^{CJD} . Since it is known that most of the PrP^{CJD} is PK-sensitive, a diagnostic assay, which does not rely on proteolysis is desirable.

The aim of this work was to develop a molecular diagnostic test for CJD. Because the cellular PrP (PrP^{C}) does not differ chemically from PrP^{CJD} , disease-associated properties had to be drawn on. Therefore the aggregated state was chosen as a diagnostic marker. For the detection of aggregates the method of surface-FIDA was available. A part of this work was to optimize surface-FIDA in its methodology and to adapt it as a diagnostic test for CJD. The surface-FIDA assay involves the immobilization of prion protein aggregates on a glass surface. In a first optimization step the capture antibody was bound covalently to the glass surface of a microplate by using a heterobifunctional spacer. After precipitating PrP^{CJD} from brain tissue of CJD victims a capture-mediated binding of PrP^{CJD} could be achieved. Multiple fluorescence labeled probes can bind to the PrP^{CJD} aggregates resulting in highly fluorescent particles. These particles were visualized by laser scanning microscopy. With a newly established image analysis single particles could be quantified. After optimizing the protocol for the immobilization and detection of PrP^{CJD} systematically, CJD-positive samples can be distinguished from CJD-negative samples with 100% sensitivity and specificity. Preliminary experiments concerning sensitivity show that 40 ng of CJD-positive brain tissue diluted in CJD-negative brain tissue were sufficient to detect PrP^{CJD} .

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A β	Amyloid- β -Peptid
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CDI	Konformationsabhängiger Immunotest
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
fCJD	familäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
sCJD	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
vCJD	neue Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CWD	Chronic Wasting Disease (Chronisch zehrende Krankheit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbant Assay
FCS	Fluoreszenz-Correlations-Spektroskopie
FIDA	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse
gÄ	Grammäquivalent
GdnHCl	Guadininhydrochlorid
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HCl	Salzsäure
HH	Hirnhomogenat
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
MG	Markierungsgrad
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaOH	Natronlauge
NaPTA	Phosphorwolframat
NHS	N-Hydroxysuccinimid

NHS-PEG-COOH	Polyethylenglykol-Spacer mit endständiger N-Hydroxysuccinimid- und Carboxylgruppe
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PBST	Phosphatpuffer mit 0,1 % Tween20
PBSTT	Phosphatpuffer mit 0,05 % Tween20 und 0,2 % TritonX100
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	Zelluläre Form des Prion-Proteins
PrP ^{Sc}	Krankheits-assoziierte Form des Prion-Proteins (Sc für Scrapie)
PrP ^{CJD}	Creutzfeldt-Jakob-assoziierte Form des Prion-Proteins
PrP27-30	N-terminal verkürzte, infektiöse Form des Prion-Proteins
rek huPrP	In E. coli exprimierte humane Form des Prion-Proteins
resPrP ^{Sc}	Proteinase K-resistente Form des krankheits-assoziierten Prion-Proteins
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
senPrP ^{Sc}	Proteinase K-sensitive Form des krankheits-assoziierten Prion-Proteins
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA	Triethylamin
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
u. a.	unter anderem
Ü	Überstand
ÜN	Über nacht
Vergl.	Vergleich
W	Waschschritt
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 LITERATUR

- Aguzzi, A. (2000). "Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality." *Haematologica* **85**(1): 3-10.
- Aguzzi, A., M. Glatzel, F. Montrasio, M. Prinz and F. L. Heppner (2001). "Interventional strategies against prion diseases." *Nat Rev Neurosci* **2**(10): 745-9.
- Alper, T., D. A. Haig and M. C. Clarke (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." *Biochem Biophys Res Commun* **22**(3): 278-84.
- Anderson, R. M., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, M. E. Woolhouse, C. J. Watt, H. J. Udy, S. MaWhinney, S. P. Dunstan, T. R. Southwood, J. W. Wilesmith, J. B. Ryan, L. J. Hoinville, J. E. Hillerton, A. R. Austin and G. A. Wells (1996). "Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle." *Nature* **382**(6594): 779-88.
- Angers, R. C., S. R. Browning, T. S. Seward, C. J. Sigurdson, M. W. Miller, E. A. Hoover and G. C. Telling (2006). "Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease." *Science* **311**(5764): 1117.
- Banks, W. A., M. L. Niehoff, C. Adessi and C. Soto (2004). "Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier." *Biochem Biophys Res Commun* **318**(1): 125-30.
- Belay, E. D., R. A. Maddox, E. S. Williams, M. W. Miller, P. Gambetti and L. B. Schonberger (2004). "Chronic wasting disease and potential transmission to humans." *Emerg Infect Dis* **10**(6): 977-84.
- Bernoulli, C., J. Siegfried, G. Baumgartner, F. Regli, T. Rabinowicz, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1977). "Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery." *Lancet* **1**(8009): 478-9.
- Bieschke, J., A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen and H. Kretzschmar (2000). "Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5468-73.
- Birkmann, E., F. Henke, N. Weinmann, C. Dumpitak, M. Groschup, A. Funke, D. Willbold and D. Riesner (2007). "Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA)." *Vet Microbiol* **123**(4): 294-304.

- Birkmann, E., O. Schafer, N. Weinmann, C. Dumpitak, M. Beekes, R. Jackman, L. Thorne and D. Riesner (2006). "Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion." *Biol Chem* **387**(1): 95-102.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." *Science* **218**(4579): 1309-11.
- Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway and H. Kretzschmar (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." *Nature* **390**(6661): 684-7.
- Brown, D. R., B. Schmidt and H. A. Kretzschmar (1997). "Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells." *Int J Dev Neurosci* **15**(8): 961-72.
- Brown, P. (2000). "The risk of blood-borne Creutzfeldt-Jakob disease." *Dev Biol (Basel)* **102**: 53-9.
- Brown, P. (2005). "Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy." *Vox Sang* **89**(2): 63-70.
- Brown, P., L. Cervenakova and H. Diringer (2001). "Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease." *J Lab Clin Med* **137**(1): 5-13.
- Brown, P., D. C. Gajdusek, C. J. Gibbs, Jr. and D. M. Asher (1985). "Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy." *N Engl J Med* **313**(12): 728-31.
- Brown, P., R. G. Will, R. Bradley, D. M. Asher and L. Detwiler (2001). "Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns." *Emerg Infect Dis* **7**(1): 6-16.
- Bruce, M. E. and H. Fraser (1991). "Scrapie strain variation and its implications." *Curr Top Microbiol Immunol* **172**: 125-38.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser and C. J. Bostock (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." *Nature* **389**(6650): 498-501.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." *Nature* **356**(6370): 577-82.

- Butler, J. E. (2000). "Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays." *Methods* **22**(1): 4-23.
- Castilla, J., P. Saa and C. Soto (2005). "Detection of prions in blood." *Nat Med* **11**(9): 982-5.
- Caughey, B., G. J. Raymond and R. A. Bessen (1998). "Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein." *J Biol Chem* **273**(48): 32230-5.
- Chandler, R. L. (1961). "Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material." *Lancet* **1**(7191): 1378-9.
- Chazot, G., E. Broussolle, C. Lapras, T. Blattler, A. Aguzzi and N. Kopp (1996). "New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man." *Lancet* **347**(9009): 1181.
- Cochius, J. I., R. J. Burns, P. C. Blumbergs, K. Mack and C. P. Alderman (1990). "Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotrophin." *Aust N Z J Med* **20**(4): 592-3.
- Cohen, F. E., K. M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R. J. Fletterick and S. B. Prusiner (1994). "Structural clues to prion replication." *Science* **264**(5158): 530-1.
- Cuillé, J. and P. Chelle (1936). "La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable?" *Comptes Rendus de L'Academie Des Sciences* **12**: 1552-1554.
- Deleault, N. R., B. T. Harris, J. R. Rees and S. Supattapone (2007). "Formation of native prions from minimal components in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23): 9741-6.
- Detwiler, L. A. (1992). "Scrapie." *Rev Sci Tech* **11**(2): 491-537.
- Dickinson, A. G. (1976). "Scrapie in sheep and goats." *Front Biol* **44**: 209-41.
- Dickinson, A. G., V. M. Meikle and H. Fraser (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." *J Comp Pathol* **78**(3): 293-9.
- Dormont, D. (2003). "Approaches to prophylaxis and therapy." *Br Med Bull* **66**: 281-92.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten and D. Cowen (1974). "Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." *N Engl J Med* **290**(12): 692-3.

- Eigen, M. (1996). "Prionics or the kinetic basis of prion diseases." *Biophys Chem* **63**(1): A1-18.
- Field, E. J. (1969). "Invasion of the nervous system by "slow" virus: a study with scrapie agent." *Int Arch Allergy Appl Immunol* **36**: Suppl:568-73.
- Fradkin, J. E., L. B. Schonberger, J. L. Mills, W. J. Gunn, J. M. Piper, D. K. Wysowski, R. Thomson, S. Durako and P. Brown (1991). "Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States." *JAMA* **265**(7): 880-4.
- Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs and M. Alpers (1966). "Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees." *Nature* **209**(5025): 794-6.
- Ghani, A. C., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson and R. M. Anderson (2003). "Updated projections of future vCJD deaths in the UK." *BMC Infect Dis* **3**: 4.
- Gibbs, C. J., Jr., A. Joy, R. Heffner, M. Franko, M. Miyazaki, D. M. Asher, J. E. Parisi, P. W. Brown and D. C. Gajdusek (1985). "Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone." *N Engl J Med* **313**(12): 734-8.
- Glatzel, M., E. Abela, M. Maissen and A. Aguzzi (2003). "Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *N Engl J Med* **349**(19): 1812-20.
- Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2004). "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8342-7.
- Grassi, J., S. Maillet, S. Simon and N. Morel (2008). "Progress and limits of TSE diagnostic tools." *Vet Res* **39**(4): 33.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." *Nature* **215**(5105): 1043-4.
- Hadlow, W. J. (1959). "Scrapie and Kuru." *Lancet* **ii**: 289-290.
- HealthProtectionAgency. (2007). "4th case of variant CJD infection associated with blood transfusion." from http://www.hpa.nhs.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733711457?p=1171991026241.
- Henke, F. (2005). Analyse oberflächenfixierter Prionen mit der Methode der 2D-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Diplomarbeit**.
- Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, M. Penney, D. Ritchie and J. W. Ironside (2002). "Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples." *BMJ* **325**(7365): 633-4.

- Hornshaw, M. P., J. R. McDermott and J. M. Candy (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein." *Biochem Biophys Res Commun* **207**(2): 621-9.
- Hsich, G., K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee and M. G. Harrington (1996). "The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies." *N Engl J Med* **335**(13): 924-30.
- Huang, N., S. K. Marie, J. A. Livramento, R. Chammass and R. Nitrini (2003). "14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia." *Neurology* **61**(3): 354-7.
- Janissen, R., L. Oberbarnscheidt and F. Oesterhelt (2009). "Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications." *Colloids Surf B Biointerfaces* **71**(2): 200-7.
- Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" *Cell* **73**(6): 1055-8.
- Kellings, K., N. Meyer, C. Mirenda, S. B. Prusiner and D. Riesner (1992). "Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis." *J Gen Virol* **73** (Pt 4): 1025-9.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1989). "Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection." *Virus Res* **12**(3): 213-20.
- Klatzo, I., D. C. Gajdusek and V. Zigas (1959). "Pathology of Kuru." *Lab Invest* **8**(4): 799-847.
- Koch, T. K., B. O. Berg, S. J. De Armond and R. F. Gravina (1985). "Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone." *N Engl J Med* **313**(12): 731-3.
- Kretzschmar, H. A. and W. Feiden (2002). "[Human prion diseases]." *Pathologe* **23**(4): 241-51.
- Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring and S. J. DeArmond (1986). "Scrapie prion proteins are synthesized in neurons." *Am J Pathol* **122**(1): 1-5.
- Kusnezow, W. and J. D. Hoheisel (2003). "Solid supports for microarray immunoassays." *J Mol Recognit* **16**(4): 165-76.
- Lacroux, C., S. Simon, S. L. Benestad, S. Maillet, J. Mathey, S. Lugan, F. Corbiere, H. Cassard, P. Costes, D. Bergonier, J. L. Weisbecker, T. Moldal, H. Simmons, F. Lantier, C. Feraudet-Tarisse, N. Morel, F. Schelcher, J. Grassi and O. Andreoletti

- (2008). "Prions in milk from ewes incubating natural scrapie." *PLoS Pathog* **4**(12): e1000238.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside and J. J. Hauw (1996). "BSE transmission to macaques." *Nature* **381**(6585): 743-4.
- Lazarus, L. (1985). "Suspension of the Australian human pituitary hormone programme." *Med J Aust* **143**(2): 57-9.
- Le Pichon, C. E., M. T. Valley, M. Polymenidou, A. T. Chesler, B. T. Sagdullaev, A. Aguzzi and S. Firestein (2009). "Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice." *Nat Neurosci* **12**(1): 60-9.
- Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2004). "Synthetic mammalian prions." *Science* **305**(5684): 673-6.
- Lehto, M. T., H. E. Peery and N. R. Cashman (2006). "Current and future molecular diagnostics for prion diseases." *Expert Rev Mol Diagn* **6**(4): 597-611.
- Leopoldt, J. D. (1759). "Einleitung zu der Landwirtschaft." *Christian Friedrich Günther, Berlin Gronau*.
- Liu, H., S. Farr-Jones, N. B. Ulyanov, M. Llinas, S. Marqusee, D. Groth, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and T. L. James (1999). "Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231)." *Biochemistry* **38**(17): 5362-77.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie and R. G. Will (2004). "Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion." *Lancet* **363**(9407): 417-21.
- Magde, D., E. L. Elson and W. W. Webb (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization." *Biopolymers* **13**(1): 29-61.
- Malaga-Trillo, E., G. P. Solis, Y. Schrock, C. Geiss, L. Luncz, V. Thomanetz and C. A. Stuermer (2009). "Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein." *PLoS Biol* **7**(3): e55.
- Marsh, R. F. and R. H. Kimberlin (1975). "Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis." *J Infect Dis* **131**(2): 104-10.
- Mathiason, C. K., J. G. Powers, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, S. A. Hays, J. Hayes-Klug, D. M. Seelig, M. A. Wild, L. L. Wolfe, T. R. Spraker,

- M. W. Miller, C. J. Sigurdson, G. C. Telling and E. A. Hoover (2006). "Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease." *Science* **314**(5796): 133-6.
- McKinley, M. P., D. C. Bolton and S. B. Prusiner (1983). "A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." *Cell* **35**(1): 57-62.
- Mehlhorn, I., D. Groth, J. Stockel, B. Moffat, D. Reilly, D. Yansura, W. S. Willett, M. Baldwin, R. Fletterick, F. E. Cohen, R. Vandlen, D. Henner and S. B. Prusiner (1996). "High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein." *Biochemistry* **35**(17): 5528-37.
- Mishra, R. S., S. Basu, Y. Gu, X. Luo, W. Q. Zou, R. Mishra, R. Li, S. G. Chen, P. Gambetti, H. Fujioka and N. Singh (2004). "Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine." *J Neurosci* **24**(50): 11280-90.
- Nuvolone, M., A. Aguzzi and M. Heikenwalder (2009). "Cells and prions: a license to replicate." *FEBS Lett* **583**(16): 2674-84.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood and et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." *Cell* **40**(4): 735-46.
- Orru, C. D., J. M. Wilham, A. G. Hughson, L. D. Raymond, K. L. McNally, A. Bossers, C. Ligios and B. Caughey (2009). "Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP(res) detection using seeded conversion of recombinant prion protein." *Protein Eng Des Sel* **22**(8): 515-21.
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen and et al. (1993). "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(23): 10962-6.
- Pastrana, M. A., G. Sajnani, B. Onisko, J. Castilla, R. Morales, C. Soto and J. R. Requena (2006). "Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction." *Biochemistry* **45**(51): 15710-7.
- Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett and W. A. Watson (1974). "Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep." *Br Vet J* **130**(4): lxxv-lxxvii.
- Pattison, I. H. and G. C. Millson (1961). "Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome." *J Comp Pathol* **71**: 101-9.

- Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell and J. W. Ironside (2004). "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient." *Lancet* **364**(9433): 527-9.
- Pitschke, M., R. Prior, M. Haupt and D. Riesner (1998). "Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy." *Nat Med* **4**(7): 832-4.
- Post, K., M. Pitschke, O. Schafer, H. Wille, T. R. Appel, D. Kirsch, I. Mehlhorn, H. Serban, S. B. Prusiner and D. Riesner (1998). "Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation." *Biol Chem* **379**(11): 1307-17.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." *Science* **216**(4542): 136-44.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, D. C. Bolton, S. B. Kent and L. E. Hood (1984). "Purification and structural studies of a major scrapie prion protein." *Cell* **38**(1): 127-34.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, M. P. McKinley, S. P. Cochran, K. A. Bowman and K. C. Kasper (1981). "Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7): 4606-10.
- Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth and G. G. Glenner (1983). "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." *Cell* **35**(2 Pt 1): 349-58.
- Riesner, D., K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M. A. Baldwin and S. B. Prusiner (1996). "Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity." *J Virol* **70**(3): 1714-22.
- Riesner, D., K. Kellings, U. Wiese, M. Wulfert, C. Mirenda and S. B. Prusiner (1993). "Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene." *Dev Biol Stand* **80**: 173-81.
- Roberts, M. J., M. D. Bentley and J. M. Harris (2002). "Chemistry for peptide and protein PEGylation." *Adv Drug Deliv Rev* **54**(4): 459-76.
- Rossi, G., M. Salmona, G. Forloni, O. Bugiani and F. Tagliavini (2003). "Therapeutic approaches to prion diseases." *Clin Lab Med* **23**(1): 187-208.
- Saborio, G. P., B. Permanne and C. Soto (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* **411**(6839): 810-3.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." *Nat Med* **4**(10): 1157-65.

- Safar, J. G., M. D. Geschwind, C. Deering, S. Didorenko, M. Sattavat, H. Sanchez, A. Serban, M. Vey, H. Baron, K. Giles, B. L. Miller, S. J. Dearmond and S. B. Prusiner (2005). "Diagnosis of human prion disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3501-6.
- Safar, J. G., K. Kellings, A. Serban, D. Groth, J. E. Cleaver, S. B. Prusiner and D. Riesner (2005). "Search for a prion-specific nucleic acid." *J Virol* **79**(16): 10796-806.
- Safar, J. G., M. Scott, J. Monaghan, C. Deering, S. Didorenko, J. Vergara, H. Ball, G. Legname, E. Leclerc, L. Solforosi, H. Serban, D. Groth, D. R. Burton, S. B. Prusiner and R. A. Williamson (2002). "Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice." *Nat Biotechnol* **20**(11): 1147-50.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual - 2nd edition." *S. Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Schäfer, O. (2002). "Nachweis von Prionen als Prionprotein-Aggregate im Hirngewebe TSE-erkrankter Tiere mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie " *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Schaller, O., R. Fatzer, M. Stack, J. Clark, W. Cooley, K. Biffiger, S. Egli, M. Doherr, M. Vandeveld, D. Heim, B. Oesch and M. Moser (1999). "Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)." *Acta Neuropathol* **98**(5): 437-43.
- Schwille, P., F. J. Meyer-Almes and R. Rigler (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." *Biophys J* **72**(4): 1878-86.
- Sigurdson, C. J., K. P. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, M. Polymenidou, P. Schwarz, M. Leclerc, P. Hammarstrom, K. Wuthrich and A. Aguzzi (2007). "Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers." *Nat Methods* **4**(12): 1023-30.
- Soto, C. (2004). "Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes." *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 809-19.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." *Biochemistry* **32**(8): 1991-2002.
- Steele, A. D., J. G. Emsley, P. H. Ozdinler, S. Lindquist and J. D. Macklis (2006). "Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3416-21.

- Tabaton, M., S. Monaco, M. P. Cordone, M. Colucci, G. Giaccone, F. Tagliavini and G. Zanusso (2004). "Prion deposition in olfactory biopsy of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* **55**(2): 294-6.
- Tamguney, G., M. W. Miller, L. L. Wolfe, T. M. Sirochman, D. V. Glidden, C. Palmer, A. Lemus, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2009). "Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces." *Nature* **461**(7263): 529-32.
- Terry, L. A., L. Howells, J. Hawthorn, J. C. Edwards, S. J. Moore, S. J. Bellworthy, H. Simmons, S. Lizano, L. Estey, V. Leathers and S. J. Everest (2009). "Detection of PrPsc in blood from sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy." *J Virol.*
- Thadani, V., P. L. Penar, J. Partington, R. Kalb, R. Janssen, L. B. Schonberger, C. S. Rabkin and J. W. Prichard (1988). "Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report." *J Neurosurg* **69**(5): 766-9.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." *Nature* **380**(6575): 639-42.
- Tzaban, S., G. Friedlander, O. Schonberger, L. Horonchik, Y. Yedidia, G. Shaked, R. Gabizon and A. Taraboulos (2002). "Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes." *Biochemistry* **41**(42): 12868-75.
- Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos and S. B. Prusiner (1996). "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14945-9.
- Walsh, M. K., X. Wang and B. C. Weimer (2001). "Optimizing the immobilization of single-stranded DNA onto glass beads." *J Biochem Biophys Methods* **47**(3): 221-31.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson and R. Bradley (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." *Vet Rec* **121**(18): 419-20.
- Wildemann, B., P. Oschmann and H. Reiber (2006). Neurologische Labordiagnostik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan and M. J. Atkinson (1991). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin." *Vet Rec* **128**(9): 199-203.
- Will, R. G., M. Zeidler, G. E. Stewart, M. A. Macleod, J. W. Ironside, S. N. Cousens, J. Mackenzie, K. Estibeiro, A. J. Green and R. S. Knight (2000). "Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* **47**(5): 575-82.

- Wille, H., M. Shanmugam, M. Murugesu, J. Ollesch, G. Stubbs, J. R. Long, J. G. Safar and S. B. Prusiner (2009). "Surface charge of polyoxometalates modulates polymerization of the scrapie prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 3740-5.
- Wroe, S. J., S. Pal, D. Siddique, H. Hyare, R. Macfarlane, S. Joiner, J. M. Linehan, S. Brandner, J. D. Wadsworth, P. Hewitt and J. Collinge (2006). "Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report." *Lancet* **368**(9552): 2061-7.
- Zerr, I., M. Bodemer, O. Gefeller, M. Otto, S. Poser, J. Wiltfang, O. Windl, H. A. Kretzschmar and T. Weber (1998). "Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* **43**(1): 32-40.
- Zigas, V. and D. C. Gajdusek (1957). "Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea." *Med J Aust* **44**(21): 745-54.