

Aus dem Institut für Neuropathologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Reifenberger

Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Konformere des Prionproteins

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Andreas Breil-Wirth

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Korth

Korreferent: Priv.-Doz. Methner

1 Einleitung	6
1.1 Übersicht	6
1.2 Das PrP	7
1.3 Prion Replikation	9
1.4 Prionerkrankungen des Menschen	11
1.4.1 Kuru	11
1.4.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	11
1.4.3 Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	12
1.4.4 Fatale Familiäre Insomnie	13
1.5 Glykosylierungsformen des PrPs	14
1.6 Konformere des PrPs	15
1.7 Antikörper	19
1.7.1 Monoklonale Antikörper	20
1.8 Proteinkonformationen und ihre Differenzierung	21
1.9 Therapeutischer Einsatz von monoklonalen Antikörpern bei Prionerkrankungen	23
1.10 Zielstellung dieser Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden	30
2.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) – Herstellen von Proteinbeladenen Maxisorp Platten	32
2.4 Enzyme linked immunofilter assay (ELIFA)	34
2.5 Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese und Western Blot	36
2.6 Fusion	38
2.7 Identifizierung Prion spezifischer monoklonaler Antikörper (Screening)	42
2.7.1 Screening mittels ELISA	43
2.7.2 Screening mittels ELIFA	44
2.7.3 Screening mittels Fluoreszenz	45
2.8 Identifizierung monoklonaler Antikörper gegen das 19C3 spezifische Peptid	51
2.9 Subklonierung der monoklonalen Antikörper	53
2.10 Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper	56
2.11 Bestimmung der Antikörperbindungsstellen am PrP	57
2.12 Aufreinigen von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen	58
2.12.1 Dialysieren	60
2.12.2 Konzentrationsbestimmung	60
2.12.3 Aktivitätsmessung	61
2.13 Ammoniumsulfat Fällung	63
2.14 Schockgefrieren von monoklonalen Antikörpern	64

2.15 Kalter Protease K Verdau	65
2.16 Immunpräzipitation	67
2.17 Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen Antikörpern.....	71
2.18 Untersuchung unterschiedlich glykosylierter PrP Formen mit 17B4	73
2.19 Immunpräzipitation mit 17B4.....	75
2.20 Immunfluoreszenz von ScN2a und N2a Zellen.....	79
2.21 17B4.G3 und Creutzfeldt-Jakob-Disease	81
3 Ergebnisse.....	82
3.1 Identifizierung Prion spezifischer monoklonaler Antikörper.....	82
3.1.1 Versuche zur Optimierung der Methode	82
3.1.2 Screening.....	85
3.2 17B4 – ein glykoformspezifischer Antikörper	91
3.2.1 Subklonierung	91
3.2.2 Isotyp des Antikörpers	92
3.2.3 Untersuchung unterschiedlich glykosylierter Formen von PrP mit 17B4.....	92
3.2.4 Immunpräzipitation mit 17B4.G3	94
3.2.5 Immunfluoreszenz mit 17B4 und 19C4	95
3.2.6 17B4 und Creutzfeldt-Jakob-Disease.....	98
3.2.7 Zusammenfassung 17B4	99
3.3 19C3 und ^{CTM}PrP	100
3.3.1 Subklonierung	101
3.3.2 Isotyp.....	102
3.3.3 Epitop des Antikörpers.....	102
3.3.4 Klone der Immunisierung mit dem 19C3 Peptid	102
3.3.5 Kalter PK-Verdau.....	102
3.3.6 Immunpräzipitation mit Gehirnhomogenaten und anti-PrP Antikörpern	104
3.3.7 Zusammenfassung 19C3	107
3.4 19C4- ein universeller Anti-Prion Antikörper.....	108
3.4.1 Subklonierung	108
3.4.2 Isotyp.....	108
3.4.3 Epitop	108
3.4.4 Immunpräzipitation mit PrP ^{Sc}	108
3.4.5 Behandlung von Prion infizierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern	109
3.4.6 Zusammenfassung 19C4	110
3.5 Zusammenfassung weiterer Antikörper und Versuche.....	111
3.5.1 Gewonnene Subklone.....	111
3.5.2 Isotypen der monoklonalen Antikörper.....	111
3.5.3 Epitope der Antikörper.....	111
3.5.4 Ergebnisse der Antikörperaufreinigung	112
3.5.5 Resistenz der monoklonalen Antikörper gegen Schockgefrieren	113
4 Diskussion.....	114
4.1 Generierung von monoklonalen Antikörper mit der Hybridoma Methode.....	114
4.2 Die Suche nach einem CTM spezifischen Antikörper	116
4.3 17B4 – Ein glykoformspezifischer Antikörper	119

4.4 Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen PrP Antikörpern	121
5 Abkürzungen	123
6 Literaturverzeichnis.....	125
7 Abstract.....	131
8 Danksagung.....	132
9 Lebenslauf.....	133

1 Einleitung

Die Gruppe der transmissiblen spongiformen Encephalopathien umfasst eine Reihe von infektiösen Erkrankungen des Zentralnervensystems, welche entweder durch Kontakt zu infiziertem Material, durch genetische Mutationen oder, im überwiegenden Teil der Fälle, sporadisch entstehen können. Ihnen sind eine progrediente, nicht therapierbare Demenz und Ataxie gemeinsam. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu den namensgebenden schwammartigen (spongiformen) Veränderungen des Gehirns bei den infizierten Menschen oder Tieren.

1.1 Übersicht

Die am längsten bekannte Transmissible Spongiforme Encephalopathie (TSE) oder Prionkrankheit ist die auch als Scrapie bekannte Traberkrankheit bei Schafen, welche erstmals 1732 erwähnt wurde (*Hörnlimann B. 2001a, Schwartz M. 2003*). Die Namensgebung und Beschreibung der Krankheit basierte zunächst auf den Symptomen Kratzen (to scrape), Traben und Muskelzittern (*Hörnlimann B. 2001a*). Ende des 19. Jahrhunderts wurden erstmals pathologische Veränderungen in den Gehirnen der befallenen Tiere beschrieben (*Cassirer R. 1898*). Die experimentelle Übertragung der Erkrankung gelang 1936 (*Hörnlimann B. 2001a*). Als Infektionsweg wurde sowohl die horizontale Übertragung von Tier zu Tier als auch die vertikale Übertragung von Mutter zum Nachkommen beschrieben (*Hadlow W. J. 1982, Pattison I. H. 1972*).

Ein weiter bekannter Vertreter der TSE im Tierreich ist die bovine spongiforme Encephalopathie (BSE) bei Rindern (*Collee J. G. 1997*), welche ihren Ausgang vermutlich in Großbritannien nach der Verfütterung von unzureichend sterilisierten Tiermehl aus den Kadavern von infizierten Schafen nahm (*Hörnlimann B. 2001b*). Auch die transmissible mink encephalopathy (TME) bei Nerzen, welche erstmals 1947 in Nerzfarmen in den USA beobachtet wurde und eventuell ebenfalls in Verbindung mit der Verfütterung von mit Scrapie infiziertem Schafmehl steht, gehört zu den TSE (*Sigurdson C. J. 2003*). Auch die chronic wasting disease (CWD) bei nordamerikanischen Hirschen und Elchen ist eine TSE. Sie steht jedoch vermutlich nicht in epidemiologischer Verbindung zu Scrapie (*Williams E. S. 2005*).

Die häufigste menschliche Prionenerkrankung ist die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD). Weitere humane prionassoziierte Erkrankungen sind das Gerstmann-

Sträussler-Scheinker Syndrom, die fatale familiäre Insomnie, sowie Kuru (siehe auch den Abschnitt „Prionerkrankungen des Menschen“).

1.2 Das PrP

S. B. Prusiner isolierte 1982 das infektiöse Agens der Prionen Erkrankung (*Prusiner S. B. 1982*). Hierbei fiel auf, dass das Agens mit einem physiologischen, zellulären Protein cofraktionierte. Das Agens wurde Prion genannt (Proteinacious Infectious Particle), das zelluläre Protein wurde PrP genannt.

Bei dem physiologischerweise vorkommenden PrP (PrP^C) handelt es sich um ein ca. 35kDa umfassendes Glykoprotein (*Stahl N. 1987*), welches in seiner zellulären Form über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol Anker mit der Zellmembran verknüpft ist. Posttranslational kann das PrP durch fakultative N-Glykosylierung an den Asparagin Aminosäuren 181 und 197 modifiziert werden (*Endo T. 1989*).

Das Protein wird an der Oberfläche fast aller Zelltypen präsentiert. Die höchste Konzentration von PrP^C liegt an Neuronen und der Neuroglia vor, dort insbesondere an synaptischen Enden (*Fournier J-G. 1998*), wohin es durch axonalen Transport gelangt (*Borchelt D. R. 1994*). Auch in zahlreichen nicht neuronalen Geweben konnte das PrP nachgewiesen werden. So z.B. in einigen Zelltypen des Gastrointestinaltraktes und der Niere (*Fournier J-G. 1998, Le maire-Vieille C. 2000*), aber auch in der Milz und anderen lymphatischen Geweben, wie z.B. in follikulärdendritischen Zellen (*Blättler T. 1997, McBride P. A. 1992*).

Das hochkonservierte Protein wurde in zahlreichen Tierarten nachgewiesen und ist jeweils auf einem einzelmem Gen codiert (*Sparkes R. S. 1986*). Der Grad der Konservierung ist unter den Säugetieren besonders ausgeprägt (*Schätzl H. M. 1995*), gilt jedoch auch für evolutiv weiter entfernte Tierarten wie z.B. Vögel (*Wopfner F. 1999*). Dieser hohe Grad der Konservierung deutet auf eine wichtige Funktion des Proteins hin.

Die genaue Funktion des PrPs ist jedoch bis heute unklar. PrP^{0/0} knock-out Mäuse zeigten keine signifikante Einschränkung der Lebenserwartung. Bei allen knock-out Stämmen konnte jedoch ein gestörter Tag-Nacht Rhythmus beobachtet werden (*Tobler I. 1996*). In welcher Weise das Protein den zirkadianen Rhythmus zu beeinflussen mag ist unklar. PrP^{0/0} knock-out Mäuse waren empfindlicher gegenüber oxidativen Stress als Wildtyp Mäuse (*Brown D. R. 1997*) und zeigten eine reduzierte Aktivität der Cu/Zn Superoxid Dismutase (SOD).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass PrP^C dazu in der Lage ist Kupfer-Ionen im Bereich der N-terminalen Octarepeats zu binden (*Hornshaw M. P. 1995*). Diese Octarepeats schienen, insbesondere wenn sie durch Mutationen vermehrt waren, einen Einfluss auf die Interaktion zwischen zellulären und pathologischen PrP zu haben (*Leliveld S. R. 2005*).

Die infektiöse Scrapie Form (PrP^{Sc}) unterscheidet sich von der zellulären, nicht infektiösen Variante erheblich in ihren biochemischen Eigenschaften. Seit langem ist bekannt, dass der Scrapie-Erreger, ebenso wie der CJD Erreger, außerordentlich widerstandsfähig gegen herkömmliche Sterilisierungsverfahren (Autoklavieren bei 120°C für 20 Minuten), gegen Nukleasen und die Bestrahlung mit UV-Licht ist (*Gibbs C. J. 1978*). Hingegen gelang die Denaturierung mit Harnstoff oder Natronlauge. Das von Prusiner beschriebene infektiöse Protein erwies sich als partiell resistent gegen den Verdau mit Protease K und hatte nach dem Verdau eine Masse von 27-30 kDA (*Prusiner S. B. 1982*). Dieses schwer degradierbare Protein lagerte sich in Lysosomen ab (*Caughey B. 1991*).

NMR Strukturanalysen zeigten drei alpha Helices in der c-terminalen Hälfte des zellulären Proteins und nur einen geringen Anteil an beta Faltblättern (3%) (*Rieck R. 1996, Zahn R. 2000*). Für den N-terminale Bereich, in welchen die Octarepeats liegen, konnte keine definitive Struktur gezeigt werden. PrP^{Sc} wiederum zeigte eine von beta Faltblättern dominierte Struktur (45% beta, 30% alpha-helikale).

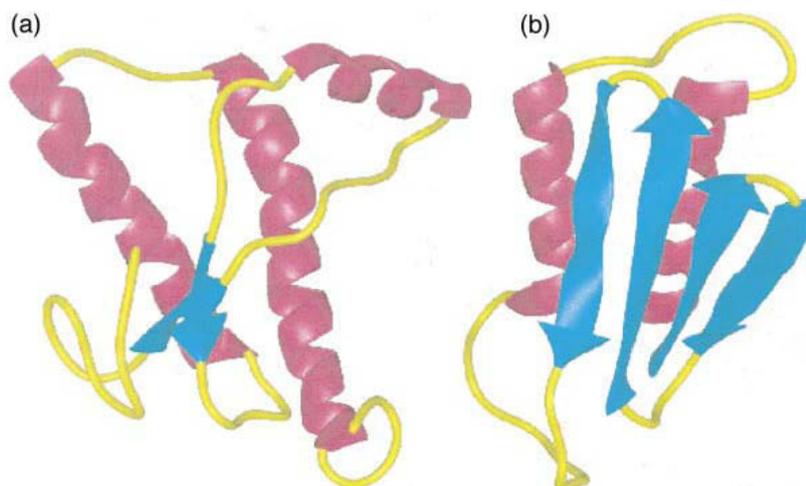


Abb. 1.1: (a) Zelluläres PrP mit hohem alpha Helix Anteil; (b) PrP^{Sc} mit hohem beta Faltblatt Anteil; (Cohen F. E. 1999)

Bei der Untersuchung infizierter menschlicher Gehirne waren bereits makroskopisch unterschiedliche Ausprägungen von Atrophie des Gehirns zu erkennen (*Kretzschmar*

H. 2001). Bei Tieren waren die untersuchten Gehirne makroskopisch unauffällig (Hewicker-Trautwein M. 2001). Als typische mikroskopische Veränderung wurde die namensgebende spongiforme neuronale Vakuolisierung, das heißt Ausbildung kleiner Löcher im Gewebe, beschrieben. Hinzu kamen neuronale Degeneration, also Zerfall und Verlust von Nervenzellen, sowie Astrozytose, das heißt Ersatz der neuronalen Substanz durch anwachsende Astrozyten (Zlotnik I. 1962). Bei Hamstern, Mäusen und in geringerem Ausmaß auch bei Schafen konnten amyloide Plaques und Fibrillen beobachtet werden. Auch bei Kuru und bei anderen menschlichen Prionerkrankungen wurden amyloide Ablagerungen beschrieben (Kretzschmar H. 2001).

	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Infektiösität	Keine	Vorhanden
Toxizität	Vorwiegend nicht toxisch	Vorwiegend neurotoxisch
Sekundärstruktur	Alpha Helices	Beta Faltblattstruktur
Protease K Resistenz	Sensitiv	Teilweise resistent
Molekulargewicht	35 kDa	35 kDa, 27-30 kDa nach PK Verdau
Löslichkeit in Detergentien	Löslich	Unlöslich

1.3 Prion Replikation

Ursprünglich wurden die TSE in der Annahme, dass der Erreger ein Virus mit langer Inkubationszeit sei, als slow virus disease bezeichnet (Thorgeirsdottir S. 2002). Gegen diese These sprach, dass nie ein Nukleinsäurenachweis gelungen war und dass auch nach aggressiven Versuchen Nukleinsäuren zu zerstören, die Infektiösität infizierter Gehirnpräparate nicht gesenkt werden konnte (Prusiner S. B. 1991).

Das heute weitestgehend akzeptierte Modell der Entstehung von Prionkrankheiten wurde 1982 von S.B. Prusiner entwickelt (Prusiner S. B. 1982). Es ging davon aus, dass die fehlgefaltete Form des PrPs (PrP^{Sc}) dazu in der Lage sei bei Kontakt mit der physiologischen Form diese in den fehlgefalteten Zustand zu versetzen und so die Scrapie Form zu replizieren (Nguyen J. 1995, Pan K-M. 1993).

Für diese Theorie sprach auch, dass das Vorhandensein von endogenen PrP an der Zelloberfläche für Infektion mit Scrapie zwingend erforderlich war. So wurde gezeigt,

dass PrP^{0/0} knock-out Mäuse nicht infizierbar waren (*Büeler H. 1993, Sailer A. 1994*). Mallucci et al. (*Mallucci G. 2003*) konnten an transgenen Mäusen, bei welchen das neuronenspezifische PrP selektiv abgestellt werden konnte, zeigen, dass die histologische Degeneration in Abwesenheit des Proteins reversibel war, obwohl PrP^{Sc} in nicht neuronalen Gewebe weiter akkumulierte. Dies zeigte zum einen, dass endogenes PrP im neuronalen Gewebe für die Manifestation der Erkrankung essentiell ist und gab zum anderen Hoffnung auf eine Therapierbarkeit auch histopathologisch degenerativer Stadien.

Ein weiterer Hinweis für die Protein only Hypothese, das heißt die Idee, dass sich die Fehlfaltung ohne weitere Moleküle, insbesondere ohne Nukleinsäuren repliziert, war die Infektion von Mäusen mit rekombinant hergestellten PrP (*Legname G. 2004*). Hierbei wurde in *E. coli* Kulturen rekombinantes PrP hergestellt, welches zu Fibrillen mit großer Ähnlichkeit mit „Prion Rods“ (also dem Protease K resistenten Teil des PrP^{Sc} (recMoPrP(89-230))) aggregiert wurde. Mit diesen Fibrillen wurden transgene Mäuse, welche diesen Teil des PrPs überexprimierten (MoPrP(89–231)), intrazerebral inokuliert. Diese Mäuse entwickelten innerhalb von 380 bis 660 Tagen neurologische Dysfunktionen und konnten ihrerseits Wildtypmäuse mit weniger als 150 Tagen Inkubationszeit infizieren. Im Rahmen dieses Versuches konnte erstmals gezeigt werden, dass die Verwendung synthetischer Prionen eine Infektion zu verursachen mag, was die Protein only Hypothese untermauerte.

Früh wurde beobachtet, dass die Übertragung von Prionerkrankungen zwischen zwei Arten mit unterschiedlichen Erfolg gelang. Die Konversion des zellulären Proteins in das pathogene Agens wurde durch eine Speziesbarriere erschwert, wobei das Ausmaß der Sequenzhomologie zwischen Spender- und Empfängerart von Bedeutung zu sein schien. Das heißt, je ähnlicher Aminosäuresequenz und Proteintopologie zweier Spezies, desto wahrscheinlicher die Übertragung der Erkrankung (*Prusiner S. B. 2001a, Prusiner S. B. 1990, Scot t M. 1989*). Des Weiteren wurde postuliert, dass bislang unbekannte Chaperone (Faktor X) an der Konversion beteiligt seien und eine gewisse Spezifität für ihre Spezies aufwiesen (*Telling G. C. 1995*).

Die eigentliche Infektion mit dem Erreger erfolgt meist oral. Eine parenterale, insbesondere eine intrakranielle Infektion führt zur Reduktion der Inkubationszeit. Die Ausbreitung des Erregers von der Peripherie zum Zentralnervensystem ist abhängig von prionhaltigen Gewebe (*Blättler T. 1997, Brandner S. 1996*).

1.4 Prionerkrankungen des Menschen

1.4.1 Kuru

Kuru trat im 20. Jahrhundert beim Volksstamm der Fore in Papua-Neuguinea auf und war auf den dort praktizierten rituellen Kannibalismus zurückzuführen. Als Hauptsymptom imponierten zunehmende Ataxie, Demenz trat vergleichsweise selten auf. Nach Verbot des Kannibalismus Mitte des Jahrhunderts ebte die Epidemie ab (*Gajdusek D. C. 1959, Zigas V. 1975*). Von westlichen Medizinern wurde sie erstmals 1956 beschrieben (*Gajdusek D. C. 1957*). Die Hauptursache bestand in der Präparation und dem Verzehr der Gehirne der Toten, wobei davon ausgegangen wurde, dass der parenterale Infektionsweg bei der Zubereitung den effizienteren Infektionsweg darstellte. Eine Infektiösität des Gehirns von Kuru Erkrankten in Primaten konnte nachgewiesen werden (*Gajdusek D. C. 1967*).

1.4.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

CJD wurde erstmals in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts von den namensgebenden Ärzten beschrieben (*Jakob A. M. 1921*). Heute werden vier verschiedene Formen des Krankheitsbildes unterschieden. Die idiopathische oder auch sporadische Form macht 80-95% der Fälle aus und wird auf spontane, somatische Mutationen oder spontane Umlagerungen des PrPs zurückgeführt. Die familiäre Form macht 15% aller Fälle aus und wird auf unterschiedliche Punktmutationen des Priongens zurückgeführt (*Prusiner S. B. 1998*). Von der iatrogenen Form sind bisher weltweit ca. 180 Fälle beschrieben worden, welche auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen waren (*Budka H. 2001a*). Patienten wurden sowohl durch Transplantation von infektiöser Hornhaut oder Dura als auch durch die Verwendung von unzureichend sterilisierten Tiefenelektroden zur EEG Ableitung infiziert (*Brown P. 1992*). Ein weiterer Infektionsweg war die Verwendung von humanen Wachstumshormon, welches aus Verstorbenen gewonnen wurde. Durch dieses kontaminierte Hormon wurden über 90 Menschen infiziert (*Prusiner S. B. 1998*).

Schließlich wurde die neue Variante (vCJD) beschrieben, deren Auftreten offenbar in Zusammenhang mit BSE stand (*Budka H. 2001a*). Dies wurde zum einen aufgrund der zeitlichen und geographischen Koinzidenz in Großbritannien angenommen, konnte aber auch experimentell untermauert werden. So konnte gezeigt werden, dass BSE auch nach Passagen in mehreren Tieren ein charakteristisches

Inkubations- und Läsionsprofil beibehält (*Bruce M. E. 1997*). Wurden nun transgene Mäuse mit vCJD bzw. BSE-haltigen Hirnproben inokuliert, konnten ähnliche Inkubationszeiten und klinische Symptome beobachtet werden (*Bruce M. E. 1997, Collinge J. 1996, Hill A. F. 1997*), was nicht für andere CJD Formen galt. Auch die biochemische Untersuchung der Glykosylierungsmuster zeigte Unterschiede zur sporadischen CJD, jedoch Übereinstimmungen zwischen auf andere Tiere übertragenes BSE und vCJD (*Collinge J. 1996*).

Bei allen Varianten der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) wurde histopathologisch die Trias spongiforme Veränderung, Neuronenverlust und Gliose beschrieben. Klinisch imponierten motorische Auffälligkeiten, wie Myoklonien, Spastik, Hyperreflexie oder Ataxie und eine progrediente Demenz. Als diagnostisch wegweisend wurden weiterhin typische EEG Veränderungen bestehend aus periodischen Komplexen scharfer Wellen beschrieben (*Budka H. 2001a*).

Bei der neuen Variante von CJD ist die symptomatische Phase der deutlich jüngeren Patienten (29 Jahre gegen 65 bei der sporadischen Form) im Gegensatz zur klassischen Variante von 6 auf bis zu 12 Monate verlängert. Darüber hinaus weisen die Patienten vor der Demenz oftmals zusätzlich psychiatrische Störungen auf (*Will R. G. 1996a, Will R. G. 1996b*) (www.who.int). Inzwischen sind an vCJD mehr als 157 Menschen verstorben, davon die meisten in Großbritannien (WHO-Statistik, Stand 2005).

Genetisch scheint bei der CJD insbesondere der M129V Polymorphismus von Bedeutung zu sein. Während in der deutschen Normalpopulation 37% der Individuen homozygot für Methionin (MM), 51% heterozygot (MV) und 12% homozygot für Valin (VV) sind, wurde bei der sporadischen CJD 72% MM, 10% MV und 17% VV beobachtet (*Parchi P. 1999*). Patienten mit vCJD waren bislang ausschließlich homozygot für Methionin (*Will R. G. 1996b*).

1.4.3 Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

Das Syndrom wurde erstmals 1928 als „eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems“ von Josef Gerstmann beschrieben (*Gerstmann J. 1936*). Erst 1962 wurde die große Ähnlichkeit der Klinik und der Neuropathologie mit Kuru erkannt. Durch nachträgliche molekulargenetische Untersuchungen konnte die Krankheit in mehreren Familien gehäuft nachgewiesen werden (*Budka H. 2001b, Kretzschmar H. A. 1991*). Als verursachende Mutation wurde P102L im PrPGen

beschrieben (*Doh-ura K. 1989*), ebenso wurde eine Assoziation mit der A117V Mutation (*Hegde R. S. 1998a, Mastrianni 1997*) und anderen Genloci beobachtet.

Die Krankheit konnte mit unterschiedlichem Erfolg von erkrankten Menschen auf Ratten, Mäuse und Primaten übertragen werden, dabei schien der Genotyp des Empfängers für die Übertragbarkeit bedeutsam zu sein (*Budka H. 2001b*).

Klinisch wurden zwei Varianten unterschieden. Bei der klassischen Form dominierte eine langsam, über mehrere Jahre (2-17) progrediente spinal-ataktische Symptomatik mit spät einsetzenden dementiellen Erscheinungen (*Hsiao K. 1990*).

Die dementielle Form verlief ähnlich wie CJD, meist rascher als die klassische Form. Ende der 90er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen GSS und einem bestimmten Konformer des PrPs, dem ^{CTM}PrP, angenommen. Hierauf wird im Abschnitt „Konformere des PrPs“ näher eingegangen.

1.4.4 Fatale Familiäre Insomnie

Bei dieser autosomal dominant vererbten Krankheit kommt es zu progredienter Schlaflosigkeit mit dem Verlust von Schlaf Mustern im EEG, Hyperaktivität, einem Aufmerksamkeitsdefizit und motorischen Ausfällen. Diese Symptome sind pathophysiologisch mit einer Atrophie einzelner thalamischer Kerne assoziiert (*Lugaresi E. 1998*). Genetisch wurde eine Mutation auf Codon 178 und gleichzeitige Heterozygotie oder Homozygotie für Methionin am Codon 129 beschrieben (*Medori R. 1992*). Es gab jedoch auch Hinweise, die auf ein sporadisches Auftreten der Erkrankung hindeuteten (*Mastrianni J. A. 1999*).

1.5 Glykosylierungsformen des PrPs

Das PrP verfügt über zwei hoch konservierte potentielle Glykosylierungsstellen (Stahl N. 1987) an den Asparaginen der Positionen 180 und 196 (Korth C. 2000).

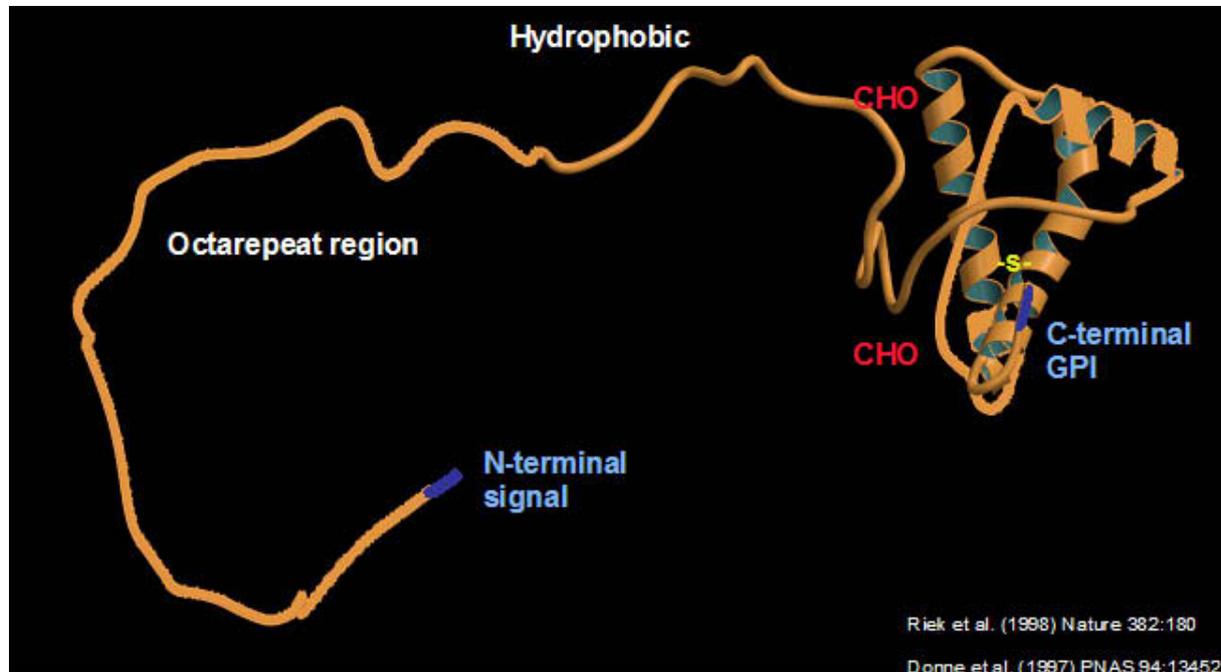


Abb. 1.2: Struktur des Prion Moleküls mit Glykosylierungsstellen

Die unterschiedliche Glykosylierung dieser Positionen führt zur Bildung von PrP mit keinen, einen oder zwei Zuckerresten, was zum Auftreten von drei Banden im Westernblot führt. Die obere Bande stellt die diglykosylierte (~35 kDa), die mittlere die monoglykosylierte (~32 kDa) und die untere die unglykosylierte (~25 kDa) Form dar (Stahl N. 1987).

Die relative Verteilung der Glykosylierungsformen und deren Massenanteil scheint für unterschiedliche Prionenstämme spezifisch zu sein (Collinge J. 1996). Die Existenz unterschiedlicher Stämme wurde früh aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften des PrPs postuliert. So wurde beobachtet, dass einzelne Stämme sich bezüglich der Inkubationszeit und des pathologischen Läsionsprofils unterschieden (Prusiner S. B. 2001a). Des Weiteren kam es nach Protease K Verdau zu leicht unterschiedlichen Größen der Glykosylierungsformen im Western Blot, was zur weiteren Stammcharakterisierung herangezogen wurde (Bessen R. 1992, Telling C. 1996). Dabei schienen der Genotyp und das Glykosylierungsmuster des Empfängers von untergeordneter Bedeutung zu sein, da auch nach Passagen von PrP^{Sc} in unterschiedlichen Mauslinien identische Muster gesehen wurden (Kaccsak R. J. 1986, Kuczius T. 1998).

Glykosylierungsmuster untermauerten auch die Abstammung der vCJD vom BSE Erreger, da diese beiden Stämme in ihrem Glykosylierungsmuster weitestgehend übereinstimmten, während sCJD und vCJD sich voneinander unterschieden (*Collinge J. 1996*).

Bei der CJD wurden anhand der Glykoformen verschiedene Typen im Western Blot unterschieden. Beim Typ 1 liegt die monoglykosylierte Form bei ~21 kDa, beim Typ 2 bei ~19 kDa. Dabei konnte die Methionin-Methionin Form zu beiden Typen führen, während Methionin-Valin und Valin-Valin immer zu Typ 2 führten (*Collinge J. 1996*).

Über die Zusammensetzung der glykosylierenden Zucker ist bekannt, dass sich diese bei PrP^C und PrP^{SC} nicht in der Art, wohl aber im Mengenverhältnis der Saccharide unterschieden (Rudd P. 1999), wobei PrP^{SC} mehr komplexe Zucker aufwies.

Ein Verlust der Glykosylierung förderte die Bildung von PrP^{SC} in infizierten Zelllinien (*Korth C. 2000*), bzw. die Bildung von PrP Typen mit PrP^{SC} ähnlichen Eigenschaften in gesunden Zellmodellen (*Lehmann S. 1997, Taraboulos A. 1990*).

1.6 Konformere des PrPs

Für die meisten Glykoproteine gilt, dass aus der Messenger RNA genau ein Protein entsteht. Beim PrP ist zunächst in zellfreien Translationssystemen gezeigt worden, dass hier mehr als nur eine Form gebildet wurde (*Yost C. S. 1990*). Ein Konformer wurde komplett in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transloziert und nach Bindung an einen GPI-Anker an der Zelloberfläche präsentiert (*Stahl N. 1987*). Zwei weitere Formen durchspannten die Membran in unterschiedlicher Richtung (*Hegde R. S. 1998a, Lingappa V. R. 2002*).

Bei dem einen Konformer lag der Carboxyterminus (-COOH) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und entsprechend extrazellulär nach Fusion mit der Zellmembran. Dieses Konformer wurde als ^{CTM}PrP (c-transmembranäres PrP) bezeichnet. Die andere transmembranäre Form war genau entgegengesetzt orientiert, das heißt hier lag der Aminoterminus (NH₂) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Dieses Konformer wurde entsprechend als ^{NTM}PrP bezeichnet.

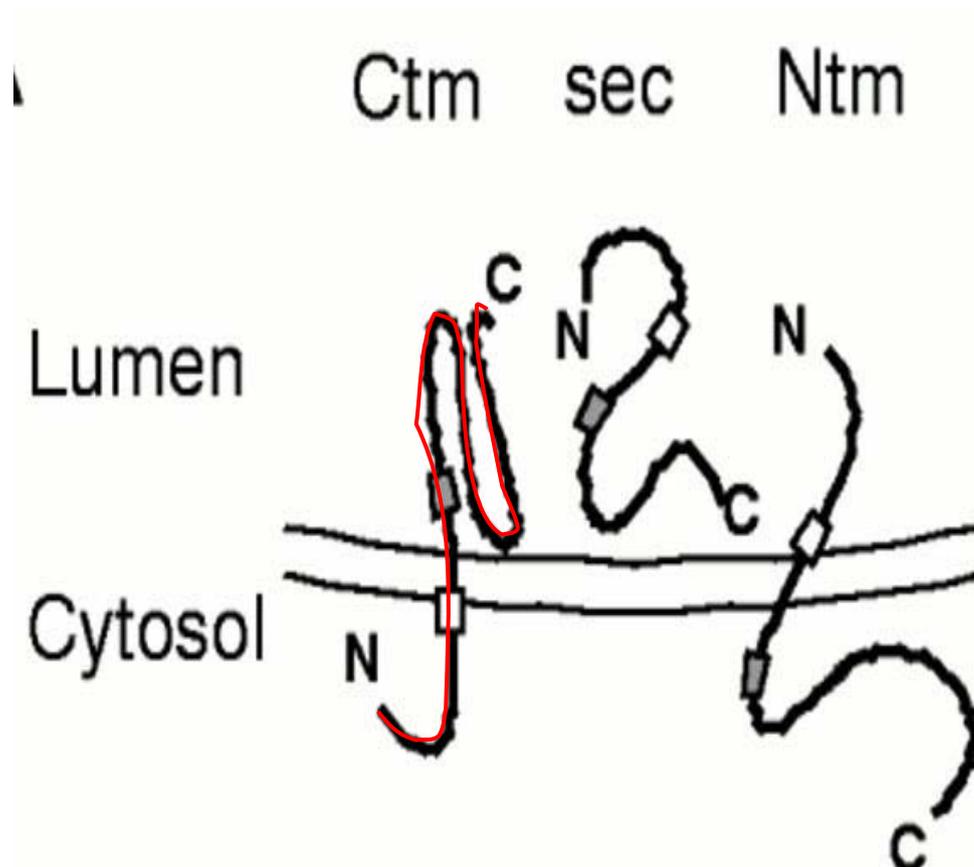


Abb. 1.3 Konformere des PrPs an der ER-Membran; aus (Hegde R. S. 1998a); Die beiden transmembranären Formen durchspannen die Membran – Ctm mit dem Carboxy-Terminus im ER-Lumen, Ntm mit dem Amino-Terminus im Lumen; Die sekretorische Form (sec) befindet sich komplett intraluminal

Im zellfreien System zeigten die beiden transmembranären Formen in Abwesenheit von Detergentien eine partielle Resistenz gegen kalten Protease K Verdau auf Eis. Der intraluminale Teil des Proteins wurde von der Protease K nicht erreicht (Hegde R. S. 1998a). Diese Resistenz war jedoch nicht mit der konformationsbedingten Resistenz des PrP^{Sc} zu vergleichen, da sie ausschließlich auf der Barrierefunktion der Membran basierte.

Beide Konformere schienen die Plasmamembran mit den gleichen Aminosäuren zu durchspannen. Dabei handelte es sich in etwa um die hydrophoben Aminosäuren 110 bis 135 (Hegde R. S. 1998a). Entsprechend ist gezeigt worden, dass auch auf Ebene der DNA Mutationen, Deletionen oder Insertionen in einer umschriebenen Region die Expression der Konformere zu beeinflussen mag (De Fea K. A. 1994, Hegde R. S. 1998a, Stahl N. 1987). In dieser Region des Proteins war in Magnetresonanzuntersuchungen keine helikale Struktur nachgewiesen worden (James T. L. 1997). Die Bildung unterschiedlicher Konformere des PrPs schien

jedoch nicht nur auf seiner Aminosäuresequenz zu beruhen, vielmehr schienen akzessorische Translokationsfaktoren benötigt zu werden, um die sekretorische Form zu bilden (*Hegde R. S. 1998b*), da in deren Abwesenheit im zellfreien System ausschließlich die ^{CTM}PrP Form gebildet worden war.

Diese ungewöhnliche Biogenese des PrPs hat Konsequenzen für die Physiologie im Organismus nahegelegt. *Hegde et al (Hegde R. S. 1998a)* haben gezeigt, dass transgene Mäuse mit Mutationen in dem beschriebenen Bereich ^{CTM}PrP in deutlich höherem Anteil bildeten als Wildtyp Mäuse. Bei der KH->II Mutation wurden das Lysin und Histidin an den Positionen 110 bzw 111 durch Isoleucin ersetzt. Dies führte zu einer Steigerung des ^{CTM}PrP-Anteils von ca. 10% auf ca. 50%. Die transgenen Tiere entwickelten klinische Zeichen von Prion Erkrankungen, wie Ataxie und Paresen. Auch histopathologisch konnten in den Gehirnen der Tiere Veränderungen nachgewiesen werden, welche denen bei Scrapie infizierten Tieren ähnlich waren (u.a. vakuoläre Degeneration und Astrozytose). In keinem der Tiere konnte jedoch Protease K resistentes Prionmaterial gefunden werden. Daraus ist geschlossen worden, dass es sich um eine Prionenerkrankung ohne PrP^{Sc} handelte. Diese Ergebnisse sind auch für andere Mutationen, welche die ^{CTM}PrP Form verstärken, bestätigt worden (*Hegde R. S. 1998a, Stewart R. S. 2005*).

Die Beobachtung, dass Prionenerkrankungen ohne oder mit nur sehr wenig PrP^{Sc} auftreten können, war bereits zuvor gemacht worden (*Hegde R. S. 1998a, Tateishi J. 1990*) und sprach gegen PrP^{Sc} als alleiniges pathogenes Agens. Dies wurde unterstützt durch die Tatsache, dass PrP^{Sc} nur bei vorhandenen PrP zur Erkrankung führte (*Brandner S. 1996*).

Das ^{CTM}PrP auch in der Pathogenese von Prionenerkrankungen beim Menschen von Bedeutung ist, ist von *Hedge et al (Hegde R. S. 1998a)* durch Untersuchungen von Gehirnproben von Gerstmann Sträussler Scheinker Syndrom (GSS) Patienten untermauert worden. Für einen Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und ^{CTM}PrP sprach die Ähnlichkeit der pathologischen Befunde, die assoziierte A117V Mutation, welche in der erwähnten hydrophoben Region gelegen ist (*Hegde R. S. 1998a, M astrianni 1997*), sowie die relativ geringe Menge an nachweisbaren Protease K resistenten PrP bei GSS (*Tateishi J. 1990*). Im zellfreien System führte die A117V Mutation zu einem Anstieg der ^{CTM}PrP Expression (*Hegde R. S. 1998a*). Auch ist durch einen milden Protease K Verdau (250 µg/mL, 0°C) demonstriert worden, dass Hirnproben von GSS Patienten ebenso wie von KH->II Mäusen unter

diesen Bedingungen partiell resistentes Prionmaterial, welches unter harschen Bedingungen (37°C) komplett verdaut wurde, enthielten. Das Fehlen von PrP^{Sc} wurde weiterhin gezeigt durch die Unfähigkeit des Gehirnhomogenats von terminal kranken KH->II Mäusen, Prionerkrankungen durch Inokulation zu verursachen (Hegde R. S. 1999). Dies sprach auch gegen eine Infektiosität des ^{CTM}PrP.

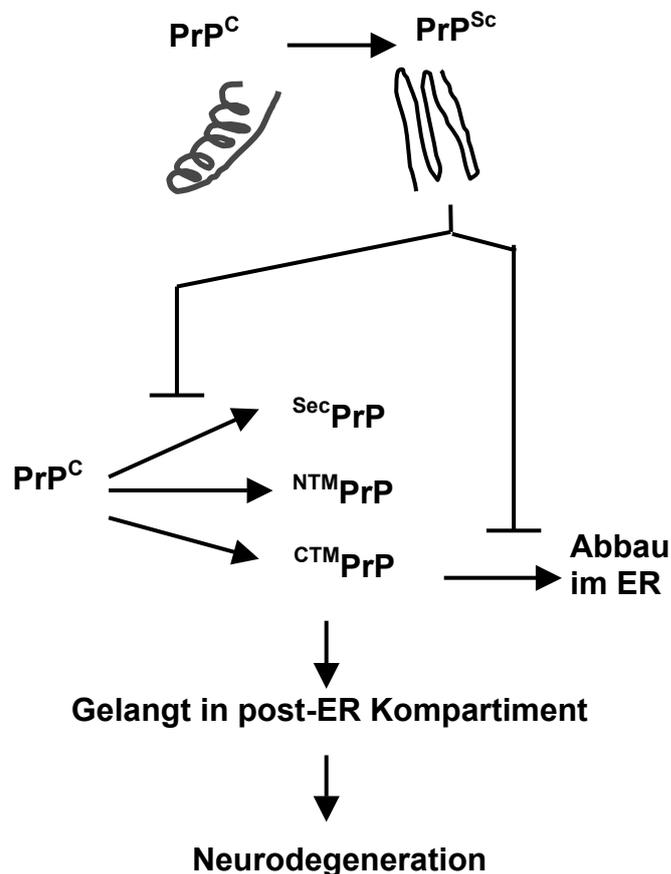


Abb. 1.4: Zusammenspiel zwischen ^{CTM}PrP und PrP^{Sc}; Erläuterung siehe Text; nach Hegde R. S. 1999

Die Bedeutung des ^{CTM}PrP in der Pathogenese übertragbarer Prionerkrankungen ist durch Infektionsversuche an transgenen Mäusen bestätigt worden (Hegde R. S. 1999). Hierbei sind Tiere mit unterschiedlichen Expressionsgraden von ^{CTM}PrP mit PrP^{Sc} infiziert worden und die Inkubationszeit ist bestimmt worden. Dabei zeigte sich, dass diese mit steigender ^{CTM}PrP Expression sank.

Schließlich wurde auch gezeigt, dass PrP^{Sc} die Menge an ^{CTM}PrP signifikant zu erhöhen vermag (Hegde R. S. 1999).

Aus diesen Ergebnissen haben Hedge et al (Hegde R. S. 1998a, Hegde R. S. 1999) ein Zusammenspiel von ^{CTM}PrP und PrP^{Sc} in der Pathogenese der prionassoziierten Neurodegeneration abgeleitet. Demnach beginnt die Prionerkrankung mit der Akkumulation des PrP^{Sc}, entweder infolge einer Inokulation oder einer spontanen

Konversion. Auf unbekanntem Weg führt PrP^{Sc} dann zu einer Steigerung des Levels an ^{CTM}PrP, entweder über Steigerung der Synthese oder über Hemmung des Abbaus. Unter physiologischen Bedingungen wird ^{CTM}PrP vermutlich zu einem großen Teil im Proteasom abgebaut (*Hegde R. S. 1998a, Stewart R.S. 2001*). Schließlich führt das hohe ^{CTM}PrP Level zur Neurogeneration, welche bei Individuen mit ohnehin durch Mutationen erhöhter ^{CTM}PrP Synthese schneller einsetzt. Als Ursache für diese Neurodegeneration ist eine Akkumulation des ^{CTM}PrP im endoplasmatischen Retikulum (*Stewart R.S. 2001*) oder im Golgi-Apparat (*Stewart R. S. 2005*) und dortige Induktion von zellulären Stressreaktionen mit nachfolgender Apoptose vorgeschlagen worden.

1.7 Antikörper

Bei der evolutionären Entwicklung komplexer, vielzelliger Lebensformen entwickelten sich neben den anderen Organsystemen auch Systeme zur Verteidigung gegen einfachere, parasitäre, den Organismus schädigende Mikroorganismen. Diese Immunität steht bei den Säugetieren auf den beiden Säulen des zellulären und des humoralen Immunsystems. Diese beiden Systeme sind eng miteinander verknüpft und ergänzen sich gegenseitig in ihrer Funktion. Das humorale System basiert unter anderem auf den von B-Lymphozyten gebildeten Antikörpern, welche Mikroorganismen erkennen, markieren oder durch Agglutination direkt unschädlich machen können. Das System der humoralen Immunantwort wird von jedem Lebewesen im Laufe der Entwicklung perfektioniert und verfügt über die Fähigkeit sich an neue Pathogene anzupassen (*Hof H. 2005, Zola H. 2000*).

Immunglobuline werden in unterschiedlichen Klassen gebildet. Das pentamere IgM stellt dabei die früheste Form dar, denn es wird in der initialen Immunreaktion gebildet. Durch den Isotypenswitch kommt es zur Bildung anderer Klassen. Die häufigste ist dabei das monomere IgG, welches den Vorteil besserer Gewebegängigkeit besitzt.

Alle Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, welche durch Schwefeldisulfidbrücken miteinander verbunden sind. Am carboxyterminalen Ende der schweren Ketten liegt das kristallisierbare Fragment (F_c-Fragment), welches speziesspezifisch und Isotypenspezifisch ist.

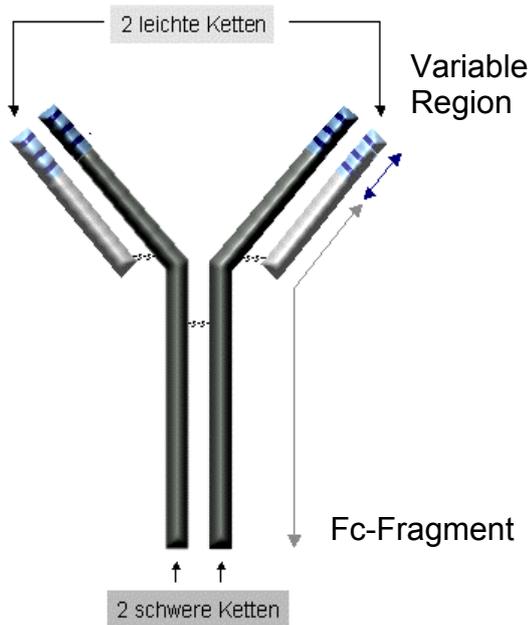


Abb. 1.5: Antikörper nach: www.hal-allergie.de/allergieinfos/anti.htm

Am aminoterminalen Ende der leichten und schweren Kette befindet sich die Variable Region, welche für die Spezifität des Antikörpers wichtig ist (Hof H. 2005). Die Spezifität eines Antikörpers kann dabei so genau sein, dass Modifikationen eines Zuckerrestes unterschieden werden können (Zola H. 2000).

Die enorme Vielfalt an potentiell generierbaren Antikörpern (geschätzt 10^{11}) suggerierte bereits früh umfangreiche Anwendungsmöglichkeiten für Antikörper in Wissenschaft, Forschung und Medizin (Zola H. 2000).

1.7.1 Monoklonale Antikörper

Ziel bei der Entwicklung monoklonaler Antikörper war es, durch Kultur einer Zellreihe gleichartige Antikörper, welche alle das gleiche Antigen erkennen, zu isolieren. Dies bot gegenüber polyklonalen Antikörpern den Vorteil größerer Spezifität, verbunden mit geringerer Signalintensität. Hierbei wurde ausgenutzt, dass eine B-Zelle immer nur einen Antikörper bestimmter Spezifität produzieren kann (Zola H. 2000).

Die Myelomamethode bestand darin Splenozyten von zuvor immunisierten Mäusen zu entnehmen und mit Myelomzellen zu fusionieren (Köhler G. 1975). Myelomzellen sind bösartige, antikörperproduzierende Zellen welche sich schnell vermehren und große Mengen Antikörper zu bilden vermögen. Die Fusion mit der selbst antikörperbildenden Mauszelle führte zu einer neuen Zelle, die einen Typ Antikörper produzierte (Zola H. 2000). Die Fusion gelang auch mit Myelomzellen, welche selbst keine Antikörper bildeten (Kearney J. F. 1979).

Die Immunisierung der Maus musste zuvor mit einer ausreichenden Menge Antigen erfolgt sein, wobei je nach Antigen unterschiedliche Mengen als ausreichend anzusehen waren. Antigene von mehr als 3 kDa konnten rein gegeben werden, kleinere Antigene mussten zuvor an ein immunogenes Peptid gebunden werden, um eine Immunreaktion zu provozieren. Zusätzlich wurde bei der Immunisierung ein unspezifisches Immunstimulans gegeben (Hunt B. 2000).

Durch zunehmende Verbesserung der hier nur grob angedeuteten Methode ist es möglich geworden eine Vielzahl unterschiedlicher Antikörper zu entwickeln. Modernere Ansätze zielen darauf ab, den zeitaufwendigen und nicht immer erfolgreichen Weg der Immunisierung und Fusion zu umgehen und mittels gentechnischer Verfahren Antikörper für ein bestimmtes Antigen zu kreieren (Zola H. 2000).

1.8 Proteinkonformationen und ihre Differenzierung

Unterschiedliche Konformere eines Proteins besitzen unterschiedliche Eigenschaften und können mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sein (Leliveld R. S. 2007). Dies wurde zuvor bereits für das PrP und seine sekretorische, transmembranäre und pathogene Form dargelegt, gilt jedoch auch für andere mit Neurodegeneration assoziierte Proteine, wie das A β bei der Alzheimerschen Erkrankung (Glennner G. 1984), das α -Synuclein beim Morbus Parkinson (Spillantini M. G. 1997) oder das mutierte Huntingtin beim Morbus Huntington (DiFiglia M. 1997). Alle diese Proteine tendieren dazu sich in ihrer krankheitsassoziierten Konformation als unlösliche Aggregate im Gehirn anzusammeln. Dabei ist die Fehlfaltung eines Proteins kein seltenes Ereignis, sie wird jedoch im gesunden Organismus durch verschiedene Mechanismen, wie das Proteasom, unschädlich gemacht (Bukau B. 2006). Auffällig war hierbei, dass die gebildeten Aggregate bei den sporadischen und den im Allgemeinen selteneren genetischen Formen gleich waren (Prusiner S. B. 2001b).

Im folgenden werden kurz einige Möglichkeiten der Differenzierung von Konformeren am Beispiel des PrP dargestellt.

Ein relativ einfacher Ansatz ist der Verdau des Proteins. Der heiße Protease K Verdau stellt dabei den klassische Weg PrP^{Sc}, welches partiell resistent ist, zu detektieren, dar (McKinley M. 1983). Mithilfe des diffizileren kalten Protease K Verdaus können feinere Konformationsunterschiede, wie das ^{CTM}PrP, detektiert werden (Hegde R. S. 1998a). Eine weitere Möglichkeit der ligandenunabhängigen Differenzierung ist die Ultrazentrifugation (Leliveld R. S. 2007).

Eine klassische Möglichkeit Amyloid darzustellen ist die Färbung mit Kongo Rot, welches an die β -Faltblattstruktur des aggregierten Proteins bindet und dieses spezifisch darstellt, jedoch keine Differenzierung des Amyloids erlaubt (Leliveld R. S. 2007).

Die genaueste und spezifischste Methode ein Konformer darzustellen ist die Markierung mit monoklonalen Antikörpern. Konformationsspezifische Antikörper erkennen dabei möglichst nur eine, im Idealfall die krankheitsassoziierte, Form. Dies gelingt entweder durch Bindung an ein durch die dreidimensionale Struktur entstehendes Epitop, welches aus nicht benachbarten Aminosäuren besteht, oder durch Bindung an lineare Aminosäuren, die in anderen Konformeren verdeckt werden (*Leliveld R. S. 2007*).

Die Schwierigkeit in der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen das PrP wurde auf die hohe Konservierung des Proteins zwischen den Spezies und die endogene Expression, welche eine natürliche Toleranz des Immunsystems gegen das Protein förderte, zurückgeführt (*Korth C. 1999*). Erste Immunisierungsversuche von Mäusen mit Hamster PrP^{Sc} führten zu Antikörpern gegen das Hamsterprotein, welche das Mausprotein jedoch nicht erkannten. Des Weiteren waren diese Antikörper nicht dazu in der Lage PrP^C und PrP^{Sc} zu differenzieren (*Kacsak R. J. 1987*).

Eine Möglichkeit die Toleranz zu umgehen war die Entwicklung von PrP^{0/0} knock-out Mäusen (*Büeler H. 1992*) und deren Immunisierung. Dies führte zur Entwicklung von Antikörpern gegen das von Mäusen gebildete PrP, aber zunächst nicht zu Antikörpern, welche die Konformationen des physiologischen und infektiösen Prions zu unterscheiden vermochten (*Williamson R. A. 1996*). 1997 gelang schließlich durch Immunisierung von PrP^{0/0} knock-out Mäusen mit rekombinanten Rinder PrP die Entwicklung eines Antikörpers, der ausschließlich das fehlgefaltete PrP^{Sc} von Rindern, Mäusen und Menschen erkannte, nicht jedoch die physiologische Form (*Korth C. 1997*). Ein weiterer konformationsspezifischer Antikörper war 3F4, dessen Epitop nur beim sekretorischem PrP gebunden werden konnte und beim PrP^{Sc} verborgen war (*Kanyo Z. 1999*).

Durch einfache Anwendung dieser Methoden oder durch Kombinationen, wie zum Beispiel Beobachtung des Bindungsverhaltens bei schrittweiser Denaturierung, war es möglich Prionstämme zu unterscheiden (*Leliveld R. S. 2007*).

1.9 Therapeutischer Einsatz von monoklonalen Antikörpern bei Prionerkrankungen

Die beschriebenen Prionerkrankungen sind nach wie vor nicht heilbar, auch wenn in den letzten Jahren zahlreiche, zum Teil vielversprechende, Ansätze untersucht wurden. Ein Ansatz zur Therapie war die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, welche in anderen Bereichen der Medizin, insbesondere bei der Therapie maligner Erkrankungen, bereits breite Anwendung finden. Peretz et al. (Peretz D. 2001) konnten zeigen, dass die Behandlung von kultivierten, prioninfizierten Mäuseneuroblastomzellen (ScN2a Zellen) mit bestimmten monoklonalen Antikörpern zu einer vollständigen Unterdrückung der PrP^{Sc} Replikation führte. Dabei stellten sie die Bedeutung der Bindungsstelle heraus und propagierten eine direkte sterische Behinderung der PrP-PrP^{Sc} Interaktion, ebenso wie die Bedeutung der Affinität des Antikörpers zum Protein. Enari et al. (Enari M. 2001) konnten mit einem weiteren, ebenfalls im Bereich der Helix 1 bindenden, Antikörper sowohl die Infektion von N2a Zellen durch PrP^{Sc} verhindern als auch ScN2a Zellen erfolgreich und für einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen nach Ende der Therapie behandeln.

White et al. (White A. B. 2003) versuchten mit PrP^{Sc} infizierte Mäuse zu therapieren. Dabei konnte die Überlebenszeit intraperitoneal infizierter Mäuse mit Beginn der Therapie 7 bzw. 30 Tage nach Infektion, also vor Beginn klinischer Symptome, um mehr als 300 Tage verlängert werden. Bei Therapiebeginn nach Einsetzen klinischer Symptome konnte die Überlebenszeit jedoch ebenso wenig verlängert werden wie bei intrazerebral infizierten Tieren. Dies wurde auf die unzureichende Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für die verwendeten Antikörper zurückgeführt.

Trotz dieser Schwierigkeit scheint der Einsatz von Antikörpern neben anderen Substanzen in der Therapie von Prionerkrankungen vielversprechend.

1.10 Zielstellung dieser Arbeit

Antikörper sind wichtige Hilfsmittel bei der Charakterisierung von Konformere. Von den unterschiedlichen bisher entdeckten Antikörpern gegen PrP zeigen jedoch nur wenige konformationsspezifisches Bindungsverhalten.

Ziel dieser Arbeit war daher die Immunisierung von PrP^{0/0} knock-out Mäusen und die Isolierung von Antikörper gegen unterschiedliche Konforme des PrPs.

1. Dabei sollte insbesondere nach Antikörpern gegen das transmembranäre PrP gesucht werden.
2. Die gefundenen Antikörper sollten in Bezug auf Glykoformspezifität und ihre Eignung zur Charakterisierung von Prionstämmen untersucht werden.
3. Die Eignung einzelner Antikörper zur in-vitro Therapie von ScN2a Zellen sollte betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden werden allgemeine Verbrauchsmaterialien und Pufferzusammensetzungen aufgelistet. Spezielle Materialien werden vor den jeweiligen Versuchen erwähnt.

Zellkultur:

Cryotube	NUNC	368632
DMSO (dimethylsulfoxid)	Sigma	D5879
D-MEM High Glucose 4,5g/l	PAA	E15-009
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA	A15-649
Hypoxanthine /Thymidine (HT)	Gibco	41065-012
L-Glutamin	Gibco	25030024
MEM	Gibco	21090
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010
Tissue culture Plate, 6 Well	NUNC	140675
Tissue culture Plate, 6 cm	Corning	430589
Tissue culture Plate, 10 cm	NUNC	172958
Tissue culture Plate, 12 Well	NUNC	150628
Tissue culture Plate, 24 Well	NUNC	142475
Tissue culture Plate, 96 Well	Greiner Biotech	655180
Tissue culture plate, 96 Well (Nuncion black microwell SI)	NUNC	137101
T-75 Flacs	Greiner Bio-One	658175

Geräte/sonstiges Material:

1-200 µL graduated filter tips	Star Lab	S1120-8810
1-20 µL	Star Lab	
S1120-1810		
100-1000 µL	Star Lab	S1111-2820
0,1-10 µL	Star Lab	S1121-3810
Acura 853 Multipipette	Scororex	
Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Aufreinigungsröhrchen (Amicron Ultra)	Millipore	UFC801024

Beckman coulter Allegra 6KR Centrifuge		
Beckman coulter Optima™Max Ultracentrifuge 130.00rpm		
MLS 50 Rotor		
Cellstar PP-Test tubes 15 mL	Greiner Bio-one	188271
Cellstar PP-Test tubes 50 mL	Greiner Bio-one	227261
Costar Stripette, non pyrogenic, 2 mL	Greiner Bio-one	710180
Costar Stripette, non pyrogenic, 5 mL	Corning	4487
Costar Stripette, non pyrogenic, 10 mL	Corning	4488
Costar Stripette, non pyrogenic, 25 mL	Corning	4489
ELISA Platte	NUNC	439454
Eppendorf research Pipetten 2-20 µL		
Eppendorf research Pipetten 20-200 µL		
Eppendorf research Pipetten 100-1000 µL		
Eppendorf safe-lock tubes 1,5 mL		
Eppendorf safe-lock tubes 2 mL		
Eppendorf Mini Spin		
20% Gel	BioRad	345-0033
Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R		
Hettich Zentrifuge Rotofix 32		
Hirschmann Laborgeräte Pipetus only		
Homogenisator		
IsoStrip	Roche	1493027
Millipore MilliQ plus		
NanoDrop, PreqLab, ND1000 Spectrometer		
Neubauer Zählkammer		
Nitrozellulose Membran 0,45	Protran	10401196
Petrischale 60 mL	Greiner Bio-one	628160
pH Elektrode SenTix 21		
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
Sartorius ML210P (Waage)		
Säulensystem zur Antikörperaufreinigung BioRad		
Snake skin	Pierce	69035
Spritze 5 mL		
Spritzenaufsatz (Sterilfilter)	Sartorius	SM17597

Sterilfilter (Stericup)	Milipore	15477723
Tecan-Safir Spectrometer		
WTW digital pH Meter		

Puffer:

Gel, 12%

Untere Phase

3,3 mL Wasser dest.		
4,0 mL 30% Acrylamid	Roth	3029.1
2,5 mL 1,5 m Tris pH 8,8	Merck,	1.08382.2500
0,2 mL 10% SDS	Fluka	71729
0,2 mL 10% APS	Roth	9592.5
0,0008 mL Temed	Roth	2367.1

Obere Phase

1,35 mL Wasser dest.		
0,33 mL 30% Acrylamid	Roth	3029.1
0,25 mL 1,5 m Tris pH 6,8	Merck,	1.08382.2500
0,04 mL 10% SDS	Fluka	71729
0,04 mL 10% APS	Roth	9592.5
0,0004 mL Temed	Roth	2367.1

HT-Medium

MEM	Gibco	21090
10%FCS	PAA	A15-649
1x HT 50x	Gibco	41065-012
1x L-Glutamin 100x	Gibco	25030024
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010

MEM-Medium

MEM	Gibco	21090
10%FCS	PAA	A15-649
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010
1x L-Glutamin 100x	Gibco	25030024

GKN-Lösung:

GKN Medium (10x) + DMEM high Glucose (PAA E15-009)

2 Material und Methoden

24g NaCl	Merck	K34243404 504
1,2g KCl	Roth	6781.3
4,26g Na ₂ HPO ₄		
1,8g NaH ₂ PO ₄	Sigma	S0751
6g Glucose	Sigma	G7528
0,03g Phenol-red	Sigma	5530
Loading buffer		
10 mM Tris pH 6,8	Merck	1.08382.2500
4% SDS	Fluka	71729
10%Glycerin	Sigma	G8898
4% β -Mercaptoethanol	Sigma	M3148
Lysis Puffer		
50 mM Tris	Merck	1.08382.2500
140 mM NaCl	Merck	K34243404 504
0,5%TX100	Merck	1.08603.1000
0,5% DOC	Sigma	D-2510
Natriumhydrogencarbonatpuffer		
Natriumcarbonat	Sigma	S7795
Natriumhydrogencarbonat	Merck	K107290529
PBS		
137mM NaCl	Merck	K34243404 504
2,7mM KCl	Roth	6781.3
2 mM KH ₂ PO ₄	Sigma	P0662
10 mM Na ₂ HPO ₄	Sigma	S0751
PBS-T		
137mM NaCl	Merck	K34243404 504
2,7mM KCl	Roth	6781.3
2 mM KH ₂ PO ₄	Sigma	P0662
10 mM Na ₂ HPO ₄	Sigma	S0751
0,05% Tween	Serva	37470
Running buffer		
25 mM Tris	Merck	1.08382.2500
250 mM Glycin	Roth	3908.2
0,1% SDS	Fluka	71729

2 Material und Methoden

Striping buffer

100 mM Glycin pH 2,5-3	Roth	3908.2
250 mM NaCL	Merck	K34243404504
0,5% β -Mercaptoethanol	Sigma	M3148

TBS

25 mM Trisbase pH 7,5	Merck	1.08382.2500
2,7mM KCl	Roth	6781.3
137mM NaCl	Merck	K34243404 504

Transfer Buffer

48mM Tris	Merck	1.08382.2500
39mM Glycin	Roth	3908.2
20% Methanol	Merck	1.06009.2500

VRL-Puffer

50 mM Hepes pH 7,5	Sigma	H3375
250 mM Sucrose	Sigma	S0389
5 mM MgCl ₂	Normapur	25108295
100 mM KAC (KCH ₃ COO)	JT Baken	204-

822-2

2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden

Material:

Allgemeine Zellkulturmaterialien (s.o.)

Zellkulturmedien (s.o.)

a. Myeloma (P3U) und Hybridoma Zellen

Myelomzellen sind bösartige, zur unbegrenzten Vermehrung befähigte Zellen. Hybridomzellen entstehen durch die Fusion von Myelomzellen mit Splenozyten von z.B. Mäusen.

Die Zellen wurden bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre in HT Medium kultiviert. Hypoxanthin und Thymidin (HT) ermöglichten die Nutzung des salvage pathways über die Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRase) und Thymidinkinase (TK), was eine Vergiftung der Zellen mit Aminopterin, welches bei der Gewinnung der Hybridomzellen zur Selektionierung erfolgreich fusionierter Zellen verwendet wurde, verhinderte. Nach einigen Passagen hätte das HT weggelassen werden können, da kein frisches Aminopterin mehr zugesetzt wurde. Hybridomzellen sollten nicht zu sehr vereinzelt werden, da dies einen Wachstumsstopp hätte verursachen können (Dies lies sich durch Zugabe von Hybridoma cloning Faktor vermeiden).

Splitten, Gewinnung von Überständen und Einfrieren:

1. Die Zellen wurden von der Kulturflasche mit einer 10 mL Pipette durch Spülen der Flasche mit dem Medium abgelöst.
2. Die Suspension wurde in ein 50 mL Falcon Tube überführt.
3. Es wurde 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert.
4. Die Zellkulturflasche wurde wieder mit Medium aufgefüllt (die verbliebenden Zellen reichten in der Regel für die weitere Kultivierung aus).
5. Der Überstand wurde in ein weiteres Falcon Tube überführt, ggf. wurde er zum Schutz vor mikrobieller Kontamination mit 10 mM Natriumacid versetzt und bei 4°C gelagert.
6. In ein Cryotube wurde 100 µL DMSO (dimethylsulfoxid) gegeben.
7. Das Pellet (Zellen) des zentrifugierten Falcons wurde in einen Milliliter FCS resuspendiert, in das Cryotube gegeben und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Nach ein bis zwei Tagen konnten diese in flüssigen Stickstoff überführt werden.

b. N2a und ScN2a-Zellen

N2a Zellen sind Neuroblastomzellen aus Mäusen, ScN2a Zellen sind dauerhaft mit PrP^{Sc} infizierte N2a Zellen.

Diese Zellen wurden bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre in MEM-Medium kultiviert. Da die Zellen adhärent wuchsen, unterschied sich das Splitten etwas von dem der Hybridomzellen. Das Einfrieren der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Splitten:

1. Der Überstand wurde abgesaugt.
2. Es wurde vorsichtig mit PBS gespült, und erneut abgesaugt.
3. Trypsin wurde zugegeben (1 mL bei 10 cm Platte, 400 µL bei 6 cm Platte) und es wurde für eine Minute bei 37°C inkubiert. Hierdurch wurden die adhärennten Zellen von der Kulturplatte gelöst.
4. Nach Neutralisieren des Trypsins durch Zugabe von Medium (10 mL bei 10 cm Platte, 4 mL bei 6 cm Platte) wurden die Zellen von der Platte abgespült.
5. Einige Tropfen der Suspension wurden in eine neue Zellkulturplatte überführt und mit ausreichend Medium (10 mL bei 10 cm Platte, 4 mL bei 6 cm Platte) versorgt. Die restliche Suspension wurde verworfen.

2.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) – Herstellen von Proteinbeladenen Maxisorp Platten

Material:

Bovines Serumalbumin	Sigma	A7906
Destilliertes Wasser		
Maxisorp Immuno Plates	NUNC	083837
Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,3		
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine sodium salt)	Sigma	L5777

Beim ELISA handelte es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem eine enzymatische Farbreaktion gemessen wurde. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten biologische Substanzen, wie z.B. Proteine, Hormone oder Toxine nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Substanz mithilfe eines spezifischen Antikörpers gebunden, der zuvor entweder selbst mit einem Enzym markiert worden war oder wiederum mit einem markierten Antikörper gebunden wurde.

In dieser Arbeit ging es weniger um die Detektion eines Proteins, sondern viel mehr um das Auffinden des Antikörpers gegen das Protein.

Beladen von Maxisorp Immuno Plates mit rekombinanten PrP (PrP) bzw. Bovines Serumalbumin:

Für die BSA-Platte:

1. Pro Well wurden je 200 μ L 5% BSA (in H_2O) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.
2. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit H_2O gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Für die PrP-Platte:

3. Das rekombinante PrP wurde in einer Konzentration von 0,1mg/L in Natriumhydrogencarbonatpuffer pH8,3 gelöst.
4. 0,2% Sarkosyl wurde zugegeben, um die Löslichkeit des Proteins zu verbessern.
5. Es wurden 50 μ L pro well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.
6. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit H_2O gewaschen und anschließend über Nacht, nach Zugabe von 200 μ L 5% BSA (in H_2O) pro Well, inkubiert.

7. Die Platten wurden erneut gewaschen und dann ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Die auf diese Weise hergestellten Platten wurden zum späteren Screening verwendet.

Vorteil dieser Methode war, dass die aufgetragenen Proteine nicht denaturiert wurden, sondern, im Gegensatz zu Western Blot Verfahren, in ihrer natürlichen Faltung vorlagen.

Die genaue Methode des ELISAs wird im Kapitel „Identifizierung prionspezifischer Antikörper“ beschrieben.

2.4 Enzyme linked immunofilter assay (ELIFA)

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Nitrozellulose Membran	Protran	10401196
PBS-T		
POD markierten goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
VRL-Puffer		

Im Gegensatz zum ELISA wurde beim ELIFA das Antigen (Protein) nicht auf einer absorbierenden Platte aufgetragen, sondern mittels Unterdruck in eine Nitrozellulosemembran eingesogen. Dadurch kam es zu hohen Proteinkonzentrationen auf engstem Raum, was den Test sehr empfindlich für geringe Mengen Antikörper oder schwach bindende Antikörper machte.

1. Eine Membran aus Nitrozellulose wurde in das ELIFA Titer System eingelegt.
2. Die Membran wurde mit 100 μ L VRL-Puffer pro Well angefeuchtet, anschließend wurde der Puffer angesaugt, um auf das Beladen mit Substrat vorzubereiten.
3. Das gelöste Substrat (z.B. in VRL Puffer) wurde angesaugt. Da das Substrat größer war als die Porengröße der Membran, blieb es in dieser hängen, wohingegen das Lösungsmittel die Membran ungehindert passieren konnte.
4. Die Membran wurde mit je 100 μ L VRL-Puffer pro well nachspült und aus dem Titer System entfernt.
5. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 50 mL 5% Milchpulver in PBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt.
6. Die Membran wurde an ihrer ursprünglichen Position in das Titer System eingelegt.
7. Nach Zugabe der Antikörper in die Wells (meist als Zellkulturüberstand), wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert (die Wells wurden mit luftdichter Klebefolie verschlossen, um Kontaminationen und Verdunstung zu vermeiden).

8. Die Überstände wurden abgeschlagen und mehrfach mit PBS-T gespült.
9. Die Membran wurde aus dem Titer System gelöst und im Milchpulver für ca. eine Minute gewaschen.
10. Die Membran wurde für 10 Minuten in PBS-T gewaschen (PBS-T mehrmals gewechselt).
11. Die Membran wurde für 45 Minuten mit POD markierten goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20000 in PBS-T bei Raumtemperatur unter ständigen Schütteln inkubiert.
12. Die Membran wurde für 20 Minuten in PBS-T gewaschen (PBS-T mehrmals gewechselt).
13. Die Membran wurde mit 2 mL ECL (1 mL Reagent 1 + 1 mL Reagent 2) benetzt und anschließend in Klarsichtfolie eingeschweißt.
14. Der ELIFA wurde mit Amersham Hyperfilm entwickelt (Belichtungsdauer je nach Bedarf).

2.5 Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese und Western Blot

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Elektrophorese Modul		
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
Filterpapier (Blotting Paper)	Whatman	10426896
Loading Buffer		
Methanol	Merck	1.06009.2500
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Panceau	Sigma	P3504
PBS-T		
POD goat anti-mouse IgG	Pierce	31444
Polyacrylamidgel		
PVDF Membran	Millipore	IPVH00010
Running Buffer		
Transfer Buffer		

Beim Western Blot Verfahren wurden Proteine spezifisch nachgewiesen. Hierfür musste das Proteingemisch zunächst elektrophoretisch nach Molekülgröße aufgetrennt werden. Dies geschah in Polyacrylamidgelen.

1. Das Substrat wurde mit Loading Buffer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.
2. Nach Abkühlen wurde das Substrat in die Geltaschen geladen und im Elektrophorese Modul bei 100V aufgetrennt.
3. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (PVDF) übertragen, in der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert wurden.
4. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert.
5. Der Aufbau erfolgte nach dem Sandwichprinzip, mit einem Filterpapier an der Kathode, gefolgt vom Polyacrylamidgel, der Nitrozellulose Membran und einen weiteren Filterpapier.
6. Das Sandwich wurde über Nacht bei 130 mA in einer Blot Transfer Apparatur in Transfer Buffer geblottet.

7. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran mit 5% Milchpulver in PBS-T durch einstündige Inkubation geblockt. Dies diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.
8. Einzelne Blots wurden vor dem Blocken mit Panceau angefärbt, um die Lage der Proteinbanden zu erkennen und ein Schneiden der Blots zur getrennten Antikörpermarkierung zu ermöglichen.
9. Im Anschluss wurde die Membran kurz in PBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem jeweiligen primären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert.
10. Nach 10 minütigen Waschen, wobei das PBS-T mehrfach gewechselt wurde, erfolgte die Markierung der gebundenen Primärantikörper mittels Meerrettichperoxidase markierten Sekundärantikörper (45 Minuten bei Raumtemperatur, 1:25000).
11. Die Membran wurde für eine Stunde in PBS-T gewaschen.
12. Nun wurde die Membran mit Enhanced chemical luminescence detection reagent (ECL) benetzt. Hierbei wurden 2 mL ECL bestehend aus je 1 mL Reagenz 1 und 2 pro Membran verwendet. Dieses diente als Substrat für die Meerrettichperoxidase und ermöglichte die Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid. Durch die Oxidation des Luminols kam es zu einer Lichtemission, die dann mit Hyperfilm aufgezeichnet werden konnte.

Strippen von Western Blots:

Mit diesem Verfahren konnten Primär- und Sekundärantikörper von der PVDF-Membran gelöst werden, um diese dann erneut mit einem anderen Antikörper markieren zu können.

1. Der Blot wurde einmal in destilliertem Wasser gewaschen.
2. Der Blot wurde für 30 Minuten in 50 mL Stripping Buffer gegeben. Durch den sauren pH und das β -Mercaptoethanol wurden die Bindungen gelöst und die Antikörper denaturiert.
3. Der Blot wurde 10 Minuten in PBS-T gewaschen.
4. Der Blot musste für eine Stunde in 5% Milchpulver nachgeblockt werden.
5. Um Sicherzustellen, dass das Strippen erfolgreich war, wurde der Blot für eine Stunde mit POD markierten Antikörper (1:20000) inkubiert, gewaschen und entwickelt.
6. Der antikörperfreie Blot konnte nun erneut mit einem Antikörper markiert werden.

2.6 Fusion

Material:

Aminopterin 50x	Sigma	A5159
Ammoniumchlorid	Sigma	10171
GKN Lösung		
Hybridoma Cloning Factor (HCF)	BioVeris	210001
Hypoxanthine /Thymidine (HT)	Gibco	41065-012
MPL+TDM adjuvant (US.Pat 4436727)	Sigma	M6536
Polyethylenglykol	Merck	1.09727.0100
Steriles (autoklaviertes) Besteck (2 Pinzetten, 2 Scheren, 1 Metallsieb)		

Für die Fusion wurden zwei PrP-knock-out Mäuse immunisiert, das heißt diese Mäuse bildeten keine Form des PrPs und besaßen auch keine immunologische Toleranz. Die eine Maus wurde mit rekombinanten PrP immunisiert, die andere mit dem Homogenat des Gehirns einer ^{CTM}PrP überexprimierenden Maus. Um eine Reaktion des Immunsystems zu provozieren wurde zusätzlich MPL+TDM adjuvant zugegeben. Dieses starke Immunstimulans bestand aus monophosphorilierten Lipid A (MPL) aus *S. minnesota* und Trehalose Dicorynomycolate (TDM), welches analog zum cord factor des Tuberkelbazillus ist (*Produktinformation des Herstellers*).

Die erste Immunisierung erfolgte sechs Wochen vor der Fusion, die zweite drei Wochen und die dritte eine Woche vorher. Drei und zwei Tage vor der Fusion wurden die Tiere noch einmal immunisiert, um eine maximale Aktivität der antikörperbildenden Zellen zu provozieren.

1. Eine 60 mm Zellkulturschale wurde mit 5 mL GKN Lösung gefüllt.
2. Nach dem Töten der Maus wurde diese mit Alkohol eingesprüht, um maximale Sterilität zu erreichen.
3. Die Milz wurde mit sterilem Besteck entnommen und in die Zellkulturschale überführt.
4. Das Herz des Tieres wurde zum Gewinnen des peripheren Blutes punktiert.
5. Die Milz wurde in der Zellkulturschale auf einem sterilen Metallsieb mithilfe eines 5 mL Spritzenkolbens zerrieben.
6. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen in zwei 15 mL Falcons überführt.
7. Anschließend wurde das Sieb mehrmals mit 5 mL GKN Lösung gespült. Auch diese 5 mL wurden zu gleichen Teilen in die beiden Falcons überführt. Das

Bindegewebe der Milz wurde dabei möglichst in der Zellkulturschale zurückgelassen.

8. Die beiden 15 mL Tubes wurden bei 1500 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 5 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
9. Die Tubes wurden auf Eis gegeben und der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt.
10. Durch Zugabe von jeweils 5 mL eiskalten 0,75% Ammoniumchlorid wurden die Erythrozyten lysiert.
11. Die Lösung wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und während dieser Zeit dreimal geschüttelt.
12. Die beiden Zellsuspensionen wurden in ein 50 mL Falcon zusammengeführt und mit GKN Lösung auf 50 mL aufgefüllt.
13. Parallel dazu wurden P3U Zellen, welche zwei Tage zuvor ausgesät worden waren, aus einer T75 Flask in ein 50 mL Tube überführt und ebenfalls mit GKN auf 50 mL aufgefüllt.
14. Die beiden 50 mL Tubes wurden bei 1500 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 5 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
15. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt, die Tubes mit GKN auf 50 mL aufgefüllt und kurz geschüttelt.
16. Die beiden 50 mL Tubes wurden bei 1500 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 5 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
17. Die Überstände wurden abgesaugt und je 10 mL GKN wurden zugegeben.
18. Die Zellzahlen in den beiden Tubes wurden mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Von den vier Quadraten der Zählkammer wurden Durchschnittswerte gebildet und anhand der folgenden Formel wurde das Mischungsverhältnis der beiden Zellsuspensionen bestimmt.

$$\frac{x \text{ Splenozyten} * 10000 * 10 \text{ ml}}{3 * (x \text{ Myeloma} * 10000)} = x \text{ ml P3U Suspension auf 10 ml Splenozyten Suspension}$$

Bei durchschnittlich 16 Splenozyten und 58 P3U Zellen ergab sich also ca.1 mL P3U Zellen auf 10 mL Splenozyten.

19. Die Mischung wurde auf 50 mL GKN Lösung aufgefüllt und bei 1500 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 5 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
20. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt.
21. Das Falcon wurde in ein 37°C Wasserbad gestellt und es wurden 500 µL 50% Polyethylenglykol-GKN zugegeben. Dies destabilisierte die Membranen der Zellen und regte diese Fusion an.
22. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und bei 700 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 4 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
23. Das Falcon Tube mit den Zellen wurde in das Wasserbad überführt und die Zellen wurden in 10 mL GKN Lösung resuspendiert.
24. Weitere 10 mL GKN Lösung wurden zugegeben und gemischt.
25. Weitere 10 mL GKN Lösung wurden zugegeben und gemischt.
26. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C wurde das Tubes bei 1500 rpm, Raumtemperatur, Bremse 0, Beschleunigung 2 für 5 Minuten in der Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R zentrifugiert.
27. Die Zellen wurden in 50 mL MEM Medium ohne HAT oder HT über Nacht regeneriert.
28. Die Zellen wurden sorgfältig vom Flaschenboden abgespült und in ein 50 mL Falcon überführt.
29. Nachdem diese 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert worden waren, wurden die Zellen in 200 mL Selektionsmedium mit HAT und 10% Hybridoma Cloning Factor resuspendiert.

Aminopterin (A) blockierte die DNA Synthese durch Inhibition der Dihydrofolatreduktase. Zellen, die den Salvage Pathway zur Nukleinsäuresynthese nicht nutzen konnten, starben. Zellen, die über Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRTase) und Thymidinkinase (TK) verfügten, konnten den salvage pathway nutzen, falls sie mit Hypoxanthin und Thymidin (HT) versorgt wurden (*Produktinformation des Herstellers*).

30. Die Zellen wurden auf 20 96 Well Zellkulturplatten Platten mit 100 µL pro Well verteilt.

31. Die Wells wurden nach fünf Tagen mit weiteren 150 µL HAT haltigen Medium aufgefüllt.

Fusion 2

Material:

Siehe oben +

HSA

Bayer

685-20

HSA-peptid (19C3.C7 Antigen)

Bei dieser Fusion wurde eine Maus mit dem Antigen des 19C3.C7 Klons immunisiert, um verbesserte Antikörper gegen dieses Epitop zu erhalten. Dieses Antigen war an Humanes Serumalbumin (HSA) gebunden worden, um eine ausreichende Immunstimulation zu ermöglichen. Zusätzlich wurde der Maus MPL+TDM Adjuvant injiziert, um die Immunreaktion zu maximieren. Die Immunisierungen erfolgten wie im folgendem Schema dargestellt:

13.12.06	100 µg s.c.
03.01.07	100 µg s.c.
18.01.07	100 µg s.c.
31.01.07	100 µg s.c.
06.02.07	100 µg intraperitoneal
07.02.07	100 µg intraperitoneal

Die Fusion wurde am 8.2.07 durchgeführt. Das Protokoll entsprach dem oben bereits dargestellten Ablauf. Es wurden 22 Myelomas zu 15 Splenozyten ausgezählt und 1 mL Myelomas zu den Splenozyten gegeben.

2.7 Identifizierung Prion spezifischer monoklonaler Antikörper (Screening)

Nach der Fusion wurden die Zellen so sehr verdünnt, dass in jedem Well maximal eine Zelle zu finden war. Diesen monoklonalen Zellen wurde Zeit gegeben sich zu teilen und Antikörper zu produzieren. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit 150 µL HT-Medium pro Well gegossen. Nach acht Tagen waren in den ersten Wells deutliche, makroskopisch erkennbare Kolonien zu finden. In diesen Wells kam es, als Hinweis auf die Stoffwechselaktivität der Zellen, zu einer gelblichen Verfärbung des Mediums. Damit begann der Prozess der Identifikation Prion spezifischer Antikörper, der sich aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Klone über zehn Tage hinzog.

Um geeignete Klone zu identifizieren wurden drei Methoden angewandt. Die Überstände wurden mittels ELISA auf Affinität zu rekombinanten PrP untersucht und zugleich auf fehlende Affinität zu Bovinen Serumalbumin. Die Überstände der Klone, die aus der Fusion der mit Hirnhomogenat immunisierten Maus hervorgegangen waren, wurden mittels ELIFA auf Affinität zu ^{CTM}PrP-haltigen Gehirnhomogenat untersucht. Die Klone der mit rekombinanten PrP immunisierten Maus wurden mittels Fluoreszenzmarkierung auf Affinität zu ScN2a Zellen untersucht, um Antikörper gegen die infektiöse Scrapie Form des PrPs zu identifizieren. Die bei den beiden letztgenannten Experimenten gefundenen Antikörper wurden später auch mit dem jeweils anderen Verfahren untersucht.

Überführung von Überständen in BSA Platten

In einem ersten Schritt wurden für alle Verfahren die Überstände aus den Zellkulturplatten in mit BSA markierte bzw. geblockte ELISA Platten überführt (Herstellung dieser Platten: siehe oben).

1. Interessante Klone wurden anhand der Kriterien Größe der Kolonie und Verfärbung des Mediums ausgewählt. Ziel war es, Klone erst möglichst spät zu untersuchen, um eine ausreichende Antikörperproduktion zu gewährleisten. Andererseits sollte natürlich auch kein Klon durch zu langen Nährstoffmangel gefährdet werden.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Substrate B enthielt 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB) (www.bdeurope.com/temp/usextfile48086.pdf). In der folgenden Reaktion wurde TMB unter Katalyse durch die Meerrettichperoxidase oxidiert und es kam zu einer bläulichen Verfärbung der Lösung.

9. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25% Schwefelsäure gestoppt. Dieses bewirkte einen Umschlag der Farbe von blau zu gelb.
10. Die Farbintensität und folglich die Reaktion wurde mittels photometrischer Messung (Tecan Safire) durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm bestimmt.

Messeinstellungen:

Measurement mode:	Absorbance
Measurement wavelength:	455 Nm
Reference wavelength:	0 Nm
Number of flashes:	10
Plate definition file:	GRE96fb.pdf

2.7.2 Screening mittels ELIFA

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Nitrozellulose Membran	Protran	10401196
PBS-T		
POD markierten goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
VRL-Puffer		

Dieses Verfahren sollte zur Identifikation von Antikörpern mit hoher Affinität zur CTM Form der PrPs angewendet werden. Initial wurde es ausschließlich für Überstände verwendet, die aus der Fusion der mit Gehirnhomogenat immunisierten Maus entstanden waren. Später wurden jedoch auch interessante Klone der anderen Fusion untersucht. Das allgemeine Prinzip des ELIFAs wurde bereits erläutert, daher im Folgenden nur die Besonderheiten dieser Untersuchung.

1. Die Membran wurde zu einer Hälfte mit Gehirnhomogenat normaler Mäuse beladen. Das bedeutet, es hat sich um Mäuse gehandelt, welche die Konformere des PrPs in natürlich Verhältnissen bildeten.
2. Die andere Hälfte der Membran wurde mit Gehirnhomogenat von Tet-Off Mäusen, welche ^{CTM}PrP überexprimierten, beladen.
3. Die Membran wurde mit 5% Milchpulver für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt.
4. 50 µL antikörperhaltiger Überstand wurden pro Homogenat zugegeben.
5. Es wurde mit POD markierten Antikörper markiert und mit ECL entwickelt.
6. Die Intensität der Reaktion der einzelnen Antikörper auf den beiden Homogenaten wurde verglichen, um Antikörper aufzuspüren, die eine höhere Affinität zum Gehirn der Tet-Off Maus aufwiesen.

Die restlichen 80 µL Zellkulturüberstand wurden im ELISA gegen rekombinantes PrP und Bovines Serumalbumin getestet (Protokoll siehe oben).

2.7.3 Screening mittels Fluoreszenz

In diesem Teil des Screenings ging es um die Identifikation von Antikörpern mit Affinität zur Scrapie Form des PrPs. Dazu wurden in der Zellkultur N2a-Zellen und ScN2a Zellen herangezüchtet und mit den Antikörpern der Klone markiert. Diese wurden dann mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert und schließlich wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Arbeiten mit ScN2a Zellen und anderen PrP^{Sc} haltigen Materialien (z.B. Homogenate) wurden ausschließlich in den dafür zugelassenen Räumen unter S2** Bedingungen durchgeführt.

Da eine rein visuelle Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung bei der großen Anzahl von Klonen extrem zeitaufwendig und aufgrund der beschränkten Haltbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen bei Lichteinfall auch sehr unzuverlässig gewesen wäre, musste zunächst eine zuverlässige, schnelle Detektionsmethode entwickelt werden.

Markierung mit FITC/ELISA

Material:

BD Bioscience Substrate A and B	Bioscience 550534 bzw. 550536
1% Bovines Serum Albumin	Sigma A7906
FITC markierter anti Mouse IgG Antikörper	Pierce 31569
5% Milchpulver	Oxoid LP0031

N2a und ScN2a Zellen

4% Paraformaldehyd	Fluka	76240
POD markierter anti Mouse IgG Antikörper	Pierce	31444
PBS, steril	Gibco	14190

1. ScN2a und N2a Zellen wurden in 96well Zellkulturplatten ausgesät.
2. Am übernächsten Tag erschienen die Zellen im Lichtmikroskop konfluent und wurden, nach Auswaschen des Mediums mit PBS, mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dabei wurden pro Well 50 μ L PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur verwendet.
3. Die Hälfte einer jeden Zellreihe wurde nach zweimaligen Waschen für eine halbe Stunde mit Proteinase K verdaut, um Prion freie Zellen zu erhalten.
4. Da bei diesen Versuchen Scrapie haltige Zellen verwendet wurden, wurden alle Schritte unter der Zellkulturbank im S2-Labor durchgeführt. „Waschen“ bedeutet daher, dass die Zellkulturplatten auf saugfähigem Flies ausgeschlagen wurden und durch Zupipetieren von PBS gespült wurden. Durch vorsichtiges Zupipettieren sollte ein Wegspülen der Zellen verhindert werden.
5. Es wurde zwei mal mit 100 μ L PBS pro Well gewaschen.
6. Die Wells wurden mit einer Lösung aus 5% Milchpulver und 1% Bovines Serum Albumin für 30 Minuten inkubiert (200 μ L pro Well).
7. Es wurde zwei mal mit 100 μ L PBS pro Well gewaschen.
8. 50 μ L W226 Antikörper wurden pro Well in einer Verdünnung von 1:20.000 zugegeben und für eine Stunde inkubiert.
9. Es wurde zwei mal mit 100 μ L PBS pro Well gewaschen.
10. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der N2a und ScNa2 Zellen mit je 50 μ L FITC markierten anti Mouse IgG Antikörper für 30 Minuten, 1:50 verdünnt, inkubiert. Bei FITC handelte es sich um Fluorescein-5-isothiocyanat, einem grünen Fluoreszenzfarbstoff, der nach Excitation bei 485nm eine Emission bei 520 nm zeigte.
11. Um ein vorzeitiges Ausbleichen des fotoinstabilen Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden, wurden die Platten nach Bearbeitung lichtdicht abgedeckt.
12. Die andere Hälfte wurde mit 50 μ L pro Well POD markierten anti Mouse IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 markiert.

13. Es wurde zwei mal mit 100 µL PBS pro Well gewaschen.
14. Die mit POD Antikörper markierten Zellen wurden mit ELISA Substrate A und B in gleichen Mengen behandelt. Die Wells haben sich gleichermaßen gelb gefärbt, es war keinerlei Differenzierung zwischen Proteinase K verdauten und nicht verdauten Zellen möglich.
15. Die mit FITC angefärbten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die mit FITC markierten Zellen haben sich im Fluoreszenzmikroskop kaum angefärbt präsentiert und die automatische Fluoreszenzmessung mittels Tecan Safire hat auch keine nützlichen Ergebnisse ergeben.

Markierung mit DAB

Material:

Siehe vorigen Versuch und

DAB Lösung nach Herstellerangaben

Vektor SK 4100

Anstelle einer Entwicklung mit den Elisa Substraten A und B wurde auch eine Markierung mit DAB (Diaminobenzinidine) versucht. Auch bei dieser Methode wurde eine Peroxidasereaktion genutzt. Das DAB wurde mit Wasserstoffperoxyd zu einem alkoholunlöslichen braunen Präzipitat umgesetzt. Hierfür wurde nach Markierung mit dem POD markierten Sekundärantikörper die DAB Lösung nach Herstellerangaben (2,5 mL destilliertes Wasser, ein Tropfen buffer stock solution, ein Tropfen Hydrogen peroxidase solution, zwei Tropfen DAB stock solution) je 50 µL pro Well zugegeben. Die braunen Präzipitate wurden mit dem Mikroskop gesucht.

Markierung mit FITC/ALEXA FLUOR

Material:

Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11005
1% Bovines Serum Albumin	Sigma	A7906
FITC markierter anti Mouse IgG Antikörper	Pierce	31569
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
N2a und ScN2a Zellen		
4% Paraformaldehyd	Fluka	76240
PBS, steril	Gibco	14190
Schwarze Zellkulturplatten Nuncion black microwell SI	NUNC	137101

Die Idee eine Messung von Antikörperbindungen auf Zellen mittels Peroxidase Antikörpern und Substraten durchzuführen wurde zugunsten einer Optimierung der Fluoreszenzmarkierung verlassen. In diesem Versuch wurde ein weiterer Fluoreszenz Antikörper untersucht, Alexa Fluor 594. Dieser Farbstoff zeigte eine Emission bei 617 nm nach Excitation mit 590 nm. Im Fluoreszenzmikroskop erschien er rot (<http://probes.invitrogen.com/lit/catalog/3/sections/7813.html>). Des weiteren wurde untersucht, ob in schwarzen Zellkulturplatten durch Verminderung der Lichtstreuung bessere Ergebnisse zu erzielen wären.

1. Die ScN2a und N2a Zellen wurden auf je eine halbe durchsichtige und eine halbe schwarze Zellkulturplatte ausgesät.
2. Die Konfluenz in der klaren Platte wurde lichtmikroskopisch überprüft. Ein Nachteil der schwarzen Platte war die fehlende Möglichkeit einer mikroskopischen Betrachtung.
3. Die Zellen wurden wie zuvor behandelt, lediglich der Proteinase K Verdau wurde weggelassen.
4. W226 wurde als Primärantikörper verwendet, zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen nicht mit W226 behandelt.
5. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 594 in einer Verdünnung von 1:100 und FITC in einer Verdünnung von 1:50 mit je 50 μL pro Well verwendet.

Nach Auswertung mittels Tecan Safire hat sich gezeigt, dass Alexa Fluor die besten Resultate liefert (Details siehe Ergebnisteil).

Verdünnung des Sekundärantikörpers

Um einerseits eindeutige Ergebnisse mit ausreichender Fluoreszenz bei andererseits möglichst geringen Antikörperverbrauch zu erzielen, wurden die Messungen mit unterschiedlichen Verdünnungen von Alexa Fluor 594 wiederholt. Die Durchführung entsprach dem letzten Versuch, der Sekundärantikörper wurde jedoch mit 1:200 und 1:400 verdünnt.

Aussaatzeitpunkt

Die Messungen sollten mit konfluenten Zellen durchgeführt werden. Es blieb jedoch die Frage nach dem idealen Zeitpunkt der Aussaat der Zellen. Hierfür wurden die Zellen sowohl einen als auch zwei Tage vor der Messung ausgesät. Die anschließende Messung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Zellzahl

Um Messergebnisse vergleichen zu können, sollte die Zellzahl bestimmt werden. Dies wurde zum einen mit Quinacrin, zum anderen mit DAPI versucht. Für die Messung mit Quinacrin wurden die Zellen vor der Fixierung mit Paraformaldehyd für 30 Minuten bei 37°C mit 1mM Quinacrin inkubiert.

Das DAPI wurde nach Zugabe des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 (50 µL pro Well) für 30 Sekunden in die Wells gegeben. Anschließend wurden diese Wells mit Wasser gewaschen. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenz mittels Tecan Safire bestimmt und die Zellen im Lichtmikroskop gezählt.

Endgültiges Protokoll Fluoreszenzmessung

Material:

Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11005
1% Bovines Serum Albumin	Sigma	A7906
DAPI		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
N2a und ScN2a Zellen		
4% Paraformaldehyd	Fluka	76240
PBS, steril	Gibco	14190

Nach Durchführung der Vorversuche ergab sich das folgende Protokoll für die Fluoreszenzmessung.

1. Die ScN2a und N2a Zellen wurden mit 50 µL PBS pro Well gewaschen.
2. Die Zellen wurden durch eine halbstündige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (50 µL pro Well) fixiert.
3. Die Zellen wurden mit 50 µL PBS pro Well gewaschen.
4. Freie Bindungsstellen wurden mit 5% Bovinen Serum Albumin und 1% Milchpulver geblockt (200 µL pro Well, 30 Minuten).
5. Die Zellen wurden zwei mal mit 100 µL PBS pro Well gewaschen.
6. Die antikörperhaltigen Überstände (50 µL pro Well) wurden für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Dabei wurde jeder Überstand sowohl auf die ScN2a als auch auf die N2a Zellen gegeben.
7. Die Zellen wurden zwei mal mit 100 µL PBS pro Well gewaschen.

8. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper Alexa Fluor 594 wurde in einer Verdünnung von 1:400 mit 50 µL pro Well für 30 Minuten auf die Zellen gegeben (dabei lichtgeschützt behandeln).
9. Jedes Well wurde vier mal mit je 100 µL PBS gewaschen. Diese letzte Waschung war für die Messergebnisse besonders wichtig, da eine unzureichende Entfernung von ungebundenen Sekundärantikörper zu starken Hintergrund und falschen Ergebnissen geführt hätte.
10. Die Zellen wurden mit 50 µL PBS pro Well feucht gehalten.
11. Auf jeder Platte wurde in einigen Wells kein Überstand, sondern lediglich der Sekundärantikörper hinzugegeben. Diese Wells dienten als negative Kontrolle.
12. Als positive Kontrolle wurden auf jeder Platte wenigstens zwei Wells mit W226 als Primärantikörper inkubiert. Aus den Voruntersuchungen war bekannt, dass dieser zu deutlichen Fluoreszenzemissionen führt.
13. Des weiteren wurden zwei Wells pro Platte mit keinerlei Antikörper inkubiert, sondern lediglich mit PBS feucht gehalten. Nach dem letzten Waschen wurde in diese Wells für 30 Sekunden DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 gegeben und anschließend mit Wasser gespült.
14. Schließlich wurde die Intensität der Fluoreszenz für alle Wells mit dem Tecan Safire Messgerät bestimmt.

Im folgenden die Messeinstellungen:

	Alexa: DAPI:			
	Fluorescence Top		Fluorescence Top	
Measurement mode:				
Excitation wavelength:	590	nm	359	nm
Emission wavelength:	617	nm	461	nm
Excitation bandwidth:	5	nm	5	nm
Emission bandwidth:	5	nm	5	nm
Gain (Manual):	200		150	
Number of flashes:	10		10	
Lag time:	0	µs	0	µs
Integration time:	40	µs	40	µs
Plate definition file:	GRE96fb.pdf		GRE96fb.pdf	
Multiple reads per well (Square):	3x3		2x2	
Z-Position (Manual):	4351	µm	4351	µm
Time between move and flash:	100	ms	100	ms

2.8 Identifizierung monoklonaler Antikörper gegen das 19C3 spezifische Peptid

Bei dieser Fusion war eine Maus mit dem linearen Epitop des Antikörpers 19C3 (Aminosäuren 161-167 des PrPs, VYYRPVD) immunisiert worden. Um eine Immunreaktion zu provozieren, war das Peptid an Humanes Serum Albumin crossgelinkt worden. Um interessante Antikörper zu isolieren, wurde mittels ELIFA und ELISA gesucht.

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
An HSA gebundenes Peptid (19C3 Antigen)		
Anti Mouse IgG POD Antikörper	Pierce	31444
BD Bioscience Substrate A and B	51-2607KC bzw	51-2606KC
BSA-Elisa Platte		
Humanes Serum Albumin	Bayer	685-20
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Nitrozellulose Membran	Protran	10401196
PBS-T		
PrP-Elisa Platte		
Rekombinantes PrP		
Urea	Fluka	51439
VRL-Puffer		

1. Das 19C3-peptid und das HSA wurden in VRL Puffer gelöst und mit je 100 ng pro Well auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen.
2. Das rekombinante PrP wurde in 8M Urea gelöst und mit 500 ng pro Well aufgetragen.
3. Die Membran wurde mit 5% Milchpulver geblockt und erneut im ELIFA eingespannt.
4. Die antikörperhaltigen Überstände (50 µL pro Well) wurden aufgelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

5. Als negative Kontrolle wurde je ein Well mit frischen, unbenutzten Medium beladen.
6. Als positiv Kontrolle wurde ein Well mit 19C3.C7 Überstand inkubiert.
7. Die Membran wurde wie beschrieben gewaschen und mit POD markierten anti-Maus Antikörper für eine Stunde inkubiert.
8. Die Membran wurde gewaschen und mit ECL entwickelt.
9. Durchführung des ELISAs mit den selben Antikörpern gegen BSA und PrP, wie bereits beschrieben.

2.9 Subklonierung der monoklonalen Antikörper

Material:

HT Medium

Hybridoma Cloning Factor Bioveris 210001

Die im Rahmen des Screenings entdeckten und in Bezug auf ihr Bindungsverhalten besonders interessanten Antikörper wurden subkloniert. Dabei wurden Klone, welche Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität bildeten, selektioniert und zugleich solche mit schwach bindenden Antikörpern ausselektioniert.

1. Die Hybridoma Zellen wurden mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf ca. 100 Zellen pro 100 μL HT-Medium verdünnt.
2. Die so verdünnten Zellen wurden im ersten Drittel einer 96 well Platte mit je 100 μL HT-Medium pro well ausgesät.
3. Die restliche Zellsuspension wurde 1:10 verdünnt und Hybridoma Cloning Factor, Endkonzentration 10%, zugegeben.
4. Diese Suspension wurde auf dem zweiten Drittel der 96well Platte ausgesät (100 μL /well).
5. Die verbliebende Zellsuspension wurde erneut 1:10 verdünnte, mit 10% HCF versehen und auf dem letzten Drittel ausgesät. Auf diese Weise erhielt man eine absteigende Konzentration von Hybridoma Zellen zwischen 100 pro well und 1 pro well.
6. Die Platte wurde im Brutschrank inkubiert und nach 4 Tagen zunächst mikroskopische kontrolliert. Hierbei wurde die Anzahl der Kolonien pro Well gezählt und solche Wells markiert, in welchen nur eine Kolonie zu erkennen war. So wurde versucht Wells mit initial nur einer Zelle zu selektionieren.
7. Alle Wells wurden mit 100 μL HT-Medium aufgefüllt, um den Zellen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und genug Ausgangsmaterial für das anschließende Screening zu gewinnen.

Nach ca. 9 Tagen zeigten sich in den Wells mit nur einer Kolonie zum einen eine makroskopisch sichtbare Kolonie und zum anderen eine Gelbfärbung des Medium, als Hinweis auf Stoffwechselaktivität der Zellen.

Die Überstände wurden abgenommen und mit den oben beschriebenen Methoden (ELISA, ELIFA, Fluoreszenz) getestet, um den potentesten Klon zu gewinnen. Bei der Subklonierung von 17B4.G3 wurde ein ELIFA verwendet. Hierbei wurden die Überstände in einer Verdünnungsreihe auf die Membran aufgetragen, um den ergiebigsten Klon zu bestimmen. Außerdem wurden die Überstände gegen rekombinantes PrP (c=500 ng/well) getestet, um den Antikörper mit der höchsten Affinität zu finden.

Subklonierung 19C3

Lediglich bei 19C3 wurde anders verfahren. Hier wurde versucht einen Klon zu gewinnen, der im ELIFA^{CTM}PrP-Hirnhomogenat möglichst gut erkennt.

Der gewonnene Subklon, 19C3.C7, wurde erneut, wie oben beschrieben, subkloniert, jedoch anders getestet. Hier wurde im ELIFA gegen rekombinantes PrP (recPrP) und HSA-peptid (an Humanes-Serum-Albumin gebundenes Peptid; es handelt sich um das exakte Antigen von 19C3) untersucht, als negative Kontrolle diente ein ELISA gegen BSA.

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
An HSA gebundenes Peptid (19C3 Antigen)		
Anti Mouse IgG POD Antikörper	Pierce	31444
BD Bioscience Substrate A and B	51-2607KC bzw	51-2606KC
BSA-Elisa Platte		
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Nitrozellulose Membran	Protran	10401196
PBS-T		
Rekombinantes PrP		
Urea	Fluka	51439
VRL-Puffer		

1. Das rekombinanten PrP wurde in 8M Urea für 30 min bei Raumtemperatur denaturiert und in einer Konzentration von 500 ng pro Well aufgetragen.

2. Das HSA-peptid wurde in VRL Puffer gelöst und mit 100 ng pro well aufgetragen.
3. Die Membran wurde für eine Stunde mit 5% Milchpulver geblockt und erneut im ELIFA eingespannt.
4. Die antikörperhaltigen Überstände wurden aufgelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Als negative Kontrolle wurde je ein Well beladen, jedoch nicht mit AK inkubiert.
6. Als weitere Kontrolle wurde ein Well mit W226 inkubiert.
7. Die Membran wurde in PBS-T für 10 Minuten gewaschen (PBS-T wurde mehrmals gewechselt).
8. Anschließend wurde die Membran mit POD markierten anti-Maus Antikörper für eine Stunde inkubiert.
9. Nach dem Waschen der Membran wurde diese, wie beschrieben, mit ECL entwickelt.
10. Der ELISA gegen BSA wurde wie beschrieben ausgeführt.

Auch der dabei gewonnene Subklon, 19C3.C7.D11, wurde erneut auf diese Weise subkloniert.

2.10 Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper

Material:

IsoStrip	Roche	1493027
PBS		

Antikörper können in verschiedenen Isotypen gebildet werden. Bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper, wie sie hier durchgeführt worden war, waren die beiden Typen IgM und IgG am wahrscheinlichsten. IgM entsprang dabei der Frühphase der Immunreaktion, IgG wurde in der Spätphase nach dem Isotypenswitch gebildet.

Um den Subtyp zu bestimmen wurde das IsoStrip Kit der Firma Roche verwendet. Es handelt sich um einen Array von 13er Peptiden, die entlang der Aminosäuresequenz des PrPs, jeweils 11 Aminosäuren überlappend, das PrP darstellen (*Korth C. 1999*). Der Versuchsablauf entsprach den Herstellerangaben.

1. Nach Verdünnung des antikörperhaltigen Überstands in PBS 1:10 wurden 150 μ L der Probe in das mitgelieferte Entwicklungsröhrchen gegeben.
2. Die Probe wurde für 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig geschüttelt, bis das blaue Latex komplett resuspendiert war.
3. Der Indikator Strip wurde mit dem schwarzen Ende nach unten in das Entwicklungsröhrchen zugegeben.
4. Nach 5-10 Minuten erschienen die positiv-Kontroll Banden. Nun konnte das Ergebnis abgelesen werden.

2.11 Bestimmung der Antikörperbindungsstellen am PrP

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
BSA	Sigma	A7906
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
Peptide Library	Jerini Biotools	
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444

Stripping Buffer

Die verwendete Peptide Library bestand aus 104 Polypeptiden von je 13 Aminosäuren, welche um je zwei Aminosäuren verschoben waren und das gesamte Rinder PrP abdeckten. Durch Analyse des Bindungsverhaltens ließen sich die Epitope der Antikörper bestimmen.

1. Die Membran (Peptide Library) wurde mit 5% BSA/TBST geblockt.
2. Die Membran wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit antikörperhaltigen Überständen inkubiert.
3. Anschließend wurde die Membran, nach mehrmaligen Waschen in TBST, für eine Stunde in POD markierten anti Maus Antikörper inkubiert.
4. Entwicklung der Membran mit ECL, wie beschrieben.

2.12 Aufreinigen von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen

Material:

PBS Puffer

POD markierten anti-Maus IgG	Pierce	31444
Protein A	Sigma	P3476
19C3.C7 Peptid		
Destilliertes Wasser		
500 mM EDTA	AppliChem	A3553
Hettich Zentrifuge Rotofix 32		
HT-Medium		
Humanes Serum Albumin	Bayer	685-20
KLH		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
NanoDrop (ND1000 Spectrometer, PreqLab)		
Natriumacid	Merck	K20741188
Snake-skin Membranen	Pierce	69035
TBS Puffer		
1M Tris pH 8,0	Merck	1.08382.2500
1M Tris pH 8,5	Merck	1.08382.2500
Elutionspuffer		
100 mM Glycin pH 2,5	Roth	3908.2, 500
mM Nacl	Merck	K34243404504

Die in der Zellkultur gewonnenen Überstände der klonierten Hybridomazellen enthielten die gewünschten Antikörper nur in relativ geringer Konzentration. Außerdem fand man in ihnen auch noch andere Stoffe, wie Glucose, Aminosäuren oder die zum Schutz der Zellen zugegebenen Antibiotika. Dies erschwerte die Lagerung der Antikörper, da die nährstoffhaltigen Medien auch für Pilze oder Bakterien einen guten Lebensraum boten. Ein Schutz vor mikrobiologischer Besiedlung war zwar mit Substanzen wie Natriumacid möglich, diese machten aber den Einsatz der Antikörper in Zellkulturexperimenten unmöglich.

Durch das Aufreinigen und Konzentrieren der Überstände war es möglich die Antikörper in ein weniger pilzfreundliches Milieu zu überführen, ihre Konzentration

exakt zu bestimmen, was zur Untersuchung konzentrationsabhängiger Effekte erforderlich war, und sie in kleinen Volumina zu lagern. Auch der Einsatz in der Zellkultur wurde vereinfacht, da höhere Konzentrationen eingesetzt werden konnten und Effekte sicher auf die Antikörper zurückgeführt werden konnten.

1. Antikörperproduzierende Zellen wurden in T-75 Flacs kultiviert.
2. Nach vier bis fünf Tagen, wenn die Zellen konfluent und das Medium gelblich verfärbt waren, wurden die Überstände (ca. 50 mL) abgenommen,.
3. Die Zellen wurden vom Flaschengrund durch Abspülen mit einer 10 mL Pipette gelöst und in ein 50 mL Falcon überführt.
4. Das Falcon wurde für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotofix 32).
5. Der Überstand wurde in ein Sammelgefäß (meist leere Mediumflasche) überführt, das Sediment (Zellen) wurde verworfen.
6. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen Zellen wurden mit frischen Medium versorgt und weiterkultiviert.
7. Je nach Bedarf wurden die Überstände durch Zugabe von 10 mM Natriumacid konserviert.
8. Nachdem etwa ein Liter Überstand pro Klon gesammelt worden war, wurden 20 mM Tris pH 8,0 und 2 mM EDTA zugegeben. Anschließend wurde sterilfiltriert, um grobe Partikel aus dem Überstand zu entfernen.
9. In das Aufreinigungsröhrchen wurden 500 µL Protein A und 5 mL TBS-Puffer gegeben.
10. Das Protein A sedimentierte für etwa 30 Minuten.
11. Das Säulensystems wurde luftdicht zusammengebaut und mit ca. 50 mL TBS-Puffer gespült.
12. Das Protein A wurde mit dem Zellkulturüberstand mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,5 mL pro Stunde gespült, um die Antikörper am Protein zu binden.
13. Das verbliebene Medium wurde mittels TBS-Puffer aus dem System gespült (ca. 50 mL TBS).
14. Saurer Elutionspuffer wurde zugegeben, um die Bindungen zwischen Antikörpern und Protein A zu lösen.
15. Die UV-Absorption bei 280 nm wurde gemessen, um die Proteinfraction zu bestimmen.
16. Das proteinhaltige Eluat wurde aufgefangen.

17. Der saure pH, welcher die Antikörper zerstört hätte, wurde mit 200 mM Tris pH 8,5 neutralisiert.
18. Das Säulensystem wurde zunächst mit 50 mL TBS-Puffer und anschließend erneut mit dem Überstand gespült.

2.12.1 Dialysieren

Die auf die geschilderte Weise gewonnenen, in neutralisierten Elutionspuffer gelösten Antikörper wurden zur besseren Lagerung und Einsetzbarkeit gegen PBS-Puffer dialysiert.

1. Die Proben wurden in snake-skin Membranen, die mit Klemmen geschlossen wurden, gegeben.
2. Die Membranbeutel wurden über Nacht bei 4°C in der hundertfachen Menge PBS-Puffer aufgehängt.
3. Der PBS-Puffer wurde gewechselt und die Membranbeutel wurden erneut für zwei Stunden aufgehängt.

Im Rahmen dieses Prozesses kam es durch Diffusion zu einem Konzentrationsausgleich der Puffersubstanzen und aufgrund der Mengenverhältnisse zu einer Verdünnung des glycinhaltigen Elutionspuffers. Die Antikörper blieben aufgrund ihrer Größe in der snake skin Membran. Nach zweifacher Dialyse lagen die Antikörper in fast reinem PBS-Puffer vor (rechnerische Konzentration von Glycin: 10 nM).

2.12.2 Konzentrationsbestimmung

1. Das Nano-Drop Gerät wurde eingeschaltet (Messung Protein A280).
2. Ein Tropfen destilliertes Wasser wurde aufgelegt.
3. Nach Einstellen des IgG Messmodus wurde ein Tropfen PBS-Puffer, als Nullwert, aufgelegt.
4. Anschließend wurde ein Tropfen Probe aufgelegt und gemessen.
5. Die Proben wurden sterilfiltriert und aliquotiert.

2.12.3 Aktivitätsmessung

Die Messung des NanoDrop Gerätes bestimmte zwar die Proteinkonzentration, ob es sich bei den Proteinen um Antikörper handelte vermochte sie aber nicht zu sagen. Aus diesem Grund und zur Beantwortung der Frage, ob die eluierten Antikörper auch biologisch aktiv seien, wurden die Proben im ELIFA getestet.

1. Die Proben (Antikörper) wurden im ELIFA aufgetragen (Prinzip siehe oben).
2. Die mit Antikörpern beladene Membran wurde mit 5% Milchpulver für 30 Minuten geblockt.
3. Die Membran wurde mit POD markierten anti-Maus IgG (1:20000) für eine Stunde inkubiert und anschließend mit ECL entwickelt.

Auf diese Weise konnten schnell und zuverlässig Fc-Fragmente nachgewiesen werden, die Aktivität der Antikörper blieb jedoch unklar.

Um auch diese Frage zu beantworten, wurden Western Blots von rekombinanten PrP und Mäusegehirnhomogenat hergestellt. Auf diese Blots wurden die Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und entwickelt.

19C3.C7 wurde zusätzlich auf einen anderen Western Blot aufgetragen. Hierfür wurde das Antigenpeptid von 19C3 erworben und sowohl an Humanes Serum Albumin als auch an KLH gekoppelt.

1. Das gekoppelte Peptid (beide Substanzen) wurde in einer Konzentration von 50 ng pro μL auf ein 12% Gel aufgetragen.
2. Zur Kontrolle wurden Humanes Serumalbumin und KLH auch alleine aufgetragen.
3. Das Gel wurde über Nacht bei 4°C und 0,15A geblottet.
4. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.
5. Der Blot wurde mit 19C3.C7 in einer Konzentration von 0,24ng pro μL für eine Stunde inkubiert.
6. Zwei Lanes wurden direkt mit POD markierten anti Maus IgG und nicht mit 19C3.C7 inkubiert, um unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Sekundärantikörper und HSA bzw KLH auszuschließen.
7. Der Blot wurde mit ECL entwickelt.

Für die Versuche zur Unterdrückung der PrP^{Sc}-Expression in ScN2a Zellen wurde ein nicht Prion spezifischer Antikörper zur Kontrolle eines Immunoglobulin G abhängigen Effekts benötigt. Hierfür wurde 9.E10, ein Antikörper gegen das humane Proto-Onkogen c-myc, mit den oben beschriebenen Methoden kultiviert und aufgereinigt. Die Aktivität dieses Antikörper wurde im Western Blot gegen in unserer Arbeitsgruppe rekombinant hergestellten W226, der mit dem c-myc Epitop markiert worden war, überprüft. Im gleichen Blot wurde rekombinantes PrP aufgetragen, um Wechselwirkungen zwischen 9.E10 und dem PrP auszuschließen. Der rekombinante W226 und das rekombinante PrP wurden in einer Konzentration von je 33ng pro μL , 9.E10 einer Konzentration von 0,65 ng pro μL verwendet.

2.13 Ammoniumsulfat Fällung

Material:

Ammonium Sulfate	Sigma	A4418
Antikörperhaltige Zellkulturüberstände		
PBS Puffer		
Snake-skin Membranen	Pierce	69035

In einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung konnten Proteine, insbesondere hochmolekulare wie Antikörper, präzipitiert werden. Dabei wurde ausgenutzt, dass Ammoniumsulfat mit Wasser um Bindungsstellen an den Proteinen kompetiert. Bei hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen wurde dadurch die Löslichkeit der Proteine reduziert (Herstellerangaben).

1. Gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde unter langsamen Rühren in eine gleich große Menge Zellkulturüberstand gegeben.
2. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Sedimentieren stehen gelassen.
3. Die Proben wurde für 20 Minuten bei 3000xg zentrifugiert.
4. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in PBS gelöst (10% des Ausgangsvolumens).
5. Mittels Snake Skin Membran wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gegen das 100 fache Volumen PBS dialysiert.
6. Punkt 5 wurde wiederholt.
7. Über Nacht wurde bei 4°C gegen das 100 fache Volumen PBS dialysiert.
8. Das Dialysat wurde sterilfiltriert.

Die Aktivität der Antikörper wurde mittels ELISA gegen rekombinantes PrP überprüft. Die Konzentration wurde durch Auftragen einer Verdünnungsreihe auf eine ELISA Membran und anschließenden Vergleich der Signalintensitäten bestimmt.

2.14 Schockgefrieren von monoklonalen Antikörpern

Material:

BSA Elisa Platten

PrP Elisa Platten

Flüssiger Stickstoff

Anti Mouse IgG POD Antikörper

Pierce 31444

BD Bioscience Substrate A and B

51-2607KC bzw 51-2606KC

Ein Problem beim Arbeiten mit biologischen Substanzen, wie monoklonalen Antikörpern war die Lagerung. Wünschenswert war eine möglichst lange Lagerung ohne mikrobielle Besiedlung der Materialien. Zwar standen mit Substanzen wie Natriumazid sehr potente antimikrobielle Wirkstoffe zur Verfügung, diese machten jedoch den Einsatz der monoklonalen Antikörper in Zellkulturexperimenten unmöglich. Daher lag es nahe, die Antikörper schockzugefrieren und im Eisschrank zu verwahren.

Um sicherzustellen, dass durch das Schockgefrieren kein Verlust der Aktivität der Antikörper eintrat, wurden diese probeweise schockgefroren.

Im Anschluss wurde ein ELISA verwendet, um die Aktivität der Antikörper zu testen.

1. Kleine Portionen der monoklonalen Antikörper wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei Raumtemperatur wieder aufgetaut.
2. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 0,1 µg/µL; 1 µg/µL; 10 µg/µL mit je 50 µL pro Well in einer mit rekombinanten PrP markierten ELISA Platte aufgetragen. Dabei wurde je zweimal gefrorener und nicht gefrorener Antikörper aufgetragen, um die Aktivität vergleichen zu können.
3. Zur Kontrolle wurden die Antikörper auch auf einer mit BSA gecoateten ELISA Platte aufgetragen.
4. Die Platten wurden wie zuvor beschrieben mit anti Mouse IgG POD Antikörpern und ELISA Substrat behandelt.
5. Nach Abstoppen der Reaktion mit 25% Schwefelsäure wurden die Reaktionen mithilfe des Tecan Safire ausgewertet.

2.15 Kalter Protease K Verdau

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
Gehirnhomogenate		
Gel, 12%		
Kill Buffer:		
0,1 M Tris pH 8,0		
1% SDS	Fluka	71729
Loading Buffer		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
Nitrozellulose Membran	Protran	10401196
NP 40	USB	19628
PBS-T		
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF, >99%, MW 174)	Sigma	P7626
POD markierten anti-Maus IgG	Pierce	31444
Protease K		

Beim kalten Protease K Verdau wurde Gehirnhomogenat unter speziellen, „milden“ Bedingungen verdaut, was zum Verdau von normalen, sekretorischen PrP ausreichend war. Transmembranäres PrP hingegen wurde nur teilweise verdaut und war im Western Blot nachweisbar. Die Methode ist ursprünglich von Hedge et al. (Hegde R. S. 1999) beschrieben worden und wurde im Rahmen dieser Arbeit in leicht modifizierter Art und Weise verwendet, um für die folgenden Experimente geeignete Homogenate zu identifizieren.

1. Der gesamte Versuch erfolgte auf Eis. Dies war genau zu beachten, da eine Temperaturerhöhung zu gesteigerten Verdau (auch des ^{CTM}PrPs) geführt hätte.
2. Von jedem Homogenat wurden je 10 µL in Eppendorf Cups gegeben. Die folgenden Beschreibungen beziehen sich auf je ein Homogenat.
3. In ein Cup wurden 2,5% NP 40 gegeben und 30 Minuten inkubiert.

4. Protease K 500 µg/mL wurde zu diesem und einen weiteren Cup gegeben.
Das dritte Cup diente als Kontrolle.

Inkubationsschema:

	Cup1	Cup2	Cup3
Homogenat 10%	+	+	+
PK 500 µg/mL		+	+
NP 40 2,5%			+

5. Die Proben wurden auf Eis im Kühlraum bei 4°C für eine Stunde inkubiert.
6. 1 µM frisch angesetztes PMSF wurde zugegeben.
7. Die Proben wurden in das vierfache Volumen auf 98°C vorgeheizten Kill Buffer überführt und für fünf Minuten bei 98°C gekocht.
8. Mit diesen Proben wurde, wie bereits beschrieben, ein Western Blot durchgeführt. Die Markierung erfolgte mittels W226 und POD-markierten Sekundärantikörper.

2.16 Immunpräzipitation

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Antikörperhaltige Zellkulturüberstände		
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
20% Gel	BioRad	345-0033
Loading Buffer ohne β -Mercaptoethanol		
Mäusegehirn		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
PMSF	Sigma	P7626
PBS, steril	Gibco	14190
PBS-T		
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
Protease K		
Protein A	Sigma	P3476
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine Sodium)	Sigma	L5777
TBS		
Puffer IP 1:		
50 mM Tris pH 7,5		
150 mM NaCl	Merck, K34243404	504
1% NP40	USB, 19628	
0,5 % Sarkosyl	Sigma, L5777	
Puffer IP2:		
50 mM Tris pH 7,5		
500 mM NaCl	Merck, K34243404	504
0,1 % NP40	USB, 19628	
0,05 % Sarkosyl	Sigma, L5777	
Puffer IP3:		
50 mM Tris pH 7,5		
0,1 % NP40	USB, 19628	
0,05 % Sarkosyl	Sigma, L5777	

Bei der Immunpräzipitation wurden Antigene durch Bindung an ihren Antikörper selektiv aus einer Lösung herausgefiltert. Wenn der Antikörper zuvor an Agarose gebunden worden war, konnte man die Antigen-Antikörper Komplexe abzentrifugieren, mittels Gel Elektrophorese auftrennen und durch Western Blot Technik darstellen.

Im Rahmen der Versuche wurde das folgende Protokoll ausgearbeitet.

1. 15 mL antikörperhaltiger Überstand wurden mit 100 μ L Protein A gemischt (Die Mengen gelten pro Antikörper und für je vier Präzipitationen pro Antikörper, bei anderen Mengen an Präzipitationen müssen die Zahlen entsprechend adaptiert werden).
2. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gemischt, um eine Bindung von Protein A und dem Antikörper zu ermöglichen. Protein A ist verwendet worden, weil es in unseren Versuchen bessere Ergebnisse erzielte als Protein G, welches zwar besser an Mäuse IgG gebunden hat (Herstellerangaben), aber auch einen ausgeprägteren Hintergrund verursachte.
3. Die Agarose Beads wurden runterzentrifugiert (1 Minute bei 1000rpm, es ging nur darum die Sedimentation der Beads zu beschleunigen).
4. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment wurde in 500 μ L PBS resuspendiert.
5. Der Überstand wurde wiederum verworfen.
6. Dieser Vorgang (Punkt 4 und 5) wurde noch zweimal wiederholt, dann wurde das Protein A in 400 μ L PBS suspendiert.
7. Für die Versuche wurden 10% Gehirnproben verwendet. Falls diese nicht vorgelegen haben, mussten Gehirne homogenisiert werden (Siehe Immunpräzipitation mit 17B4).
8. In einem Eppendorf Cup wurden 120 μ L Homogenat und 1080 μ L TBS mit 1,5% Sarkosyl zusammengeführt, so dass ein 1% Homogenat entstand (Volumina anpassen, falls das Ausgangshomogenat keine 10% hat!)
9. Die Proben wurden für 20 Minuten in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (16500rpm) abzentrifugiert. Hierdurch wurden grobe Fragmente entfernt.
10. 500 μ L Überstand wurden abgenommen und 500 μ L TBS mit 1,5% Sarkosyl zum abgenommenen Überstand zugegeben.

11. Diesen 1000 μL 0,5% Homogenat wurden 100 μL der an Protein A gebundenen Antikörper zugegeben.
 12. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C im Kühlraum geschüttelt.
 13. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert (Short spin 8sec), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL IP1 Puffer gelöst.
 14. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4 ° C geschüttelt.
 15. Punkt 13 und 14 wurden wiederholt.
 16. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert (Short spin 8sec), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL IP2 Puffer gelöst.
 17. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4 ° C geschüttelt.
 18. Punkt 16 und 17 wurden wiederholt.
 19. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert (Short spin 8sec), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL IP3 Puffer gelöst.
 20. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4 ° C geschüttelt.
 21. Die Proben wurden erneut abzentrifugiert, die Überstände verworfen.
 22. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 97°C in 20 μL Loading buffer ohne β -Mercaptoethanol aufgeköcht. β -Mercaptoethanol hätte die Disulfidbrücken der Antikörper zerstört, und die entstehenden Fragmente hätten sich als störende Bande mit dem PrP überlagert. Die kompletten Antikörper hingegen bildeten eine Bande weit oberhalb des PrP.
 23. Als Kontrollen wurden zusätzlich Homogenate und Proben von Homogenat mit Protein A aber ohne Antikörper auf ein 20% Gel aufgetragen.
 24. Dieses wurde über Nacht auf PVDF geblottet (130 mA).
 25. Die weitere Entwicklung erfolgte wie beschrieben: Es wurde mit 5% Milchpulver geblockt, Primärantikörper war W226, Sekundärantikörper POD markierter anti Maus Antikörper.
- Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Antikörpern und Homogenaten durchgeführt, das Hauptaugenmerk lag aber auf 19C3.C7 und dessen Affinität bzw. Spezifität für ^{CTM}PrP.

Immunpräzipitation mit PrP^{Sc}

Bei Immunpräzipitationen mit der pathogenen Form des PrPs stellte sich die Frage, ob der untersuchte Antikörper diese Form zu binden vermochte oder nicht. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde der oben beschriebenen Präzipitation ein PK Verdau hinzugefügt.

Material wie oben beschrieben.

Durchführung:

Punkt 1 bis 21 wie oben beschrieben.

22. Verdau der Proben mit 200 µg/mL Protease K für 30 Minuten bei 37°C.

23. Stoppen des Verdau mit 1 mM PMSF.

Anschließend die Punkte 22 bis 25 des oben beschriebenen Versuchs.

2.17 Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen Antikörpern

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Antikörper		
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
20% Gel	BioRad	345-0033
Loading Buffer		
Lysis Puffer		
MEM Medium		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
PBS, steril	Gibco	14190
PBS-T		
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
PMSF	Sigma	P7626
Protease K		
Quinacrin		
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine Sodium)	Sigma	L5777
ScN2a Zellen		

Peretz et al. (*Peretz D. 2001*) haben zeigen können, dass die Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen das sekretorische PrP eine dosisabhängige Reduktion des PrP^{Sc} verursachen kann. In Anlehnung an diesen Versuch ist im Rahmen dieser Arbeit mit den gefundenen Antikörpern ebenfalls eine Heilung von ScN2a Zellen versucht worden.

1. Zellen einer konfluenten 10cm Platte wurden auf 6cm Zellkulturplatten gesplittet (Je 2 Tropfen einer 10 mL Zellsuspension pro Platte unter Zugabe von 4 mL MEM Medium pro Platte).
2. Antikörper wurden in geeigneten Konzentrationen zugegeben.

Verwendete Konzentrationen[$\mu\text{g/mL}$]:

Bei Versuchen mit aufgereinigten Antikörpern:

0; 0,6; 1,2; 5; 10

Bei Versuchen mit durch Ammoniumsulfat präzipitierten Antikörpern:

0; 1; 2; 10; 20

3. Quinacrin wurde in einer Konzentration von 1 μM als Positivkontrolle zugegeben.
4. Für eine Woche wurde im Brutschrank inkubiert, dabei wurden alle zwei Tage (Tag 3 und 5) Medium und Antikörper gewechselt.
5. Am siebten Tag wurden die Zellen gesplittet und auf neue 6 cm Zellkulturschalen gegeben.
6. Anschließend wurde für eine weitere Woche mit Medium und Antikörpern in unveränderten Konzentrationen inkubiert.
7. Die Überstände wurden abgesaugt.
8. Die Zellen wurden ein mal mit PBS (~4 mL) gewaschen.
9. Einzelne Zellen wurden mit einer Pipette abgenommen und zur weiteren Kultur in eine 6 cm Zellkulturschale überführt.
10. 500 μL Lysis Puffer wurde zugeben.
11. Die Zellkulturplatten wurden mehrmals mit dem Lysepuffer gespült, bis alle Zellen gelöst waren.
12. DNA-Klumpen wurden zurückgelassen, 400 μL der Lösung in ein Eppendorf Cup gegeben.
13. Protease K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurde zugeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.
14. Der Verdau wurde mit 2 μL 2 mM PMSF gestoppt.
15. Die Proben wurden für 45 Minuten bei 16500 rpm zentrifugiert.
16. Der Überstand wurde verworfen.
17. 20 μL Loading buffer wurde zugegeben, 5 min bei 97°C gekocht und anschließend wie bereits beschrieben mittels Western Blot aufgetrennt.
18. Die Entwicklung des Blots erfolgte, nach Inkubation in 5% Milchpulver, mit W226 als Primärantikörper und POD markierten Anti-Maus Antikörper als Sekundärantikörper.
19. Die zuvor (Punkt 9) abgetrennten Zellen wurden ohne weitere Antikörperbehandlung weiter kultiviert und nach drei Wochen wie beschrieben lysiert und verdaut, um Langzeiteffekte beurteilen zu können.

2.18 Untersuchung unterschiedlich glykosylierter PrP Formen mit 17B4

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
20% Gel	BioRad	345-0033
Loading Buffer		
Lysis Puffer		
MEM Medium		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
PBS, steril	Gibco	14190
PBS-T		
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
PVDF Membran	Millipore	IPVH00010

Für diesen Versuch wurden CHO Zellen mit Konstrukten transfiziert, so dass sie bestimmte Formen des PrPs exprimierten. Zum einen wurde das MHM2PrP(N180Q) Konstrukt verwendet, zum anderen das MHM2PrP(N196Q) Konstrukt. Die transfizierten Zellen exprimierten in der Folge entweder an der Position 196 (N180Q) oder an 180 (N196Q) monoglykosyliertes (oder unglykosyliertes) PrP,.

Eine weitere Schale CHO Zellen wurde lediglich mit dem Vektor, nicht jedoch mit den zu exprimierenden Konstrukten transfiziert.

1. 2 Tage nach der Transfektion wurde das Medium von den 6cm Zellkulturplatten abgesaugt, 4mL PBS zugegeben und erneut abgesaugt.
2. Die Zellen wurden mit 500 µL Lysis Puffer lysiert und mehrmals mit einer Pipette aufgewirbelt. Verklumpende DNA Fragmente wurden in der Kulturplatte zurückgelassen, der Rest wurde in ein Eppendorf Cup überführt.
3. Von jedem Lysat wurden je zwei mal 20 µL mit 10 µL Loading Buffer für 5 Minuten bei 95°C gekocht.
4. Zusätzlich wurden zwei 20 µL Proben eines 10% Homogenats eines Mäusegehirns mit je 10 µL Loading Buffer aufgekocht.

5. Die aufgekochten Proben wurden auf ein Gel aufgetragen und bei 110V aufgetrennt, um anschließend über Nacht mit 180 mA auf PVDF Membran geblottet zu werden.

Schema:

N180Q = G1

N196Q = G2

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Marker		G1		G2		Vektor		Mouse
Lane	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	G1		G2		Vektor		Mouse		Marker

6. Die Membran wurde zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde mit 5% Milchpulver inkubiert.
7. Im Anschluss wurden die Lanes 1-9 mit W226 (20 ng/mL) und die Lanes 10-18 mit frisch abgenommenen 17B4.G3 Überstand für zwei Stunden inkubiert.
8. Die weitere Entwicklung der Blots erfolgte wie bereits beschrieben mit POD markierten anti Maus Antikörpern (1:25000) und ECL.

2.19 Immunpräzipitation mit 17B4

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
Homogenisator		
Kupfersulfat	Merck	A503390
Loading Buffer ohne β -Mercaptoethanol		
Lysis Puffer		
Mäusegehirn		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
PBS, steril	Gibco	14190
PBS-T		
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
Protein G	Sigma	P4691
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
VRL Puffer		

Homogenisieren:

Zunächst wurde ein Gehirn einer normalen Maus (d.h. nicht mit Scrapie infiziert, nicht transgen) homogenisiert.

1. Das Gewicht des tiefgefrorenen Gehirns (z.B. 0,47g) wurde bestimmt. Das Gehirn wurde bis zum Homogenisieren auf Trockeneis gelagert.
2. Es wurde die 9fache Menge an VRL Puffer in den Homogenisator vorgelegt.
3. Anschließend wurde das Gehirn in den Puffer gegeben und mittels Homogenisator vollständig homogenisiert.

Immunpräzipitation:

Bindung von Antikörper und Protein G:

1. Je 5 μ g der aufgereinigten Antikörper 17B4.G3 und 19C4.F8 wurden mit 50 μ L Protein G und 400 μ L PBS gemischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine Anlagerung des Antikörpers an das Protein G zu ermöglichen.

2. Anschließend wurde das Protein G kurz runterzentrifugiert (5sec short spin modus).
3. Die Überstände wurden abpipettiert und verworfen.
4. Das Protein G wurde in 500 μ L PBS resuspendiert und erneut kurz zentrifugiert.
5. Die Überstände wurden wiederum verworfen.
6. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, dann wurde das Protein G in 200 μ L PBS suspendiert.

Präzipitation des Antigens:

1. Von dem zuvor erstellten 10% Homogenat wurden je 300 μ L in sechs Eppendorf safe-look tubes pipettiert und mit je 1200 μ L Lysis Puffer gemischt, um ein 2% Homogenat zu erhalten.
2. In drei der Tubes wurde zusätzlich 200 μ M Kupfersulfat gegeben.
3. Die Homogenate wurden mittels Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert, um DNA und grobe Partikel entfernen zu können.
4. Von den Überständen wurden jeweils 500 μ L abgenommen und mit weiteren 500 μ L Lysis Puffer auf ein nun einprozentiges Homogenat verdünnt.
5. Je 100 μ L der Antikörper-Protein G Lösung wurden nach gründlichen Mischen in die gewonnenen einprozentigen Homogenate gegeben. Dabei wurden je 100 μ L in ein Homogenat mit Kupfer und 100 μ L in eines ohne Kupfer gegeben. Die beiden anderen Homogenate wurden mit je 25 μ L Protein G ohne Antikörper gemischt.
6. Alle Homogenate wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine Bindung der Antikörpers mit ihrem Antigen zu ermöglichen.
7. Der Protein G Komplex wurde kurz herunterzentrifugiert (5 s short spin modus). Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Protein G wurde in 1000 μ L Puffer resuspendiert und erneut kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen.
8. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, dann wurde das Protein G und die daran gebundenen Substanzen für 5 Minuten bei 97°C in 20 μ L Loading buffer ohne β -Mercaptoethanol aufgekocht. β -Mercaptoethanol hätte die Disulfidbrücken der Antikörper zerstört, und die entstehenden Fragmente hätten sich als störende Bande mit dem PrP überlagert. Die kompletten Antikörper hingegen bildeten eine Bande weit oberhalb des PrP.

Zuvor waren sowohl von dem einprozentigen Homogenat als auch von dem Überstand nach der zweistündigen Inkubation von Protein G mit dem Homogenat 20 µL Proben abgenommen worden. Auch diese wurden mit dem Loading Buffer aufgekocht.

Die aufgekochten Proben wurden auf ein 12% Gel aufgetragen.

Schema:

Gel1:							
Lane	1	2	3	4	5	6	7
	Überstand Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat	Protein G	Überstand Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat
AK	Keiner	Keiner	19C4	Keiner	Keiner	Keiner	17B4
Kupfer	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Gel2:							
Lane	1	2	3	4	5	6	7
	Überstand Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat	Protein G	Überstand Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat
AK	Keiner	Keiner	19C4	Keiner	Keiner	Keiner	17B4
Kupfer	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Die Proben wurden mit 90 V aufgetrennt und über Nacht bei 180 mA geblottet. Am nächsten Tag wurden die PVDF Membranen wie bereits beschrieben mit 5% Milchpulver geblockt, mit W226 und POD markierten Antikörper markiert und schließlich mit ECL entwickelt.

Abwandlung:

Beim zweiten Durchgang wurde der Versuch modifiziert. Die Homogenate wurden erst nach dem Abzentrifugieren der DNA mit 200 µM Kupfersulfat versetzt, da beim ersten Versuch das Kupfer zumindest teilweise als makroskopisch sichtbares Pellet abzentrifugiert worden war. Nach Zugabe des Kupfersulfats wurde der Überstand

erneut zentrifugiert und es wurden 500 μL dieses Überstandes in den Versuch eingebracht. Diesmal fiel kein sichtbares Kupfer aus.

Auch wurden diesmal keine Überstände des Protein G/Homogenat Gemisches aufgetragen.

2.20 Immunfluoreszenz von ScN2a und N2a Zellen

Material:

15 mm Plättchen	Menzel-Gläser
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse	Invitrogen A11005
BSA	Sigma A7906
Fixierlösung	
Objektträger	Menzel-Gläser 8037/1
100% Ethanol	Merck 1.00983.2500
MEM-Medium	
PBS, steril	Gibco 14190
Skim Milkpulver	Oxoid LP0031
ScN2a Zellen	
N2a Zellen	
QCC Zellen	

1. 15 mm Plättchen wurden durch Eintauchen in 100% Ethanol und Abflammen unter der Sterilbank sterilisiert.
2. Die Plättchen wurden in eine 10cm Zellkulturschale eingelegt.
3. 10 mL MEM Medium und N2a, ScN2a oder QCC Zellen wurden zugegeben.
4. Nachdem die Zellen auf den Plättchen angewachsen waren (nicht konfluent), wurden die Plättchen in eine 12-Well Platte überführt; Ein Plättchen pro Well
5. Nach Absaugen des Überstands wurde mit 1 mL sterilen PBS gewaschen.

Möglichkeit A:

6. Pro Well wurden 300 µL antikörperhaltiger Überstand zugegeben (17B4.G3, 19C4.F8 und kein Antikörper, jeweils auf alle verwendeten Zelltypen) und für eine Stunde bei 4°C inkubiert.
7. Die Zellen wurden mit 400 µL 4% Paraformaldehyd pro Well für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur fixiert.
8. Nach Absaugen des Überstands wurde mit 1 mL sterilen PBS gewaschen.

Möglichkeit B:

6. Die Zellen wurden mit 400 μ L 4% Paraformaldehyd pro Well für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur fixiert.
7. Pro Well wurden 300 μ L antikörperhaltiger Überstand zugegeben (17B4.G3, 19C4.F8 und kein Antikörper, jeweils auf alle verwendeten Zelltypen) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert
8. Nach Absaugen des Überstands wurde mit 1 mL sterilen PBS gewaschen.
9. Freie Bindungsstellen wurden mit 1 mL 5% BSA und 1% Milchpulver für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt.
10. Der Überstand wurde zweimal abgesaugt und mit 1 mL sterilen PBS gewaschen.
11. 300 μ L Alexa Fluor 594 wurden in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.
12. Der Überstand wurde viermal abgesaugt und mit 1 mL sterilen PBS gewaschen.
13. 1 Tropfen Fixierlösung pro Well wurde auf einen Objektträger gelegt.
14. Die Plättchen wurden vorsichtig aus den Wells herausgenommen und auf die Fixierlösung überführt. Die Zellen wurden dabei in die Lösung gelegt.
15. Die Objektträger wurden über Nacht lichtdicht verpackt im Kühlschrank inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.21 17B4.G3 und Creutzfeldt-Jakob-Disease

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 1	Amersham	1059243
Enhanced chemical luminescence (ECL) Reagent 2	Amersham	1059250
Gel	BioRad	345-0033
Loading Buffer		
5% Milchpulver	Oxoid	LP0031
PBS-T		
PMSF	Sigma	P7626
POD markierter goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
Protease K		
PVDF Membran	Millipore	IPVH00010

1. Für diesen Versuch wurden 1% Homogenate verschiedener Varianten der menschlichen Form der Prionkrankheit, der Creutzfeldt-Jakob Krankheit, erstellt.
2. Von jedem Homogenat wurde ein Teil für 30 Minuten bei 37°C mit 200 µg/mL Protease K verdaut.
3. Der Verdau wurde mit 1 mM PMSF gestoppt.
4. Die Proben wurden mit Loading Buffer für 5 Minuten bei 97°C aufgekocht und auf ein Gel aufgetragen.
5. Das Gel wurde auf PVDF Membran geblottet, diese wurde mit 5% Milchpulver für eine Stunde geblockt.
6. Als Primärantikörper wurde 17B4.G3 in einer Konzentration von 80 ng/mL über Nacht zugegeben.
7. Die Entwicklung mit POD markierten Antikörper (1:20000, 1 Stunde) und ECL erfolgte wie bereits beschrieben.
8. Es wurden jeweils möglichst zwei gleiche Blots entwickelt, der zweite wurde mit 19C4.F8 entwickelt, um Unterschiede im Bindungsmuster der beiden Antikörper untersuchen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung Prion spezifischer monoklonaler Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Antikörper identifiziert werden:

1. PrP^C spezifische Antikörper
2. ^{CTM}PrP spezifische Antikörper

Um entsprechende Antikörper zu identifizieren wurde mit ELISA, ELIFA und Immunhistochemie gescreent. Vor Beginn des eigentlichen Screenings wurde daran gearbeitet, die Methode der Immunfluoreszenz an N2a und ScN2a-Zellen zu optimieren.

3.1.1 Versuche zur Optimierung der Methode

Nach erfolglosen Versuchen die Zellen mit peroxidaseabhängigen Versuchen zu markieren, wurde die Immunfluoreszenz optimiert. Dabei standen zwei verschiedenartig markierte Sekundärantikörper zur Auswahl. Zum einen FITC, zum anderen Alexa Fluor 594. Auch wurde verglichen, ob sich eine durchsichtige oder schwarze Platte besser eignete. Ebenfalls untersucht wurde, bei welcher Verdünnung des Sekundärantikörpers und welchen Zeitpunkt der Aussaat der Zellen die Ergebnisse optimal waren.

FITC/ALEXA und Art der Zellkulturplatte

Die beiden Fluoreszenzantikörper FITC und Alexa Fluor 594 wurden verglichen. Hierfür wurden N2a-Zellen in klaren und schwarzen Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit W226 als Primärantikörper markiert. Anschließend wurde jeweils die eine Hälfte der Platte mit FITC und die andere mit Alexa Fluor 594 markiert. Ziel der Versuchs war zum einen der Vergleich der beiden Farbstoffe und zum anderen die Bestimmung der geeigneteren Platte.

Der mit FITC markierte Antikörper zeigte in der schwarzen Platte ein etwa doppelt so starkes Signal wie in der klaren Platte. Das gemessene Signal der nicht antikörpermarkierten Zellen war jeweils etwa halb stark wie das der markierten.

Alexa Fluor zeigte in beiden Platten vergleichbare Messwerte. Das Signal der markierten Wells war ca. 2,5 mal so stark wie das der nicht markierten. Auch war das Gesamtsignal mehr als doppelt so stark wie das des FITC Antikörpers.

Aufgrund des stärkeren Signals beim Alexa Fluor 594 Antikörper und des besseren Kontrastes zwischen markierten und nicht markierten Wells, wurde diesem der Vorzug gegeben. Da die schwarze Platte beim gewählten Antikörper keinen Vorteil bot, wurden die weiteren Versuche mit klaren Zellkulturplatten durchgeführt. Ein weiterer Nachteil der schwarzen Platte war, dass man diese nicht im Lichtmikroskop betrachten konnte, somit im Zweifel keine visuelle Kontrolle der Messdaten möglich war.

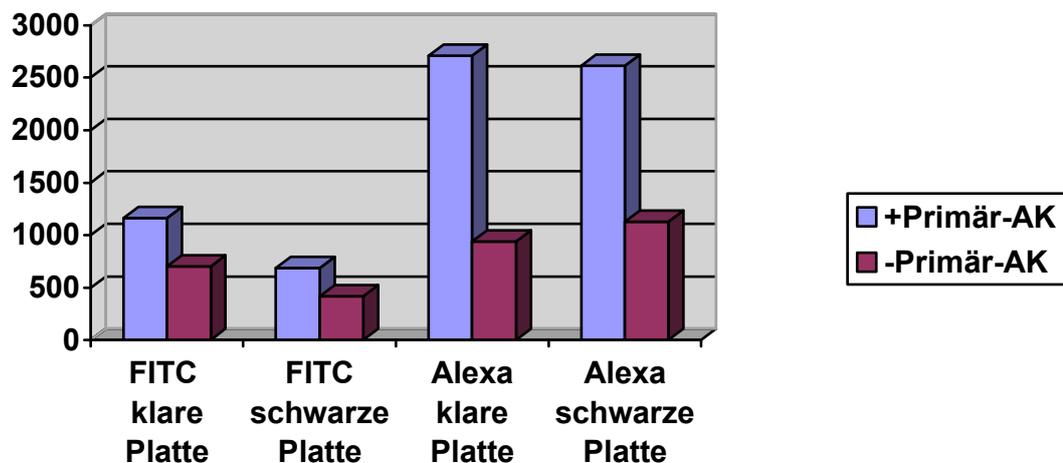


Diagramm 3.1: Fluoreszenzmessung, Vergleich der Signalintensität von Alexa Fluor 594 bzw. FITC bei schwarzen bzw. klaren Platten; Dargestellt werden die gemessenen Emissionen der Farbstoffe (Ordinate) in der Immunfluoreszenz; Verglichen werden jeweils Zellen mit (+) bzw. ohne (-) Primärantikörper (Primär-AK, verwendet wurde W226); Wie im Text erläutert ist der Signalkontrast beim Alexa Fluor 594 markierten Antikörper besser als beim FITC markierten.

Variationen der Verdünnung des Sekundärantikörpers

Ziel dieses Versuchs war es, eine optimale Verdünnung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers zu finden. Zum einen sollte eine zu hohe Konzentration, welche einen zu starken Hintergrund hätte provozieren können und mit unnötigen Materialverbrauch einhergegangen wäre, vermieden werden. Zum anderen musste die Konzentration so hoch gewählt werden, dass eine Unterscheidung zwischen geeigneten und ungeeigneten Primärantikörpern möglich war. Hierfür wurden N2a-Zellen mit W226 als Primärantikörper markiert und anschließend mit Alexa Fluor 594 in 1:200 und 1:400 Verdünnungen markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Verdünnungen des Sekundärantikörpers eine klare Unterscheidung zwischen antikörpermarkierten Zellen und nicht markierten Zellen zuließen. In beiden Fällen wäre es zu keiner Fehlbewertung gekommen. Die 1:200 Verdünnung zeigte sich dabei im Kontrast der 1:400 Verdünnung nicht

überlegen. Aus diesen Gründen wurden die Messungen mit Alexa Fluor 594 in einer Verdünnung von 1:400 durchgeführt.

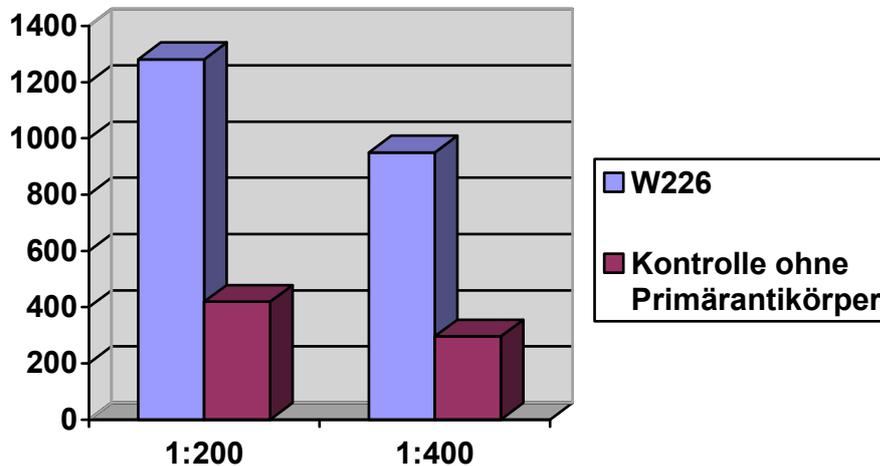


Diagramm 3.2: Fluoreszenzmessung, Gezeigt werden die Mittelwerte der Messwerte der Immunfluoreszenz mit Alexa Fluor 594 in den Verdünnungen 1:200 und 1:400; Markiert wurden N2a-Zellen, Primärantikörper war W226. Zwischen den beiden Verdünnungen gibt es keine Unterschiede, welche eine Überlegenheit der 1:200 Verdünnung zeigen würden.

Variationen des Aussaatzeitpunktes

Es wurde verglichen, ob der Zeitpunkt der Aussaat der (Sc)N2a-Zellen einen Einfluss auf die Messergebnisse hatte. Hierfür wurden Zellen einen bzw. zwei Tage nach Aussaat mit W226 und Alexa Fluor 594 markiert.

Die einen Tag vor der Messung ausgesäten Zellen ergaben eine falsch positive Messung, die zwei Tage zuvor ausgesäten Zellen führten zu eindeutigen Ergebnissen, sprich es gab keine Fehlzuweisungen. Des Weiteren war der Kontrast zwischen markierten und nicht markierten Zellen bei den früher ausgesäten Zellen deutlich besser. Dies war am ehesten darauf zurückzuführen, dass diese Zellen mehr PrP produzieren konnten, daher mehr Antikörper binden konnten und folglich die Bedeutung des unspezifischen Hintergrundes geringer wurde.

Konsequenterweise wurden die Zellen zwei Tage vor der Messung ausgesät.

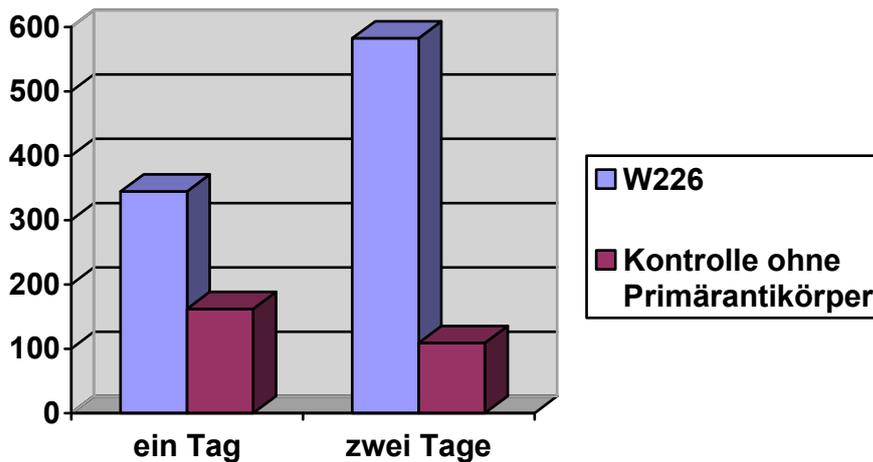


Diagramm 3.3: Fluoreszenzmessung, Gezeigt werden die Messwerte bei unterschiedlichen Aussaatzeitpunkten (1 bzw. 2 Tage vor Untersuchung); Die gemessenen Emissionen der Immunfluoreszenz sind auf der Ordinate abgebildet. Markiert wurden N2a-Zellen, Primärantikörper war W226. Der Kontrast zwischen mit W226 als Primärantikörper markierten Zellen und solchen ohne Primärantikörper ist nach zwei Tagen besser.

Bestimmung der Zellzahl

Um Messergebnisse vergleichen zu können sollte die Zellzahl bestimmt werden. Dies sollte mit Quinacrin oder DAPI geschehen. Für die Messung mit Quinacrin wurden die Zellen vor der Fixierung mit Paraformaldehyd mit Quinacrin inkubiert. Das DAPI wurde nach Zugabe des Sekundärantikörpers zugegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenz mittels Tecan Safire bestimmt und die Zellen im Lichtmikroskop gezählt. Die Markierung der Zellen mit Quinacrin gelang leider nicht, weder mittels Tecan Safire noch im Fluoreszenzmikroskop konnten gefärbte Zellen nachgewiesen werden.

Die Markierung mit DAPI war erfolgreicher. Auch hier wurde die Messung mit dem Tecan Safire Messgerät durchgeführt (Excitation(Ex)/Emission(Em) 359/461). Die in einigen Wells im Lichtmikroskop gezählten Zellzahlen korrelierten dabei gut mit den Messwerten. Die Nutzbarkeit der Methode für das Screening wurde jedoch durch die durchaus unterschiedlichen Zellzahlen in einzelnen Wells eingeschränkt (Mittelwert 127 ± 37 , maximale Abweichung 30%). Daher wurde die gemessene Zellzahl nur bei extremen Werten mit in die Bewertung einbezogen.

3.1.2 Screening

Nach Bestimmung geeigneter Versuchsbedingungen und Optimierung der Fluoreszenzmethode konnte das Screening begonnen werden. Zur Gewinnung

geeigneter antikörperbildender Klone wurden zwei Mäuse immunisiert. Die eine mit rekombinanten PrP, die andere mit gereinigtem Hirnhomogenat einer ^{CTM}PrP überexprimierenden Maus. Die Splenozyten dieser Tiere wurden mit P3U Zellen fusioniert, um immortalisierte, antikörperbildende Zellen zu gewinnen.

Insgesamt gingen aus diesen beiden Fusionen mehrere hundert Klone hervor, wobei die Fusion der mit rekombinanten PrP immunisierten Maus mehr Klone hervorbrachte. Die Klone wurden zunächst mit den für die jeweilige Fusion vorgesehenen Methoden untersucht, das heißt ELISA und ELIFA bei der mit dem ^{CTM}PrP-haltigen Homogenat immunisierten Maus, ELISA und Fluoreszenz bei der mit rekombinanten PrP immunisierten. Bei der Untersuchung ergaben sich zunächst 46 Klone, die in den einen oder anderen Versuch vielversprechend wirkten. Diese Klone wurden in den folgenden Untersuchungen, nachdem sie einige Tage kultiviert worden waren, um neuen Antikörper zu produzieren, erneut untersucht. Dabei ließen sich die initial interessanten Ergebnisse bei 34 Klonen nicht zufriedenstellend replizieren. Diese Klone wurden daher verworfen.

Im Gegensatz zu diesen Klonen bestätigten 12 Klone ihre initial guten Ergebnisse und wurden weitergezogen und untersucht.

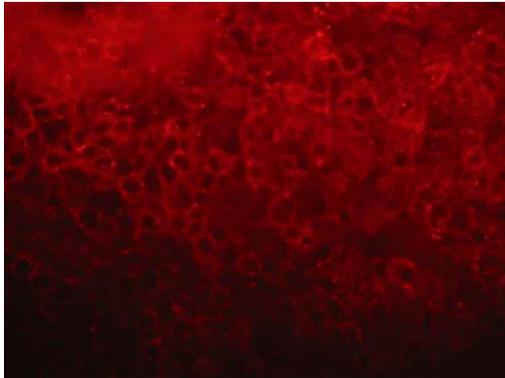
Tabelle A (Folgeside): Die Tabelle stellt die interessantesten Klone dar. ELISA: zeigt das Bindungsverhalten der Antikörper im ELISA +++ sehr gut; ++ gut; + mäßig; - schlecht; ELIFA: beschreibt das Bindungsverhalten der Antikörper im ELIFA gegen ^{CTM}PrP haltiges und normales Homogenat; Fluoreszenz: beschreibt das Bindungsverhalten der Klone in der Immunfluoreszenz mit N2a bzw. ScN2a Zellen +++ sehr gut; ++ gut; + mäßig; - schlecht

Klon	ELISA	ELIFA	Fluoreszenz
5E11	Initial: +++ später: -	Erkennt kein ^{CTM} PrP haltiges Homogenat	Schwach, wechselhaft
6D4	++	Erkennt beide Homogenate	++
10C3	++	Erkennt beide Homogenate	++
16D3	+ Erkennt BSA bei späteren Versuchen	Erkennt kein ^{CTM} PrP haltiges Homogenat;	++
17B4	+++	Erkennt beide Homogenate	++
19C3	+++	Erkennt kein ^{CTM} PrP haltiges Homogenat	+
19C4	+++	Erkennt beide Homogenate	+++
20B6	+	Erkennt ^{CTM} PrP haltiges und normales Homogenat	Initial nur positiv bei ^{SC} N2a, ließ sich aber nicht bestätigen-> schlussendlöich für beide Homogenate negativ
21B7	-	Initial nur ^{CTM} PrP positiv, ließ sich aber nicht bestätigen	-
26B5	+; aber auch für BSA	Initial stärker für ^{CTM} PrP, ließ sich aber nicht bestätigen	++
28H11	- BSA positiv	Initial stärker für ^{CTM} PrP, ließ sich aber nicht bestätigen;	++
34F11	++	Erkennt beide Homogenate	+

5E11

Dieser Klon erschien initial sehr stark im ELISA, büßte jedoch bedauerlicherweise seine Potenz ein und wurde letztlich aufgegeben.

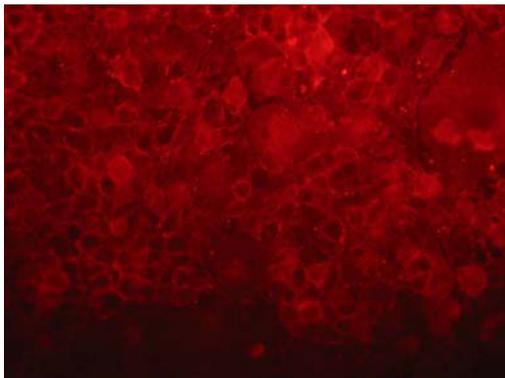
6D4



Dieser Antikörper überzeugte vor allen durch konstante Ergebnisse in allen Assays (ELISA, ELIFA, Fluoreszenz) und wurde als Prion Antikörper weiterkultiviert, subkloniert und für weitere Experimente verwendet. Im CTM-Assay erkannte der Antikörper sowohl normales als auch ^{CTM}PrP angereichertes Homogenat.

Abb. 3.1: Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 6D4.G7; 10 sec. Exposition

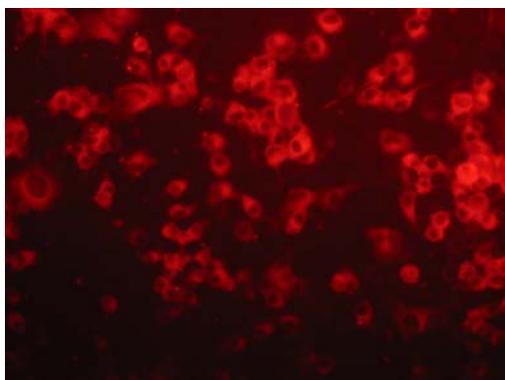
10C3



Dieser Antikörper zeigte in allen Assays (ELISA, ELIFA, Fluoreszenz) gute und konstante Ergebnisse, daher wurde er subkloniert und weitergezogen. Im CTM-Assay erkannte der Antikörper sowohl normales als auch ^{CTM}PrP angereichertes Homogenat.

Abb. 3.2: Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 10C3; 10 sec. Exposition

16D3



Dieser Antikörper zeigte eine eher geringe Aktivität im ELISA und in der Fluoreszenz, war im ELIFA bei ^{CTM}PrP haltigen Homogenat negativ und entwickelte schließlich eine Affinität zu BSA, die sich auch nach dem Subklonieren fortsetzte. Daher wurde dieser Antikörper nicht weiter untersucht.

Abb. 3.3 : Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 16D3.D10; 10 sec. Exposition

17B4

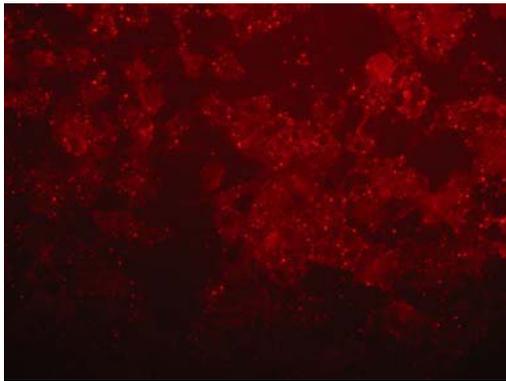


Abb. 3.4: Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 17B4; 10 sec. Exposition

Dieser Antikörper wurde aufgrund konstanter Messwerte im ELISA und meist guten Ergebnissen bei der Fluoreszenzmessung weitergezogen und auch später weitergehend untersucht. Im ELIFA wurden sowohl normales als auch ^{CTM}PrP angereichertes Homogenat erkannt.

Man beachte bei diesem Antikörper auch die punktförmigen Strukturen in der Fluoreszenzaufnahme, welche bei den anderen Antikörpern in diesem Maß nicht vorhanden waren.

19C3

Dieser Antikörper zeigte in den Screeninguntersuchungen vor allem gute Werte im ELISA, wurde jedoch später auch aufgrund anderer Experimente intensiv untersucht (siehe unten). In der Fluoreszenz war der Antikörper schwach, im CTM-Assay erkannte er fast kein Signal.

19C4

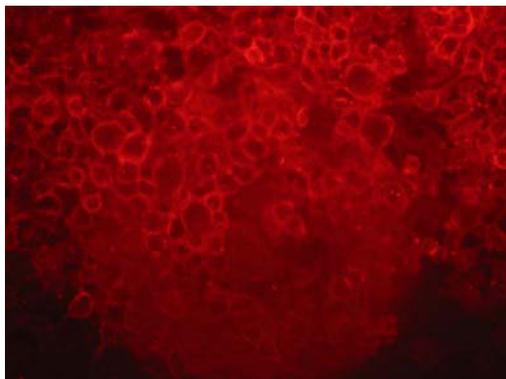


Abb. 3.5: Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 19C4.G8; 10 sec. Exposition

Dieser Antikörper überzeugte durch gute bis sehr gute Ergebnisse im ELISA und wurde konsequenterweise subkloniert und weitergezogen. In der Fluoreszenz und im CTM-Assay war er durchweg für beide Homogenate positiv. Schließlich diente er als Primärantikörper bei Western Blots.

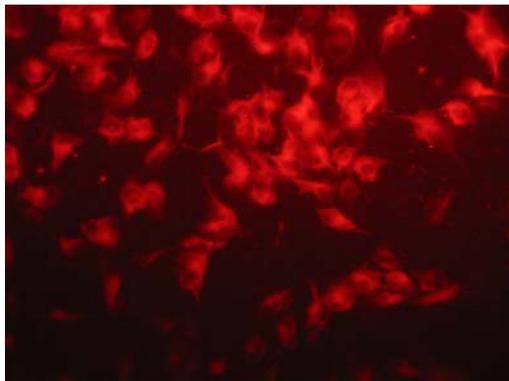
20B6

Dieser Antikörper wurde vorübergehend als potentieller Scrapie spezifischer Antikörper gehandelt, da er stärkere Signale in der Fluoreszenz bei ScN2a als bei N2a Zellen lieferte. Aufgrund inkonsistenter und allgemein eher schwacher Ergebnisse wurde er jedoch schlussendlich verworfen.

21B7

Dieser Antikörper zeigte kaum Affinität im ELISA und in der Fluoreszenz, schien aber eine erhöhte Affinität zum ^{CTM}PrP zu haben. Da er dies aber alles in allen nicht bestätigen konnte, wurde er schließlich verworfen.

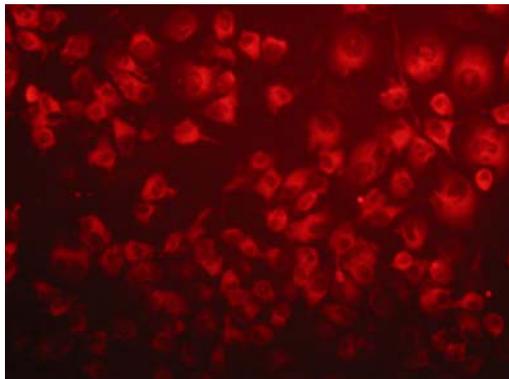
26B5



Dieser Antikörper aus der zweiten Fusion (Homogenat als Immunisierungssubstanz) schien zunächst aufgrund seiner höheren Affinität zu ^{CTM}PrP im ELIFA hoffnungsvoll, verlor diese jedoch und wurde aufgrund eher schwacher Messwerte im ELISA und vor allem aufgrund positiver BSA Reaktionen aufgegeben.

Abb. 3.6: Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 26B5; 10 sec. Exposition

28H11



Dieser Antikörper aus der zweiten Fusion (Homogenat als Immunisierungssubstanz) schien zunächst aufgrund seiner höheren Affinität zu ^{CTM}PrP hoffnungsvoll, musste aber aufgrund eher schwacher Messwerte im ELISA und vor allem aufgrund positiver BSA Reaktionen verworfen werden.

Abb. 3.7 : Immunfluoreszenz von ScN2a Zellen mit mAB 28H11; 10 sec. Exposition

34F11

Dieser Antikörper wurde aufgrund guter ELISA Messergebnisse und guter Erkennung beider Homogenate im ELIFA als Prion Antikörper subkloniert und für weitere Experimente verwendet.

Von den beschriebenen Antikörpern wurden drei ausführlich untersucht und sollen im folgenden umfassend beschrieben werden. Dabei handelt es sich um 17B4, 19C3 und 19C4.

3.2 17B4 – ein glykoformspezifischer Antikörper

Dieser Antikörper zeigte im ELISA konstante Messwerte sowie meist gute Ergebnisse bei der Fluoreszenzmessung. Im ELIFA wurden beide Homogenate gebunden. In der Fluoreszenz fielen punktförmige Strukturen auf, welche bei den anderen Antikörpern in diesem Maß nicht vorhanden waren. Als dieser Antikörper im Western Blot als Primärantikörper verwendet wurde, fiel eine Doppelbande anstelle der gewöhnlichen Dreierbande des PrPs auf. Die oberste – diglykosylierte – Bande fehlte.

3.2.1 Subklonierung

Wie alle interessanten Klone wurde auch 17B4 subkloniert, um eine möglichst stabile, stark antikörperproduzierende, hochaffine Zellreihe zu isolieren. Hierfür wurden die Zellen des Ausgangsklons auf eine Zelle pro Well vereinzelt, hochgezogen und anschließend in der Aktivität der gebildeten Antikörper mit den bereits beschriebenen Methoden verglichen.

17B4.G3 zeigte ein stärkeres Signal im ELISA als seine Geschwisterklone, zumal einer von diesen (17B4.C8) auch in der Fluoreszenz kein Signal verursachen konnte, was jedoch auch auf eine zu geringe Konzentration infolge einer noch nicht ausreichenden Antikörperproduktion zurückzuführen gewesen sein könnte.

Bei der zweiten Subklonierung, bei welcher mit einem ELIFA untersucht wurde, wurde letztlich der Subklone B12 ausgewählt, weil dieser etwas stärkere Signale zeigte (also in höherer Konzentration vorlag) als die anderen Subklone von 17B4.G3.

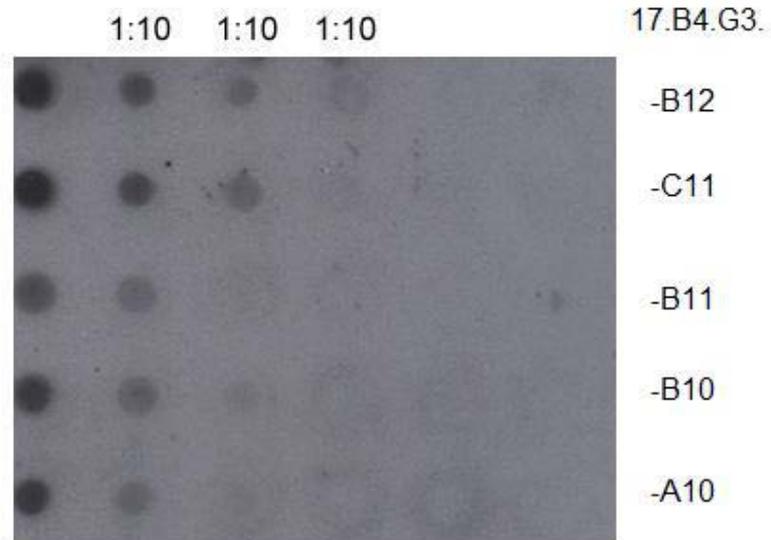


Abb. 3.8 ELIFA; Subklonierung von 17B4.G3; Im einem ELIFA wurden die Überstände der Klone in aufsteigender Verdünnung (je 1:10, Ausgangsmaterial ganz links) aufgetragen und mittels Sekundärantikörper markiert. Hierbei erschienen die Antikörperkonzentrationen in den Überständen von 17B4.G3.B12 und -C11 am größten.

3.2.2 Isotyp des Antikörpers

Bei 17B4 handelte es sich um einen Antikörper des Isotyps IgG₁.

3.2.3 Untersuchung unterschiedlich glykosylierter Formen von PrP mit 17B4

Wie bereits erwähnt fiel bei 17B4 im Western Blot auf, dass der Antikörper nur zwei Banden des PrPs markiert hat und die obere, die diglykosylierte, Bande nicht markiert wurde. Hieraus wurde abgeleitet, dass der Antikörper glykoformspezifisch sein könnte. Im folgendem Versuch wurde dies genauer untersucht. Es sollte auch die Frage beantwortet werden, welche der beiden Glykoformen der Antikörper bindet.



Abb. 3.9: Zeichnung nach Manson et al. (Manson J. C. 2001). Eingezeichnet sind die beiden fakultativen Glykosylierungsstellen (-CHO) bei Aminosäure 180 und 196.

In diesem Versuch waren CHO Zellen mit Vektoren transfiziert worden, so dass sie selektiv bestimmte monoglykosylierte Formen des PrPs exprimierten (Korth C. 2000). Die N180Q Form war an der Glykosylierungsstelle 1 (G1) nicht glykosyliert, die N196Q Form an der Glykosylierungsstelle 2 (G2) nicht. Diese Zellen wurden zur Konfluenz gebracht, lysiert und im Western Blot aufgetragen.

In dem mit W226 entwickelten Blot, zeigte sich im Homogenat des Mäusegehirns das typische dreibandige PrP Muster. Die obere Bande doppelt, die mittlere einfach und die untere gar nicht glykosyliert. Derselbe Antikörper zeigte bei den Lysaten der transfizierten CHO Zellen lediglich zwei Banden, die einfach und die nicht glykosylierte Form.

17B4.G3 zeigte auch beim Mäusegehirn nur diese beiden Banden. Beim MHM2PrP(N180Q) Konstrukt (G1) wurde nur die unglykosylierte Bande schwach markiert. Beim MHM2PrP(N196Q) Konstrukt (G2) hingegen wurden dieselben Banden erkannt, wie im Mäusegehirn, also die monoglykosylierte und die unglykosylierte.

Der Vektor ohne PrP kodierende Sequenz (pCDNA) wurde von keinen der Antikörper erkannt.

Da 17B4 nur an das Lysat der Zellen mit dem G2 Konstrukt gebunden hat, welches an Aminosäure 196 nicht glykosyliert sein konnte, musste die Bindungsstelle des Antikörpers entweder im Bereich dieser Position liegen oder aber an einer von diesem Zuckerrest verdeckten Stelle. Folglich erkannte 17B4 unglykosyliertes PrP und solches, welches nur an Aminosäure 180 glykosyliert war.

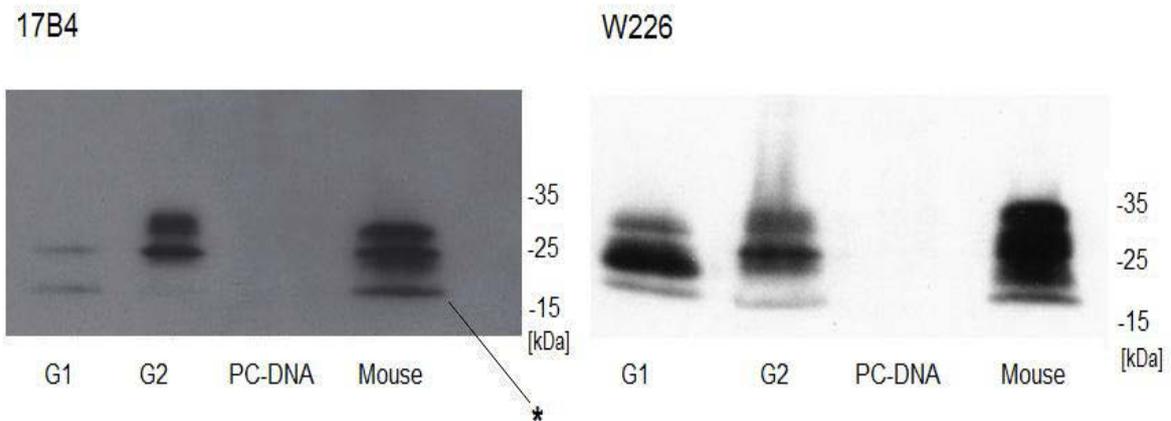


Abb. 3.1 0: Western Blot; Zellen wurden im Western Blot aufgetragen. G1 - MHM2PrP(N180Q); G2 - MHM2PrP(N196Q); PC-DNA – Vektor ohne kodierende Sequenz; Mouse – Mausgehirnhomogenat. Diese Lyse wurden einmal mit 17 B4 (links) und einmal W226 (rechts) inkubiert.

W226/Mouse zeigte die klassische Dreierbande des PrP. W226/G1 und W226/G2 zeigten zwei Banden (monoglykosyliert oben, diglykosyliert unten). 17 B4 zeigte Doppelbanden bei Mouse und G2 (mono- und unglykosyliert). Bei 17B4/G1 ist lediglich die unglykosylierte Bande zu sehen, 17B4 konnte bei diesem Lysat die monoglykosylierte Form nicht binden. Der Vektor ohne Konstrukt (pCDNA) wurde von keinem Antikörper erkannt. Bei der mit Stern (*) markierten Bande handelt es sich um ein PrP Fragment.

Da 17 B4 nur bei G2 Konstrukt, welches nur an Aminosäure 180 glykosyliert sein konnte, gebunden hat, muss dieser Antikörper für diese Glykoform spezifisch sein. Die Bindungsstelle des Antikörpers liegt entweder im Bereich der bei diesem Konstrukt nicht glykosylierten Aminosäure 196 oder aber an einer vom diesem dortigen Zuckerrest verdeckten Stelle.

3.2.4 Immunpräzipitation mit 17B4.G3

Auch dieser Versuch drehte sich um die Glykoformspezifität des Antikörpers. Es sollte überprüft werden, ob auch bei der Präzipitation aus Gehirnhomogenaten nur un- und monoglykosyliertes PrP gebunden wurde. Hierfür wurde eine Immunpräzipitation von PrP mit 17B4.G3 aus normalen Mäusegehirn vorgenommen. Zum Vergleich wurde auch mit dem Antikörper 19C4 präzipitiert.

In allen Homogenaten und Überständen erkannte der Primärantikörper W226 sämtliche drei Glykosylierungsformen des PrPs. Zwischen dem Überstand des zentrifugierten Homogenates und dem Überstand nach der Interaktion des Homogenates mit Protein G ließ sich kein Unterschied erkennen. In der Negativkontrolle (Protein G ohne Antikörper, zum Ausschluss unspezifischer Bindungen von PrP an das Protein G, Lane 4) konnte kein Signal erkannt werden.

Die von 17B4.G3 präzipitierten Proteine stellten sich in zwei Banden dar (Lane 7), entsprechend der unglykosylierten und der monoglykosylierten PrP Bande.

Die von 19C4.F8 präzipitierten Proteine stellten sich erwartungsgemäß dreibandig dar (Lane 3), da dieser Antikörper auch die doppelt glykosylierte Form zu binden vermochte.

Die Zugabe von Kupfer führte zu keiner Veränderung des Bandenmusters. Auch die in einem zweiten Versuch, wie im Methodenteil beschrieben, später durchgeführte Zugabe von Kupfer, ergab keine Änderungen.

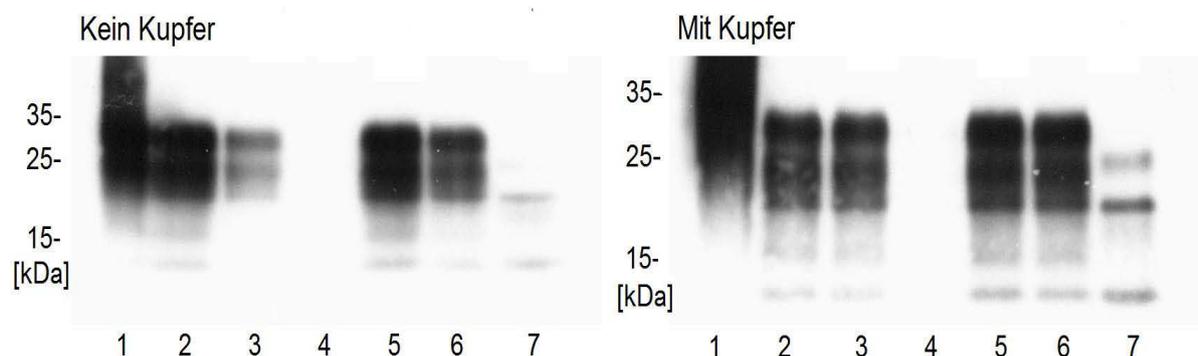


Abb. 3.11:

Lane	1	2 3	4	5 6 7			
Überstand	Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat	Präzipitat Protein G Ohne AK	Überstand Homogenat 10%	Überstand Homogenat 1%	Präzipitat
AK	Keiner	Keiner	19C4	Keiner	Keiner	Keiner	17B4

Immunpräzipitation von Mäusegehirn mit 17B4.G3 (Lanes 5-7) und 19C4.F8 (Lanes 1-3) bzw. ohne Zugabe eines Antikörpers (Lane 4). Die Lanes 1 und 5 zeigen jeweils den Überstand nach Abzentrifugieren des Homogenates; die Lanes 2 und 6 den Überstand nach Interaktion des Antikörper-Agarose Komplexes mit dem Antigen. In Lane 3 ist das dreibandige Präzipitat von 19C4.F8 zu sehen, in Lane 7 das doppelbandige Präzipitat von 17B4.G3. Die Zugabe von Kupfer (rechts) verursacht keinen signifikanten Effekt.

3.2.5 Immunfluoreszenz mit 17B4 und 19C4

Wie bereits beschrieben zeigten sich bei den ersten Immunfluoreszenzuntersuchungen von 17B4 punktförmige Strukturen. Ob es sich bei diesen Strukturen um Artefakte handelte oder ob sie replizierbar wären, sollte mit diesem Versuch festgestellt werden. Auch sollten die beiden Antikörper 19C4 und 17B4 und ihr Färbeverhalten gegenüber ScN2a und N2a Zellen verglichen werden.

In diesem Versuch wurden die beiden Antikörper 17B4.G3 und 19C4.F8 gegen unterschiedliche Zellen auf ihr Bindungsverhalten untersucht. Dabei wurden N2a Zellen, ScN2a Zellen und QCC (Quinacrin cured ScN2a cells) verwendet. Untersucht wurde mittels Immunhistochemie unter Verwendung von Alexa Fluor 594 als Sekundärantikörper. Durch das DAPI-haltige Eindeckelmedium wurden die Zellkerne markiert, diese erscheinen als helle Strukturen auf den Bildern.

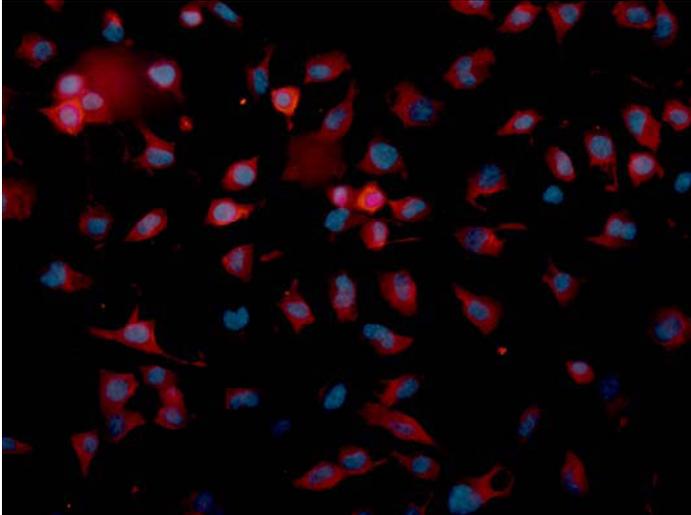


Abb. 3.12: Immunfluoreszenz von ScN2a-Zellen; Primäranikörper 19C4.F8

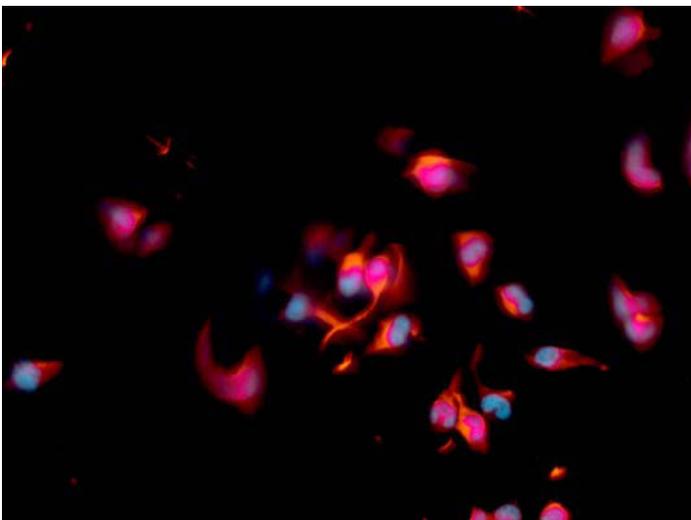


Abb. 3.13: : Immunfluoreszenz von N2a-Zellen; Primäranikörper 19C4.F8

19C4.F8 lieferte bei allen Zelltypen deutliche Signale, zwischen diesen bestanden keine Unterschiede.

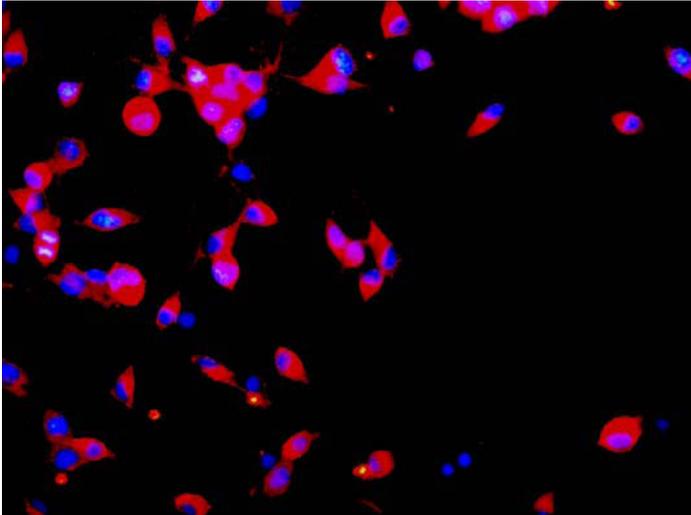


Abb. 3.14: Immunfluoreszenz von ScN2a-Zellen; Primäranikörper 17B4.G3

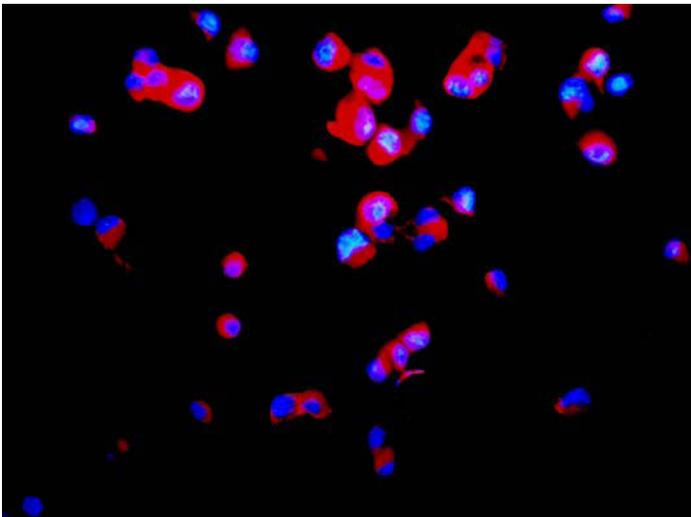


Abb. 3.15: Immunfluoreszenz von N2a-Zellen; Primäranikörper 17B4.G3

Auch 17B4.G3 liefert gute Signale, Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen konnten nicht ausgemacht werden. Im direkten Vergleich der beiden Antikörper schien 19C4.F8 leicht stärker anzufärben, dies konnte jedoch nicht sicher bestätigt werden.

Die initial gesehenen, von 17B4.G3 markierten punktförmigen Strukturen wurden nicht mehr beobachtet, es musste daher von einem Artefakt bei den zunächst erhaltenen Ergebnissen ausgegangen werden.

3.2.6 17B4 und Creutzfeldt-Jakob-Disease

Bei diesem Versuch wurden Homogenate unterschiedlicher Prionenstämme von an der Creutzfeldt-Jakob Krankheit verstorbenen menschlichen Individuen mittels Western Blot aufgetrennt und mit anschließender Markierung mit 17B4.G3 bzw. 19C4.F8 untersucht. Ziel war es zu untersuchen, ob die beiden Antikörper suffizient an menschliches PrP zu binden vermögen und ob der glykoformspezifische Antikörper 17B4 dazu in der Lage ist, menschliche Prionenstämme zu charakterisieren. Trotz anfänglich interessanter und vielversprechender Ergebnisse sind abschließende, verallgemeinernde Aussagen nur schwer zu machen, da die zur Verfügung stehende Zahl an hochwertigen Homogenaten sehr gering war.

17B4.G3 hat an menschliches PrP gebunden und markierte auch hier lediglich die mono- und die unglykosylierte Form. Dabei wurde im Bereich der unglykosylierten Form ein doppelbandiges Muster beobachtet. Dieses schien vor allen bei der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung zu erscheinen. Leider war die Zahl an zur Verfügung stehenden Homogenaten zu gering, um dies zu verallgemeinern. Das selbe Muster konnte auch vereinzelt in unterschiedlichen menschlichen Gehirnhomogenaten von nicht an einer Prionenerkrankung leidenden Individuen gefunden werden. Des Weiteren wurden bei einigen Homogenaten deutlich abweichende Bandenmuster entdeckt (z.B. bei 1689VV [Lane 3]).

19C4.F8 hat ebenfalls an menschliches PrP gebunden und markierte alle drei Glykoformen. Bei diesem Antikörper erschien keine Doppelbande im Bereich der unglykosylierten Form.

Da das besagte Muster auch beim gleichen Homogenat nicht immer replizierbar war, bleiben die Ergebnisse unschlüssig. Es wäre denkbar, dass 17B4.G3 aufgrund der Lage seiner Bindungsstelle eine feinere Auflösung bietet als 19C4.F8 und sich die monoglykosylierte Fraktion des menschlichen PrPs bei einigen Individuen tatsächlich aus mehreren, mit diesem Antikörper differenzierbaren Anteilen, zusammensetzt.

Auch unter Nutzung unterschiedlicher Gele, wie z.B. Tricin-Gele zur Verbesserung der Auflösung im niedermolekularen Bereich, war es nicht möglich, diese Fragen mit letzter Sicherheit zu beantworten. Hierzu sind weitere Experimente notwendig.

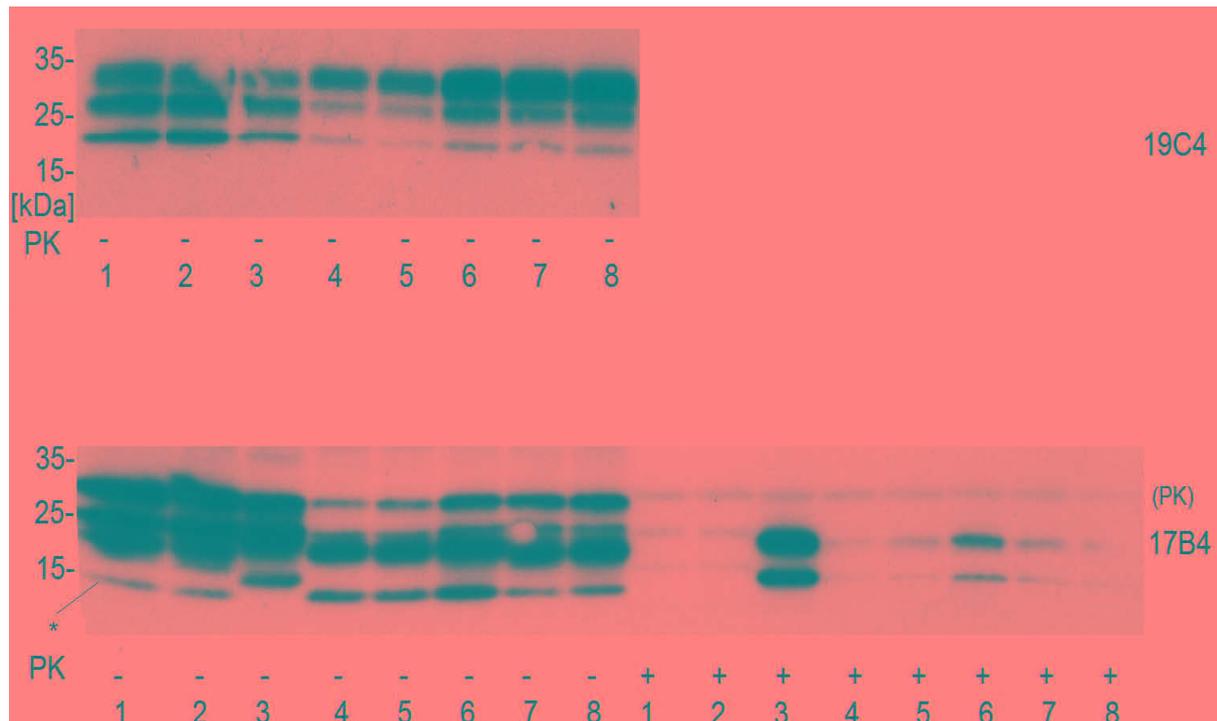


Abb. 3.16 Western Blot von CJD positiven Homogenaten. Primärantikörper 19C4.F8 (oben) und 17B4.G3 (unten)

1- 16 66MM (Methionin-Methionin); 2- 1712 mM ; 3- 1689VV (Valin-Valin); 4- 17 33VV; 5- Roll69 vCJD (neue Variante von CJD); 6- Roll98 vCJD; 7- R02/03 v CJD; 8- R0 3/05 vCJD; Molekulargewicht auf der Ordinate in kDa.

Oben ist die typische Dreierbande des PrPs zu sehen. Die unglykosylierte Form zeigt ein doppelbandiges Muster.

Unten ist in den Banden 4-8 der unverdauten Homogenate (PK-) ein doppelbandiges Muster bei der unglykosylierten Form zu erkennen. Die mit Stern (*) markierten Banden sind am ehesten Fragmente unterhalb der unglykosylierten Form. Die obere Bande bei den verdauten Homogenaten (PK) ist ein Protease K bedingtes Artefakt.

3.2.7 Zusammenfassung 17B4

Bei 17B4 handelte es sich um einen IgG₁ Antikörper gegen das PrP. Dieser Antikörper vermochte sowohl Maus PrP als auch menschliches PrP zu binden. Aufgrund seiner Bindungsstelle erkannte der Antikörper nur PrP, welches an der Aminosäure 196 nicht glykosyliert war. Dies tat er sowohl im Western Blot als auch in der Immunpräzipitation, bei beiden beschriebenen Spezies. Der Antikörper war zur Immunfluoreszenz geeignet, sowohl von N2a Zellen als auch von ScN2a Zellen, obwohl davon ausgegangen werden musste, dass 17B4 an die pathologische PrP^{Sc} Form nicht zu binden vermag (siehe unten – Abschnitt 19C4). Die Tauglichkeit des Antikörpers zur Charakterisierung von CJD-Gehirnen konnte nicht abschließend beurteilt werden, es gab jedoch Hinweise, dass eine detaillierte Beschreibung unterschiedlicher Glykosylierungsmuster möglich wäre.

3.3 19C3 und ^{CTM}PrP

Ziel dieser Arbeit war auch die Charakterisierung eines Antikörpers gegen ^{CTM}PrP. Die durchgeführten Screening Versuche mit ELISA, ELIFA und Fluoreszenz führten zunächst zu keinen überzeugenden Kandidaten. Daher wurden zahlreiche antikörperhaltige Überstände zur Arbeitsgruppe von V. Lingappa nach San Fransisco geschickt. Dort wurden Immunpräzipitationen mit radioaktiv markierten Konformeren des PrPs durchgeführt. Diese Konformere waren in zellfreien Systemen gewonnen worden und dabei durch Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert worden. Nach der Immunpräzipitation konnte die Radioaktivität der geblotteten Präzipitate registriert werden. Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich, dass 19C3 eine Präferenz für ^{CTM}PrP besaß. Diese Entdeckung führte dazu, dass in den eigenen Immunpräzipitationen 19C3 besondere Aufmerksamkeit erhielt.

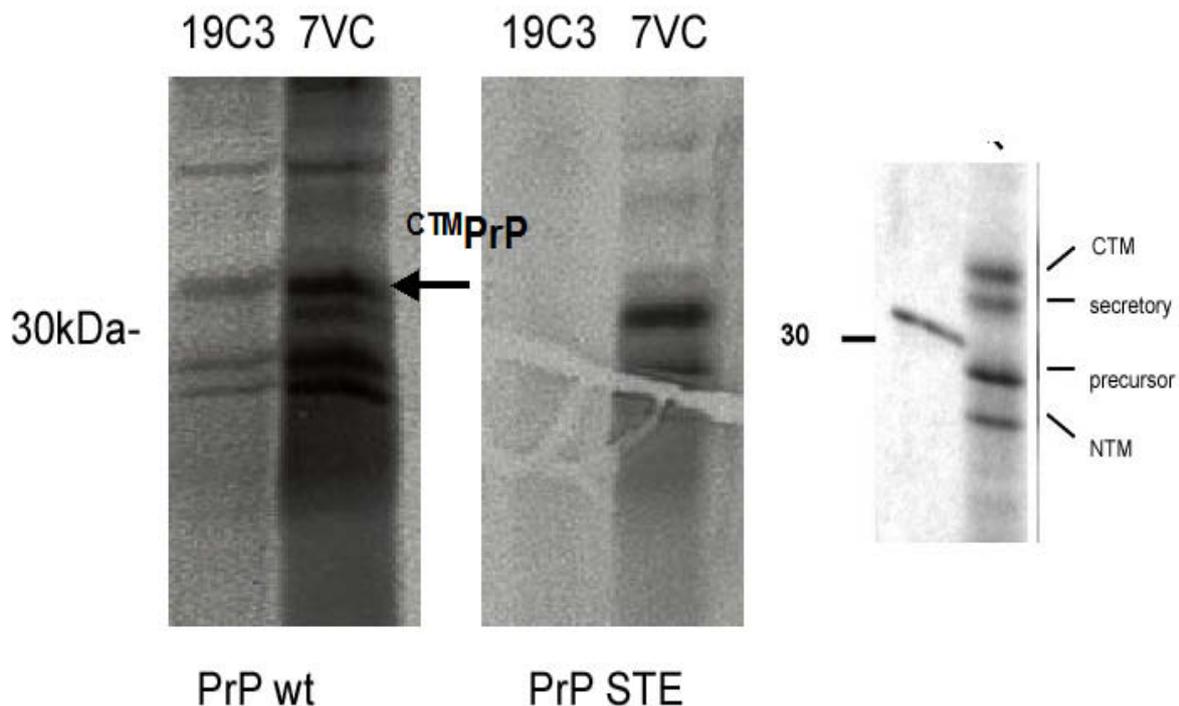


Abb. 3.1 7: Immunprä zipitation mit radioa ktiv markierten in v itro tran slatierten Prion Konformeren.

PrP wt- Wildtyp PrP; PrP STE- Mutante, welche kein CTM bildet;

19C3 prä zipitierte da s CTM, nicht das se kretorische PrP. Der Ko ntrollantikörper 7VC prä zipitierte beide Formen. 19C3 prä zipitierte nichts aus der PrP STE-Mutante, 7VC die sekretorische Form. Hierdurch k onnte g ezeigt werden, d ass 19 C3 l ediglich da s ^{CTM}PrP Konformer bindet, nich t jedoch die sekre torische Form. (Arbeitsgr u ppe V. Lingappa, San Fransisco)

3.3.1 Subklonierung

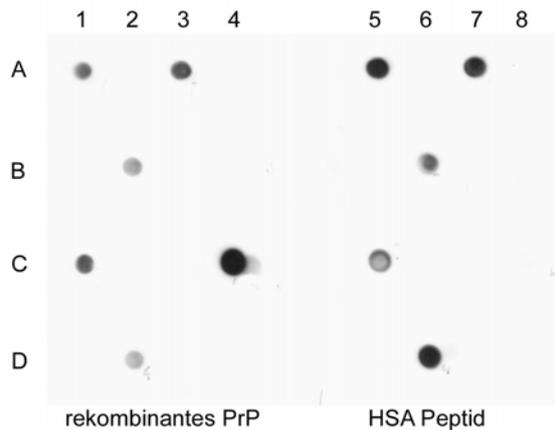
Auch 19C3 wurde subkloniert, um eine möglichst stabile, stark antikörperproduzierende, Zellreihe zu isolieren. Hierfür wurden die Zellen des Ausgangsklons auf eine Zelle pro Well vereinzelt, hochgezogen und anschließend in der Aktivität der gebildeten Antikörper verglichen.

Im ersten Subklonierungsschritt wurde versucht einen im ELIFA gegen ^{CTM}PrP Hirnhomogenat möglichst aktiven Klon zu isolieren. Leider zeigte sich, dass alle untersuchten Klone gleichermaßen schwach aktiv waren, daher wurde der Klon ausgewählt, der am schnellsten gewachsen war. Dies war 19C3.C7. Keiner der Klone zeigte Aktivität gegen BSA im ELISA.

Im einen zweiten Subklonierungsschritt wurde im ELIFA gegen rekombinantes PrP und HSApeptid (hierbei handelte es sich um rekombinant hergestelltes Antigen von 19C3 , gebunden an HSA) untersucht. Dabei erkannten alle Klone das an HSA gebundene Peptid trotz dessen 5fach geringeren Konzentration deutlich besser als das denaturierte rekombinante PrP. Ein Klon zeigte ein stärkeres Signal als die restlichen und wurde folglich selektioniert (19C3.C7.D11).

Der dritte Subklonierungsschritt entsprach dem zweiten und führte zum Subklon 19C3.C7.D11.D12 (Well D2/D6 in Abbildung 3.18). Dieser Klon wuchs schneller als der ebenfalls gut bindende Subklon 19C3.C7.D11.G9 (A3/A7).

Der anti-Mouse IgG POD Antikörper erkannte weder das rekombinante PrP noch das HSApeptid. Eine Wechselwirkung zwischen diesen Substanzen kann also ausgeschlossen werden. Der W226 Antikörper erkannte das rekombinante PrP, nicht jedoch das an HSA gebundene Peptid, was den Erwartungen entsprach, da die Bindungsstellen von 19C3 und W226 nicht identisch sind. Keiner der Antikörper erkannte BSA im ELISA.



Position	Zellkolonie
A1/A5	B4
A3/A7	G9
B2/B6	C9
C1/C5	D8
C4/C8	W226
D2/D6	D12

Abb. 3.18: Subklone von 19C3. C7.D11; Die Abbildung zeigt ein ELISA der Subklone der antikörperbildenden Zellen. Die Membran wurde mit rekombinanten PrP (links) bzw. mit an HSA gebundenes 19C3 Antigen (rechts, HSA Peptid) beladen. Der Klon -D12 in Position D2/D6 zeigt das stärkste Signal.

3.3.2 Isotyp

Der Antikörper 19C3 war ein IgG₁ Isotyp.

3.3.3 Epitop des Antikörpers

Das Epitop von 19C3 hatte die Sequenz VYYRPVD, es handelte sich um die im Bereich des beta Faltblatt 2 lokalisierten Aminosäuren 161-167.

3.3.4 Klone der Immunisierung mit dem 19C3 Peptid

Um einen besseren Antikörper gegen ^{CTM}PrP zu gewinnen wurde eine Maus mit einem Peptid, das dem Epitop von 19C3 entsprach, immunisiert. Bei dieser Fusion wurden relativ wenige Klone (21) gezählt. Einzelne Klone (8) wurden weiteruntersucht, von denen einer (3F11-D6) nach Subklonierung trotz relativ schwacher Signale zur Untersuchung in Immunpräzipitationsexperimenten weitergezogen wurde. Hier zeigte er jedoch keine Bindung im Sinne einer ^{CTM}PrP Spezifität.

3.3.5 Kalter PK-Verdau

Um für die Immunpräzipitation mit 19C3 geeignete Homogenate zu finden, mussten diese auf ihren Gehalt an ^{CTM}PrP überprüft werden. Dazu wurde ein kalter PK-Verdau durchgeführt (Hegde R. S. 1998a). Hierbei wurde Gehirnhomogenat unter speziellen, „milden“ Bedingungen verdaut, was zum Verdau von normalen, sekretorischen PrP ausreichend war. Transmembranäres PrP hingegen wurde nur teilweise verdaut und

war im Western Blot nachweisbar. Die Methode ist ursprünglich von Hedge et al. (Hegde R. S. 1999) beschrieben worden und wurde im Rahmen dieser Arbeit in leicht modifizierter Art und Weise verwendet.

Bei diesem Versuch wurden Homogenate einer normalen Maus und einer KHII Maus in Bezug auf ihren Gehalt an ^{CTM}PrP verglichen. Bei KHII handelte es sich um eine transgene Maus, welche mutiertes Hamster PrP bildete [Tg(ShaPrP)KH->II] (Hegde R. S. 1998a). Dies hatte einen überproportionalen Anteil an ^{CTM}PrP zur Folge. In diesem Versuch konnte, analog zu den Beschreibungen von Hedge et al. (Hegde R. S. 1999), gegenüber kaltem PK Verdauung resistentes Material im Homogenat der KHII Maus nachgewiesen werden.

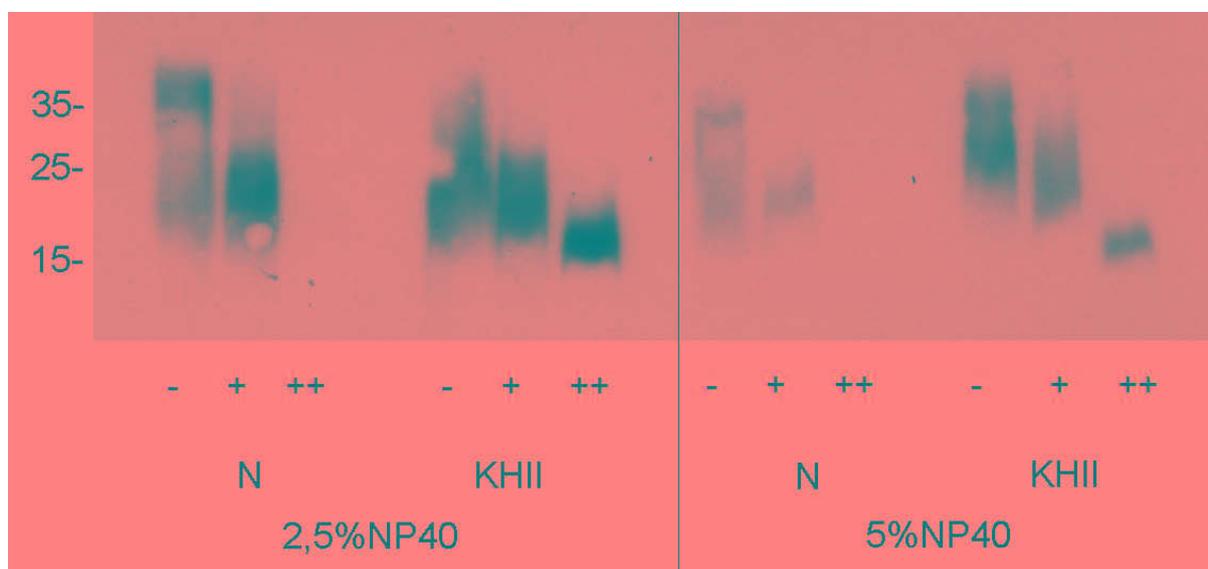


Abb. 3.19: Kalter PK Verdauung, Western Blot. Es wurde normales Gehirn (N) und KHII Gehirn (KHII) verwendet. Die Proben wurden gar nicht (-), nur mit Protease K 500 µg/mL (+) oder mit Protease K 500 µg/mL und NP 40 2,5% bzw 5% (++) verdaut. Im KHII Homogenat lässt sich mittels W226 und POD markierten Antikörper resistentes Material zwischen 15 und 20 kDa (Ordinate in kDa) nachweisen.

Bei Zugabe von NP 40 wurde das normale Gehirnhomogenat komplett verdaut, wohingegen das KHII Homogenat teilweise resistent war. Das sekretorische PrP im normalen Gehirn war nach Zerstörung der membranären Strukturen durch das Detergens der Protease K schutzlos ausgeliefert. Das ^{CTM}PrP war durch seine enge Membranbindung besser geschützt und relativ kleine Fragmente des PrPs blieben unter den „milden“ Bedingungen bei ca. 0° C auf Eis unverdaut. Auf diese Weise getestetes Homogenat wurde für die folgenden Immunpräzipitationen verwendet.

3.3.6 Immunpräzipitation mit Gehirnhomogenaten und anti-PrP

Antikörpern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunpräzipitationen mit unterschiedlichen Gehirnen (Wildtyp-Maus, Scrapie-Maus, ^{CTM}PrP-Maus, s.u.) und Antikörpern durchgeführt. Hierbei ging es vor allen darum die Ergebnisse aus San Fransisco zu bestätigen und die Spezifität von 19C3 für ^{CTM}PrP weiter zu untersuchen. Des weiteren sollte das Bindungsverhalten verschiedener Antikörper an Homogenaten beschrieben werden.

Anmerkung zu den verwendeten Gehirnen:

7BH entsprach der Linie A3922 [Tg(SHaPrP)/Prnp^{0/0}] (*Hegde R. S. 1998a*). Hierbei handelte es sich um transgene Mäuse, welche Hamster PrP auf einem PrP knock out Hintergrund bildeten, das heißt sie bildeten kein endogenes MausPrP.

Bei KHII handelte es sich um eine transgene Maus, welche mutiertes Hamster PrP bildete [Tg(ShaPrP)KH->II] (*Hegde R. S. 1998a*). Dies hatte einen überproportionalen Anteil an ^{CTM}PrP zur Folge, was zuvor mit der Methode des kalten PK-Verdaus bestätigt wurde.

Normale Mäuse entsprachen dem Wildtyp.

Scrapie Mäuse waren an der mit PrP^{Sc} assoziierten Prionerkrankung erkrankt.

19C4.F8

19C4.F8 vermochte bei allen vier Homogenaten deutliche Banden zu verursachen, was auf eine starke Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen hindeutete. Dabei ließ sich kein quantitativer Unterschied zwischen den Homogenaten feststellen. (zu 19C4 siehe auch den betreffenden Abschnitt)

19C3.C7

Diesem Antikörper galt die Hauptaufmerksamkeit bei dem Versuch. Er präzipitierte in allen Versuchen PrP aus dem KHII Homogenat. Aus dem 7BH Homogenat wurde kein Antigen präzipitiert. Normalhirn wurde in den Versuchen nicht präzipitiert. Aus Gehirnen von Scrapie infizierten Mäusen wurde prionhaltiges Material präzipitiert.

Weitere Antikörper

Weitere Antikörper wurden zu selten getestet, um sichere Aussagen über ihr Bindungsverhalten machen zu können (5E11, 6D4, 34F11). 17B4.G3 wurde bereits in einem gesonderten Abschnitt besprochen.

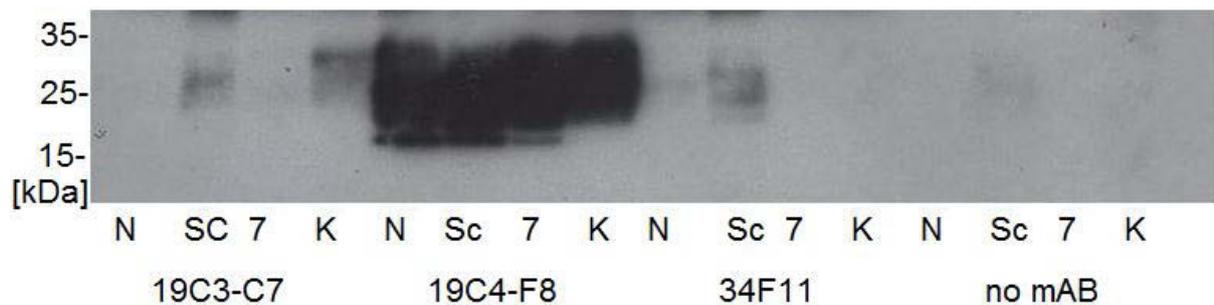


Abb. 3.20: Immunpräzipitation/Western Blot. Gezeigt wird die Präzipitation von vier unterschiedlicher Homogenate; N – Normale Maus; Sc – PrP^{Sc} Maus; 7 – 7BH Mäuse; K – KHII Maus; Es wurden drei unterschiedliche Antikörper verwendet (19C3.C7; 19C4.F8; 34F11) und eine Kontrolle ohne Antikörper mit Homogenat und Protein A (no mAB). Ordinate: Molekulargewicht in kDa; 19C3.C7 präzipitierte PrP sowohl aus dem KHII als auch aus dem Sc Homogenat. 19C4.F8 präzipitierte aus allen Homogenaten. Somit ist 19C3 spezifisch für ^{CTM}PrP.



Abb. 3.21: Immunpräzipitation/Western Blot. Zweites, unabhängiges Experiment zu Abb. 3.20; Gezeigt wird die Präzipitation zweier unterschiedlicher Homogenate; N – Normale Maus; K – KHII Maus; Es wurden zwei unterschiedliche Antikörper verwendet (19C3.C7.D11.D8 (19C3); 19C4.F8) und eine Kontrolle ohne Antikörper mit Homogenat und Protein A (no mAB). Des Weiteren wurde reines Homogenat aufgetragen, um den PrP Gehalt der Homogenate vergleichen zu können. Ordinate: Molekulargewicht in kDa; 19C3.C7 präzipitierte PrP aus dem KHII Homogenat. 19C4.F8 präzipitierte aus beiden Homogenaten. Auch dieser Versuch zeigt, dass 19C3 spezifisch für ^{CTM}PrP ist.

Kalter PK-Verdau

Es wurde versucht, die Präzipitate einem kalten Protease K Verdau zu unterziehen, um präzipitiertes ^{CTM}PrP direkt nachweisen zu können. Trotz Anwendung unterschiedlicher Protease K Konzentrationen ist es leider nicht gelungen, einen erfolgreichen Verdau zum Nachweis von ^{CTM}PrP durchzuführen. Die Proben wurden immer über- oder unterverdaut. Als Ursache wurde vermutet, dass die Konzentration des PrPs in den Präzipitaten einer gewissen Variabilität unterlagen und dadurch die Einstellung geeigneter Verdaubedingungen für diesen sehr empfindlichen Verdau stark erschwert war.

Calorie restricted Maus

Hier wurde versucht aus dem Gehirn einer Maus zu präzipitieren, die unter kalorienreduzierten Bedingungen gelebt hatte. Kalorienreduktion vermag die Lebenserwartung zu verlängern und die Inzidenz altersassoziierter Erkrankungen bei Nagetieren zu reduzieren (Le Bourg E. 2005). Es stellte sich die Frage, ob es im Rahmen des Alterns zu einen Anstieg an ^{CTM}PrP kommt und ob dieser in Bezug zur Ernährung steht.

In keinen der beiden verwendeten Homogenate (Kalorienreduziert und nicht kalorienreduziert) konnte ^{CTM}PrP nachgewiesen werden, wohl aber PrP mit 19C4.F8.

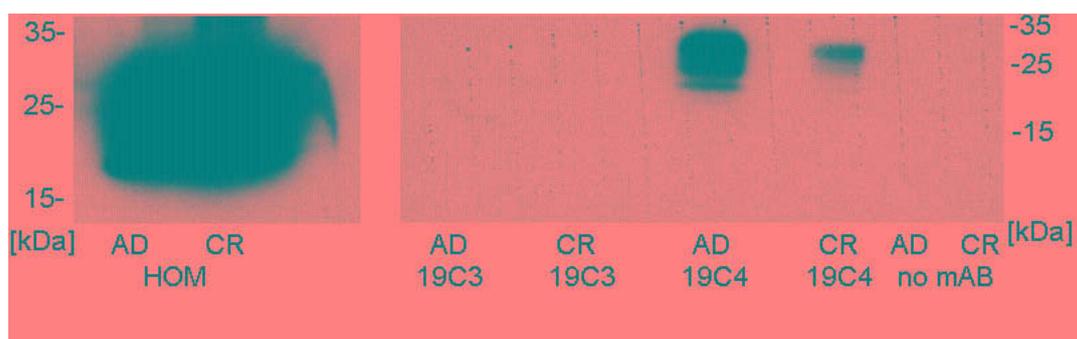


Abb. 3.2 2: Immunpräzipitation/Western Blot mit 19C3.C7. D1.D8 (19C3) und 19C4.F8 (19C4). Präzipitiert wurden Gehirnhomogenate einer calorie reduzierten Maus (CR) und einer altersgleichen, nicht kalorienreduzierten Maus (AD). Ordinate: Molekulargewicht in kDa; 19C3 präzipitierte aus keinen der beiden Gehirne, wohingegen 19C4 aus beiden Prionmaterial präzipitierte. An den aufgetragenen Homogenaten ist zu erkennen, dass ausreichend PrP in den Gehirnen vorhanden war. In der Kontrolle ohne Antikörper (no mAB) aber mit Protein A und Homogenat wurde nichts präzipitiert.

3.3.7 Zusammenfassung 19C3

Bei 19C3 handelte es sich um einen IgG₁ Antikörper gegen das PrP mit einer Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 161-167 (VYYRPVD). In der Immunfluoreszenz zeigte der Antikörper eher schwache Ergebnisse. Im ELISA wurden beide verwendeten Homogenate nur schwach gebunden. Durch Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper aus ^{CTM}PrP und aus PrP^{Sc} haltigen Homogenaten zu präzipitieren vermag, jedoch aus normalen Mäusegehirnen nicht präzipitiert. Hieraus wurde auf eine Spezifität des Antikörpers für ^{CTM}PrP geschlossen.

3.4 19C4- ein universeller Anti-Prion Antikörper

3.4.1 Subklonierung

Bei der Subklonierung von 19C4 wurde 19C4.F8 ausgewählt, da er deutlich stärkere Signale in der Fluoreszenzmessung verursachte, als die parallel untersuchten Subklone.

3.4.2 Isotyp

Auch bei 19C4 handelte es sich um einen Antikörper des Isotyps IgG₁.

3.4.3 Epitop

Das Epitop von 19C4 hatte die Sequenz NDWEDRY, es handelte sich um die Aminosäuren 143-149, welche zur Helix 1 gehören.

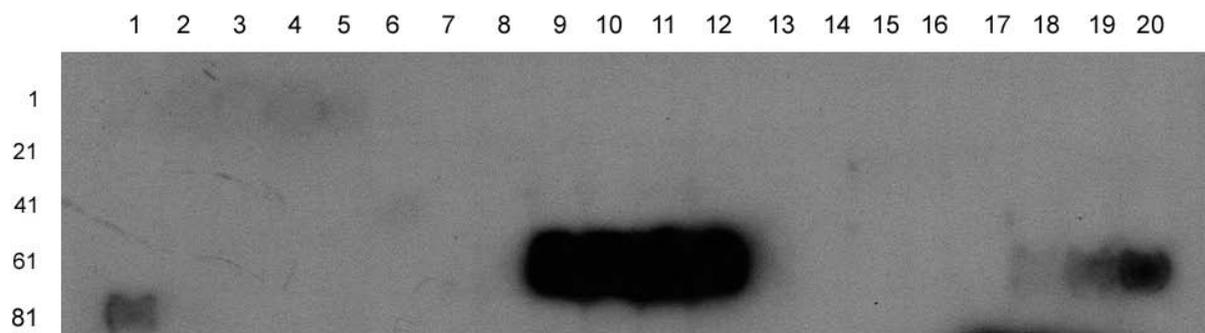


Abb. 3.23: Bindungsstelle 19C4/Peptide Library; Die Pep tidspots 69-72 wurden markiert, was den Aminosäuren 143-149(NDWEDRY) entsprach.

3.4.4 Immunpräzipitation mit PrP^{Sc}

In diesem Versuch wurde das Bindungsverhalten der Antikörper 17B4.G3 und 19C4.F8 gegenüber der pathologischen Isoform des PrPs untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob diese beiden Antikörper PrP^{Sc} binden. Hierfür wurde zunächst PrP aus Homogenaten an Scrapie erkrankter Mäuse präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend mit Protease K verdaut.

Die beiden Antikörper präzipitierten sowohl aus dem normalen (N) als auch aus dem Scrapie infizierten (Sc) Gehirn PrP. Nach dem Verdau mit Protease K war kein PrP mehr sicher nachweisbar, daher musste davon ausgegangen werden, dass die pathologische Isoform des Proteins von den beiden Antikörpern nicht gebunden wurde. In der Kontrolle ohne Antikörper konnte kein PrP nachgewiesen werden, eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Protein A und PrP war somit ausgeschlossen.

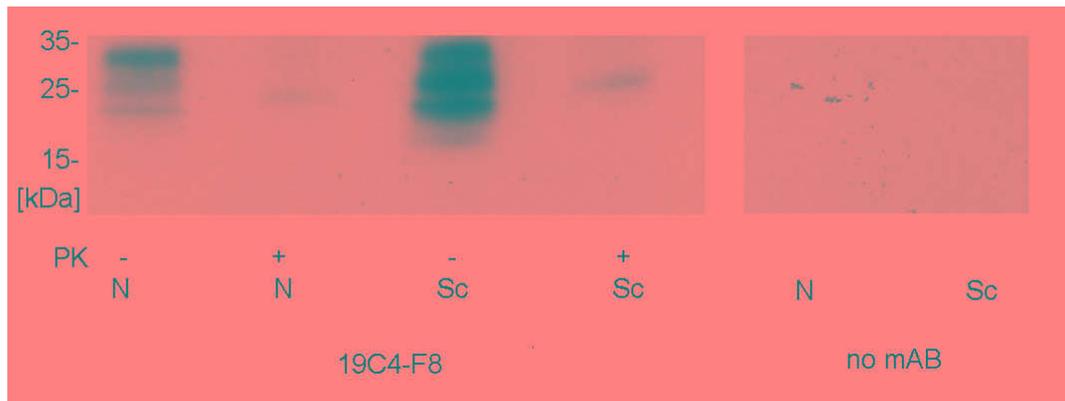


Abb. 3.24: Immunpräzipitation/Western Blot. Verwendet wurden normales Mäusegehirn (N) und scrapiehaltiges Mäusegehirn (Sc); PK- : kein Protease K Verdau; PK+ : Protease K Verdau; Ordinate: Molekulargewicht in kDa; 19C4.F8 präzipitierte aus beiden Homogenaten prionhaltiges Material, welches nicht Protease K resistent war. Die Kontrolle ohne Antikörper mit Protein A (no mAB) war negativ. Daraus folgt, dass 19C4 die pathologische Form des PrPs in Lösung nicht zu binden vermag.

3.4.5 Behandlung von Prion infizierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern

Im Rahmen dieses Experiments wurde versucht, die Konzentration von PrP^{Sc} in ScN2a Zellkulturen durch Behandlung mit monoklonalen Antikörpern zu vermindern bzw. dauerhaft unter die Nachweisgrenze zu drücken. Grundlage waren die Versuche von Peretz et al. (Peretz D. 2001), die zeigen konnten, dass die Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen das sekretorische PrP eine dosisabhängige Reduktion des PrP^{Sc} verursachen konnte.

In ersten orientierenden Versuchen mit nicht aufgearbeiteten Überständen antikörperproduzierender Zellen wurden zunächst einige potentielle Kandidaten gesichtet, deren Antikörper im folgenden, wie bereits beschrieben, aufgereinigt wurden. Bei den Therapieversuchen mit diesen aufgereinigten Antikörpern konnte kein eindeutiges Ergebnis gewonnen werden. Daraufhin wurde versucht, Zellen mit Antikörpern, welche mittels Ammoniumsulfat präzipitiert worden waren, zu therapieren. Nach Abschluss dieser Versuche kann leider nicht gesagt werden, dass die verwendeten Antikörper einen antiprion Effekt in in-vitro Versuchen hätten. Es muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass sie einen solchen nicht haben.

Zusätzlich zu den Anti-Prion Antikörpern wurde 9.E10, ein Antikörper gegen das humane Proto-Onkogen c-myc, welcher kein PrP binden konnte, auf die Zellen gegeben. Hiermit sollte ein unspezifischer Effekt durch einen IgG Antikörper ausgeschlossen werden.

Hingegen konnte der bekannte antiprion Effekt von Quinacrin und 6H4, einen monoklonalen Antikörper gegen das PrP, bestätigt werden (Enari M. 2001).

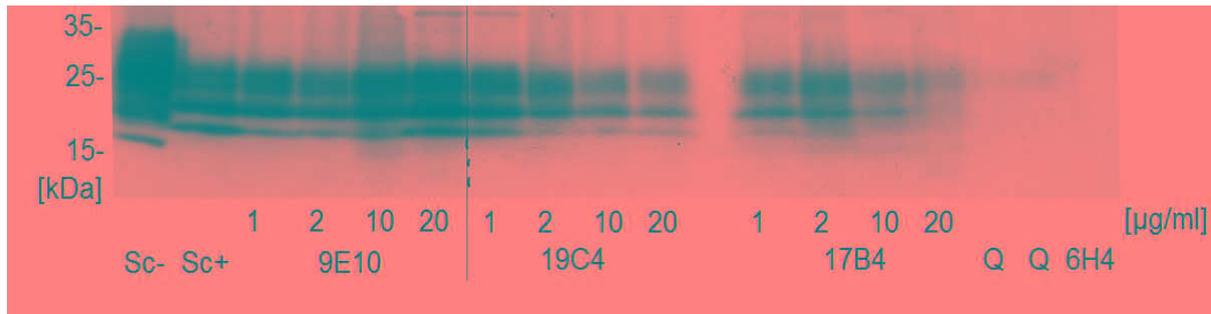


Abb. 3.2 5: Western Blot von ScN2a Zellen, die mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurden. Verwendet wurden 9.E10 als nicht Prion-erkennender Antikörper (IgG Kontrolle), 19C4.F8 (19C4), 17B4.G3 (17B4), sowie 6H4 und Quinacrin als Positivkontrollen. Ordinate: Molekulargewicht in kDa; Sc- zeigt unverdautes Lysat unbehandelter ScN2a Zellen, Sc+ zeigt dasselbe Lysat verdaut; Alle weiteren Lysate sind mit PK verdaut worden. Hiermit wurde gezeigt, dass die Zellen PrP^{Sc} positiv sind. Die Antikörper zeigten keinen Antiprion-Effekt. Quinacrin und 6H4 [1 µg/mL] unterdrückten die Bildung des PrP^{Sc}.

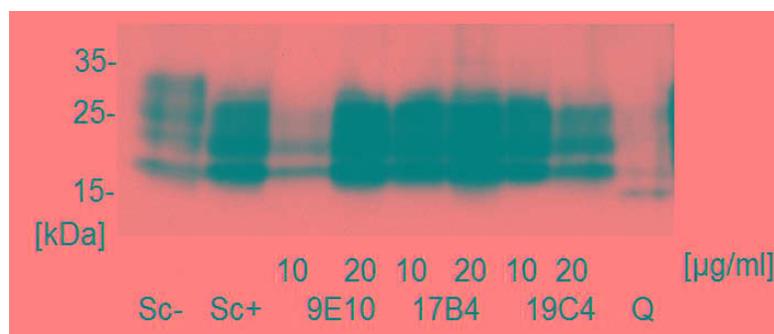


Abb. 3.26 : Western Blot; ScN2a Zellen 3 Wochen nach Ende der oben dargestellten Behandlung. Legende wie in der vorigen Abbildung. Die monoklonalen Antikörper hatten keinen Langzeiteffekt, der Effekt des Quinacrins hielt an.

3.4.6 Zusammenfassung 19C4

Bei 19C4 handelte es sich um einen IgG₁ Antikörper gegen das PrP mit einer Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 143-149 (NDWEDRY). In der Immunfluoreszenz zeigte der Antikörper gute Ergebnisse sowohl für N2a als auch für ScN2a-Zellen. Im ELISA wurden beide verwendeten Homogenate gebunden. Durch Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper aus PrP^{Sc} haltigen Homogenaten zu präzipitieren vermag, jedoch nicht die pathologische Isoform präzipitiert. In Zellkulturexperimenten konnte nicht gezeigt werden, dass der Antikörper einen nachhaltigen Anti-Prion Effekt hätte.

3.5 Zusammenfassung weiterer Antikörper und Versuche

3.5.1 Gewonnene Subklone

Um optimale, möglichst stabile Antikörper zu erhalten, wurden diese subkloniert. Hier werden die Klonierungsergebnisse weiterer Antikörper dargestellt.

Die subklonierten Antikörper unterschieden sich in ihrem Bindungsverhalten nicht von den Ausgangsantikörpern, untereinander ergaben sich jedoch unterschiedlich ausgeprägte Aktivitäten zwischen den Subklonen eines Klones. Im Zweifel wurde nicht nur das Bindungsverhalten, sondern auch das Wachstumsverhalten berücksichtigt, um möglichst gut wachsende, hochaffine Klone zu selektionieren.

Bei 10C3 fiel die Wahl auf 10C3.F4, da dieser gegenüber 10C3-G8 in der Fluoreszenzuntersuchung etwas aktiver war.

16D3.D10 wurde ausgewählt obwohl er, ebenso wie 16D3.E10, auch BSA erkannte.

34F11.G4, 20B6.B5, 28H11.D4 (BSA-positiv) mussten selektioniert werden, da bei diesen Antikörpern keine weiteren sicher monoklonalen Subklone gewonnen werden konnten.

26B5.C7 zeigte als einziger 26B5 Klon ein Signal im ELISA und wurde folglich trotz seiner Affinität zu BSA selektioniert.

Bei 6D4 wurde schlussendlich 6D4.G7 selektioniert.

3.5.2 Isotypen der monoklonalen Antikörper

Die Isotypen der Antikörper stellten sich wie folgt dar.

Antikörper	Subtyp
5E11	IgM
6D4.G7	IgG1
34F11.G4	IgG1

3.5.3 Epitope der Antikörper

In diesem Versuch wurden die Epitope einiger der gefundenen Anti-Prion Antikörper mit Hilfe einer Peptide Library bestimmt.

6D4/10C3:

Diese beiden Antikörper banden an das gleiche Polypeptid, daher wurde vermutet, dass die beiden Klone identisch seien. Das Epitop hatte die Sequenz WEDRYRENMRY, es handelte sich um die im Bereich der Helix 1 lokalisierten Aminosäuren 144-157.

21B7:

Dieser Antikörper hat an keines der Peptide gebunden, es ist daher davon auszugehen, dass sein Epitop nicht linear ist.

26B5:

Dieser Antikörper hat unspezifisch an unterschiedlichste Peptide der Library gebunden. Dies steht im Einklang mit dem unspezifischen Bindungsverhalten gegenüber BSA.

3.5.4 Ergebnisse der Antikörperaufreinigung

Um Antikörper in hohen Konzentrationen zu erhalten wurden diese aufgereinigt. Die aufgereinigten Antikörper wurden in ihrer Aktivität untersucht. Im ELISA waren alle Antikörper deutlich zu erkennen. Im Western Blot zeigten alle Antikörper eine Bindung an das PrP. Allerdings wurde diese erst bei unterschiedlichen Konzentrationen deutlich. Dies galt insbesondere für die Antikörper 6D4.G7 und 10C3.F4, die erst bei Konzentrationen von 200 ng/mL schwache Signale zeigten (bei 2 µg/mL starke). Zum Vergleich zeigt W226 bereits bei 20 ng/mL sehr starke Signale. 19C4.F8 zeigte ebenfalls bereits ein deutliches Signal bei 10fach niedrigerer Konzentration als 10C3.F4 oder 6D4.G7, was auf eine höhere Affinität des Antikörpers zum PrP schließen lässt.

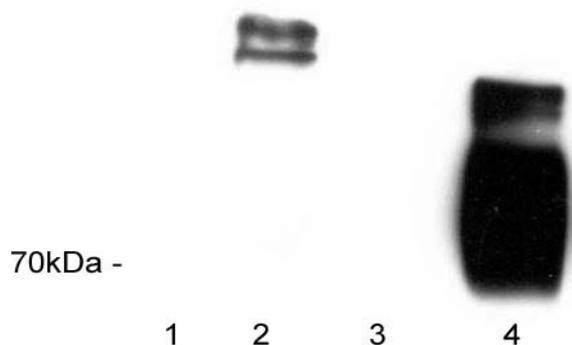


Abb. 3.27: Western Blot von KLH (1), KLH mit gebundenen Peptid des 19C3 Antigens (2), HSA (3) und HSA mit gebundenen Peptid des 19C3 Antigens (4). Primärantikörper 19 C3, Sekundärantikörper Anti Mouse POD; 19 C3 erkennt das gebundene Peptid, nicht jedoch die Trägersubstanzen.

19C3 zeigte in allen Western Blots Aktivität, lediglich das rekombinante PrP wurde nur schlecht erkannt. Im Versuch mit Peptid-markierten HSA erkannte der Antikörper das Peptid sowohl in Bindung an HSA als auch an KLH sehr deutlich (klares Signal bereits nach einer Belichtungszeit von 5 Sekunden). Das reine HSA bzw. KLH wurde nicht erkannt. Auch eine Interaktion zwischen den aufgetragenen Substanzen und dem Sekundärantikörper konnte ausgeschlossen werden.

9.E10 erkannte den rekombinanten W226, nicht aber das rekombinante PrP.

3.5.5 Resistenz der monoklonalen Antikörper gegen Schockgefrieren

Zur Lagerung sollten die Antikörper schockgefroren werden. Vorab musste die Resistenz der Antikörper gegen diese Behandlung überprüft werden, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden.

Die Resistenz der Antikörper wurde mit je zwei Messungen bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der gefrorenen Portion und der nicht gefrorenen. Auf der mit BSA gecoateten ELISA Platte wurden keinerlei Bindungen gemessen.

Folglich wurden die monoklonalen Antikörper zur Aufbewahrung schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

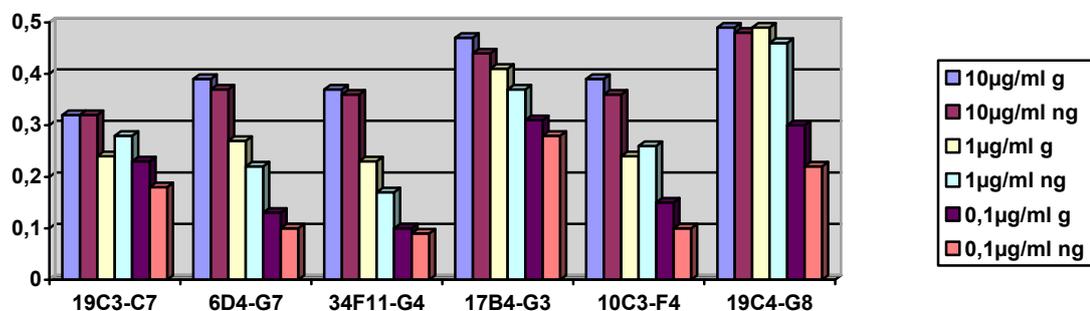


Diagramm 3.4: Mittelwerte der Messungen des ELISAS mAB gefroren (g)/nicht gefroren (ng) auf recPrP

4 Diskussion

4.1 Generierung von monoklonalen Antikörper mit der Hybridoma

Methode

Zielstellung dieser Arbeit war die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen das PrP und deren Anwendung zur Charakterisierung von PrP Konformeren. Dabei wurde insbesondere nach einem konformationsspezifischen Antikörper gegen das ^{CTM}PrP gesucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Myeloma Methode wurde 1975 von Köhler et al. (Köhler G. 1975) beschrieben und ist eine klassische Methode zur Generierung von Antikörpern. Die Myelomamethode besteht darin Splenozyten von zuvor immunisierten Mäusen zu entnehmen und mit Myelomzellen zu fusionieren (Köhler G. 1975). Myelomzellen sind bösartige, antikörperproduzierende Zellen welche sich schnell vermehren und große Mengen Antikörper zu bilden vermögen. Die Fusion mit der selbst antikörperbildenden Mauszelle führte zu einer neuen Zelle, die einen Typ Antikörper produzierte (Zola H. 2000). Die Fusion gelang auch mit Myelomzellen, welche selbst keine Antikörper bildeten (Kearney J. F. 1979).

Die Myelomamethode hat zwar den Nachteil einer schlechteren Vorhersagbarkeit der Epitope der gewonnenen Antikörper, gleicht also verglichen mit der epitopspezifischen Konstruktion der modernen Molekularbiologie eher einem groben Suchverfahren, bietet jedoch auch klare Vorteile. Ein wichtiger Vorteil ist die enorme Vielfalt des natürlichen Immunsystems und die Vielzahl an unterschiedlichen potentiellen Antikörpern. Das heißt, so können auch Antikörper gegen unbekannte Epitope generiert werden. Das Problem an der Generierung eines konformationsspezifischen Antikörpers gegen ^{CTM}PrP war ja unter anderen, dass das Aussehen eines spezifischen Epitops nicht bekannt war. Dieses ergab sich entweder aus der dreidimensionalen Struktur des Proteins oder durch die Art der Präsentation des Prionkonformers an der Zelloberfläche und ließ sich nur schwer vorhersagen, was ein molekularbiologisches Design eines Antikörpers erschwerte.

Die grundsätzliche Möglichkeit, konformationsspezifische Antikörper gegen das PrP mit der Myeloma Methode zu gewinnen, war gesichert. So gelang es Korth et al. (Korth C. 1997) einen Antikörper mit Spezifität für PrP^{Sc} zu generieren. Ähnlich wie in der damaligen Arbeit wurden auch in dieser Arbeit PrP knock-out Mäuse immunisiert.

Seit Mitte der 1990er Jahre war bekannt, dass die Gewinnung von Antikörpern gegen das PrP in Mäusen ohne endogenes PrP möglich war (*Williamson R. A. 1996*).

Bei Wildtyp Mäusen waren Immunisierungsversuche zuvor mehrfach gescheitert. Dieses Scheitern wurde auf die natürliche Toleranz des Immunsystems gegen das PrP, welche durch die hohe Konservierung des Proteins zwischen den Spezies und die endogene Expression verstärkt wurde, zurückgeführt (*Korth C. 1999*). Durch die Entwicklung von PrP^{0/0} knock-out Mäusen (*Büeler H. 1992*) und deren Immunisierung wurde es möglich diese Toleranz zu umgehen und Antikörper gegen das von Mäusen gebildete PrP zu entwickeln (*Williamson R. A. 1996*). 1997 gelang schließlich durch Immunisierung von PrP^{0/0} knock-out Mäusen mit rekombinanten Rinder PrP die Entwicklung eines Antikörpers, der ausschließlich das fehlgefaltete PrP^{Sc} von Rindern, Mäusen und Menschen erkannte, nicht jedoch die physiologische Form (*Korth C. 1997*).

Zur Immunisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestelltes PrP verwendet. Wie von der Generierung des Antikörpers gegen PrP^{Sc} bekannt, ist es damit grundsätzlich möglich konformationsspezifische Antikörper zu erzeugen, obwohl die Zielkonformation im immunisierenden Antigen eigentlich nicht vorhanden ist. Wenn aber die verschiedenen Konformere in einem Gleichgewicht vorliegen, kann die gewünschte Konformation dennoch in geringen Maße auftreten und eine Immunreaktion auslösen. Um die Wahrscheinlichkeit einen ^{CTM}PrP spezifischen Antikörper zu gewinnen zu erhöhen, wurde auch mit Homogenat eines ^{CTM}PrP überexprimierenden Mäusegehirns immunisiert. Hierzu wurden Tet-Off Mäuse, dies sind transgene Maus, bei welchen die Expression des Transgens (in diesem Fall PrP) durch Exposition zu einem Aktivator (z.B. Doxycyclin) gesteuert werden kann, verwendet (*Tremblay P. 1998*). Diese Mäuse bilden vermehrt PrP und konsekutiv auch ^{CTM}PrP (Lingappa et al, unveröffentlicht). Diese Immunisierung wurde in der Hoffnung, dass dieses Homogenat genug ^{CTM}PrP enthielt um eine Immunreaktion gegen diesen Konformer auszulösen, durchgeführt.

Der gewonnene Antikörper 19C3 stammte jedoch aus der mit rekombinanten PrP immunisierten Maus. Selbes gilt für den zwar nicht konformationsspezifischen, aber glykoformpepezifischen Antikörper 17B4. Diese Erfolge stehen im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Bedeutung von rekombinanten PrP bei der Gewinnung von Antikörpern gegen Prionen (*Korth C. 1997, Williamson R. A. 1996*).

Auch aus der mit Homogenat immunisierten Maus wurden monoklonale Antikörper gewonnen. Diese waren zwar zahlenmäßig unterlegen und stellten schlussendlich keinen im Rahmen dieser Arbeit interessanten Antikörper dar, zeigten jedoch, dass eine Gewinnung von Prion Antikörpern mit relativ gering konzentrierten Homogenat grundsätzlich möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Antikörper gefunden, die an das PrP gebunden haben. Die große Masse dieser Antikörper musste jedoch aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit anderen Antigenen, wie z.B. Albumin, verworfen werden. Da bei der Hybridoma Methode durch die Fusion zweier Zellen eine Zelle mit vergrößerten Chromosomensatz entsteht, sind diese Hybridomzellen genetisch nicht sehr stabil, zumal die verwendeten Myelomzellen als maligne entartete Zellen per se nicht sehr stabil sind. Aus diesem Grund gab es auch Klone, welche initial Prion bindende Antikörper produzierten, diese Produktion jedoch spontan einstellten.

Schlussendlich verblieb eine handvoll Klone, welche als stabile, PrP spezifische antikörperbildende Zellen bezeichnet werden konnten. Von diesen Klonen wurden drei intensiv untersucht. Alle drei Klone waren IgG, die häufigste Antikörperklasse, und zwei von ihnen wiesen eine Spezifität für bestimmte Formen des PrPs auf. 19C3 als ^{CTM}PrP spezifischer Antikörper und 17B4 als Glykoform spezifischer Antikörper. Der dritte untersuchte Antikörper, 19C4, war zwar nicht konformationspezifisch, band jedoch gut an das PrP.

4.2 Die Suche nach einem CTM spezifischen Antikörper

Ende der 90er Jahre wurde zunächst in zellfreien Translationssystemen entdeckt, dass das PrP in drei verschiedenen Konformeren gebildet wird (*Hegde R. S. 1998a*). Die Existenz dieser Konformere in vivo konnte später bestätigt werden. Von den drei Konformeren durchspannen zwei die Plasmamembran in entgegengesetzter Richtung, ^{CTM}PrP und ^{NTM}PrP. Die dritte Form wird mit einem GPI Anker an die Plasmamembran gebunden.

In weiteren Untersuchungen ist gezeigt worden, dass ^{CTM}PrP mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert ist. Dies führte schließlich zu dem Modell, dass ^{CTM}PrP und PrP^{Sc} sich im Rahmen von Prionerkrankungen beeinflussen. PrP^{Sc} soll dabei zur Akkumulation von ^{CTM}PrP führen, indem es dessen Abbau hemmt bzw. die Synthese des sekretorischen PrP zu Gunsten des ^{CTM}PrP inhibiert (*Hegde R. S. 1999*). Diese Akkumulation löst bei transgenen, ^{CTM}PrP überexprimierenden Tieren klinische

Zeichen einer Prionenerkrankung ohne Nachweis von PrP^{Sc} aus, woraus die Toxizität dieses Konformers abgeleitet wurde (Hegde R. S. 1998a, Stewart R. S. 2005).

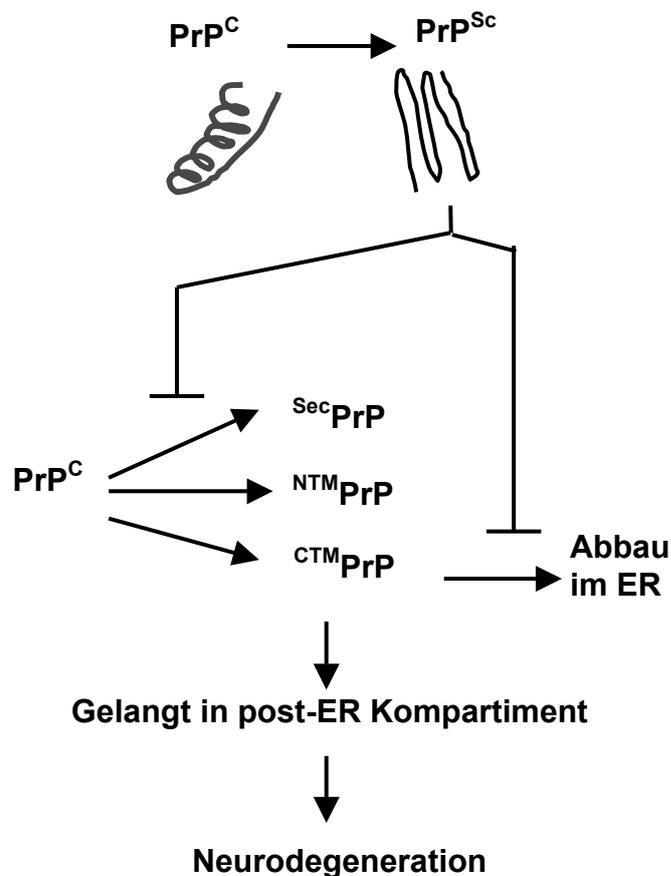


Abb. 4.1 : Zusammenspiel zwischen CTMPrP und PrP^{Sc} ; PrP^{C} wird in unterschiedlichen Konformeren gebildet, wobei das sekretorische PrP (SecPrP) überwiegt. Das CTMPrP wird nach Bildung im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgebaut. Wird dieser Abbau, z.B. durch PrP^{Sc} gehemmt, akkumuliert das CTMPrP und wird toxisch.; nach Hegde R. S. 1999

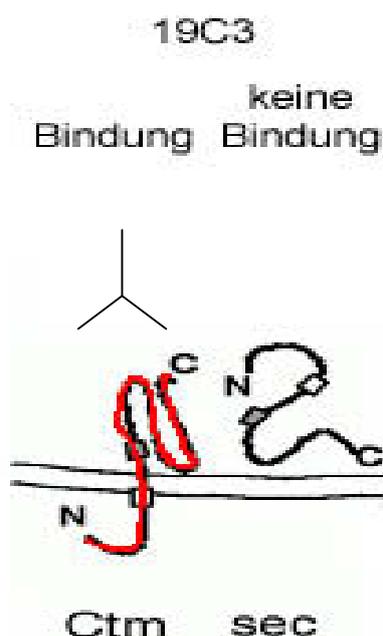
Ein Problem in der Erforschung des CTMPrP war dessen Nachweis. Es konnte zwar mit der Methode des kalten PK Verdaus nachgewiesen werden (Hegde R. S. 1999), dieser war jedoch sehr aufwendig und diffizil, da er eine exakte Einhaltung der störanfälligen Versuchsbedingungen erforderte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein CTMPrP spezifischer Antikörper gefunden werden. Wie bereits beschrieben wurden dafür Mäuse mit rekombinanten PrP bzw. mit CTMPrP haltigen Gehirnhomogenat immunisiert. Zum Screening wurde ein ELIFA mit diesem Homogenat verwendet. Dieser bot gegenüber dem ELISA den Vorteil der Immobilisierbarkeit schlecht löslicher Substanzen und auch die dreidimensionale Struktur des Proteins sollte durch dieses Verfahren geschont werden. Auch war diese Methode bereits zuvor erfolgreich zur Identifikation eines PrP^{Sc} spezifischen Antikörpers eingesetzt worden (Korth C. 1997). Weiterhin wurde auch normales

Homogenat aufgetragen, in der Hoffnung ein spezifischer Antikörper würde beim CTM PrP-haltigen Homogenat ein stärkeres Signal produzieren. Da im Rahmen des Screening zunächst kein Antikörper gefunden wurde, der dauerhaft und überzeugend eine Präferenz für das CTM PrP Homogenat hatte, wurden schließlich auch die anti-Prion Antikörper bildenden Klone der mit rekombinanten PrP immunisierten Maus getestet.

Auch hier konnte mit der beschriebenen Screening Methode kein spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Schließlich wurden einige antikörperhaltigen Überstände verschiedener Klone zu einer befreundeten Arbeitsgruppe nach San Fransisco geschickt. Dort wurden in zellfreien Translationssystemen durch Einbau radioaktiver Aminosäuren markierte Konformere des PrPs hergestellt. Diese wurden anschließend mit den Antikörpern präzipitiert. Dabei zeigte sich, dass ein IgG1 Antikörper, 19C3, zwar die CTM PrP Form, nicht aber die sekretorische Form präzipitierte.

Im folgendem ging es darum dieses Ergebnis selbst zu bestätigen. Hierzu wurden Immunpräzipitationen mit CTM PrP haltigen Gehirnhomogenaten durchgeführt. Zuvor war das transmembranäre PrP in diesem Homogenat mithilfe eines kalten PK Verdaus nachgewiesen worden. Gegenüber den zuvor erfolglos eingesetzten Screening Methoden, bei welchen 19C3 zwar rekombinantes PrP im ELISA erkannte, jedoch keine Homogenate im ELIFA, bot dies den Vorteil einer weitestgehend natürlichen Faltung der Proteine und einer großen Konzentrierbarkeit der Präzipitate



im Western Blot. In den Immunpräzipitationsexperimenten konnten die Ergebnisse aus San Fransisco bestätigt werden. 19C3 präzipitierte aus CTM PrP haltigen Homogenaten, nicht jedoch aus normalen Homogenaten.

In weiteren Präzipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass 19C3 auch aus PrP^{Sc} haltigen Homogenaten präzipitiert. Dies ist nicht als Hinweis gegen die Spezifität dieses Antikörpers zu werten,

Abb. 4.2: 19C3 bindet an CTM PrP, nicht an die sekretorische Form.

sondern steht vielmehr im Einklang mit dem zuvor dargestellten Modell der

Pathogenese von Prionerkrankungen von Hegde (*Hegde R. S. 1999*), welches von einem Anstieg der ^{CTM}PrP Konzentration im Rahmen der Infektion mit PrP^{Sc} ausgeht. Warum der Antikörper im ELIFA gegen Homogenate nicht binden konnten, bleibt offen. Mögliche Ursachen sind vielfältig und wären z.B. eine zu geringe PrP Konzentrationen im Blot oder für die Interaktion dieses Antikörpers ungünstige Pufferbedingungen. Insgesamt schien die Wahl geeigneter Pufferbedingungen bei diesem Antikörper keineswegs trivial, da eine ungünstige Pufferwahl die Immunpräzipitationen erschwerte. Am ehesten ist die Unfähigkeit des Antikörpers im ELIFA ^{CTM}PrP haltiges Homogenat zu differenzieren, jedoch auf die Faltung des Proteins zurückzuführen

Auch die Möglichkeit der Immunfluoreszenz mit diesem Antikörper wurde untersucht. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu einigen anderen Antikörpern relativ schwache Bindung, dennoch konnte die Eignung des Antikörpers zur Markierung von (Sc)N2a Zellen gezeigt werden. Eine Differenzierung von ScN2a und N2a Zellen war nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich 19C3 als ein ^{CTM}PrP spezifischer Antikörper bezeichnen, der in der weiteren Erforschung dieses Konformers des PrPs nützlich werden könnte, da er gegenüber dem kalten PK Verdau leichter einsetzbar ist und im Rahmen dieser Arbeit die transmembranäre Isoform sicher differenzieren konnte.

4.3 17B4 – Ein glykoformspezifischer Antikörper

Endogenes PrP kann posttranslational an zwei Stellen (N180; N196) glykosyliert werden. Dies führt zur Entstehung von vier verschiedenen Glykosylierungszuständen, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse im Western Blot zu drei Banden auftrennen lassen. Eine Bande aus diglykosylierten, eine aus den beiden monoglykosylierten und eine aus unglykosylierten PrP (*Stahl N. 1987*).

Im Rahmen dieser Arbeit fiel ein Antikörper (genannt 17B4) auf, der im Western Blot lediglich zwei Banden des PrPs erkannte und zwar die un- und die monoglykosylierte. 17B4 markierte sowohl rekombinantes PrP im ELISA als auch Mäusehirn im ELIFA. Auch die Markierung von (Sc)N2a Zellen in der Immunfluoreszenz gelang ohne Probleme. Nur die doppelt glykosylierte Bande im Western Blot wurde nicht gebunden. Hieraus wurde auf eine Glykoformspezifität des Antikörpers geschlossen.

Um die naheliegende Frage nach der genauen Natur dieser Spezifität zu beantworten wurden CHO Zellen durch Transfektion dazu gebracht unterschiedlich glykosylierte Formen von Maus Prionen zu bilden. Anschließend wurden Lysate dieser Zellen, nach Auftrennen im Western Blot, mit dem Antikörper markiert. Dabei zeigte sich, dass 17B4 an Aminosäure 196 unglykosyliertes PrP (MHM2PrP(N196Q)) zu binden vermag, nicht jedoch an dieser Stelle glykosyliertes.



Abb. 4.3: Sc hema Bindungsverhalten 17B4. Doppelt glykosyliertes PrP (oben links) wird von 17B4 nicht gebunden. An Aminosäure 196 glykosyliertes PrP (unten links, MHM2PrP(N180Q) Konstrukt) wird ebenfalls nicht gebunden. An Aminosäure 180 glykosyliertes PrP (oben rechts, MHM2PrP(N196Q) Konstrukt) wird gebunden. Unglykosyliertes PrP (unten rechts) wird gebunden. Daraus folgt, dass eine Glykosylierung an Aminosäure 196 die Bindung von 17B4 verhindert und dessen Bindungsstelle entweder in Bereich der AS 196 oder an einer vom dortigen Zuckerrest blockierten Stelle liegt.

Auf der Basis dieser Ergebnisse lässt sich 17B4 als glykoformspezifischer Antikörper gegen das PrP beschreiben. Dieser stammte aus der Immunisierung mit rekombinanten PrP, welches unglykosyliert war und daher das Epitop frei präsentieren konnte. Ursache der Spezifität ist am ehesten eine sterische Behinderung der Bindung durch den Zuckerrest an Aminosäure 196.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Eignung des Antikörpers für die Immunfluoreszenz mit (Sc)N2a Zellen ebenso gezeigt werden, wie die Anwendbarkeit in Immunpräzipitationsexperimenten, in welchen der Antikörper erwartungsgemäß lediglich mono- und unglykosyliertes PrP präzipitierte.

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.5 Glykosylierungsformen des PrPs) bereits erwähnt, konnten Glykosylierungsmuster zur Stammcharakterisierung herangezogen werden (Telling G. C. 1996) und wurden auch zur Beschreibung der Beziehung von vCJD und BSE verwendet (Collinge J. 1996). Auch wurden bei der CJD zwei Typen anhand des Molekulargewichts der monoglykosylierten Bande unterschieden (Typ1: 21kDa; Typ2: 19kDa) (Collinge J. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Markierungsversuche an humanen Gehirnproben unternommen, welche zum einen zeigten, dass 17B4 ebenso wie der

Vergleichsantikörper 19C4 humanes PrP bindet, zum anderen interessante Bandenmuster offenbarten. So ergab die Markierung mit 17B4 eine Doppelbande im Bereich der unglykosylierten Form, welche bei allen Proben von an vCJD erkrankten Individuen erschien. Dieses Muster war aber auch bei einigen gesunden Individuen und einer an klassischer CJD erkrankten Person zu finden. Daher und aufgrund der geringen Gesamtzahl der CJD Proben ist eine verallgemeinernde Aussage schwierig. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass 17B4 als glykoformspezifischer Antikörper vielversprechende Ansätze zur weiteren Charakterisierung von Prionstämmen und Prionerkrankungen bietet.

4.4 Behandlung von ScN2a Zellen mit monoklonalen PrP

Antikörpern

Auch wenn die Prionerkrankungen nach wie vor nicht heilbar sind, konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass unterschiedliche chemische Verbindungen ebenso wie einzelne anti-Prion Antikörper dazu in der Lage sind, die Infektion mit dem Erreger zu verhindern oder sogar zu heilen (*Enari M. 2001, Peretz D. 2001*). Zum einen wurde gezeigt, dass heterozyklische Verbindungen wie z.B. das Quinacrin in der Zellkultur anti-prion Effekte haben (*Korth C. 2001*). Für diese Substanzen konnte jedoch bis dato kein überzeugender Wirksamkeitsnachweis in vivo erbracht werden. Im Tiermodell waren die Ergebnisse widersprüchlich, dass heißt einzelne Studien konnten eine Überlebenszeitverlängerung zeigen, andere jedoch nicht. Am Menschen wurden diese Substanzen bisher in Heilversuchen eingesetzt, klinische Studien sind in Planung (*Korth C. 2006*).

Mit monoklonalen Antikörpern konnten im Tiermodell Effekte nachgewiesen werden. So konnte die Überlebenszeit nach intraperitonealer Infektion mehr als verdoppelt werden, wenn die Therapie vor Beginn klinischer Symptome begonnen wurde (*White A. B. 2003*). Nach Beginn klinischer Symptome oder auch nach intrazerebraler Infektion zeigten die Antikörper keine Wirkung. Dies wurde auf die Blut-Hirn-Schranke zurückgeführt, welche die Antikörper zurückhält und generell eine Übertragung zellkultureller Wirksamkeit auf Tiermodelle erschwert.

In Zellkulturexperimenten war gezeigt worden, dass einzelne Antikörper dauerhaft mit PrP^{Sc} infizierte Neuroblastomzellen (ScN2a-Zellen) behandeln können und diese für wenigstens sechs Wochen nach Therapieende von PrP^{Sc} reinigen können (*Enari M.*

2001). Der dabei verwendete Antikörper 6H4 war gegen die Helix 1 gerichtet, deren Eignung als anti-Prion Antigen auch durch andere Antikörper gezeigt wurde (*Müller-Schiffmann A. 2008*). Auch Antikörper gegen wenigstens drei weitere Regionen (Octarepeat-region, codon 91-110, extremer c-Terminus) zeigten anti-Prion Eigenschaften. Als Ursache für den anti-Prion Effekt wurde insbesondere eine schützende Wirkung für das PrP^C gegen PrP^{Sc} durch Bindung an ein für die Konversion bedeutsames Antigen diskutiert (z.B. Helix 1) (*Müller-Schiffmann A. 2008*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der generierten monoklonale Antikörper auf ihre anti-Prion Wirksamkeit in der Zellkultur getestet. Als Vergleichssubstanz wurden Quinacrin und der Antikörper 6H4 (*Enari M. 2001*) eingesetzt. Beide Substanzen zeigten den bekannten Effekt und unterdrückten die Bildung von PrP^{Sc} in dauerhaft infizierten ScN2a Zellen. Bei den eigenen Antikörpern galt die Hauptaufmerksamkeit 19C4, einem an Helix 1 bindenden IgG₁.

Dieser Antikörper zeigte in den Screening Versuchen gute Bindung an das PrP. Interessant war er auch dadurch, dass er gut an humanes PrP binden konnte, daher wurde er in einigen Versuchen als Primärantikörper zur Markierung von CJD Homogenaten eingesetzt. Seine Auswahl als potentieller priontherapeutischer Antikörper basierte zum einen auf vielversprechenden Ergebnissen in ersten orientierenden Behandlungsversuchen, zum anderen auf seiner Bindungsstelle im Bereich der Helix 1, an welche auch zahlreiche der in der Literatur beschriebenen, anti-prion wirksamen Antikörper gebunden hatten. Dennoch konnte auch nach Untersuchung unterschiedlicher Ansätze kein Effekt dieses oder eines anderen Antikörpers nachgewiesen werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die getesteten Antikörper in der Zellkultur keine Effektivität bei der Behandlung von Scrapie Infektionen besitzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zielsetzungen der Doktorarbeit erfüllt wurden und drei neue monoklonale Antikörper zur Erforschung und Charakterisierung von Prionen und Prionerkrankungen identifiziert wurden.

5 Abkürzungen

7BH	Mauslinie A3922 [Tg(SHaPrP)/Prnp ^{0/0}] Knock out für PrP, Transgen für SHaPrP
A117V Mutation	Ersatz des Alanins an Position 117 des PrPs durch ein Valin
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CHO Zellen	Chinesische Hamster Ovarien Zellen
CJD	Creutzfeldt Jakob Disease
vCJD	variant Creutzfeldt Jakob Disease
sCJD	sporadic Creutzfeldt Jakob Disease
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemical luminescence
ELIFA	Enzym-linked-immunofilter-assay
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-assay
EX/EM	Excitation/Emission
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (grüner Fluoreszenzfarbstoff)
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HSA	Humanes Serumalbumin
HT	Hypoxanthin Thymidin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin MS
kDA	Kilo Dal ton
KH->II Mutation	Ersatz des Lysin und Histidins an den Positionen 110 bzw 111 des PrPs durch Isoleucin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MEM	Minimum essential medium
MHM2PrP (N180Q) [G1]	Maus PrP, in welches das Epitop des Antikörpers

	3F4 eingebaut wurde und an der Position 180 Asparagin durch Glutamin ersetzt wurde-> keine Glykosylierung an Position 180
MHM2PrP (N196Q) [G2]	Maus PrP, in welches das Epitop des Antikörpers 3F4 eingebaut wurde und an der Position 196 Asparagin durch Glutamin ersetzt wurde-> keine Glykosylierung an Position 196
MPL	Monophosphoriliertes Lipid A
N2a Zellen	Neuroblastom Zellen
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
P102L Mutation	Ersatz des Prolins an Position 102 des PrPs durch ein Leucin
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Protease K
POD	Peroxidase
Prnp	PrP Gen
PrP	PrP
PrP ^C	Zelluläres PrP
PrP ^{Sc}	Scrapie Form des PrPs
^{CTM} PrP	Carboxy-transmembranäre Form des PrPs
^{NTM} PrP	Amino- transmembranäre Form des PrPs
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
QCC	Quinacrin cured (ScN2a) cells
ScN2a Zellen	N2a Zellen, die dauerhaft PrP ^{Sc} bilden
ShaPrP	Syrian Hamster PrP
TDM	Trehalose Dicorynomycolate
Tet-Off Maus	Transgene Maus, bei der das Transgen durch Exposition zu einem Aktivator (z.B. Doxycyclin) inaktiviert werden kann
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathie
W226	Antikörper gegen PrP
WHO	World Health Organisation

6 Literaturverzeichnis

- Bessen R., M. R.** (1992) Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters Journal of General Virology 73 329-334
- Blättler T., et al.** (1997) PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain Nature 389 69-73
- Borchelt D. R., et al.** (1994) Rapid Anterograde Axonal Transport of the Cellular Prion Glycoprotein in the Peripheral and Central Nervous Systems The Journal of biological chemistry 269 14711-14714
- Brandner S., et al.** (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity Nature 379 339-343
- Brown D. R., et al.** (1997) Prion Protein-Deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity Experimental Neurology 146 104-112
- Brown P., et al.** (1992) "Friendly Fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease The Lancet 340 24-27
- Bruce M. E., et al.** (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent Nature 389 498-501
- Budka H.** (2001a) Portrait der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) Prionen und Prionkrankheiten 147-151
- Budka H.** (2001b) Portrait des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms (GSS) Prionen und Prionkrankheiten 158-161
- Büeler H., et al.** (1993) Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie Cell 73 1339-1347
- Büeler H., et al.** (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein Nature 356 577-582
- Bukau B., et al.** (2006) Molecular Chaperones and Protein Quality Control Cell 125 443-451
- Cassirer R.** (1898) Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomisch und bakterielle Untersuchungen Virchows Archiv 153 89-110
- Caughey B., et al.** (1991) N-Terminal Truncation of the Scrapie-Associated Form of PrP by Lysosomal Protease(s): Implications Regarding the Site of Conversion of PrP to the Protease-Resistant State Journal of Virology 65 12 6597-6603
- Cohen F. E.** (1999) Protein Misfolding and Prion Diseases Journal of molecular biology 293 313-320
- Collee J. G., et al.** (1997) BSE: a decade on Lancet 349 636-641
- Collinge J., et al.** (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD Nature 383 685-690
- De Fea K. A., et al.** (1994) Determinants of Carboxyl-terminal Domain Translocation during Prion Protein Biogenesis The Journal of biological chemistry 269 16810-16820
- DiFiglia M., et al.** (1997) Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain Science 277 1990-1993
- Doh-ura K., et al.** (1989) Pro-->Leu change at position 102 of Prion Protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann Straussler Syndrom Biochemical and biophysical research communications 163 974-979

- Enari M., et al.** (2001) Scrapie prion protein accumulation by scrapieinfected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody PNAS 98 16 9295-9299
- Endo T., et al.** (1989) Diversity of Oligosaccharide Structures Linked to Asparagines of the Scrapie Prion Protein Biochemistry 28 8380-8388
- Fournier J-G., et al.** (1998) Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues Cell Tissue Res 292 77-84
- Gajdusek D. C., et al.** (1967) Transmission and Passage of Experimental "Kuru" to Chimpanzees Science 155 3759 212-214
- Gajdusek D. C., et al.** (1957) Degenerative Disease of the central nervous system in new guinea; The endemic occurrence of Kuru in the native population New England Journal of Medicine 257 974-978
- Gajdusek D. C., et al.** (1959) Kuru: Clinical, Pathological and Epidemiological Study of an Acute Progressive Degenerative Disease of the Central Nervous System among Natives of the Eastern Highlands of New Guinea American Journal of Medicine 442-469
- Gerstmann J., S. E., Scheinker I.** (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich auch ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen Alterns. Z. Neurol. 154 736-762
- Gibbs C. J., et al.** (1978) Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie PNAS 75 12 6268-6270
- Glennner G., et al.** (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 120 3 885-890
- Hadlow W. J., et al.** (1982) Natural Infection of Suffolk Sheep with Scrapie Virus The Journal of Infectious Diseases 146 657-664
- Hegde R. S., et al.** (1998a) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease Science 279 5352 827-834
- Hegde R. S., et al.** (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration Nature 402 822-826
- Hegde R. S., et al.** (1998b) Regulation of Protein Topology by trans-Acting Factors at the Endoplasmic Reticulum Molecular cell 2 85-91
- Hewicker-Trautwein M., et al.** (2001) Die Pathologie der Prionkrankheiten beim Tier Prionen und Prionkrankheiten 225-230
- Hill A. F., et al.** (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE Nature 389 448-450
- Hof H., et al.** (2005) Immunologie Medizinische Mikrobiologie
- Hörnlimann B.** (2001a) Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten Prionen und Prionkrankheiten 3-20
- Hörnlimann B.** (2001b) Portrait der BSE beim Rind Prionen und Prionkrankheiten 173-180
- Hornshaw M. P., et al.** (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein Biochemical and biophysical research communications 207 621-629
- Hsiao K., et al.** (1990) Inherited human prion diseases Neurology 40 1820-1827
- Hunt B., et al.** (2000) Hybridoma technology: making monoclonal antibodies Monoclonal Antibodies 16-31

- Jakob A. M.** (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 70 132-146
- James T. L., et al.** (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform (NMR structure/conformational change) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 10086–10091
- Kanyo Z., et al.** (1999) Antibody Binding Defines a Structure for an Epitope that Participates in the PrPC PrPSc Conformational Change Journal of molecular biology 293 855-863
- Kascsak R. J., et al.** (1986) Immunological Comparison of Scrapie-Associated Fibrils Isolated from Animals Infected with Four Different Scrapie Strains Journal of Virology 59 676-683
- Kascsak R. J., et al.** (1987) Mouse Polyclonal and Monoclonal Antibody to Scrapie-Associated Fibril Proteins Journal of Virology 61 12 3688-3693
- Kearney J. F., et al.** (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines Journal of Immunology 123 4 1548-1550
- Köhler G., et al.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity Nature 256 495-497
- Korth C., et al.** (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrPSc formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains Journal of General Virology 81 2555-2563
- Korth C., et al.** (1997) Prion (PrPSc)- specific epitope defined by a monoclonal antibody Nature 390 74-77
- Korth C., et al.** (1999) Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein Methods in Enzymology 309 102-112
- Korth C., M. B., Cohen F. E., Prusiner S. B.** (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease PNAS 98 9836-9841
- Korth C., P. J.** (2006) Emerging Pharmacotherapies for Creutzfeldt-Jakob Disease Archives of Neurology 63 497-501
- Kretzschmar H.** (2001) Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen Prionen und Prionkrankheiten 207-224
- Kretzschmar H. A., et al.** (1991) Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Strüssler, and Scheinker Lancet 337 1160
- Kuczius T., et al.** (1998) Molecular Analysis of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Strain Variation Journal of infectious diseases 178 694-699
- Le Bourg E.** (2005) Calorie restriction to retard aging and increase longevity Presse Medical 34 121-127
- Legname G., et al.** (2004) Synthetic Mammalian Prions Science 304 673-676
- Lehmann S., et al.** (1997) Blockade of Glycosylation Promotes Acquisition of Scrapie-like Properties by the Prion Protein in Cultured Cells Journal of biological chemistry 272 21479-21487
- Leliveld R. S., et al.** (2007) The use of conformation-specific ligands and assays to dissect the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases Journal of Neuroscience 85 2285-2287
- Leliveld R. S., D. R. T., Wuite G., Stitz L., Korth C.,** (2005) The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions Journal of biological chemistry
- Lemaire-Vieille C., et al.** (2000) Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice PNAS 97 10 5422-5427

- Lingappa V. R., et al.** (2002) Conformational control through translocational regulation: a new view of secretory and membrane protein folding BioEssays 24 741-748
- Lugaresi E., T. I., Gambetti P., Montagna P.** (1998) The Pathophysiology of Fatal Familial Insomnia Brain Pathology 8 521-526
- Mallucci G., et al.** (2003) Depleting Neuronal PrP in Prion Infection Prevents Disease and Reverses Spongiosis Science 302 871-874
- Manson J. C., et al.** (2001) Transgenic models of the transmissible spongiform encephalopathies Exp. Rev. Mol. Med.
- Mastrianni, C., Oberholtzer, Da Costa, DeArmond, Prusiner, Garbern** (1997) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia Neurology 45 2042-2050
- Mastrianni J. A., et al.** (1999) Prion Protein Conformation in a patient with sporadic fatal insomnia The New England Journal of Medicine 1630-1638
- McBride P. A., et al.** (1992) PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice The Journal of Pathology 168 4 413-418
- McKinley M., et al.** (1983) A Protease-Resistant Protein Is a Structural Component of the Scrapie Prion Cell 35 57-62
- Medori R., et al.** (1992) Fatal familial insomnia: A second kindred with mutation of Prion protein gene at codon 178 Neurology 42 669-670
- Müller-Schiffmann A., K. C.** (2008) Vaccine Approaches to Prevent and Treat Prion Infection BioDrugs 22 45-52
- Nguyen J., et al.** (1995) Prion Protein Peptides Induce α -Helix to β -Sheet Conformational Transitions Biochemistry 34 4186-4192
- Pan K-M., et al.** (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins PNAS 90 10962-10966
- Parchi P., et al.** (1999) Classification of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Based on Molecular and Phenotypic Analysis of 300 Subjects Annals of Neurology 46 224-233
- Pattison I. H., et al.** (1972) Spread of Scrapie to Sheep and Goats by oral Dosing with Foetal Membranes from Scrapie-affected Sheep The Veterinary Record 90 465-467
- Peretz D., et al.** (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity Nature 412 739-742
- Prusiner S. B.** (1982) Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie Science 216 136-144
- Prusiner S. B.** (1991) Molecular Biology of Prion Diseases Science 252 1515-1522
- Prusiner S. B.** (1998) The Prion Diseases Brain Pathology 8 499-513
- Prusiner S. B.** (2001a) Die Geschichte der Erforschung von Prionen Prionen und Prionkrankheiten 36-49
- Prusiner S. B.** (2001b) Shattuck Lecture- neurodegenerative diseases and prions New England Journal of Medicine 344 1516-1526
- Prusiner S. B., et al.** (1990) Transgenic Studies Implicate Interactions between Homologous PrP Isoforms in Scrapie Prion Replication Cell 63 673-686
- Rieck R., et al.** (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231) Nature 382 180-182
- Rudd P., et al.** (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms PNAS 96 13044-13049
- Sailer A., et al.** (1994) No Propagation of Prions in Mice Devoid of PrP Cell 77 967-968

- Schätzl H. M., et al.** (1995) Prion Protein Gene Variation Among Primates Journal of molecular biology 245 362-374
- Schwartz M.** (2003) How the Cows Turned Mad
- Scott M., et al.** (1989) Transgenic Mice Expressing Hamster Prion Protein Produce Species-Specific Scrapie Infectivity and Amyloid Plaques Cell 59 847-857
- Sigurdson C. J., et al.** (2003) Other animal prion diseases British Medical Bulletin 66 199-212
- Sparkes R. S., et al.** (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes PNAS 83 7358-7362
- Spillantini M. G., et al.** (1997) α -Synuclein in Lewy bodies Nature 388 839-840
- Stahl N., et al.** (1987) Scrapie Prion Protein Contains a Phosphatidylinositol Glycolipid Cell 51 229-240
- Stewart R. S., et al.** (2005) A Transmembrane form of the prion protein is localized in the golgi apparatus of neurons Journal of biological chemistry 280 15855-15864
- Stewart R.S., D. B., Harris D. A.** (2001) A Transmembrane Form of the Prion Protein Contains an Uncleaved Signal Peptide and Is Retained in the Endoplasmic Reticulum Molecular biology of the cell 12 881-889
- Taraboulos A., et al.** (1990) Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapieinfected cells does not require asparagine-linked glycosylation PNAS 87 8262-8266
- Tateishi J., et al.** (1990) Immunochemical, molecular genetic, and transmission studies on a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome NEUROLOGY 40 1578-1581
- Telling C., P. P., DeArmond S. J., Cortelli P., Montagna P., Gabizon R., Mastrianni J., Lugaresi E., Gambetti P., Prusiner S. B.** (1996) Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity Science 274 2079-2082
- Telling G. C., et al.** (1996) Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity Science 274 2079-2082
- Telling G. C., et al.** (1995) Prion Propagation in Mice Expressing Human and Chimeric PrP Transgenes Implicates the Interaction of Cellular PrP with Another Protein Cell 83 79-90
- Thorgeirsdottir S., et al.** (2002) Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection of sheep in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PrP genotype Archives of Virology 147 709-722
- Tobler I., et al.** (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein Nature 380 639-642
- Tremblay P., M. Z., Galoum., Heinrich C., Petromilli C., Lisse T., Cayetano J., Torchiam., Mobley W., Bujardi H., Dearmond S., Prusiner S. B.,** (1998) Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice PNAS 95 12580-12585
- White A. B., et al.** (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease Nature 422 6927 80-83
- Will R. G., et al.** (1996a) Creutzfeldt-Jakob Disease Lancet 347 65-66
- Will R. G., et al.** (1996b) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK Lancet 347 921-925
- Williams E. S.** (2005) Chronic Wasting Disease Vet Pathology 42 530-549
- Williamson R. A., et al.** (1996) Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein PNAS 93 7279-7282

- Wopfner F., et al.** (1999) Analysis of 27 Mammalian and 9 Avian PrPs Reveals High Conservation of Flexible Regions of the Prion Protein Journal of molecular biology 289 1163-1178
- Yost C. S., et al.** (1990) Non- hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein Nature 343 669-672
- Zahn R., et al.** (2000) NMR solution structure of the human prion protein PNAS 97 1145-150
- Zigas V.** (1975) Kuru: A critical review Med. J. Aust 2 483-486
- Zlotnik I., et al.** (1962) The pathology of the brain of mice inoculated with tissues from scrapie sheep Journal of comparative Pathology 72 360-365
- Zola H.** (2000) Antibodies as laboratory and therapeutic reagents Monoclonal Antibodies 1-15

7 Abstract

Hintergrund:

Die Hypothese dieser Forschungsarbeit war, dass sich konformationelle Isoformen des Prionproteins (PrP) durch monoklonale Antikörper unterscheiden ließen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen bestimmte Konformationen des PrPs generiert werden, um das Vorkommen solcher Isoformen im Gehirn besser untersuchen zu können.

Die intrazellulär gebildeten Isoformen sind das ^{SEC}PrP, ^{CTM}PrP und das ^{NTM}PrP. Das ^{SEC}PrP wird komplett transloziert, wohingegen die beiden anderen die Membran in unterschiedlicher Richtung durchspannen.

Im Maus Modell und auch bei menschlichen Prionerkrankungen führt die Überexpression von ^{CTM}PrP zu neurotoxischen Veränderungen.

Eine weitere Form des PrPs ist das PrP^{Sc} (PrP Scrapie). Dieses entsteht bei Prionerkrankungen extrazellulär aus ^{SEC}PrP infolge einer Interaktion mit PrP^{Sc} Molekülen. Auch bei dieser Form der Prionerkrankung ist die Konzentration der ^{CTM}PrP Isoform erhöht und wird für die neurotoxische Effekte mitverantwortlich gemacht.

Methoden:

Es wurden PrP knock-out Mäuse zum einem mit rekombinantem Maus PrP und zum anderen mit Hirnhomogenat einer ^{CTM}PrP überexprimierenden Maus immunisiert. Die Splenozyten dieser Tiere wurden isoliert und mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert, um stabile Antikörper bildende Zelllinien zu gewinnen. Im Anschluss wurden solche Klone selektioniert, die PrP spezifische Antikörper bildeten. Dabei wurde an N2a und ScN2a (eine PrP^{Sc} exprimierende Zelllinie) Zellen mittels Fluoreszenzmarkierung untersucht und im ELIFA wurde mittels ^{CTM}PrP überexprimierenden Hirnhomogenats gescreent. Letztlich wurde auch auf rekombinantes PrP im ELISA getestet.

Die weitere Charakterisierung erfolgte insbesondere mit der Methode der Immunpräzipitation.

Resultate:

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden mehrere PrP spezifische Antikörper gefunden, von denen einer eine starke Prävalenz für ^{CTM}PrP hat. Dieses Bindungsverhalten wurde mittels Immunpräzipitation von Hirnhomogenaten ^{CTM}PrP überexprimierender Mäuse weiter untersucht. Dabei ließ sich die Prävalenz des Antikörpers für die transmembranäre Form des PrPs bestätigen.

Im Rahmen des Projektes wurde zusätzlich ein glykoformspezifischer Antikörper gefunden, welcher lediglich eine monoglykosylierte und die unglykosylierte Form des PrPs, nicht jedoch die andere monoglykosylierte oder die diglykosylierte Form bindet.

Schlussfolgerung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich Antikörper isoliert, welche spezifisch an verschiedene Formen des PrPs binden. Mit Hilfe derartiger Antikörper ist es möglich, weitere Eigenschaften des PrPs, seiner konformationellen Isoformen und der mit diesen assoziierten Erkrankungen zu untersuchen.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. C. Korth für die gute Einarbeitung und Betreuung, die überaus nette Arbeitsatmosphäre und für die Begutachtung meiner Arbeit und deren Vertretung vor der medizinischen Fakultät.

Weiterhin danke ich dem Direktor des Instituts für Neuropathologie, Herrn Prof. Dr. G. Reifenberger, sowie Herrn Professor Dr. C. Korth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Auch danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die entspannte, freundliche Arbeitsatmosphäre, für die Einarbeitung sowie für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft in den letzten Jahren.

Weiterhin danke ich dem GRK 1033 „Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“ für die erfahrene Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Breil-Wirth, geb. Breil
 Geb.-Datum: 21.10.1982
 Geb.-Ort: Oberhausen
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Konfession: römisch-katholisch
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1989-1993 Gemeinschaftsgrundschule Wegberg
 1993-2002 Maximilian-Kolbe Gymnasium Wegberg
 1999-2000 Crescent High School, Iva, SC, USA
 Mai 2002 Abitur (Durchschnittsnote 1,4)

Zivildienst:

1.8.02-31.5.03 Chirurgisch/Internistische Station des Herman-Joseph-Krankenhauses Erkelenz

Studium

10.2003 Beginn des Medizinstudiums an der HHU Düsseldorf
 09.2005 Physikum (Durchschnittsnote 1,5)
 02.2006 Beginn medizinische Dissertation Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf, Prof. Dr. Korth
 08.2006 Famulatur Unfallchirurgie Marienhospital Düsseldorf
 09.2006 Famulatur chirurgische Ambulanz Marienhospital Düsseldorf
 03.2007 Famulatur Radiologie EVK Düsseldorf
 07.2007 Famulatur Orthopädie Marienkrankenhaus Kaiserswerth
 03.2008 Famulatur Allgemein Chirurgie Diakonie Kaiserswerth
 08.2008-07.2009 PJ UKD Düsseldorf, Wahlfach Orthopädie
 1.12.2009 Staatsexamen Medizin (Durchschnittsnote 1,85)

Berufliche Tätigkeit

2001-2003 McDonalds Erkelenz
 06.2003-07.2007 Pflegeaushilfe Hermann-Joseph Krankenhaus Erkelenz
 WS04 und WS05 Institut für Anatomie HHU Düsseldorf, Vorpräperant im Präparierkurs
 06-09.2006 Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, studentische Hilfskraft
 08.2006-10.2007 Kollegiat im GRK 1033 „Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Altersprävention“
 02.2008-09.2009 Pflegeaushilfe Vinzenzkrankenhaus Düsseldorf

Fremdsprachen

Englisch sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
 Französisch Grundkenntnisse in Wort und Schrift