

**Nachweis von Prionen als
Prionprotein-Aggregate im Hirngewebe
TSE-erkrankter Tiere mittels
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver Schäfer

aus Wattenscheid

Düsseldorf 2002

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Riesner, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Durch seine zahlreichen Anregungen und Diskussionen, sowie seine Unterstützung wurde die Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich. Vor allem danken möchte ich Ihm für die Gelegenheit Forschung mit möglichst viel Freiheit, Eigenverantwortung und Selbständigkeit zu betreiben.

Dank gilt auch der Prion-Gruppe, in der die Zusammenarbeit mehr als nur kollegial war und die Arbeitsatmosphäre sehr nett. Hier sind eigentlich alle ausnahmslos hervorzuheben, angefangen von Initiatoren der Priongruppe, Karin und Martin, die mich in dieses Thema einweichten, weiter zu den Wegbegleitern Jens, Katja und Christian, die mich während fast meiner gesamten Arbeit am Institut begleitet haben, über die, die ich nur noch am Anfang Ihrer wissenschaftlichen Karriere angetroffen habe (schon mehr oder weniger weit fortgeschritten): Tina, Ilka, Goldie und Jan, sowie die beiden „Randgruppenmitglieder“ der Alzheimer-Gruppe Luitgard und Katja. Nicht zu vergessen die, die mein Thema mehr oder weniger selbst erfahren durften und noch dürfen, Eva und Ralf (ich drücke Eva alle Daumen für die Fortsetzung), und natürlich diejenigen mit denen ich (aber nicht nur, n.e.d.) eine große Leidenschaft zur Kletterei hege: Michael, Elfi und Kasi. Eine Leidenschaft die im Institut auch bei der Rechnergruppe ihren Platz hatte, so dass mit Gerhard und Schmitzi eine kleine, aber feine Klettergemeinschaft geboren werden konnte. Der Rechnergruppe schulde ich inklusive der schon beiden aufgeführten Personen und den weiteren Mitgliedern, allen voran Jochen und Stefan, großen Dank für die Lösung meiner Datenverarbeitungsprobleme. Ohne Sie wäre die Auswertung der Daten nie in einem vernünftigen Zeitrahmen möglich gewesen. Vergessen möchte ich auch nicht all die anderen Institutsangehörigen, sei es aus der RNA-Stabilitätsgruppe, den Viroiden oder den Wagners. gerade bei letzteren finden sich auch einige meiner Wegbegleitern durchs Leben und Studium, Olli Z., Lars und Jan (der mich schon am längsten von allen aushalten muss). Daneben gibt es natürlich noch eine weitere Anzahl von Freunden, bei deren Aufzählung ich bestimmt jemanden vergessen würde, darum nur der Versuch eines Anfangs: Thomas, Steffi, Sigrid, Julia

Auch in der Forschungsgemeinde der Prionforscher habe ich viele kennen und schätzten gelernt. Stellvertretend möchte ich hier Michael Beekes, Roy Jackman und Leigh Thorne hervorheben, die mir bei der Durchführung der Arbeit mit Rat, Tat und Material zur Seite standen. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Zeit für Diskussionen.

Natürlich gilt ein ganz großer, herzlicher Dank meinen Eltern und Yadi, durch deren Liebe, Zuversicht und Unterstützung diese Arbeit möglich wurde und die mich auch in den z. T. schwierigen Zeiten ertragen haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die nicht namentlich erwähnt sind, jedoch auf die eine oder andere Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Amyloide Erkrankungen | 1 |
| 1.2 | Transmissible Spongiforme Enzephalopathien | 1 |
| 1.3 | Die Entdeckung des Erregers | 2 |
| 1.4 | Die Eigenschaften des zellulären PrP | 3 |
| 1.4.1 | Vorkommen | 3 |
| 1.4.2 | Modifikationen | 3 |
| 1.4.3 | Funktion | 5 |
| 1.5 | Prion-Replikation | 5 |
| 1.5.1 | Biochemische und physikalische Eigenschaften von PrP ^C und PrP ^{Sc} | 5 |
| 1.5.2 | Scrapie-Stämme, Spezies-Spezifität | 6 |
| 1.5.3 | Replikations-Hypothesen | 8 |
| 1.6 | Erregerausbreitung im Körper nach peripherer Übertragung | 10 |
| 1.6.1 | Bedeutung des hämatopoetischen Systems | 11 |
| 1.6.2 | Die neuronale Ausbreitung von PrP ^{Sc} | 11 |
| 1.7 | Die wichtigsten Formen der TSE | 11 |
| 1.7.1 | Kuru | 11 |
| 1.7.2 | Creutzfeldt-Jakob-Krankheit | 12 |
| 1.7.3 | Scrapie | 13 |
| 1.7.4 | Bovine Spongiforme Enzephalopathie | 14 |
| 1.8 | Diagnose der TSE | 16 |
| 1.8.1 | Humane TSE | 16 |
| 1.8.2 | Tier-TSE | 17 |
| 1.8.3 | PrP ^{Sc} -Nachweis mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie | 18 |
| 1.9 | Fragestellung | 19 |
| 2 | Material | 20 |
| 2.1 | Geräte | 21 |
| 2.2 | Fluoreszenzfarbstoffe | 21 |
| 2.3 | Verbrauchsmaterial | 21 |
| 2.4 | Antikörper | 22 |
| 2.5 | Gewebe und Körperflüssigkeiten | 22 |
| 2.6 | Prion-Rods | 22 |
| 2.7 | Rekombinantes PrP | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Methoden | 24 |
| 3.1 | Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 24 |
| 3.2 | Immunologischer Proteinnachweis | 25 |
| 3.2.1 | Dot-Blot | 25 |
| 3.2.2 | Semi-Dry-Blot | 25 |
| 3.2.3 | Proteinnachweis mit dem ECL-System | 26 |
| 3.2.4 | Proteinnachweis mit dem NBT/BCIP-System | 26 |
| 3.3 | Silberfärbung von Proteingelen | 28 |
| 3.4 | Fluoreszenzmarkierung von Proteinen | 28 |
| 3.5 | Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation | 30 |
| 3.6 | Isolation von Prion-Rods | 30 |
| 3.6.1 | Isolation von Prion-Rods nach McKinley <i>et al.</i> | 30 |
| 3.6.2 | Isolation von Prion-Rods nach Beekes <i>et al.</i> | 31 |
| 3.7 | Proteolyse von Hirnhomogenat mit Proteinase K | 33 |
| 3.8 | Aufreinigung von Antikörpern | 33 |
| 3.9 | FCS / FIDA | 33 |
| 3.9.1 | Basis-Konzept | 33 |
| 3.9.2 | Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse | 36 |
| 3.9.3 | Scanning | 36 |
| 3.9.4 | Zweifarbenanalysen | 37 |
| 4 | Ergebnisse | 38 |
| 4.1 | Keiminduzierte Aggregation des Prion-Proteins | 39 |
| 4.2 | Untersuchungen mit Cerebrospinalflüssigkeit | 41 |
| 4.3 | Untersuchung von Hirngewebe | 43 |
| 4.3.1 | Präparation von Prion-Rods aus Hirngewebe | 44 |
| 4.4 | Optimierung des Messaufbaus | 46 |
| 4.5 | Verwendung von Antikörpern als Sonde | 51 |
| 4.5.1 | Ergebnisse an Hirngewebe aus Hamstern | 51 |
| 4.5.2 | Ergebnisse mit bovinem Hirngewebe | 53 |
| 4.6 | Quantitative Aufreinigung von Prion-Rods | 54 |
| 4.7 | Antikörperscreening | 55 |
| 4.8 | Sensitivität | 58 |
| 4.9 | Analyse von verschlüsselten BSE-Proben | 59 |
| 4.9.1 | Messungen mit 1D-FIDA | 61 |
| 4.9.2 | Messungen mit 2D-FIDA | 61 |
| 4.10 | Reduzierung des Hintergrunds | 65 |
| 4.11 | Ergebnisse mit PrP ^{BSE} | 68 |
| 5 | Diskussion | 69 |
| 5.1 | Optimierung der Messmethode | 70 |
| 5.2 | Sensitivität im Vergleich zu anderen bereits auf dem Markt befindlichen Methoden | 75 |
| 5.3 | Nachweis von PrP ^{BSE} | 79 |
| 5.4 | Ausblick | 79 |

| | |
|--|-----------|
| 6 Zusammenfassung | 83 |
| 7 Literatur | 84 |
| A Programmlistings | 95 |
| A.1 Listing zur Histogrammerzeugung | 95 |
| A.2 Listing zum Umgang mit Daten aus Rohdatenerfassungskarte | 96 |
| A.2.1 Mehrerer Dateien gleichzeitig auswerten | 105 |
| A.2.2 Graphische Darstellung des Histogramms | 107 |
| A.3 Analyse der 2D-Daten | 108 |
| A.3.1 Mehrere 2D-Dateien gleichzeitig verarbeiten | 110 |
| A.3.2 Erzeugen von Tabellen aus 2D-Daten | 110 |

1 Einleitung

1.1 Amyloide Erkrankungen

Krankheiten mit Funktionsverlust des Nervengewebes nennt man Neurodegenerative Erkrankungen. Häufig kommt es bei diesen Erkrankungen zum selektiven Untergang anatomischer bzw. funktioneller Strukturen, so z. B. des *Nucleus caudatus* bei der Chorea Huntington, des dopaminergen Systems bei der Parkinson-Erkrankung oder der Motorneuronen bei der Amylotrophen Lateralsklerose (Herdegen *et al.*, 1997). Bei der Alzheimer-Erkrankung und bei den Prion-Erkrankungen sind dagegen verschiedene Hirnbereiche betroffen. Der Begriff Amyloid steht ursprünglich für dichte, lichtmikroskopisch erkennbare Ablagerungen, die sich durch eine Reihe biophysikalischer Charakteristika auszeichnen. Sie besitzen eine fibrilläre Ultrastruktur mit Durchmesser von etwa 10 nm. Die Fibrillen sind in paralleler Orientierung mit einem Abstand von etwa 2,5 nm angeordnet und sich periodisch alle 150 nm umeinander winden (Cohen, 1967). In ihrer physikalischen Ultrastruktur zeigen sie eine Zusammensetzung aus Polypeptidketten oder Proteinen, welche in einer regelmäßigen β -Faltblatt-Konformation angeordnet sind (Glenner, 1980). Zudem gehen Amyloide mit dem Farbstoff Kongorot eine feste Bindung ein, welche zu anisotropen Eigenschaften führt. Im polarisierten Licht findet man daher eine charakteristische grün-rote Doppelbrechung, die wegen ihrer Ähnlichkeit zu solchen Effekten bei Polysacchariden zum Namen Amyloid-Ablagerungen führte.

1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) stellen eine besondere Gruppe von neurodegenerativen Krankheiten dar, da sie übertragbar sind. Sie kommen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vor (Tab. 1.1). Die bekanntesten TSE bei Tieren sind wohl die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) und die Scrapie beim Schaf. TSE sind die einzigen bekannten amyloiden Erkrankungen, die infektiös sind. Zudem grenzen sie sich von anderen Erkrankungen ab, da sie in drei Etiologien auftreten. Sie können sowohl spontan als auch genetisch oder infektiös bedingt sein. Charakteristisch für alle TSE ist eine lange Inkubationszeit, gefolgt von Symptomen wie Demenz und Verlust der Koordinationsfähigkeit, was auf die Degeneration von Neuronen zurückzuführen ist. Der Verlust der Neuronen geht einher mit Vakuolisierung des betroffenen Gewebes, sowie extrazellulären Proteinablagerungen. Nach der langen symptomlosen Inkubationszeit enden diese Erkrankungen nach einem schnellen Krankheitsverlauf stets tödlich. Die extrazellulären Proteinablagerungen bilden Plaques, welche in amorphe und amyloide Plaques unterschieden werden können. Bei den humanen TSE werden amyloide

Plaques nur bei der Kuru-Krankheit und dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) gebildet. Bei allen anderen Krankheiten existiert keine mit Kongorot anfärbbare Ultrastruktur, so dass hier von amorphen Plaques geredet werden muss.

Tabelle 1.1: Die wichtigsten Formen der TSE.

| Krankheit | Wirt |
|--|--|
| Kuru | Mensch |
| Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (CJD) | Mensch |
| Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) | Mensch |
| Fatale Familiäre Insomnie (FFI) | Mensch |
| Scrapie | Schaf, Ziege |
| Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) | Rind |
| Chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD) | Maultierhirsche, Wapiti, Weißwedelhirsche |
| Transmissible Spongiforme Nerz-Enzephalopathie (TME) | Nerz |
| Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) | Katze |
| Exotische Huftier Enzephalopathie (EUE) | Nyala, Kudu, Gemsbock |

1.3 Die Entdeckung des Erregers

Die Natur des TSE-Erregers hat die Wissenschaft in den letzten 35 Jahren in Atem gehalten und wurde kontrovers diskutiert. Bereits 1967 erkannte Tikvah Alper eine außerordentliche auch für Viren unübliche Resistenz des Scrapie-Erregers gegenüber Inaktivierung mit ionisierender und ultravioletter Strahlung (Alper, 1967). Auch das Fehlen jeglicher Immunantwort sprach gegen einen viralen Erreger im klassischen Sinne. Schon zu diesem Zeitpunkt wurden erste Spekulationen über ein Protein als möglichen Verursacher der Erkrankung diskutiert (Griffith, 1967). Nachdem der Scrapie-Erreger zunächst auf Mäuse (Chandler, 1961) und nachfolgend auf den Syrischen Goldhamster (Marsh & Kimberlin, 1975) übertragen wurde, standen Tiermodelle zur Verfügung, welche die Aufreinigung des Erregers erleichterten und auch ein geeignetes Testsystem zur Bestimmung der infektiösen Dosis darstellten. Die Inkubationszeit ist reziprok proportional zur infektiösen Dosis (Prusiner *et al.*, 1982). Die Behandlung von infektiösen Fraktionen mit Nukleinsäure modifizierenden oder hydrolysierenden Agenzien führte zu keiner Beeinflussung der Infektiosität. Proteinzerstörende oder -verändernde Bedingungen hatten hingegen einen Verlust der Infektiosität zur Folge (Prusiner *et al.*, 1982, 1981). Prusiner folgerte daraus, dass ein essentieller Bestandteil des Erregers ein Protein sein müsste und prägte den Begriff Prion (Prusiner *et al.*, 1982) als Abkürzung für „**P**roteinaceous **i**nfectious **p**article“. Schließlich erwies sich die besondere Resistenz des Erregers gegen Proteinase K als ausschlaggebend für die Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls (Prusiner *et al.*, 1982). Als Hauptbestandteil des Erregers wurde nach einer Aufreinigung mit Proteinase K ein Protein mit einem Molekulargewicht von

27 bis 30 kDa identifiziert (Prusiner *et al.*, 1982), welches PrP für „Prion Protein“ genannt wurde. Aufgrund des Molekulargewichtes bezeichnet man es heute als PrP 27-30. Kurz darauf wurde die entsprechende cDNA identifiziert (Oesch, 1985). Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass es sich um ein wirtseigenes Gen handelte, welches in allen Arten, in denen man es fand, aktiv ist und in fast allen Säugetieren hochkonserviert ist (Basler, 1986). Damit muss das Prion Protein in zwei Isoformen auftreten: i) in einer pathologischen Form als Hauptbestandteil des Erregers (PrP^{Sc}, nach Scrapie) und ii) in einer normalen bzw. zellulären Form PrP^C im nicht-infizierten Organismus. Das resultierende zelluläre Prion-Protein (PrP^C) hat ein Molekulargewicht von 33-35 kDa (Oesch, 1985). Diese mit der Krankheit assoziierte Isoform von ebenfalls 33-35 kDa wird als Scrapie-Isoform PrP^{Sc} bezeichnet, bzw. als PrP^{BSE}, PrP^{CJD} etc. je nachdem um welchen Erreger es sich handelt. Bei PrP 27-30 handelt es sich anscheinend nur um ein Artefakt, welches durch die Aufreinigung von PrP^{Sc} mittels Proteolyse mit Proteinase K entsteht (Abb. 1.1).

Die Annahme, dass ein Protein alleine als infektiöses, replizierendes Agens dienen soll, sprach gegen das zentrale Dogma der Molekularbiologie, dass der Fluß genetischer Information immer von der Nukleinsäure zum Protein verläuft (Crick, 1970). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass infektiöse Prionpräparationen keine Nukleinsäure mit codierender oder informationstragender Funktion mehr enthalten (Kellings, 1995; Kellings *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1991).

1.4 Die Eigenschaften des zellulären PrP

1.4.1 Vorkommen

Das maturierte PrP^C ist als membrangebundenes Protein auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert. Es findet sich sowohl auf neuronalen Zellen, als auch in Herz- und Skelettmuskelzellen und in geringen Mengen in den Zellen der meisten anderen Organe, mit Ausnahme von Leber und Pankreas (Weissmann, 1994). Die Menge an PrP-mRNA und PrP^C ist im Gehirn größer als in den anderen Organen. Die höchste Menge an mRNA liegt in Nervenzellen vor (Kretzschmar *et al.*, 1986). Absolut gesehen ist der PrP^C-Level im Gehirn allerdings gering. So macht PrP^C weniger als 0,1% des Gesamtproteins des ZNS aus (Oesch, 1985; Turk *et al.*, 1988).

1.4.2 Modifikationen

Das primäre Translationsprodukt enthält zwei Signalsequenzen. Die 22 AS lange N-terminale Sequenz dient als Signal für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und wird beim Eintritt in das ER abgespalten. Die C-terminale Sequenz dient als Target für das Anhängen eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Ankers (GPI-Anker) und wird im ER durch diesen ersetzt (Bolton *et al.*, 1985; Safar *et al.*, 1990). Desweiteren bildet sich eine intramolekulare Disulfidbrücke (Turk *et al.*, 1988) und zwei N-Glykosylierungen werden angehängt (Endo *et al.*, 1989). Die beiden N-Glykosylierungsstellen sind nicht immer besetzt, so dass eine heterogene Verteilung

1 Einleitung

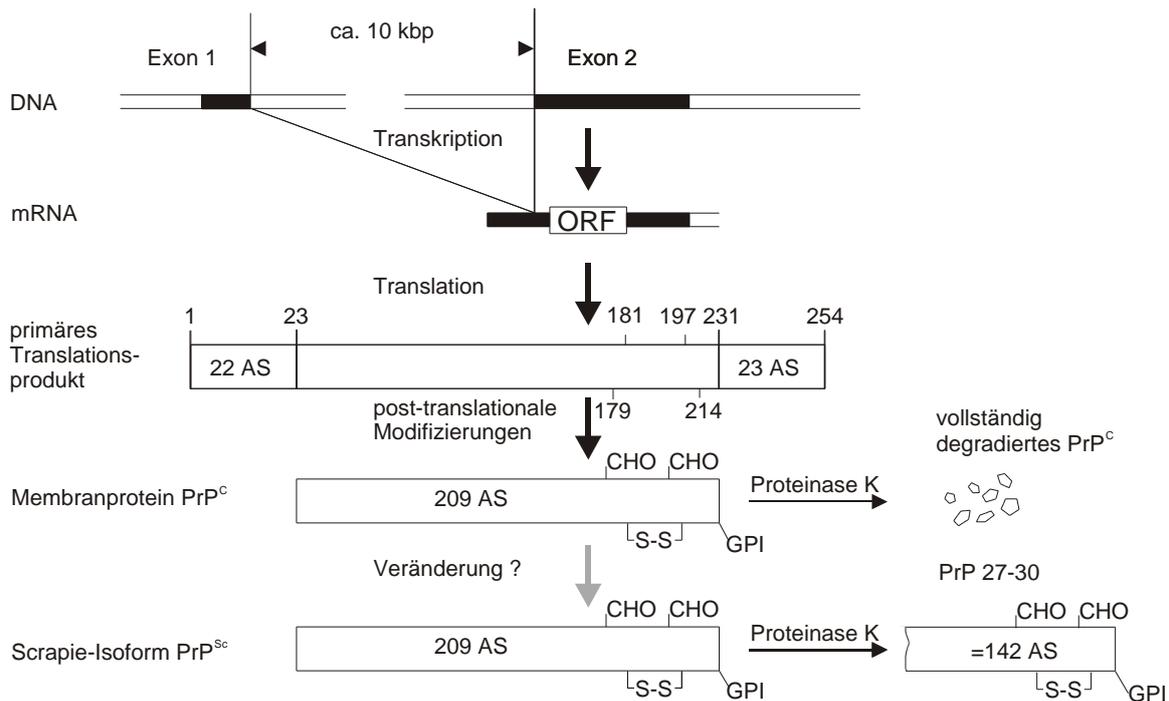


Abbildung 1.1: Biosynthese der verschiedenen Prion-Protein-Isoformen am Beispiel des Hamster Prion-Proteins. Der komplette Leserahmen des PrP liegt auf einem Exon, so dass alternatives Spleißen keinen direkten Einfluß auf PrP ausüben kann. Das primäre Translationsprodukt enthält eine Signalsequenzen für den Transport in das ER und wird beim Eintritt in das ER abgespalten. Zudem besitzt es eine C-terminale Signalsequenz zum Anhängen eines GPI-Ankers und zwei N-Glykosylierungsstellen, welche nicht immer besetzt sind, so dass eine heterogene Verteilung des Glykosylierungsmusters entsteht. Das entstehende PrP^C hat ein Molekulargewicht von 30 bis 33 kDa . PrP^C wird durch Proteinase K vollständig degradiert. Durch die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} erhält das Protein eine Teilresistenz gegen Proteinase K. Die ersten 67 AS werden abgebaut und zurück bleibt ein 27 bis 30 kDa großes Protein, PrP 27-30 (verändert nach [Weissmann \(1994\)](#)).

des Glykosylierungsmusters besteht. Die weiteren posttranslationalen Modifikationen erfolgen im Golgi-Apparat. Diese umfassen Modifikationen der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers ([Harris, 1999](#)). Wie die meisten GPI-geankerten Proteine gelangt PrP^C an die Zelloberfläche und wird dort in der Membran verankert. Es wird dabei in cholesterolreiche, detergentunlösliche Domänen der Membran gebunden ([Kaneko *et al.*, 1997a](#); [Taraboulos *et al.*, 1995](#); [Vey *et al.*, 1996](#)), bei denen es sich um Caveolae ähnliche Domänen oder frühe Endosomen handelt.

1.4.3 Funktion

Das Prion-Protein scheint eine Rolle bei der Regulation des Kupferhaushaltes zu spielen (Miura *et al.*, 1999), auch eine Superoxiddismutaseaktivität wird diskutiert (Brown *et al.*, 1999; Waggoner *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte von Mouillet-Richard *et al.* (2000) in einem Zellkultursystem gezeigt werden, dass PrP^C die Signaltransduktion beeinflusst. Doch die genaue Funktion des Prion-Proteins ist bis heute unbekannt.

1.5 Prion-Replikation

1.5.1 Biochemische und physikalische Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Zwischen PrP^C und PrP^{Sc} konnte kein Unterschied in der chemischen Zusammensetzung gefunden werden (Stahl *et al.*, 1994). Aber es gibt Unterschiede in ihrer Struktur und ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften. So ist PrP^C, im Gegensatz zu PrP^{Sc}, in milden Detergenzien löslich. Wird PrP^{Sc} in Lösung gebracht, kommt es zu einem Verlust der Infektiosität. PrP^{Sc} bildet Aggregate, welche entweder amorph vorliegen oder aber amyloide Fibrillen bilden (Merz *et al.*, 1981; Prusiner, 1983). Durch den gegenseitigen Schutz erhalten Prione Resistenz gegen Hitzedenaturierung und Abbau durch Proteinase. Während der Proteolyse durch Proteinase K (PK) wird ein etwa 68 AS umfassendes N-terminales Segment abgespalten. Die exakte Position des Schnittes variiert dabei von Stamm zu Stamm (Kap. 1.5.2). Der verbleibende Rest, das schon erwähnte PrP 27-30, bildet sehr regelmäßige amyloide Stäbchen (Prion-Rods), wenn die Proteolyse in Anwesenheit von Sarkosyl durchgeführt wird, und widersteht der PK-Verdauung mehrere Tage. Dies gilt v. a. für PrP^{Sc}, während z. B. PrP^{BSE} wesentlich Proteinase-sensitiver ist. PrP^C hingegen wird von PK innerhalb von Minuten zu kurzen Oligopeptiden verdaut (McKinley *et al.*, 1983).

Gentechnisch modifizierte Mäuse, die nur die N-terminal verkürzte Form PrP 27-30 exprimieren, können noch infiziert werden und die Krankheit weiter übertragen (Fischer *et al.*, 1996). Daher muss man annehmen, dass die volle Länge des Proteins nicht für einen Replikationszyklus notwendig ist. Allerdings scheint der N-Terminus bestimmte familiäre Formen der Prionkrankheiten zu determinieren (Riek *et al.*, 1998).

Auch wenn sich PrP^C und PrP^{Sc} nicht in ihrer Primärstruktur unterscheiden, so zeigten vergleichende Strukturuntersuchungen mittels Circular dichroismus und Infrarot-Spektroskopie deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur. So hat PrP^C einen α -helikalen Anteil von 42% und nur einen sehr geringen Anteil an β -Faltblatt (ca. 3%). PrP^{Sc} hingegen weist einen etwas verringerten Anteil an α -Helix von 30% und einen deutlich erhöhten Anteil an β -Faltblatt von 43% auf (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993). Es handelt sich bei den zwei verschiedenen Formen des Prion-Proteins also um Konformationsisomere.

Die dreidimensionale PrP-Struktur konnte bisher nur an rekombinantem PrP aus *E. coli* ermittelt werden, da es bis heute nicht gelungen ist, PrP^C in großen Mengen aufzureinigen. Obwohl rekombinantes PrP keine Glykosylgruppen und keinen GPI-Anker

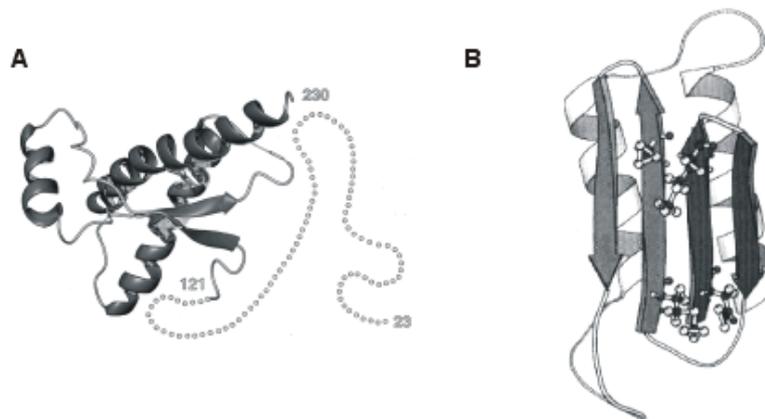


Abbildung 1.2: Dreidimensionale Struktur und Strukturmodell der PrP-Isoformen PrP^C und PrP^{Sc}. (A) NMR-Struktur des humanen rec PrP(23-231) (Zahn *et al.*, 2000) (B) Strukturmodell von PrP 27-30 des Hamsters (Huang *et al.*, 1996).

trägt und die Strukturbestimmung in Wasser und nicht in der natürlichen Membranumgebung vorgenommen wurde, gilt die ermittelte Struktur allgemein als Modell von PrP^C. Mittlerweile wurde die Struktur von PrP der Maus (Riek *et al.*, 1997), des Hamsters (Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997) und des Menschen (Zahn *et al.*, 2000) bestimmt. Abb. 1.2 A zeigt die Tertiärstruktur von humanen PrP^C. Die PrP^C-Isoform weist drei α -Helices und ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt auf. Der N-Terminus ist unstrukturiert und hoch flexibel, was aber an den Lösungsmittelbedingungen liegen kann. Im unstrukturierten N-Terminus befindet sich eine Oktarepeatregion. Hierbei handelt es sich um eine Wiederholungssequenz von acht Aminosäuren.

Aufgrund seiner Unlöslichkeit ist PrP^{Sc} für physikalische Strukturuntersuchungen schlecht zugänglich. Es existiert lediglich ein Modell der Tertiärstruktur für PrP 27-30 des Hamsters (Huang *et al.*, 1996), welches in Abb. 1.2 B dargestellt ist. PrP 27-30 hat im Gegensatz zu PrP^C kürzere α -Helices und zwei lange β -Faltblätter.

1.5.2 Scrapie-Stämme, Spezies-Spezifität

Die Definition der Erregerstämme hat sich im Laufe der Jahre entwickelt. Bereits 1961 (Pattison, 1961) stellte man fest, dass sich die Erkrankungsformen bei den Wiederkäuern unterscheiden. Mittlerweile lassen sich TSE-Erregerstämme anhand von sieben Kriterien unterscheiden:

- Klinische Symptomatik
- Inkubationszeit
- Übertragbarkeit
- Histopathologische Läsionsprofile

1 Einleitung

- Inaktivierungsverhalten
- PK-Resistenz von PrP^{Sc} und resultierende Spaltstellen
- PrP^{Sc}-Glykolysierungsmuster

Die Inkubationszeit und Übertragbarkeit des TSE-Erregers ist aber nicht nur stammsondern auch speziesspezifisch, d.h. vom wirtseigenen Genhintergrund abhängig. Gerade die Sequenzhomologie der beiden PrP-Gene scheint die Übertragbarkeit zu beeinflussen. Ein undifferenzierter Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen zwei Arten ist allerdings nicht zulässig, vielmehr scheint die Topologie entscheidend zu sein (Krakauer *et al.*, 1996). Bestimmte Bereiche innerhalb der PrP-Aminosäuresequenz scheinen für die Effizienz der Artenschanke bedeutsamer zu sein als andere (Schätzl *et al.*, 1995).

PrP^{Sc} allein kann aber nicht alle Eigenschaften der Prionkrankheiten erklären. Es gibt Hinweise, dass noch ein oder mehrere andere Faktoren des Wirtes das Verhalten von PrP^{Sc} im Wirt beeinflussen. Dieser unbekannte Faktor X scheint die Spezies-Spezifität erheblich zu beeinflussen. Diskutiert werden u. a. Chaperone bzw. chaperonähnliche Proteine. Faktor X bindet offenbar am C-Terminus (Telling *et al.*, 1994, 1995). Die genaue Bindestelle wird bei Mäusen von den Aminosäuren 168, 172, 215 und 219 gebildet, die in der 3D-Struktur eng benachbart sind und ein Epitop ausbilden (Kaneko *et al.*, 1997b; Scott *et al.*, 1997).

Zur Erklärung der Scrapie-Stämme gibt es neben dem Faktor X noch weitere Hypothesen. So könnte PrP^{Sc} stammsspezifisch unterschiedlich glykolysiert sein oder die Stammspezifität liegt in unterschiedlichen Proteinkonformationen begründet. Dass die Stämme unterschiedliche Konformationen haben, wurde mittels des konformationsabhängigen Immunotests (CDI) gezeigt (Safar *et al.*, 1998). Hierdurch konnten acht verschiedene an den Syrischen Goldhamster adaptierte Scrapie-Stämme unterschieden werden. Es muss eingeschränkt werden, dass die verschiedenen physikalischen Eigenschaften nur im aggregierten Zustand vorhanden sind, so dass zwischen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen nicht zu unterscheiden ist.

Ein weiterer Befund des CDI ist, dass sich die verschiedenen Inkubationszeiten der Scrapie-Stämme überwiegend aus unterschiedlichen PrP^{Sc} -„clearance“-Raten aus dem Gehirn ergeben. Mit der „clearance“-Rate wird die Rate der Entfernung von inokuiertem PrP^{Sc} aus dem Gehirn beschrieben. So bewirken Prion-Stämme, welche leicht abgebaut werden, eine verlängerte Inkubationszeit. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass PrP^{Sc} sowohl aus PK sensitivem, als auch aus PK resistentem Material besteht. Die Menge an PK sensitivem Material, welches von einem Stamm gebildet wird, steht in linearem Zusammenhang mit der Inkubationszeit. Es scheint also, dass sich PrP^{Sc} durch Bildung von PK resistentem Material der „clearance“ entzieht. Die PK-Sensitivität unterscheidet sich erheblich zwischen den verschiedenen Stämmen. Eine unterschiedliche PK-Sensitivität war schon zuvor in der höheren Sensitivität des PrP^{BSE} im Vergleich zu PrP^{Sc} bekannt.

1.5.3 Replikations-Hypothesen

Der Befund, dass der Erreger ein Protein ist, warf die Frage auf, wie sich ein Protein repliziert. Ein Modell der Prion-Replikation sollte in der Lage, sein alle Eigenschaften des Erregers zu erklären. Dazu zählt vor allem das Auftreten sporadischer, familiärer und infektiöser Formen der Krankheit. Auch die Existenz verschiedener Scrapie-Stämme muss mit dem Modell in Einklang gebracht werden.

Man stellt sich vor, dass PrP^{Sc} beim Infektionsprozess in engen Kontakt mit PrP^C kommt und diesem seine pathogene Konformation aufzwingt (Prusiner *et al.*, 1990). PrP^{Sc} würde damit als Umfaltungshilfe für PrP^C dienen. Proteine als Faltungshilfen sind schon von Chaperonen bekannt. Die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} ist ein autokatalytischer Prozess und läuft so lange, wie neues PrP^C gebildet wird. Es sind im Wesentlichen drei Modelle, die im Rahmen der Prionhypothese diskutiert werden.

Heterodimer-Modell

Das von Prusiner entwickelte Heterodimer-Modell (Abb. 1.3, Cohen *et al.* (1994)) geht davon aus, dass PrP^C mit PrP^{*}, einem Übergangsintermediat, welches eine leicht destabilisierte Struktur besitzt, im Gleichgewicht steht. Der kritische Schritt im Umwandlungsprozess ist die Bildung eines Heterodimers aus PrP^{*} und PrP^{Sc}. Daran schließt sich dann die Umwandlung von PrP^{*} in PrP^{Sc} an. Aus dem Heterodimer wird ein PrP^{Sc}-Homodimer, welches dissoziieren kann und entweder wieder in den Zyklus zurückgeführt oder durch Aggregation der Reaktion entzogen wird. Das Reaktionsschema dieser Reaktion ist das einer linearen Autokatalyse, die zu einer exponentiell ansteigenden Bildung von PrP^{Sc} führt. Das Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} muss auf der Seite von PrP^{Sc} liegen, da sonst keine treibende Kraft für den katalytischen Umsatz vorhanden wäre. Eigen (Eigen, 1996) hat nun berechnet, dass die spontane Umwandlung extrem langsam verlaufen muss, ansonsten würde PrP^{Sc} sogar ohne Infektion ansteigen. Damit aber eine so langsame spontane Umwandlung eine Infektion innerhalb der Lebenszeitspanne eines Lebewesens zur Krankheit führt, müsste man eine katalytische Beschleunigung von 10^{15} annehmen. Eine solche Beschleunigung ist unter den bekannten enzymatischen Reaktionen unbekannt und daher in dieser Form eher unwahrscheinlich. Dieses Modell wurde mittlerweile aufgrund von Ergebnissen mit transgenen Tieren zum *Template-assisted* Anlagerungsmodell erweitert. Dabei wird PrP^{*} durch die Bindung eines weiteren Proteins, dem sogenannten Protein X stabilisiert und der Komplex interagiert mit PrP^{Sc} (Cohen & Prusiner, 1998).

Kooperatives Prusiner-Modell

Eigen formuliert in seinem kooperativen Prusiner-Modell (Abb. 1.4) ein erweitertes Heterodimer-Modell (Eigen, 1996). Hier müssen mehrere Moleküle PrP^{Sc} kooperativ zusammenwirken, um ein Molekül PrP^C umzuwandeln. Damit ist der katalytische Effekt eines einzelnen PrP^{Sc}-Moleküls geringer als im Heterodimer-Modell. Das Modell lehnt sich an

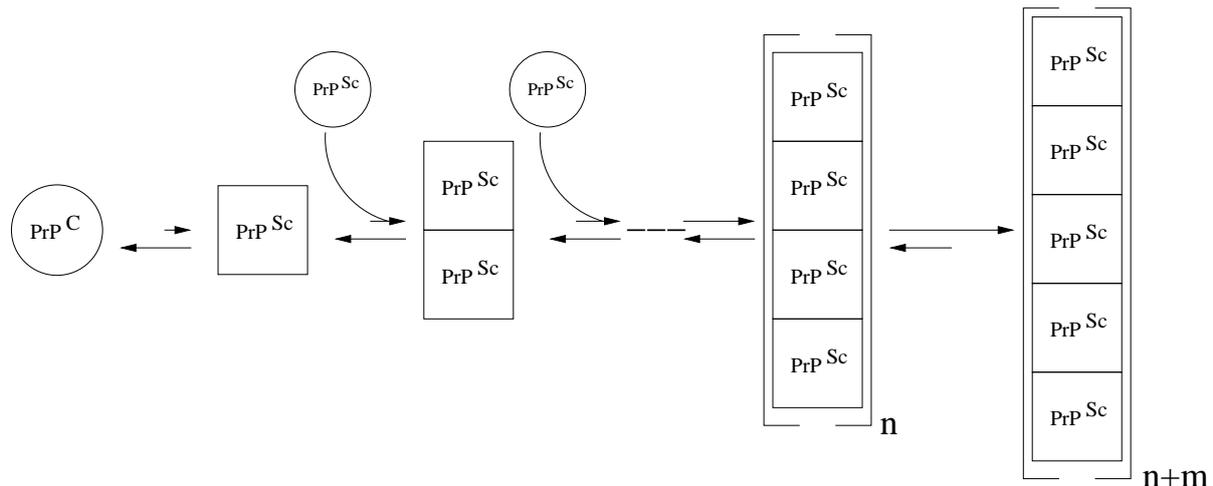


Abbildung 1.5: Keiminduzierte Aggregation PrP^{C} und PrP^{Sc} stehen im Gleichgewicht, welches auf Seiten von PrP^{C} liegt. Binden weitere PrP^{C} -Moleküle, verschiebt sich das Gleichgewicht weiter in Richtung des Komplexes, liegt aber noch nicht auf dessen Seite, bis eine bestimmte Keimgröße erreicht ist. Ab hier verlagert sich das Gleichgewicht in Richtung des Keimwachstums (Lansbury & Kosik, 2000).

Keiminduzierte Aggregation

Lansbury hat sein Modell der Prion-Replikation (Abb. 1.5, Lansbury & Kosik (2000)) von der keiminduzierten Aggregation abgeleitet, die schon für eine Vielzahl von Aggregationsprozessen beschrieben worden ist (Caughey *et al.*, 1995; Come *et al.*, 1993). Er geht von der sogenannten „Linearen Kristallisation“ aus. Im Gegensatz zu den beiden ersten Modellen liegt hier das Gleichgewicht auf der Seite von PrP^{C} . Gleiches gilt für folgende Gleichgewichte, so dass sich weitere Oligomere nur mit abnehmender Konzentration bis zu einem Nukleus bilden. Der Nukleus ist der erste stabile Zwischenzustand, von dem an das Wachstum über den Zerfall überwiegt. So können sich beliebig viele Aggregate bilden. Nach Lansbury stellt also erst der Nukleus ein infektiöses Partikel dar.

1.6 Erregerausbreitung im Körper nach peripherer Übertragung

Die Erregerausbreitung von peripheren Geweben zum ZNS verläuft offensichtlich über PrP^{C} -exprimierendes Gewebe (Blättler, 1997). Es werden zwei Wege diskutiert, die der Erreger benutzt. Zum einem kann er sich über das hämatopoetische System ausbreiten, zum anderen über das Nervengewebe.

1.6.1 Bedeutung des hämatopoetischen Systems

Splenektomie vor einer experimentellen Scrapie-Infektion verlängern die Inkubationszeit. Auch eine Immunsuppression verringert die Empfänglichkeit. Ganzkörper-Bestrahlung führt nicht zu einer Verlängerung der Inkubationszeit. Somit scheinen schnell teilende Zellen keine wesentliche Rolle bei der peripheren Übertragung zu spielen, sondern eher langlebige, strahlenresistente Zellen im lymphoretikulären System. Dies sind z. B. die follikulardendritischen Zellen (FDC) in Milz und Lymphgewebe. FDC exprimieren PrP^C und akkumulieren PrP^{Sc} bei *intra peretonal* (i. p.) infizierten Mäusen. Eine mögliche Interpretation der Ergebnisse ist, dass FDC in die periphere PrP^{Sc}-Akkumulation involviert ist.

Die periphere Ausbreitung des Scrapieerregers verläuft offensichtlich in verschiedenen Spezies in unterschiedlicher Weise. In experimentell infizierten Mäusen und Hamstern konnte eine Replikation im lymphoretikulären System gezeigt werden, bevor entsprechende Titer im ZNS zu finden sind. Entsprechende Befunde sind auch bei Scrapie erzielt worden. Hingegen finden sich experimentell bei oral mit BSE infizierten Rindern infektiöse Titer nur in den Peyer'schen Plaques und nicht in Milz oder Lymphknoten. (Zur Übersicht: Hörnlimann. *et al.* (2001))

1.6.2 Die neuronale Ausbreitung von PrP^{Sc}

Neben der Replikation im lymphoretikulären System ist das neuroinvasive Verhalten des infektiösen Agens von entscheidender Bedeutung. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass das periphere Nervensystem essentiell in der Infektionsausbreitung zum Rückenmark und Gehirn involviert ist. Dies gilt sowohl für Scrapie in Schaf, Maus und Hamster als auch für BSE. Studien an parental infizierten Mäusen und Hamstern haben gezeigt, dass die Infektion im Bereich der thorakalen Wirbelsäule in das Rückenmark eindringt und von dort in das Gehirn gelangt.

Die gegenwärtige Datenlage legt nahe, dass der Scrapieerreger nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt entlang des Vagusnervs zum *Nucleus dorsalis nervi vagi* bzw. *Nucleus tractus solitarii* wandert und über diese Eintrittsstelle in der *Medulla oblongata* das Gehirn infiziert. Daneben erreicht er nach Passage des Magen-Darm-Traktes über eine bislang nicht identifizierte Zuleitung, vermutlich dem *Nervus splanchnicus*, die graue Substanz im Bereich des thorakalen Rückenmarks. (Zur Übersicht: Beekes *et al.* (1998))

1.7 Die wichtigsten Formen der TSE

1.7.1 Kuru

In Papua-Neuguinea war Kuru eine endemische Krankheit des Eingeborenenstammes der Fore (Gajdusek & Zigas, 1957). Kuru bedeutet übersetzt „schüttelfrostartiges Zittern“. Heute steht außer Zweifel, dass Kuru auf Endokannibalismus und die damit in Zusammenhang stehenden Handlungen zurückzuführen war. Sie war die erste humane TSE,

bei der die infektiöse Ausbreitung erkannt wurde. Mit dem Verbot des Kannibalismus 1954 gingen auch die Fälle von Kuru zurück.

Die Übertragung fand wahrscheinlich entweder enteral als Folge des Verzehrs von infektiösem Gehirngewebe verstorbener Angehöriger oder parenteral durch mukösen Kontakt während der Entfernung des Gehirns aus dem Schädel und dessen Zubereitung statt. Während oral Infizierte nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich etwa 15 bis 20 Jahren an Kuru erkrankten, war die Inkubationszeit bei parenteraler Infektionsroute mit 2 bis 15 Jahren kürzer (Donnelly, 1997; Klitzman, 1984).

1.7.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die häufigste bei Menschen auftretende Prionkrankheit ist die sporadische Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (sCJD). Sie macht 80 bis 90 % aller CJD-Fälle aus. Die Inzidenz beträgt 0,3 bis 1,3 Fälle auf eine Million Einwohner pro Jahr. Rund 10 % aller CJD-Fälle sind familiären Ursprungs (fCJD), welche autosomal-dominant vererbt werden. Darüber hinaus gibt es noch die iatrogene CJD (iCJD), von welcher es bisher über 200 Fälle weltweit gibt. Der Großteil dieser Fälle geht auf die Verabreichung erregerehaltiger Hormonpräparate zurück. Die altersspezifische Inzidenz zeigt übereinstimmend in allen Ländern einen Gipfel zwischen dem 70. und 79. Lebensjahr. Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer (1,4:1) (Cousens, 1997).

Typisch für die CJD ist eine rasch fortschreitende Demenz, die mit einer Reihe anderer neurologischer Symptome wie z. B. Spastik, Hyperreflexie, Tremor und Ataxie einhergeht. In der Mehrzahl der Fälle finden sich hinweisende Veränderungen im EEG und im Liquor im Vergleich zu Gesunden. Eine Ausnahme besteht hier bei der neuen Varianten der CJD (nvCJD).

Ende 1995, Anfang 1996 wurden in Großbritannien einige CJD-Fälle bei jungen, d. h. 20 bis 30-jährigen Patienten identifiziert. Die weitere Untersuchung ergab, dass diese Fälle einen ungewöhnlichen klinischen Phänotyp gegenüber der sCJD aufwiesen. Psychiatrischen Symptomen traten früher auf und der klinische Verlauf war verlängert. Bis Anfang 2002 waren 100 „neue Variante CJD“-Fälle (nvCJD) in Großbritannien, drei Fälle in Frankreich und ein Fall in Irland identifiziert worden.

Durch die lokale Häufung in Großbritannien wurde vermutet, dass nvCJD mit BSE kausal verbunden ist. Weitere Befunde unterstreichen, dass nvCJD eher Eigenschaften von BSE als von sCJD besitzt und daher womöglich der Verzehr von mit BSE kontaminierten Nahrungsmitteln die Ursache für nvCJD sein könnte. So zeigten vergleichende biochemische und histopathologische Analysen (Kap. 1.5.1), z. B. nach Übertragung von BSE auf Makaken, dass die Erreger von nvCJD und BSE mehr Ähnlichkeiten aufweisen als die von nvCJD und sCJD. Über den möglichen weiteren Verlauf der Epidemie wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Aktuelle Fallzahlen bis Anfang 2002 sind in Abb. 1.6 abgebildet.

Angaben zur Inkubationszeit liegen naturgemäß nur bei iCJD vor. Bei direktem Kontakt des Hirns mit infektiösem Agens, z. B. durch neurochirurgische Instrumente, beträgt die Inkubationszeit 15 bis 28 Monate, nach Dura-Mater Transplantation 1,3 bis 16,1 Jahre und nach peripherer Inokulation durch Hormoninjektion 4,5 bis 30 Jahre. Bei der nvCJD

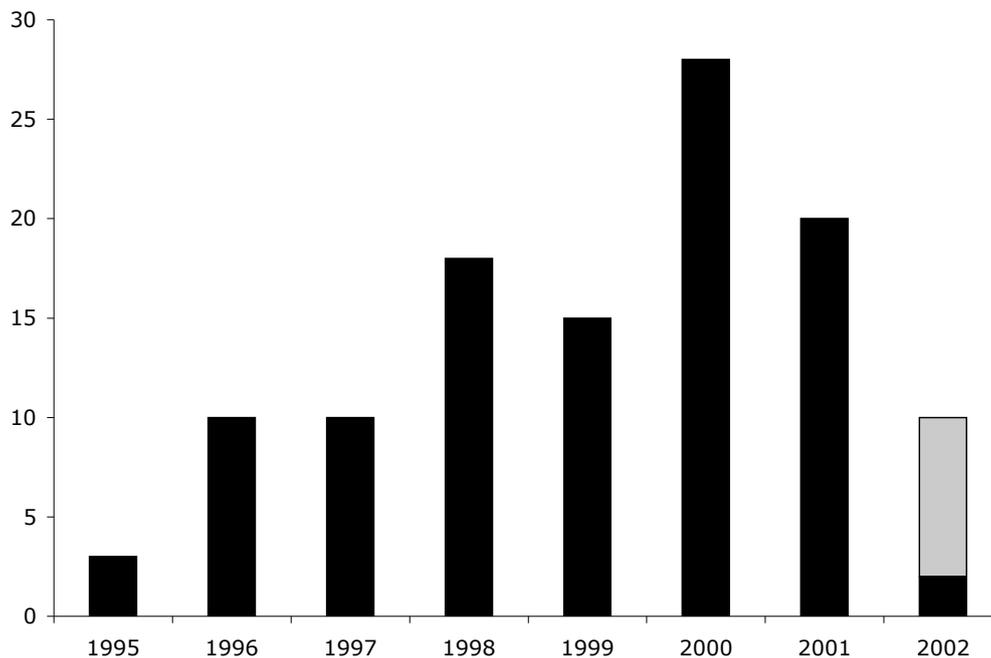


Abbildung 1.6: nvCJD Anzahl der gesicherten (schwarz) nvCJD-Fälle weltweit. Ungesicherte Fälle sind in hellgrau eingetragen. Stand: 7. Januar 2002 (Food Standard Agency, 2002)

wird eine minimale Inkubationszeit von 4,5 Jahren angenommen. Die durchschnittliche Inkubationszeit kann nach heutigem Wissensstand nicht ermittelt werden.

1.7.3 Scrapie

Mit wenigen Ausnahmen tritt weltweit in allen schafhaltenden Ländern die Tierseuche Scrapie, in Deutschland auch Traberkrankheit genannt, auf. Die erste dokumentierte Fallbeschreibung stammt aus dem Jahr 1732 (McGowan, 1914). Mit spezifischen Klassifizierungsmethoden ist es gelungen, mehr als 15 verschiedene Scrapie-Stämme (Kap. 1.5.2) zu unterscheiden (Bruce, 1991). Scrapie kommt am häufigsten bei Schafen im Alter von 2 bis 5 Jahren vor, wobei männliche wie weibliche Schafe gleichermaßen betroffen sind (Dickinson, 1976; Sigurdson, 1991). Da sich die meisten Tiere vermutlich während oder unmittelbar nach der Geburt infizieren, ist das Alter beim Einsetzen der Symptome mit der Inkubationszeit mehr oder weniger identisch.

Bei betroffenen Tieren kommt es zu Verhaltensänderungen, Juckreiz, Bewegungsstörungen und Zittern. Durch den stetigen Juckreiz scheuern sich betroffene Tiere bis zum Verlust der Wolle, was zu erheblichen ökonomischen Verlusten führt. Im weiteren Verlauf

werden die Tiere nervös und aggressiv und trotz anhaltenden Appetits tritt häufig Gewichtsverlust auf.

Übertragung

Die maternale Übertragung des Erregers auf die Nachkommen spielt nach einer Studie die Hauptrolle in der Scrapie-Ausbreitung. Das infektiöse Agens wird entweder während der Geburt auf die Nachkommen übertragen, wobei die Erregeraufnahme durch Hautläsionen oder Bindehäute aus dem infektiösen Fruchtwasser erfolgt, oder durch den Verzehr der infektiösen Plazenta aufgenommen (Pattison, 1991).

Eine Übertragung von Scrapie auf den Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Gemäß epidemiologischen Beobachtungen (Wientjens, 1996; Will *et al.*, 1996) besteht selbst in Ländern mit intensiver Schafhaltung keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Scrapie und dem Vorkommen irgendeiner Form transmissibler spongiformer Enzephalopathien des Menschen. Während die sporadische CJD weltweit mit einer konstanten Häufigkeit auftritt, ist die Scrapie-Prävalenz von Land zu Land sehr unterschiedlich. Auch wurden keine Hinweise gefunden, dass die Inzidenz für CJD bei beruflich besonders exponierten Menschen, wie Forschern, Veterinärpathologen usw., im Vergleich zur Normalpopulation erhöht ist (Wientjens, 1996). Beim Versuch Scrapie auf Primaten zu übertragen erwiesen sich Schimpansen in einer Beobachtungszeit von über 12 Jahren als unempfindlich (Gibbs, 1979).

1.7.4 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Von besonderer ökonomischer Bedeutung ist die seit 1985 in Großbritannien auftretende Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE). Die häufigsten Anfangsbefunde der BSE sind Konditions- und Gewichtsverlust oder verminderte Milchleistung. Später folgen Verhaltensstörungen, Bewegungsstörungen und Sensibilitätsstörungen (Schicker, 1997). Die Verhaltensstörungen manifestieren sich in der Regel in erhöhter sensomotorischer Erregbarkeit wie Schreckhaftigkeit, Ängstlichkeit, Unruhe und Nervosität. Die Sensibilitätsstörungen betreffen vor allem eine Hypersensibilität auf taktile Reize, Lärm und Licht. Bewegungsstörungen äußern sich durch Ataxie (Wilesmith *et al.*, 1992). Beim Fortschreiten der Krankheit haben betroffene Tiere Schwierigkeiten sich zu erheben (Wilesmith *et al.*, 1992).

Heute wird im allgemeinen angenommen, dass BSE durch die Verfütterung von Scrapie infizierten Schafkadavern in Form von Tiermehl an Rinder entstanden ist. Zwischen 1974 und 1984 stellten beinahe alle Tiermehl-Produzenten vom sog. *Batchverfahren* auf das *Kontinuierliche Verfahren* um. Bei dem neuen Verfahren wurde, u. a. wegen der Rückstandsproblematik, auf Lösungsmittel zur Fettextraktion verzichtet. Damit einhergehend senkte man die Erhitzungstemperatur. Während früher mit mindestens 120°C gearbeitet wurde, wurden jetzt nur noch Temperaturen von 80 bis 90 °C angewandt. Aufgrund der Eigenschaften des Erregers, insbesondere der erheblichen Hitzestabilität, wurde dieser durch die gewählten Bedingungen im Herstellungsverfahren des Tiermehls nicht mehr ausreichend inaktiviert. Ein weiterer Umstand, der die Übertragung des Erregers

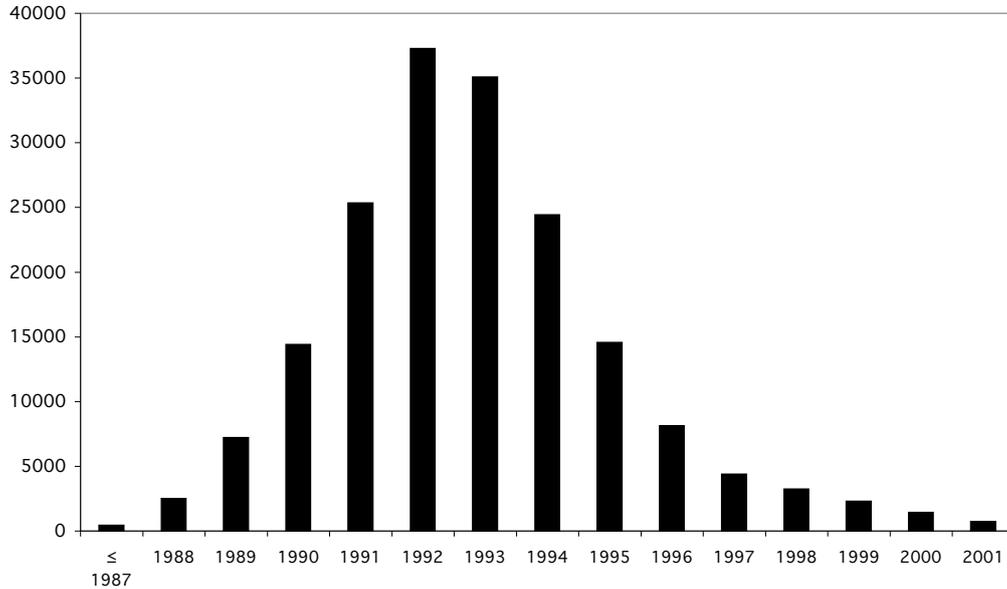


Abbildung 1.7: Verlauf der BSE-Epidemie bis Ende 2001. Aufgelistet sind die nachgewiesenen Fälle in GB. Bemerkenswert ist, dass die Epidemie entgegen den Erwartungen nur langsam abklingt. (Food Standard Agency, 2002)

begünstigte, war das häufige Vorkommen von Scrapie in britischen Schafpopulationen. Es wird geschätzt, dass ca. 35 % der Zuchtfarmen eine jährliche herdeninterne Scrapie-Inzidenz von ca. 1 % aufwiesen (Morgan *et al.*, 1990). Daher ist unter den erwähnten Umständen die wahrscheinlichste Hypothese, dass BSE durch die Übertragung des Scrapie-Erregers auf das Rind entstand.

Der Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien ist in Abb. 1.7 gezeigt. Seit 1988 darf in Großbritannien kein Tiermehl mehr an Wiederkäuer verfüttert werden und seit 1989 dürfen keine bovinen Innereien mehr in die menschliche Nahrungskette gelangen. 1992 erreichte die Epidemie mit 36.682 Fällen pro Jahr (Skegg, 1996) ihren Höhepunkt. Dies entspricht einer mittleren nationalen Jahresinzidenz von rund 1 %. Seit Einführung des Verfütterungsverbots für Tiermehl nimmt die Zahl der betroffenen Rinder stetig ab.

Die Dauer zwischen dem Erlass des britischen Verbots Mitte 1988, Wiederkäuerproteine an Wiederkäuer zu verfüttern, und dem sichtbaren Greifen der Maßnahmen im Jahr 1993, als der Höhepunkt der Epidemie überwunden war, wies auf eine durchschnittliche Inkubationszeit von 4,5 Jahren hin. Das maximale Alter eines betroffenen Rindes, das jemals festgestellt wurde, betrug 18 Jahre (Britische Landwirtschaftsministerium, 1997), das minimale Alter war 20 Monate (Bradley & Wilesmith, 1993). Die experimentell festgestellte Inkubationszeit betrug im Mittel 3 Jahre. Bei entsprechenden Versuchen wurde gezeigt, dass 1 g Hirngewebe von BSE-Kühen, oral an Kälber verabreicht, ausreicht, um

ein Tier zu infizieren (Anderson *et al.*, 1996; Bradley, 1996; Wells, 1996).

Die herdeninterne Inzidenz lag selbst zum Höhepunkt der Epidemie in Großbritannien nie über 3,5% (allerdings muss beachtet werden, dass in GB immer nur klinische Fälle diagnostiziert wurden). Dies läßt den Schluß zu, dass eine direkte horizontale Rind-zu-Rind Übertragung nicht von epidemiologischer Relevanz sein konnte (Wilesmith, 1996). Die Hauptübertragung geschah höchstwahrscheinlich, wie schon weiter oben erläutert, durch die orale Aufnahme des Erregers über kontaminiertes Tiermehl.

In Zusammenhang mit dem Auftreten von BSE wurde auch bei verschiedenen Zootieren, vor allem Großkatzen, eine TSE beobachtet, die höchstwahrscheinlich ebenfalls durch Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl und Tierbestandteilen verursacht wurde (Bons *et al.*, 1996).

Eine natürliche Übertragung von Prionkrankheiten auf Schweine scheint nicht vorzukommen, experimentell gelang dies aber durch Inokulation des BSE-Erregers in das Gehirn von Schweinen. Die Inkubationsdauer war allerdings länger als die normale Lebensdauer von Schweinen. In den meisten Industrieländern wurde bis Anfang 2001 dem Schweinefutter i.d.R. ein erheblicher Anteil tierischer Proteine in Form von Tiermehl beigemischt. Trotzdem wurde bisher weltweit keine auf dem Fütterungsweg entstandene spongiforme Enzephalopathie beim Schwein beobachtet (Bradley, 1997).

Eine ungesicherte Studie geht davon aus, dass der BSE-Erreger vom Rind wieder auf Schafe zurück übertragen werden kann. Mit dem BSE-Erreger infizierte Schafe waren nicht von Scrapie-infizierten Schafen unterscheidbar (Foster *et al.*, 1993). Es gibt also eine theoretische Gefahr, dass der BSE-Erreger auf den Menschen, neben dem Verzehr von infizierten Rindern, in dieser Form übertragen werden kann.

1.8 Diagnose der TSE

Die Prionkrankheiten manifestieren sich in einem breiten Spektrum an Symptomen und klinischen Befunden. Doch eine sichere Diagnose kann, außer bei familiären Fällen, nur *post mortem* anhand einer Hirnbiopsie erfolgen, da das gemeinsame Vorkommen einer Gliose, der Vakuolisierung des Hirns und PrP-Ablagerungen erforderlich ist.

1.8.1 Humane TSE

Sogenannte „wahrscheinliche“ Fälle sind durch ihre klinische Symptomatik definiert. Bisläng ist der direkte Nachweis von PrP^{Sc} in Körperflüssigkeiten mit klinischen Standardverfahren noch nicht möglich. Es steht somit kein krankheitsspezifischer, einfach durchzuführender Test zur Verfügung. Ein Ansatz besteht mit dem sogenannten 14-3-3 Test. Dieser beruht auf dem Nachweis des 14-3-3 Proteins als Epiphänomen im Liquor bei raschem Nervenzelluntergang (Hsich *et al.*, 1996; Moussavian *et al.*, 1997; Zerr *et al.*, 1997). Er ist der derzeit beste Labortest an lebenden Patienten. Daneben wird der Nachweis von weiteren Surrogatmarkern wie der neuronspezifischen Enolase (NSE) (Schaarschmidt, 1994) und des Proteins S100b (Otto *et al.*, 1998) im Liquor erprobt. Alle Surrogatmarker sind Ausdruck eines neuronalen Untergangs oder einer Astrozytenaktivierung und können deshalb nicht allein zur Diagnose von CJD herangezogen

werden. Sie können nur unterstützend bei einer Differentialdiagnose benutzt werden. Die Differentialdiagnose kann durch bildgebende Verfahren wie Computertomographie (Hayashi, 1992; Westphal, 1985) und Kernspintomographie (Finkenstaedt *et al.*, 1996) weiter unterstützt werden.

Bei nvCJD stellt sich die Situation anders dar. Die Routineparameter sind bei der nvCJD unauffällig (Zeidler *et al.*, 1997). Das Protein 14-3-3 läßt sich nur in der Hälfte der Fälle nachweisen (Schaarschmidt, 1994). Surrogatmarker werden auch bei der nvCJD in abnormaler Konzentration gemessen, diese sind jedoch im Vergleich zur sCJD deutlich niedriger.

1.8.2 Tier-TSE

Durch eine aktive Überwachung können Datenbanken über Epidemieverlauf, Risikoabschätzung etc. angelegt werden, aus denen Erkenntnisse zu einer Diagnose gezielten Bekämpfung gewonnen werden können. Dafür sprechen sowohl Interessen der Wirtschaft als auch des Verbraucherschutzes. Die wirtschaftlichen Verluste bei der BSE beruhen nicht allein auf dem Verlust der Fleischproduktion. Etwa 80 % aller pharmazeutischen Produkte auf dem Markt der Europäischen Union enthalten Substanzen, die aus oder mit Hilfe von Rinder-, Schaf- oder Ziegenbestandteilen hergestellt werden. Gelatine ist z. B. ein sehr häufig verwendeter Hilfsstoff. In vielen Arzneimitteln und Kosmetika werden Stoffe wie Magnesiumstearat, Glycerol und Fettalkohole eingesetzt. Diese werden aus Talg hergestellt, welcher ausschließlich durch Ausschmelzen von Schlachtabfällen gewonnen wird. Für die Produktion gentechnologisch synthetisierter Medikamente werden oft Rinderprodukte wie fötales Kälberserum oder Rinderalbumin gebraucht.

Auch wenn bisher keine Übertragung von Scrapie auf den Menschen bekannt ist, so darf dennoch nicht der Schluß gezogen werden, dass Scrapie für den Menschen ein Null-Risiko darstellt. Scrapie könnte eventuell über den Umweg BSE zum Verbraucher gelangen. Grundlage dieser Vermutung ist, dass BSE experimentell auf Schafe übertragbar ist und dann nicht mehr von der Scrapie unterscheidbar ist (Foster *et al.*, 1996, 1993, 1994). Somit könnten bestimmte Schafsorgane ein Risiko für den Menschen darstellen. Zudem ist bei BSE keine horizontale Übertragung bekannt, bei Scrapie allerdings schon. Es besteht jetzt also die potentielle Gefahr, dass BSE in Schafen auch horizontal übertragen wird und so zu einer BSE-Endemie führen kann. Lag die herdeninterne Inzidenz in GB bei BSE nie über 3,5 % (Wilesmith, 1996), so liegt die Bestandsmortalität in Schafsherden bei 3 bis 20 % (Pattison, 1965; Sigurdson, 1991). BSE könnte also eine weitere Verbreitung erlangen.

Dies alles macht die Dringlichkeit von aktiver Diagnose (Screening) der Herden deutlich. Die Lebendviehbeschau bestand schon seit vielen Jahren, brachte aber relativ wenig Krankheitsfälle zu Tage. Das limitierte aktive Testen von Stichproben mag für Länder mit günstiger Risikolage als hinreichend betrachtet werden, doch sollten in den restlichen Ländern alle normal geschlachteten Tiere mit Prion-Tests untersucht werden. Wie aus den oben genannten Ausführungen ersichtlich wird, gilt dies sowohl für Rinder als auch für Schafe und Ziegen. Gerade bei Schafen, die den Erreger schon vor Ausbruch von

Symptomen ausscheiden, wäre daher ein *in vivo*-Testverfahren erforderlich.

Bei der Scrapie fand man bei hämatologischen und blutchemischen Untersuchung sowie bei der Analyse des Liquors keine scrapiespezifischen Marker. Jedoch können gesicherte *in vivo*-Diagnosen von Tonsillen-Biopsien (Schreuder *et al.*, 1998) oder der *Membrana nictans* (O'Rourke *et al.*, 2000) gestellt werden. Inwieweit sich die zuletzt genannten Verfahren unter Praxis-Bedingungen bewähren, bleibt abzuwarten.

Auch bei der Untersuchung von BSE-Fällen zeigen hämatologische und blutchemische Befunde keine regelmäßigen Abweichungen von gesunden Tieren (Johnson, 1988; Scott *et al.*, 1989) und die Liquordiagnose ermöglicht lediglich eine Differenzierung der BSE von bestimmten viralen und bakteriellen ZNS-Infektionen (Scott *et al.*, 1989, 1995). Auch der 14-3-3 Test weist keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Robey *et al.*, 1998). Daher beschränken sich die kommerziell erhältlichen BSE-Tests auf den immunologischen Nachweis von PrP^{BSE} in Hirngewebe. Drei von vier kommerziell erhältlichen BSE-Tests erwiesen sich bei einer Evaluierung durch eine wissenschaftliche Arbeitsgruppe der europäischen Kommission als geeignet (EU-Direktorat für Verbraucherpolitik und Gesundheitsschutz, 1999; Moynagh & Schimmel, 1999). Die drei Tests erkannten den BSE-Status sämtlicher Proben, d.h. sie erwiesen sich als 100 % spezifisch und sensitiv. Die Tests wurden von folgenden drei Firmen bzw. Institutionen entwickelt:

1. *Prionics AG*, Zürich, Schweiz, zu verwendendes Material: Hirnstamm- oder Rückenmarksgewebe
2. *Atomenergie-Kommissariat (CEA)*, Frankreich, zu verwendendes Material: Hirnstammgewebe
3. *Enfer Technology Limited*, Dublin, Irland, zu verwendendes Material: Rückenmarksgewebe

1.8.3 PrP^{Sc} -Nachweis mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Wie aus den vorangegangenen Abschnitten hervorgeht, gibt es schon eine Reihe von Tests zur Diagnose von TSE in Tieren. Doch alle Tests diagnostizieren die Krankheit erst mit Einsetzen des klinischen Bildes oder im günstigsten Falle einige Monate vorher (der genaue Zeitrahmen ist bisher nicht bekannt). Wünschenswert wären aber Testverfahren, die schon sehr viel früher die Krankheit diagnostizieren können. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion kann aber bereits ein hoher Infektionstiter in betroffenen Tieren akkumuliert sein. Dies kann zu schlachttechnisch bedingten Kontaminationen führen. Gerade beim Tierhandel besteht daher großer Bedarf für einen sensitiveren Test, sowohl für den Import und Export von lebenden Tieren als auch für den Verbraucherschutz. Durch die Nicht-Erkennbarkeit einer BSE-Infektion vor dem Greifen der bisherigen Tests könnte dem Verbraucher eine falsche Sicherheit vermittelt werden.

Die Grundlage für ein neues diagnostische Verfahren wurde in unserem Labor entwickelt. Die Methode basiert auf der Detektion von Prion-Rods mittels der Fluoreszenz-

Korrelations-Spektroskopie (FCS). Da dieses System auf einem Einzelmolekülnachweis basiert, sollte es das Potential für einen hochsensitiven Nachweis des Erregers haben. Das Verfahren wurde bereits auf die Detektion von A β -Aggregaten angewandt, die für die Alzheimersche Krankheit (AD) spezifisch sind. Tatsächlich konnte in der Cerebrospinalflüssigkeit von 17 AD-Patienten A β -Aggregate nachgewiesen werden, während in einer Kontrollgruppe die Aggregate nicht auftraten (Pitschke *et al.*, 1998). In vorläufigen Versuchen konnten auch Prion-Rods prinzipiell in Lösung nachgewiesen werden.

1.9 Fragestellung

Als Hauptbestandteil, wenn nicht sogar als alleiniger Bestandteil des Erregers gilt das Prionprotein in seiner infektiösen Form, d. h. PrP^{Sc}. Übereinstimmend ist PrP^{Sc} bisher das einzige Markermolekül für eine Erkrankung, welches bei jeder Form der TSE gefunden wird. Somit ist es ideal für die Diagnose dieser Erkrankungen geeignet. PrP^{Sc} liegt im infektiösen Gewebe immer in aggregierter Form vor. Die Aggregation wurde anhand eines in unserem Labor entwickelten *in vitro* Konversionssystems für PrP (Post *et al.*, 1998) intensiv mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht (Pitschke, 1999; Schäfer, 1997). Dabei wurde gezeigt, dass sich der Prozess der Selbstaggregation des Prion-Proteins sehr gut von einem keiminduzierten Aggregationsprozess unterscheiden lässt. Bei der Selbstaggregation bildeten sich hochmolekulare Multimere in einem Zeitraum von einer halben Stunde. Bei der keiminduzierten Aggregation erfolgte dagegen die messbare Anlagerung an schon vorhandene Aggregate in einem Zeitbereich von weniger als einer Minute. Das Prinzip der Diagnose beruht auf dem nachweis schneller Aggregation zugesetzter PrP-Moleküle, die nur erfolgen kann, wenn in der Probe bereits Keime, d. h. Prionen vorhanden sind (Pitschke, 1999). Das Verfahren wurde bereits auf die Detektion von A β -Aggregaten angewandt, die für die Alzheimersche Krankheit (AD) spezifisch sind (Pitschke *et al.*, 1998) und in frühen Versuchen konnten auch prinzipiell Prion-Rods in Lösung nachgewiesen werden (Pitschke, 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, dieses Verfahren auf den Nachweis von Prion-Rods in Tieren zu übertragen. Als erster Schritt war daher die Isolation bzw. Anreicherung des Erregers aus dem Tier notwendig. Zu diesem Zweck musste zunächst geeignetes Gewebe ermittelt und nachfolgend ein sowohl geeignetes als auch effizientes Aufreinigungsprotokoll etabliert werden. Zusätzlich sollte das Detektionsverfahren auf die besonderen Erfordernisse des Nachweises in femtomolarer Konzentration weiterentwickelt werden. Hierzu waren zunächst geeignete Sonden zum Nachweis des Erregers zu ermitteln. Hierzu sollten vor allem Antikörper dienen um unabhängiger zu werden. Durch Antikörper steht eine größere Auswahl an Sonden zur Verfügung, die zudem eine hohe Spezifität besitzen und nicht die Beschränkungen wie PrP, unspezifische Anlagerung und Selbstaggregation, als Sonde aufweisen. Anschließend mussten Markierungsstrategien mit fluoreszenten Farbstoffen entwickelt werden, welche die Eigenschaften des markierten Proteins möglichst wenig beeinflussen. In einem weiteren Schritt sollte die Sensitivität und die Spezifität des Detektionsverfahren gesteigert werden.

2 Material

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen, soweit nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad p.a. (pro analysi). Alle Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Hausanlage für deionisiertes Wasser mit nachgeschaltetem Wasseraufreinigungssystem EPA Est. 41237-MA-1, Millipore GmbH, Neu-Isenburg), im Folgenden als $H_2O_{dest.}$ bezeichnet, angesetzt und, soweit möglich, vor ihrem Gebrauch 20 Minuten bei $120^\circ C$ autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mit einem $0,2\mu m$ Membranfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

Alle verwendeten Chemikalien und Materialien wurden von den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen.

Umgang mit infektiösem Material

Alle Arbeiten wurden im S2-Labor durchgeführt. Für alle Pipettierschritte mit infektiösem Material wurden ausschließlich „safe seal“-PCR-Spitzen (Biozym, Hessisch-Oldendorf) verwendet. Arbeiten mit infektiösem Material erfolgten ausschließlich unter einer sterilen Werkbank (Welche?). Probenträger für FCS wurden mit infektiösem Material unter der sterilen Werkbank befüllt, verschlossen und zum FCS gebracht.

Zur Dekontamination wurde der Festabfall in doppelte Lagen Polyamid-Vernichtungsbeutel (Greiner) für 4 Stunden bei $134^\circ C$ in wassergesättigtem Dampf autoklaviert. Flüssigabfall wurde auf 2M NaOH eingestellt, mindestens 24 Stunden inkubiert und dann mit HCl neutralisiert oder unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte und Küvetten wurden für mindestens eine Stunde in 1M NaOH eingelegt und dann mit 10mM NaPi, pH 7,2 neutralisiert.

2.1 Geräte

| Gerät | Firma |
|---|--------------------------------------|
| Auftischzentrifuge EBA 12 | Hettich, Tuttlingen, D |
| Varioklav [®] -Dampfsterilisator | H+P, Oberschleißheim, D |
| Semi-Dry-Blot Apparatur Trans-Blot S | Bio-Rad, Brussels, B |
| Dot-Blot-Kammer S & S Minifold I | Schleicher & Schuell, Dassel, D |
| Gelelektrophoresekammer Hoefer SE 600 | Hoefer Pharmacia, San Francisco, USA |
| Heatblock Dri-Block DB2A | Thermo-Dux, Wertheim, D |
| Sonificator Labsonic U | Braun Dissel, Melsungen, D |
| Ultrazentrifuge Optima TL | Beckmann, Palo Alto, USA |
| Wasseraufreinigungsanlage EPA | Millipore, Neu Isenburg, D |

2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

| Fluoreszenzfarbstoff | Firma |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Fluorolink [®] Cy2 | Amersham, Arlington Heights, USA |
| Fluorolink [®] Cy5 | Amersham, Arlington Heights, USA |
| Alexa-488 | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Alexa-633 | Molecular Probes, Eugene, USA |

2.3 Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Firma |
|------------------------------------|---|
| NAP [®] 5 Säulen | Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S |
| Glaskapillaren | Vogel GmbH, Giessen, D |
| Siegellack | Pelikan, Hannover, D |
| Chambered Coverglasses | Nalge Nunc International, Naperville, USA |
| HMW-Proteinstandard | GIBCO BRL (Life Technologies), USA |
| Protein G Spin Chromatographie Kit | Pierce, Rockford, USA |
| ECL | Amersham Life Science, Lit. Chalfont, GB |
| 3MM Chromatographiepapier | Whatman, Maidstone, GB |
| Röntgenfilm X-Omat [®] AR | Kodak, Rochester, USA |
| Polyvinylfluoridmembran | Millipore, Neu Isenburg, D |
| Polyamid-Vernichtungsbeutel | Roth, Karlsruhe, D |
| Safe Seal PCR Spitzen | Biozym, Hess. Oldendorf, D |
| Mikrozentrifugengefäße | Beckmann, München, D |
| Membranfilter | Schleicher & Schuell, Dassel, D |
| 1,5 ml Schraubdeckel Probengefäße | Roth, Karlsruhe, D |

2.4 Antikörper

Freundlicherweise wurde uns von folgende Antikörper zur Verfügung gestellt.

| Antikörper | Institut / Firma | Eptiop | Spezifität |
|---------------|--------------------------|---------|--------------------------|
| 3F4 | UCSF, San Francisco, USA | 109-112 | ha,hu |
| R1 | UCSF, San Francisco, USA | 225-231 | ha, mo |
| R2 | UCSF, San Francisco, USA | 225-231 | ha, mo |
| D13 | UCSF, San Francisco, USA | 96-104 | ha, mo |
| 6H4 | Prionics, Zürich, CH | 144-152 | mo, ha, bo, hu, sheep |
| 15B4 | Prionics, Zürich, CH | | |
| Pri-308 | CEA, Saclay, F | 214-230 | hu, ha, mo, bo, sheep |
| Pri-917 | CEA, Saclay, F | 214-230 | hu, ha |
| SAF-37 | CEA, Saclay, F | 79-92 | |
| BAR-236 | CEA, Saclay, F | | |
| 8G8 | DKFZ, Heidelberg, D | 98-113 | bo |
| 12F10 | DKFZ, Heidelberg, D | 145-179 | hu, bo |
| SP3225 8/5/00 | VLA, Weighbridge, GB | | |
| SP3443 8/5/00 | VLA, Weighbridge, GB | | |
| SP3433 8/5/00 | VLA, Weighbridge, GB | | |
| g1r1 28/9/00 | VLA, Weighbridge, GB | | |
| g3r1 28/9/00 | VLA, Weighbridge, GB | | |

ha = Hamster, hu = Mensch, bo = Rind, mo = Maus, sheep = Schaf

2.5 Gewebe und Körperflüssigkeiten

Hirngewebe und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

| Material | Spezies | Institut |
|------------|---------------|--|
| CSF | Hamster | RKI Berlin, D (M. Beekes) |
| | Rind | VLA Weighbridge, GB (R. Jackmann) |
| Hirngewebe | Hamster | RKI Berlin, D (M. Beekes) |
| | Rind (BSE) | VLA Weighbridge, GB (R. Jackmann) |
| | Rind (gesund) | Schlachthaus Düsseldorf, D (Steinbüchel) |

2.6 Prion-Rods

Von der Bundesanstalt für Viruskrankheiten, Tübingen und von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) wurden uns freundlicherweise aufgereinigte und hochkonzentrierte Prion-Rods von Hamstern zur Verfügung gestellt.

2.7 Rekombinantes PrP

Rekombinantes PrP(90-231), das der Sequenz des PrP 27-30 des Syrischen Goldhamsters *Mesocricetus auratus* entspricht (nachfolgend als SHa rec PrP(90-231) bezeichnet), wurde von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) in *E. coli* kloniert und uns als HPLC-aufgereinigtes Lyophilisat zur Verfügung gestellt (Mehlhorn *et al.*, 1996).

Rekombinantes PrP(20-231) des Syrischen Goldhamsters und das bovine rekombinante PrP(12-231) erhielten wir von der Fa. Prionics (Zürich, Schweiz).

3 Methoden

3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wie bei [Sambrook *et al.* \(1989\)](#) beschrieben, wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli ([Laemmli, 1970](#)) benutzt. Dabei wurde eine Gelelektrophoreseeinheit Hoefer SE 600 von Pharmacia Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Plattengelen verwendet. Das 12%ige Trenngel wurde nach dem Einfüllen zwischen die zwei Glasplatten mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Die Proben wurden 1 und 1 mit Lämmli-Auftragspuffer verdünnt, für 5 Minuten bei mindestens 95 °C inkubiert, abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 30 Minuten bei 180 V und anschließend für ca. 2 h bei 200 V durchgeführt. Als Marker wurde ein Molekulargewichtsstandard mit vorgefärbten Eichproteinen (14.2 - 200 kDa , HMW-Proteinstandard, GIBCO BRL, USA) eingesetzt.

| Sammelgel | | Trenngel | |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|
| 380 mM | Tris-HCl, pH 8,8 | 125 mM | Tris-HCl, pH 6,8 |
| 12 % | PAA (30:0,8) | 3 % | PAA (30:0,8) |
| 0,1 % | SDS | 0,1 % | SDS |
| 0,1 % | TEMED | 0,1 % | TEMED |
| 0,1 % | APS | 0,1 % | APS |
| Auftragspuffer nach Laemmli | | 10x Laufpuffer nach Laemmli | |
| 140 mM | Tris-HCl, pH 6,8 | 0.25 M | Tris-HCl, pH 8,3 |
| 10 % | 2-Mercaptoethanol | 1.9 M | Glycin |
| 4 % | SDS | 0,1% SDS | |
| 20 % | Glycerin | | |
| 1 Spatelspitze | Bromphenolblau | | |

Für die Acrylamidstammlösung wurden Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30 % zu 0,8 % in $H_2O_{dest.}$ gelöst, 30 Minuten mit dem Ionentauscher Amberlite MB3 unter Rühren inkubiert und filtriert.

3.2 Immunologischer Proteinnachweis

Proteine wurden entweder direkt durch das „Dot-Blot“-Verfahren oder nach der SDS-PAGE (Kap.3.1) durch „Semi-Dry-Blot“-Verfahren auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore GmbH, Neu Issenburg) transferiert. Nachfolgend wurden die Prion-Proteine spezifisch durch Immuninkubation und Chemilumineszenz identifiziert.

| Tris-Buffer-Sodium (TBS) | | Tris-Buffer-Sodium mit Tween (TBST) | |
|--------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 1 M | Tris-HCl, pH 8,0 | 10mM | Tris-HCl,pH 8,0 |
| 150mM | NaCl | 150mM | NaCl |
| | | 0,01 % | Tween |

3.2.1 Dot-Blot

Es wurde eine Dot-Blot Apparatur mit 96 Probenlöchern verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Ethanol getränkt und mit zwei Chromatographiepapieren (Whatman, 3MM) in TBST geschwenkt. Die Transfermembran wurde auf Whatman-Papier in die Blot-Apparatur geklemmt. Proben wurden 1+1 mit Auftragspuffer verdünnt und durch Unterdruck auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit $H_2O_{dest.}$ gewaschen. Da die verwendeten Antikörper nur denaturiertes Protein erkennen, wurden die Proben auf der Membran durch 5 Minuten Inkubation in 1% KOH denaturiert und danach mittels Immunoreaktion und ECL-System nachgewiesen (s. Kap. 3.2.3).

3.2.2 Semi-Dry-Blot

Proteine wurden durch „Semi-Dry-Blot“-Verfahren mit der Trans-Blot SD Apparatur von Bio Rad (Hercules, California, USA) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran Immobilon P (Millipore, Bedford, GB) transferiert. Dazu wurde im Anschluß an eine SDS-PAGE (Kap.3.1) das Trenngel für 15 Minuten in 1 x Laemmli-Puffer ohne SDS geschwenkt. Chromatographiepapier (Whatman, 3MM) wurden ebenfalls in 1x Laemmli-Puffer ohne SDS geschwenkt. Die Transfermembran wurde mit Ethanol befeuchtet und in 1x Laemmli ohne SDS geschwenkt. Transfermembran und Gele wurden zwischen Chromatographiepapieren in die Blot-Apparatur geklemmt. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 150 mA pro Gel und maximal 20 V.

3.2.3 Proteinnachweis mit dem ECL-System

| | |
|---|---|
| Absättigen freier Bindestellen auf der Membran mit 5% Milchpulver (Frema Reform, Lüneburg) in TBST. | mindestens eine halbe Stunde, optional ü. N. bei 4 °C |
| Waschen mit TBST. | 3 x 10 Sekunden |
| Immundetektion mit spezifischen Nachweisantikörper in TBST. | mindestens eine Stunde (optional ü. N. bei 4 °C) |
| Waschen mit TBST | 3 x 10 Minuten |
| Inkubation mit Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Maus Zweit-Antikörper in TBST. | zwei Stunden bei RT inkubiert |
| Waschen in TBST zur Entfernung überschüssiger Antikörper. | 3 x 10 Minuten |

Der Chemilumineszenznachweis wurde mit dem ECL-Detektions-Reagenz (Amersham Life Science, Lit. Chalfont, GB) durchgeführt. Die Exposition auf Röntgenfilmen (Kodak-X-OMAT[®], Sigma, St. Louis, USA) erfolgte für 10 Sekunden bis 30 Minuten .

3.2.4 Proteinnachweis mit dem NBT/BCIP-System

| | |
|---|---|
| Absättigen freier Bindestellen auf der Membran mit 5% Milchpulver (Frema Reform, Lüneburg) in TBST. | mindestens eine halbe Stunde, optional ü. N. bei 4 °C |
| Schwenken der Membran in Waschpuffer. | 2 x 5 Minuten |
| Inkubation mit primären Antikörper. | eine Stunde bei 37 °C |
| Schwenken der Membran in Waschpuffer. | 2 x 5 Minuten |
| Inkubation mit dem biotinylierten anti Maus IgG aus Ziege (Dako, Hamburg). | eine Stunde bei 37 °C |
| Schwenken der Membran in TBST. | 3 x 5 Minuten |

3 Methoden

| | |
|---|-----------------------------------|
| Inkubation der Membran mit dem verdünnten Streptavidin-Biotin-Komplex (Dako, Hamburg). 30 Minuten vor der Inkubation der Folie wird der Streptavidin-Biotin-Komplex durch Mischen eine Lösung aus Reagenz A (Streptavidin) und Reagenz B (biotinylierte alkalische Phosphatase) gemäß Herstellerangaben angesetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und zum Gebrauch mit Tris-Puffer, pH 7,6 1:50 verdünnen. | 30 Minuten bei 4 °C |
| Waschen mit TBST. | 2 x 5 Minuten |
| Waschen mit Zweit-Antikörper-Puffer ohne BSA. | 5 Minuten |
| Membran in Färbelösung schwenken. Färbelösung einmal wechseln. | Bis zur Entwicklung von Signalen. |
| Kurz mit H ₂ O _{dest.} waschen und mit 20 mM EDTA in PBS stoppen. | 10 Minuten |
| Nochmals mit H ₂ O _{dest.} waschen und Membran trocknen. | |

| Waschpuffer für NBT/BCIP-Färbung | Substratpuffer für NBT/BCIP-Färbung |
|--|---|
| 20 mM NaPi, pH 7,5 0,9 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Tween 20 | 100 mM TrisHCL, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ |
| 1. AK-Puffer für NBT/BCIP-Färbung | 2. AK-Puffer für NBT/BCIP-Färbung |
| 3 % (w/v) BSA in TBS | 3 % (w/v) BSA in TBS 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl |
| Färbelösung für NBT/BCIP-Färbung | |
| a) 50 mg/ml NBT in 70 % DMF b) 25 mg/ml BCIP in DMF | |

Je 130 µl in 20 ml Substratpuffer mischen. Substratpuffer ist maximal eine Stunde haltbar.

3.3 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte nach der Methode von [Merril *et al.* \(1981\)](#). Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei etwa 50 ng Protein/Bande.

| | | |
|------------|--|-------------------------|
| Fixierung | 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure | 20 min (optional ü. N.) |
| Waschen | 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure | 10 min |
| Oxidieren | 0,05 % Natriumcarbonat 0,15 % Kaliumhexacyanferrat 0,3 % Natriumthiosulfat | 1 min |
| Waschen | H ₂ O _{dest.} | 5 x 10 min |
| Färben | 0,012 M Silbernitrat | 20 min |
| Waschen | H ₂ O _{dest.} | 1 min |
| Entwickeln | 3 % Natriumcarbonat 0,02 % Formaldehyd | nach Bedarf |
| Stop | 1 % Essigsäure | 10 min |

3.4 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen erfolgte über eine kovalente Bindung des Succinimidylesters des Farbstoffs an freie Aminogruppen. Als Farbstoff dienten FluoroLink[®] Cy2 Reactive Dye 5-Pack (Amersham Life Science, Lit. Chalfont, GB), Alexa-488 und Alexa-633 (Molecular Probes, Oregon, USA). Diese Farbstoffe haben den Vorteil, dass sie hydrophil sind. Da an hydrophile Aminogruppen gekoppelt wird, sollte auch ein hydrophiler Farbstoff benutzt werden, insbesondere um der Gefahr zu begegnen, dass ein hydrophober Farbstoff selber eine Aggregation des markierten Proteins induzieren könnte. Die Farbstoffe sollten somit die Struktur und das Verhalten, insbesondere das Aggregationsverhalten, von PrP wenig beeinflussen. Zudem besitzen die Farbstoffe die geeigneten Excitations- und Emissionswellenlängen für das von uns benutzte FCS Confocor[®] 1 (Zeiss, Jena) und Olympus 2 Strahl FCS (Evotec, Hamburg). Die Bindung von nur einem Farbstoffmolekül an einem Molekül Protein hält die Beeinflussung bezüglich Struktur und Eigenschaften des Proteins gering, daher wurde die Markierung daraufhin optimiert.

| PrP-Markierungsansatz | | Antikörper-Markierungsansatz | |
|-----------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| 10 µg | PrP | 50 µg | Antikörper |
| 5 µg | Farbstoff | 5 µg | Farbstoff |
| 0,2 % | SDS | | |
| ad 50 µl | NaPi, pH 8,4 | ad 50 µl | NaPi, pH 8,4 |

3 Methoden

| Elutionspuffer für Antikörper | | Elutionspuffer für PrP | |
|-------------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| 10 mM | NaPi, pH 7,2 | 10 mM | NaPi, pH 7,2 |
| 150 mM | NaCl | 150 mM | NaCl |
| | | 0,2 % | SDS |

Natrium-Phosphat-Puffer (NaPi)

10 mM Na₂HPO₄
 10 mM NaH₂PO₄

NaPi wurde durch Mischen beider Lösungen auf pH 7,2 bzw. pH 8,3 eingestellt.

Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei der Reaktionsansatz mehrfach gemischt wurde. Die Abtrennung von freiem Farbstoff erfolgte mittels Größenausschlußchromatographie über eine NAP[®] 5-Säule (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Nach Equilibrieren der NAP[®] 5-Säule mit dem vierfachen Eigenvolumen an Elutionspuffer wurde der Reaktionsansatz auf die erste Säule gegeben und anschliessend mit Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionierung erfolgte in 100 µl Aliquots. Durch Absorptionsmessung wurde die Fraktion bestimmt, welche das mit Farbstoff markierte Protein enthielt. Markierte Proteine wurden bei 4 °C oder für einen längeren Zeitraum in 50% Glycerin bei -20 °C gelagert.

Die Markierungseffizienz kann über Gleichung 3.2 aus einer spektroskopischen Messung bestimmt werden. Markierungseffizienzen liessen sich nur für Antikörper bestimmen. Für Markierungen von Prionprotein stand nur wenig Protein zur Verfügung, so dass dort eine spektroskopische Absorptionsmessung nicht erfolgen konnte.

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wird zuerst die Proteinkonzentration bestimmt:

$$Proteinkonzentration[M] = \frac{(A_{280} - (A_{max} * K)) * V}{\epsilon} \quad (3.1)$$

- A_{280} = Absorption bei 280 nm
- A_{max} = Absorption bei Absorptionsmaximum des Farbstoffs
- K = Korrekturfaktor für Absorption des Farbstoffs bei 280 nm
- V = Verdünnungsfaktor
- ϵ = Extinktionskoeffizient für Protein, für IgG 203.000 cm⁻¹ M⁻¹

Die Markierungseffizienz errechnet sich dann aus:

$$\text{Markierungseffizienz} = \frac{A_{max} * V}{\epsilon * \text{Proteinkonzentration}[M]} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} A_{max} &= \text{Absorption bei Absorptionsmaximum des Farbstoffs} \\ V &= \text{Verdünnungsfaktor} \\ \epsilon &= \text{Extinktionskoeffizient für Farbstoff [cm}^{-1}\text{M}^{-1}] \end{aligned}$$

3.5 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation

Die Löslichkeit eines Proteins kann durch differentielle Ultrazentrifugation bestimmt werden. Proben werden für eine Stunde bei 100.000 *g* (42.000 rpm im TLA-45 Rotor) in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Partikel, die unter diesen Bedingungen im Überstand verbleiben, gelten als löslich (Hjelmeland & Chrambach, 1984). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet im gleichen Volumen wie der Überstand NaPi, 0,2% SDS resuspendiert.

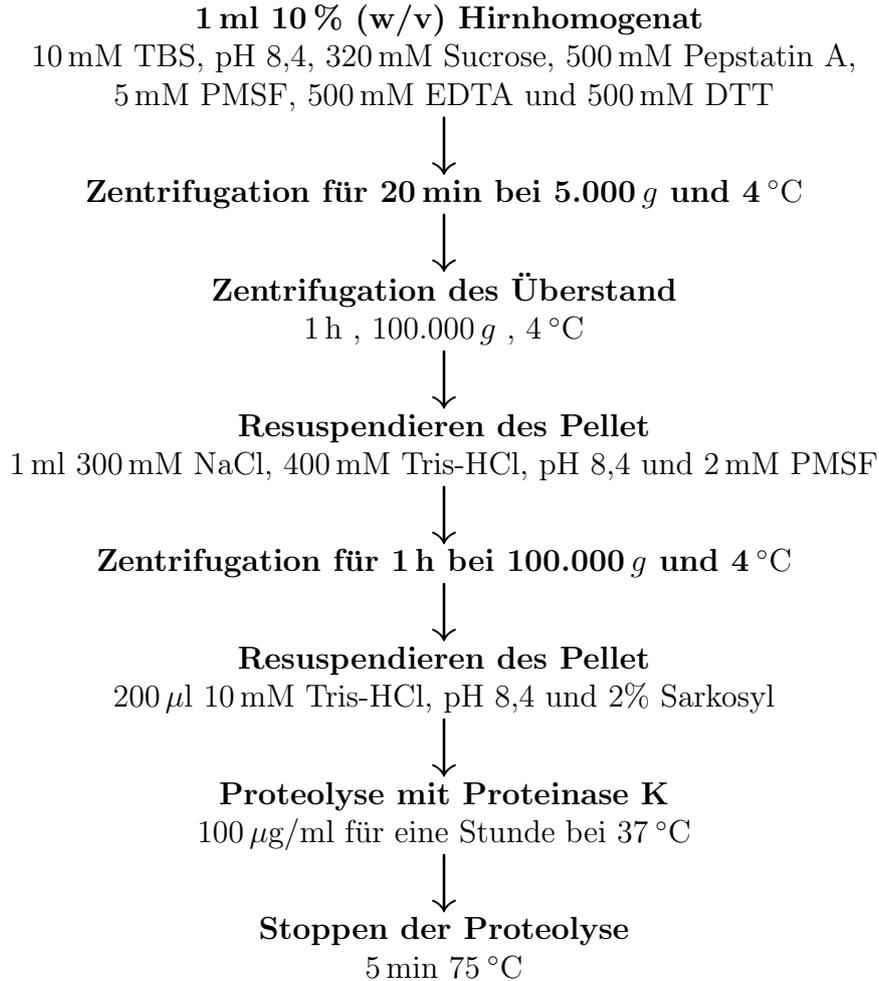
3.6 Isolation von Prion-Rods

Die Isolation der Prion-Rods erfolgte entweder nach McKinley *et al.* (1991) oder Beekes *et al.* (1995).

3.6.1 Isolation von Prion-Rods nach McKinley *et al.*

Hirngewebe wurde auf Eis mittels eines Douncehomogenisators zu 10% (w/v) Hirnhomogenat (HH) verarbeitet. Es folgten eine leichte Zentrifugation um größere Zelltrümmer und -bestandteile zu entfernen und zwei Löslichkeitsspins (Kap. 3.5). Im Anschluß erfolgt eine Proteolyse mit Proteinase K, die durch Erhitzen auf 75 °C gestoppt wird, da Proteinase K bei einer Temperatur über 61°C inaktiviert wird. In ersten Versuchen wurde die Proteolyse mit 5 mM PMSF abgestoppt. PMSF fällt allerdings aus und verursacht Streuung im FCS.

3 Methoden



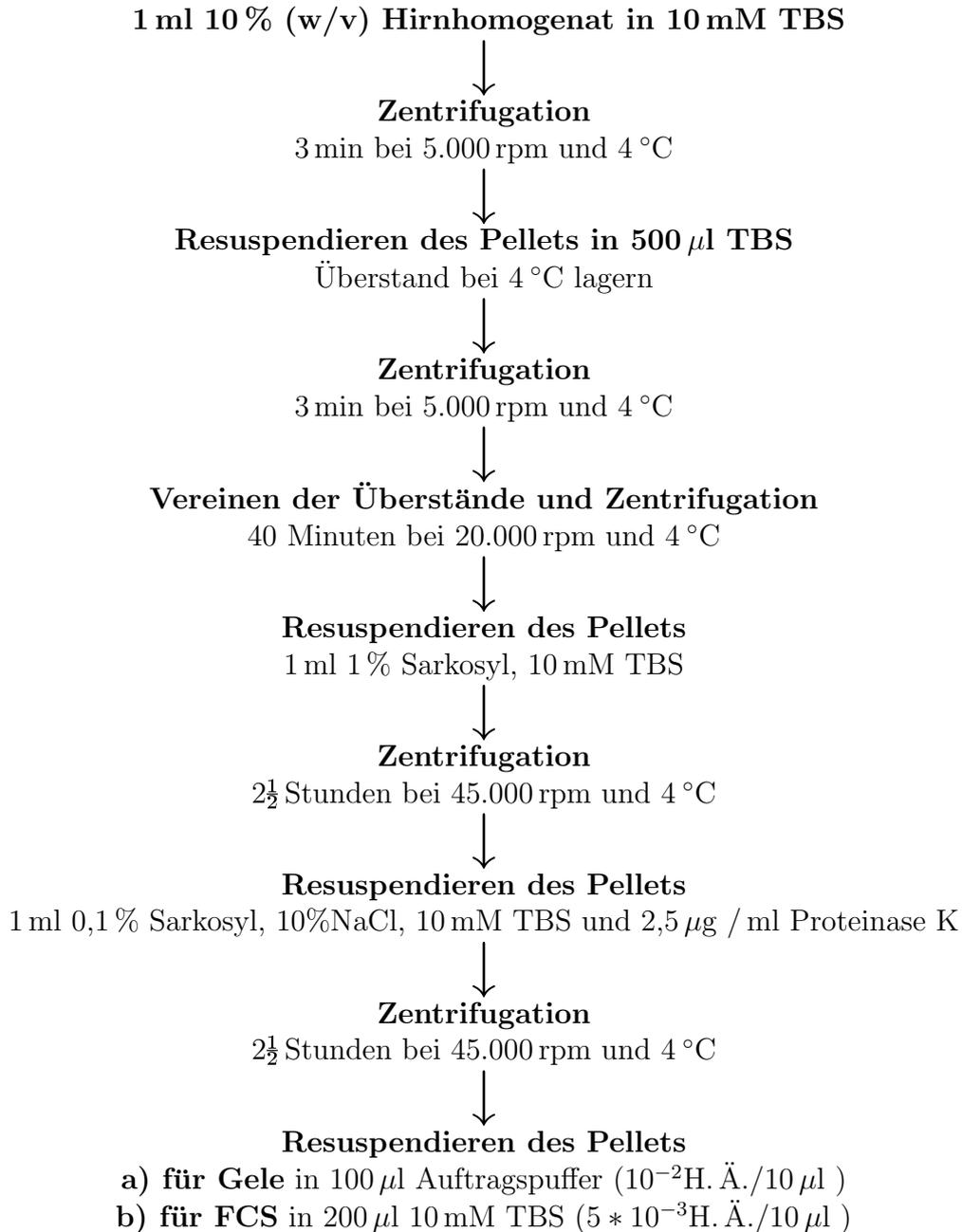
3.6.2 Isolation von Prion-Rods nach Beekes et al.

Alle Zellaufschlüsse und Resuspendierungen erfolgten mittels einer Ultraschall-Nadelsonde (Sonificator Labsonic U, Braun Dissel, Melsungen, D) bei 50 W. Dies erwies sich als sehr wichtig um eine quantitative Isolation der Prion-Rods zu erhalten. Mittels Nadelsonde konnte auch die Ausbeute der Aufreinigung nach [McKinley et al. \(1991\)](#) erheblich gesteigert werden, allerdings liegen dabei die Prion-Rods in 2% Sarkosyl vor, was eine Bindung von Antikörpern oder Prionprotein an Rods erniedrigt. Daher ist das Protokoll von [Beekes et al. \(1995\)](#) geeigneter für unsere Anforderungen. Alle Zentrifugationen erfolgten im TLA-45 Rotor (Beckmann, Palo Alto, USA).

Bei der Benutzung wurde die Nadelsonde in das Probengefäß eingeführt und die Öffnung des Probengefäßes inklusive Nadelsonde mit Saugpapier umwickelt um Aerosole und Spritzer abzufangen. Wurden bei Resuspendierungen Volumina von über 500 µl verwendet, so wurde das Pellet erst in 500 µl mit der Nadelsonde resuspendiert und dann die weiteren 500 µl dazugegeben um ein Überlaufen beim Eintauchen der Nadelsonde zu vermeiden. Resuspendiert wurde jeweils mit zweimal 50 W für 15 s.

3 Methoden

Nach jeder Benutzung wurde die Nadelsonde gereinigt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Zur Reinigung wurde die Sonde nacheinander in 500 ml 2 M NaOH oder alternativ 0,3% NaOH, 0,2% SDS und dann zweimal in je 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$ für je 30 Sekunden angewendet. Am Abschluß eines Tages erfolgte zudem ein Abwischen der Sonde mit 2 M NaOH und anschließend mit Puffer zur Neutralisation.



3.7 Proteolyse von Hirnhomogenat mit Proteinase K

Zur Bestimmung der Ausbeute der PrP 27-30 Isolation wurde das Isolat mit Hirnhomogenat verglichen. Um den ursprünglichen Gehalt von PrP^{Sc} im Gehirn festzustellen wurde das Hirnhomogenat einer entsprechenden Proteolyse mit Proteinase K unterzogen, so dass daraus der Gehalt an Prion-Rods im Gehirn vor der Aufreinigung abgeschätzt werden kann. Das entsprechende Protokoll wurde von [Beekes *et al.* \(1995\)](#) übernommen.

| | | | | |
|------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Proteolyse | 50 μ l | 10% | Hirnhomogenat | |
| | 5 μ l | 13% | Sarkosyl | |
| | 10 μ l | 1mg/ml | PK | 1 Stunde 37 °C |
| Stopp | ad 500 μ l | | Auftragspuffer | 5 min 100 °C |

3.8 Aufreinigung von Antikörpern

Antikörper aus Ascites-Überständen wurden vor der Fluoreszenzmarkierung mittels NAb[™] Protein G Spin Chromatographie Kit (Pierce, Rockford, USA) aufgereinigt. Es wurde Protein G benutzt, da dieses mit höherer Spezifität und Kapazität an verschiedene IgG Subklassen bindet als Protein A.

Die Aufreinigung erfolgte nach Anweisung von Pierce. 0,2 ml des immobilisierten Protein G wurde in Spin Columns überführt und mit 0,3 ml Protein G Bindungspuffer gewaschen. Dazu wurde ein Ansatz aus immobilisierten Protein G mit Bindungspuffer fünf Minuten geschüttelt und bei 14.000 *g* für eine Minute in der Eppifuge zentrifugiert. Es folgt ein zweites Waschen mit 0,4 ml Bindungspuffer, diesmal ohne schütteln. Protein G wurde mit der Antikörperprobe für 30 Minuten geschüttelt. Hiernach wurde der Puffer abzentrifugiert und es folgten zwei weitere Waschschrte mit Bindungspuffer.

Die Antikörper wurden durch Zugabe von 0,4 ml Elutionspuffer eluiert. Bei der Elution wurde 0,1 ml 500 mM NaPi, pH 8,4 vorgelegt, so dass bei der Elution direkt neutralisiert wurde. Zudem konnten Antikörper in diesem Puffer direkt für die Fluoreszenzmarkierung weiterverwendet werden.

3.9 FCS / FIDA

3.9.1 Basis-Konzept

Das analytische Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde vor mehr als 25 Jahren entwickelt [Ehrenberg & Rigler \(1976\)](#); [Magde *et al.* \(1972\)](#). Es basiert auf der Messung von Signalfuktuationen einer kleinen Anzahl von Molekülen in einem kleinen Meßvolumen. Theoretisch wurde dieses Konzept schon bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts ausgearbeitet [Einstein & v. Smoluchowski \(1897\)](#). Doch erst die Einführung der

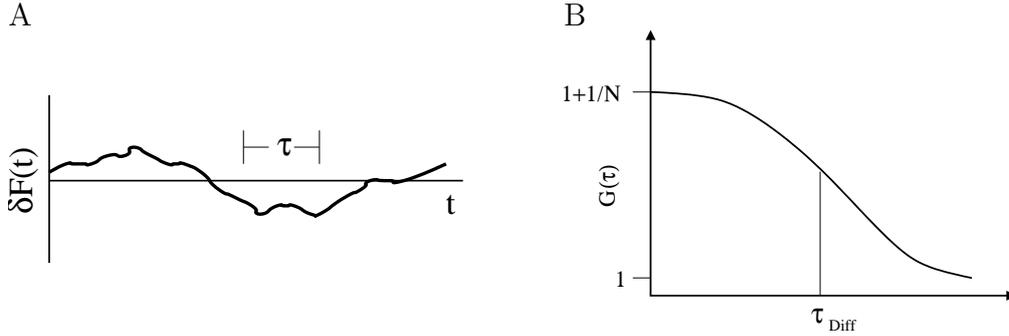


Abbildung 3.1: (A) zeitabhängige Fluoreszenzfluktuation und (B) Korrelationsfunktion Aus der Fluoreszenzfluktuation $\delta F(t)$ wird mittels der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ die Aufenthaltswahrscheinlichkeit τ_{Diff} und die Anzahl N der fluoreszierenden Moleküle im konvokalen Messvolumen berechnet.

konfokalen Abbildung in die FCS [Rigler *et al.* \(1993\)](#) ermöglichte es, die Fluktuation einzelner Moleküle zu beobachten. Im Rahmen der meisten Anwendungen der FCS werden Fluktuationen in der lokalen Teilchenkonzentration aufgrund der Brownschen Molekularbewegung genutzt, um die Geschwindigkeit der Teilchen und damit ihre Größe zu bestimmen. Gerade in der Nutzung der Fluktuationen liegt die Stärke der Methode, denn relative Fluktuationen der Konzentrationen freier beweglicher Moleküle sind um so größer, je kleiner das betrachtete Volumen und die Konzentration der Partikel ist. Bei einer Konzentration von 1 nM befindet sich in einem Messvolumen von 1 fl, also dem Messvolumen der FCS, im Mittel ein Molekül. Die FCS ermöglicht somit theoretisch Untersuchungen an einzelnen Molekülen, in der Praxis werden jedoch viele Moleküle beobachtet um eine statistisch abgesicherte Aussage machen zu können.

Um FCS-Messungen durchführen zu können, muß ein sehr kleines Volumenelement mit möglichst intensivem, monochromatischem Licht ausgeleuchtet werden. Durch den Einsatz von Lasern und das Prinzip der konvokalen Abbildung wurde es möglich, diese Voraussetzungen zu erfüllen.

Gemessen werden die Signale fluoreszenzmarkierter Moleküle, die sich durch den Fokus bewegen. Um ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis zu bekommen, sollte man mit möglichst kleinem Fokusvolumen und geringen Konzentrationen arbeiten, so daß sich nur sehr wenige Moleküle zeitgleich im Fokus befinden. Theoretisch sind Konzentrationen bis zu 10^{-21} M möglich.

Zeitliche Fluktuationen lassen sich durch die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ charakterisieren (Abb.3.1, Gl. 3.3). Sie gibt die Korrelation eines Signals zum Zeitpunkt t im Vergleich zum Zeitpunkt $t + \tau$ an. Die Abweichungen δN des Signals vom Mittelwert $\langle N \rangle$ werden multipliziert und normiert. Für N Moleküle in einem konstantem Volumen ergibt sich:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta N(t) \delta N(t + \tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (3.3)$$

3 Methoden

Die so ermittelte Korrelationsfunktion lässt sich mit einer theoretisch abgeleiteten Funktion für die Diffusion eines Moleküls durch das Messvolumen anfitzen:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_D}}} \quad (3.4)$$

- N = mittlere Anzahl der Moleküle im Fokus
- τ = Korrelationszeit
- τ_D = mittlere Diffusionszeit des Moleküls durch den Fokus
- k = Strukturparameter (Eigenschaft des Beleuchtungsfokus)

Aus Gl. 3.4 lassen sich mittels der daraus ermittelten Diffusionszeit τ_D Aussagen über die Eigenschaften des Moleküls machen. Die Diffusionszeit bezeichnet in der logarithmischen Auftragung den Wendepunkt der Korrelationskurve (Abb. 3.1). Sie kann als gewichtete mittlere Diffusionszeit des Moleküls durch das Messvolumen interpretiert werden und beruht somit auf der Brown'schen Molekularbewegung. Damit ist sie zum einen von äußeren Faktoren, also der Temperatur, Druck, Dichte bzw. Viskosität des Lösungsmittels abhängig, zum anderen von den Eigenschaften des Moleküls selbst, wie z.B. vom Diffusionskoeffizienten.

Für sphärische Partikel ist der Diffusionskoeffizient D nach Einstein und Stokes mit dem hydrodynamischen Radius r_H des Teilchens verknüpft:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \quad (3.5)$$

- D = Diffusionskoeffizient
- k = Boltzmannkonstante
- T = Temperatur
- η = Viskosität des Lösungsmittels
- r_H = hydrodynamischen Radius des Teilchens

Für globuläre Teilchen gilt dann mit $V = \frac{4}{3}\pi r^3$:

$$r = \sqrt[3]{\frac{MW \cdot \bar{v}}{N_A} \cdot \frac{3}{4\pi}} \quad (3.6)$$

- MW = Molekulargewicht
- N_A = Avogadrozahl
- $\frac{MW}{N_A}$ = Gewicht eines Moleküls
- \bar{v} = partielles spezifisches Volumen des Moleküls

Für globuläre Moleküle gleicher Dichte kann demzufolge aus dem Diffusionskoeffizienten direkt das Molekulargewicht bestimmt werden, da $\tau_D \sim \sqrt[3]{M}$ ist. Ist die Form jedoch nicht bekannt, so ist nur eine grobe Abschätzung (z.B. unter Annahme der globulären Form) möglich.

3.9.2 Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse

Ein weiterer Parameter, der neben der Diffusionszeit zur Charakterisierung eines Moleküls genutzt werden kann, ist die spezifische Helligkeit des Moleküls, welche mittels der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) ermittelt wird. Eine Analyse der Fluoreszenzintensität wurde 1990 von Qian vorgenommen (Qian, 1990). Als experimentelles Maß der spezifischen Fluoreszenzintensität kann die Zählrate der Photonen pro Molekül und Sekunde (*cpms*) angesehen werden. Diese errechnet sich aus der Detektionseffizienz $W(\vec{r})$ im dreidimensionalen Raum nach:

$$cpms = \int_{Vol} W(\vec{r}) d\vec{r}. \quad (3.7)$$

Bei konstanter Anregung ist diese Größe proportional zum Produkt aus Quantenausbeute und Absorptionsquerschnitt des Moleküls Kask *et al.* (1999) und ist charakteristisch für das Molekül. Experimentell wird sie als Produkt der Korrelationsamplitude und der Fluoreszenzintensität bestimmt. Anhand der *cpms* lassen sich fluoreszierende Moleküle aufgrund ihrer relativen Helligkeit charakterisieren.

Im Falle einer Aggregation bzw. bei der Bindung fluoreszierender Moleküle an vorhandene Aggregate steigt die relative Helligkeit der Moleküle. Vernachlässigt man das Quenching der fluoreszierenden Moleküle und deren Verdeckungseffekt im wachsenden Aggregat, so ist die Steigerung der relativen Helligkeit proportional zur Zahl der gebundenen Fluorophore. Dies kann aber in der Praxis nur zu einer groben Abschätzung genutzt werden.

Wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, keine genaue Charakterisierung der Intensitätsverteilung gefordert wird, sondern lediglich intensiv fluoreszierende Komponenten über einen Schwellenwert detektiert werden sollen, lässt sich die Verteilung der detektierten Photonen pro Meßintegral als Histogramm darstellen.

3.9.3 Scanning

Die Durchtrittszeit großer Moleküle kann durch Anlegen eines Flusses, wie z. B. beim „Scannen“ der Messlösung, stark verkürzt werden. Damit lässt sich bei geringer Konzentration die Rate der Moleküldurchtritte erheblich steigern. Auf diese Weise wird die Messzeit, die man zum Detektieren einzelner Teilchen benötigt, verkürzt (Petersen, 1986; Petersen *et al.*, 1986). Dass dies gerade bei der Suche nach Aggregaten erfolgreich

eingesetzt werden kann, konnte schon bei [Giese *et al.* \(2000\)](#) gezeigt werden. Bei [Bieschke \(2000\)](#) wird eine theoretische Sensitivitätssteigerung mittels „Scannen“ um das sechsfache für freie Diffusionsbewegungen berechnet. Der Gewinn an Sensitivität durch das „Scannen“ steigt proportional zur Diffusionszeit der Partikel. Da die Aggregate aber wahrscheinlich durch Adsorptions- und Sedimentationseffekte behindert werden, kann der experimentell ermittelte Zuwachs an Sensitivität deutlich größer sein..

3.9.4 Zweifarbenanalysen

Bei der Zweifarbenanalyse ([Schwille *et al.*, 1997](#)) wird die Fluktuation zweier Fluorophore untersucht, deren Emissionsspektren möglichst wenig überlappen. Wenn zwei Molekülspezies mit je einem dieser Fluorophore aneinander oder an einen gemeinsamen Interaktionspartner binden entsteht eine Molekülspezies, die beide Fluorophore trägt. Bei der Zweifarbenanalyse geht allein diese Spezies in die Kreuzkorrelation ein. Damit können auch Molekülspezies untersucht werden, die bezüglich Größe und Gewicht keine großen Unterschiede aufweisen. Zudem ist der Übergang zweier Fluoreszenzphotonen in den Triplettzustand auch dann voneinander unabhängig, wenn diese an das selbe Molekül gebunden sind. Somit enthält das Kreuzkorrelationssignal keinen Triplettanteil ([Schwille *et al.*, 1997](#)), im Gegensatz zu einer Einfarbenanalyse, wo der Triplettzustand Fehler erzeugt. Diese machen sich durch eine zusätzliche Komponente mit sehr kleinen Diffusionszeiten in der Auswertung und durch ein Rauschen in der Korrelationsfunktion bemerkbar machen. Ohne Triplettanteil wird die Auswertung von Messungen mit schlechten Signal/Rausch-Verhältnissen ermöglicht. Auch FIDA-Messungen sind mit einer Zweifarbenanalyse möglich. Alle Molekülspezies, beide Monomere und das Dimer, sind klar voneinander zu unterscheiden. Im Falle eines Aggregationprozesses würden Aggregationen einer einzelnen Molekülspezies getrennt betrachtet werden können.

Messungen erfolgten zum einem am Confocor 1 der Fa. Zeiss / Evotec mit der Steuersoftware FCS Control Vers. 1.2 und zum anderen am Olympus 2-Strahl FCS der Fa. Evotec mit der Steuersoftware FCS Control Vers. 2.1.1. Bei beiden Geräten wurde die Fluoreszenzintensität in kHz ausgegeben.

4 Ergebnisse

Der Prozess der Selbstaggregation des Prion-Proteins wurde schon intensiv mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht (Birkmann, 2000; Jansen, 1998; Pitschke, 1999; Post *et al.*, 1998; Schäfer, 1997). Dabei konnte von Schäfer (1997) und Pitschke (1999) gezeigt werden, dass sich die Selbstaggregation des Prion-Proteins sehr gut von einem keiminduzierten Aggregationsprozess unterscheiden ließ, da die beiden Aggregationsprozesse zeitlich aufgelöst werden konnten. Bei der Selbstaggregation bildeten sich hochmolekulare Multimere erst in einem Zeitraum von einer halben Stunde. Bei der keiminduzierten Aggregation erfolgte dagegen die messbare Anlagerung an schon vorhandene Aggregate in einem Zeitbereich von weniger als einer Minute. Mittels der keiminduzierten Aggregation wurde ein Verfahren entwickelt, welches den hochsensitiven Nachweis von pathogenen Aggregaten in Lösung mit der FCS ermöglichte (Pitschke *et al.*, 1998). Dabei wurden die pathogenen Aggregate durch Anlagerung des fluoreszenzmarkierten aggregatspezifischen Proteins hochgradig markiert. Die dadurch entstehenden hoch fluoreszenten Aggregate treten vor der Hintergrundfluoreszenz mindestens um den Faktor zwei hervor und konnten damit in der FCS sensitiv detektiert werden (Abb. 4.1). Bei Pitschke *et al.* (1998) wurde das Verfahren auf die Detektion von $A\beta$ -Aggregaten angewandt, die ein diagnostischer Marker für die Alzheimer'sche Krankheit (AD) sind. Tatsächlich konnte in der Cerebrospinalflüssigkeit von 17 AD-Patienten $A\beta$ -Aggregate nachgewiesen werden, während in einer Kontrollgruppe keine Aggregate detektiert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das System anhand des Hamster-Modells prinzipiell auf die Tier-TSE übertragen werden. Erste Analysen cerebrospinaler Flüssigkeit von Hamstern und Rindern waren nicht sehr vielversprechend. Es zeigten sich positive Signale in infizierten Tieren, aber auch ein hoher Hintergrund in nicht-infizierten Tieren. Da unbekannt war, ob Prion-Aggregate in der Cerebrospinal Flüssigkeit (CSF) infizierter Tiere vorkommen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Erreger direkt aus dem Hirn infizierter Tiere präpariert und konnte dann spezifisch in terminal erkrankten Tieren nachgewiesen werden.

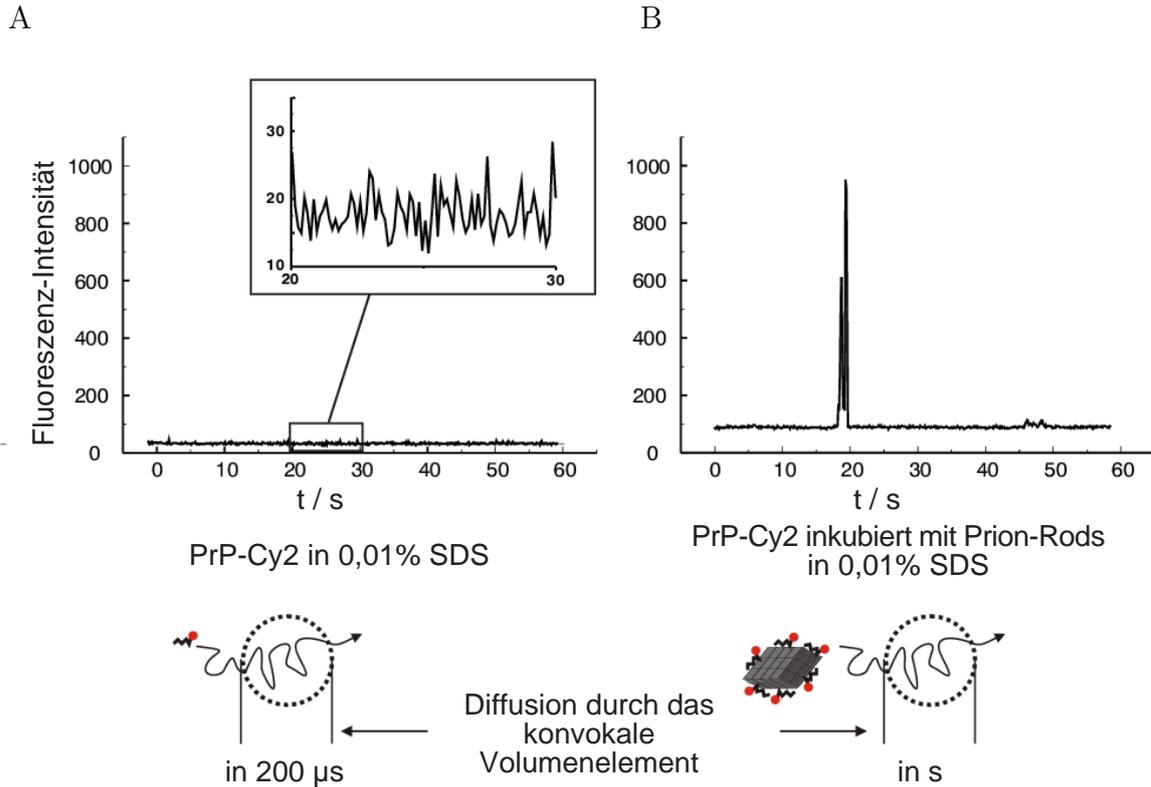


Abbildung 4.1: Prinzip des Nachweises von Aggregaten in Lösung mittels FCS. (A) Eine fluoreszenzmarkierte Sonde, hier Cy2 markiertes PrP, diffundiert in kurzer Zeit (im μs -Bereich) durch das konfokale Volumenelement, dem Messvolumen des FCS. Dabei erzeugt es ein Fluoreszenzsignal. (B) Treffen die Sonden auf ein Aggregat lagern sie sich an und erzeugen damit hochfluoreszente Aggregate, welche sehr langsam durch den Fokus diffundieren und dabei hohe Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Fluoreszenz der Sonde erzeugen. Dies macht sich als Peak in den Fluoreszenzfluktuationen bemerkbar.

4.1 Keiminduzierte Aggregation des Prion-Proteins

Zuerst wurde die Anlagerung verschiedener Sonden an Prion-Rods untersucht. Prion-Rods dienen im Folgenden als Standard, da an ihnen das Testsystem entwickelt wurde (Pitschke, 1999), und diese in hochreiner und hochkonzentrierter Form vorlagen. Als Sonden wurden PrP 106-126, rekombinantes Hamster PrP(90-231) (SHa rec PrP(90-231)) und solubilisiertes PrP 27-30 (solPrP 27-30) aus Hamster mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 in NaPi, 0,2% SDS markiert. Durch entsprechende Verdünnung mit NaPi, 0,2% SDS wurde die Fluoreszenzintensität auf ca. 250 kHz eingestellt. Eine weitere Verdünnung auf 0,02% SDS, und damit auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz, erfolgte unter Zugabe von 1/10 des Volumens an Prion-Rods und entsprechender Menge an NaPi (Abb. 4.2). Messungen erfolgten mit dem Confocor 1 der Fa. Zeiss und Evotec. Fluoreszenzintensitäten werden in kHz angegeben, da diese vom Confocor proportional in eine Frequenz übersetzt werden.

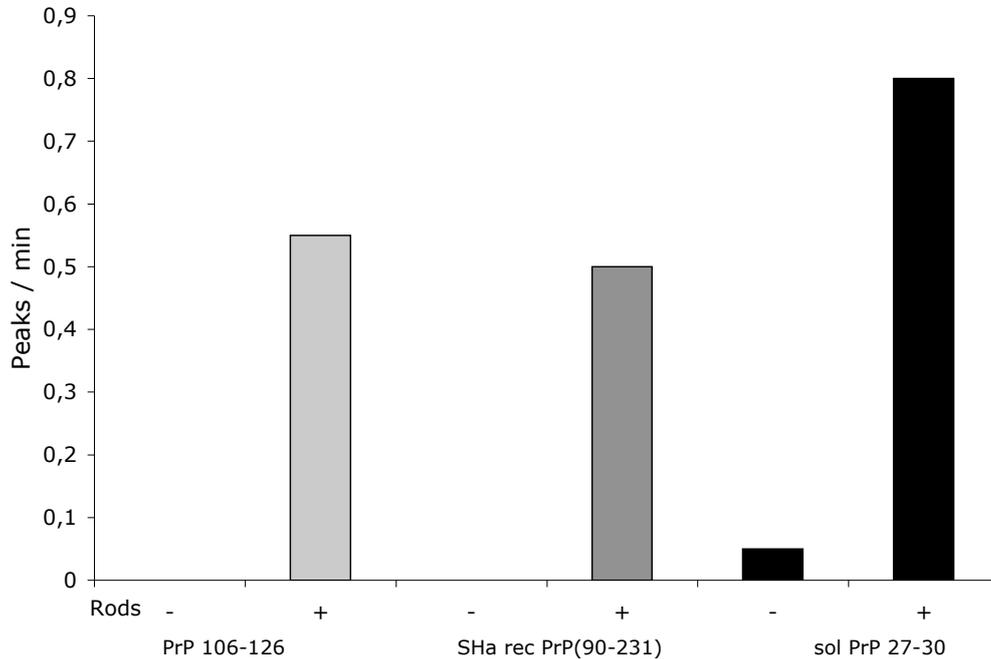


Abbildung 4.2: Anlagerungseffizienz von PrP 106-126, SHa rec PrP(90-231) und sol PrP 27-30 an Prion-Rods. Cy2 markierte Prion-Proteine wurden mit (+) und ohne (-) Prion-Rods inkubiert und zehn Minuten gemessen. Alle getesteten Prion-Proteine ließen sich mit vergleichbarer Effizienz an Prion-Rods anlagern. Mittelwerte aus 10 Messungen von 1 Minute.

Die Fluoreszenzpeaks weisen eine große Varianz in Bezug auf Signalhöhe und -breite auf. Die Höhe der Peaks ist proportional zur Menge der eingebauten fluoreszenzmarkierten PrP-Moleküle. Die Breite der Peaks gibt an, wie lange sich das Koaggregat aus Prion-Rods und fluoreszenzmarkierten PrP-Molekülen im konfokalen Volumenelement des FCS aufgehalten hat. Hieraus können Rückschlüsse auf die Diffusionszeit des einzelnen Koaggregats gezogen werden. Es kann jedoch keine statistische Betrachtung vorgenommen werden, da einem Einzelmolekül, je nach Art der Diffusion durch das Volumenelement, unterschiedliche Diffusionszeiten zugeordnet werden können. So müßte für die Bestimmung einer mittleren Diffusionszeit über eine Vielzahl von Koaggregaten gemittelt werden, was hier aufgrund der geringen Anzahl von Koaggregaten nicht geschehen kann. Als Fluoreszenzpeaks werden diejenigen maximalen Zählraten definiert, welche eine Abweichung der mittleren Fluoreszenzzählrate von mehr als 50 % von der Kontrolle haben. Als Kontrolle dient die Sonde, also das fluoreszenzmarkierte PrP, in NaPi 0,02 % SDS. Die Kontrolle sollte dabei eine Abweichung von nicht mehr als 20 % von der mittleren Fluoreszenzzählrate aufweisen. Sollte eine Sonde alleine schon eine deutliche

Anzahl von Peaks aufweisen, oftmals durch Selbstaggregation durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen verursacht, kann sie nicht weiter verwendet werden.

Die hier getesteten Prion-Proteine zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Bindungseffizienz an Prion-Rods (Abb. 4.2). Wie schon in anderen Experimenten gezeigt werden konnte (Pitschke, 1999) bindet PrP 106-126 unspezifisch an viele andere Proteine und da solPrP 27-30 nicht in ausreichenden Mengen zu Verfügung stand, wurde für weitere Koaggregationsexperimente SHa rec PrP(90-231) verwendet.

4.2 Untersuchungen mit Cerebrospinalflüssigkeit

Wie schon erwähnt konnte mit der FCS in der Cerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten A β -Aggregate nachgewiesen werden (Pitschke, 1999). Als Untersuchungsmedium zum Nachweis von pathogenen Erregern im Gehirn bietet sich die Cerebrospinalflüssigkeit, die auch Liquor genannt wird, aus zwei Gründen an: Erstens umspült der Liquor das Zentralnervensystem. Er ist damit nicht, wie z. B. Blut, durch die Blut-Hirnschranke vom Entstehungsort der pathologischen Aggregate, dem Hirn, getrennt. Zweitens handelt es sich beim Liquor um ein Ultrafiltrat, sozusagen um ein „sauberes“ Medium. Er enthält kaum Zellen oder Proteine, die selbst fluoreszieren, und eignet sich damit gut für fluoreszenzspektroskopische Methoden. Allerdings kann diese Voraussetzung im Falle einer Erkrankung nicht gegeben sein.

Der Detektionsansatz, der an isolierten Prion-Rods entwickelt und evaluiert wurde, diente auch zum Nachweis von natürlich vorkommenden pathologischen Aggregaten des Prion-Proteins im Liquor von Hamstern und Rindern. Für Untersuchungen am CSF standen uns je Hamster im Mittel ca. 50 μ l zur Verfügung, so dass gerade genug Material für ein bis zwei Tests vorhanden war und eine weitere Behandlung der Proben sich ausschloss. Wiederum wurde Cy2 markiertes SHa rec PrP(90-231) auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 250 kHz in NaPi, 0,2 %SDS verdünnt. Eine weitere Verdünnung auf 0,02 % SDS, und damit auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz, erfolgte durch Zugabe von Hamster CSF.

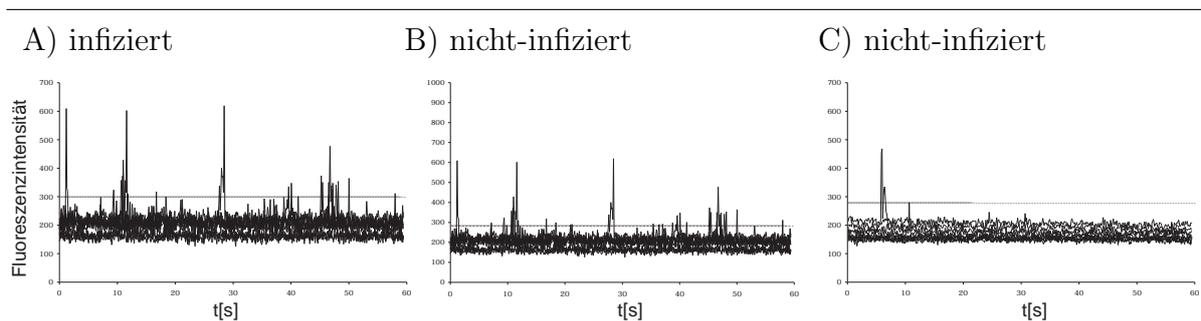


Abbildung 4.3: Fluoreszenzfluktuationsspektren von fluoreszenzmarkierten SHa rec PrP(90-231) im CSF. Exemplarisch gezeigt sind je zehn Messungen in (A) infizierten CSF, (B) nicht-infizierten CSF, welches ein falsch-positives Signal liefert, und (C) nicht-infizierten CSF zu je einer Minute, die übereinandergelegt worden sind. Der Schwellenwert ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

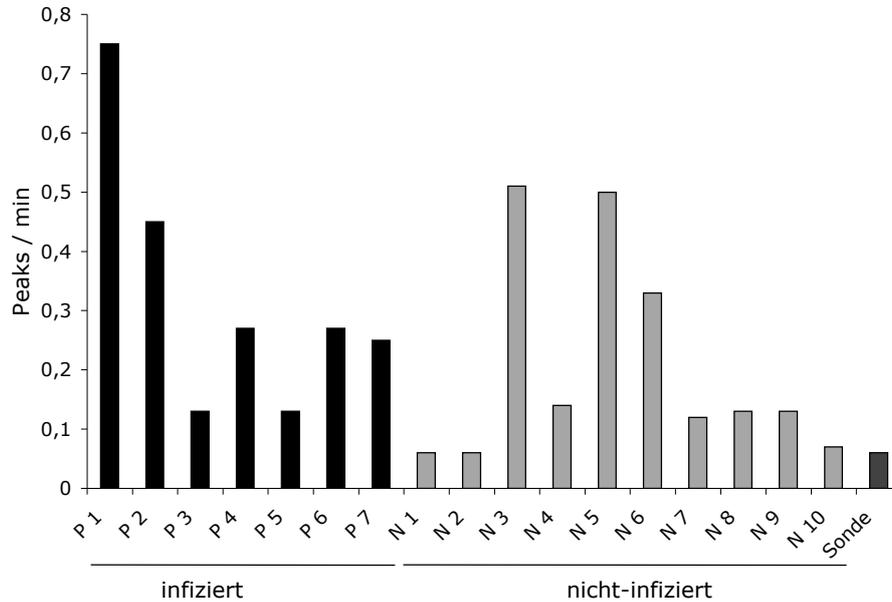


Abbildung 4.4: Nachweis von PrP^{Sc}-Aggregaten im CSF von Hamstern. Aufgetragen sind die ermittelten Peaks im CSF infizierter (P) und nicht-infizierter (N) Hamster. Eine eindeutige Einteilung in infizierte und nicht-infizierte Tiere kann nicht getroffen werden. Nicht-infizierte Tiere zeigen in ihrem Liquor zu viele falsch-positive Signale. Messungen von je 10 mal 1 Minute, je eine CSF-Probe pro Tier.

Wie man aus Abb. 4.4 erkennen kann, war eine Unterscheidung von infizierten und nicht-infizierten Tieren nicht möglich. Eine mögliche Ursache für den z. T. erheblichen Hintergrund in den gesunden Tieren kann auf die Probenentnahme zurückgeführt werden. Die CSF wird den Hamstern nach Decapitation entnommen. Durch diese Methode könnten durch die Schnittträger Verunreinigungen in den Liquor gelangt sein. In der Tat waren einige Proben, vor allem diejenigen mit hohem Hintergrund, mit Blut verunreinigt, sie wiesen eine starke rötliche Färbung auf. Andererseits wurden z. T. auch nur sehr wenig Signale im Liquor infizierter Tiere gefunden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass nicht in jedem Tier PrP^{Sc} in den Liquor übertritt, oder aber erst in einem sehr späten Stadium der Infektion. Aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial, den damit verbundenen Schwierigkeiten der Optimierung sowie der begrenzten Verfügbarkeit konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden. In Abb. 4.3 sind exemplarisch Fluoreszenzfluktuationen von zehn einminütigen Messungen einer Probe eines infizierten Tieres und zwei nicht-infizierter Tiere übereinandergelegt worden, um einen Eindruck zu bekommen, wie die Messungen aussahen und wie die Auswertung erfolgte. Abb. 4.3.B zeigt eine falsch-positive Probe, die die Probleme der Messungen am Liquor verdeutlicht. Als Fluoreszenzpeaks wurden diejenigen Zählraten gewertet, welche eine Abweichung der

mittleren Fluoreszenzzählrate von mehr als 50 % von der Kontrolle haben. Diese Grenze wurde in der Abbildung als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Wir erhielten auch Liquor von gesunden und infizierten Rindern. Im Gegensatz zum Hamster-Liquor standen uns hier einige ml je Tier zur Verfügung. Doch auch hier wurden keine eindeutige Ergebnisse erzielt. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Untersuchungen am Liquor der Hamster. (Daten nicht gezeigt).

4.3 Untersuchung von Hirngewebe

Für die folgende Optimierung des diagnostischen Tests wurden keine weiteren Experimente mit Liquor durchgeführt. Sowohl die durchgeführten Experimente als auch die ungeklärte Frage, ob PrP^{Sc} bei allen Tierarten im CSF vorliegt, und wenn ja, ob in nachweisbarer Konzentration und ob auch jedes infizierte Tier PrP^{Sc} im Liquor enthält, sprachen gegen die Untersuchung von Liquor als Probenmaterial. Als geeigneteres Probenmaterial zur Etablierung eines Testsystems erschien Hirngewebe. Hier gibt es gesicherte Erkenntnisse, dass in jedem terminal erkranktem Tier PrP^{Sc} in hohen Konzentrationen im Hirn vorkommt. Während des Krankheitsverlaufs ist der Erreger im Hirn als erstes in der *Medulla oblongata* nachweisbar. Daher wurde für die Isolation des Erregers Hirnhomogenat dieser Region eingesetzt. Ein weiterer Vorteil der *Medulla oblongata* ist, dass sie bei geschlachteten Kühen, im Gegensatz zum Liquor, leicht zu entnehmen ist. Dies war ein zusätzliches Problem bei der Verwendung von Liquor als Probenmaterial bei Tieren. Bei Hamstern wurde aufgrund der geringen Größe des Gehirns (und den damit verbundenen Schwierigkeiten die *Medulla oblongata* aus diesem kleinen Gehirn zu entnehmen) das gesamte Hirn verwendet.

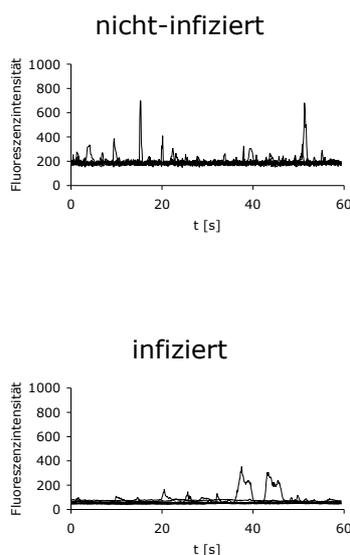


Abbildung 4.5: Fluoreszenzfluktuationen von fluoreszenzmarkierten rec PrP(90-231) in 10 % Hirnhomogenat infizierter und nicht-infizierter Hamster. Die Fluoreszenzfluktuation von zehn Messungen zu je einer Minute wurden übereinandergelegt. Für die Messungen wurde Cy2 markiertes SHa rec PrP(90-231) auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 250 kHz in NaPi, 0,2%SDS verdünnt. Eine weitere Verdünnung auf 0,02 % SDS, und damit auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz, erfolgte durch Zugabe von 10 % Hirnhomogenat. In beiden Proben sind Peaks zu erkennen. Eine eindeutige Identifizierung von infizierten und nicht-infizierten Tieren war nicht möglich, da die Proben zu viele unspezifische Signale zeigten, welche evt. durch die Anlagerung des SHa rec PrP(90-231) an Zellbestandteile entstanden. Bei Messungen mit 1 % Hirnhomogenat kam es zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

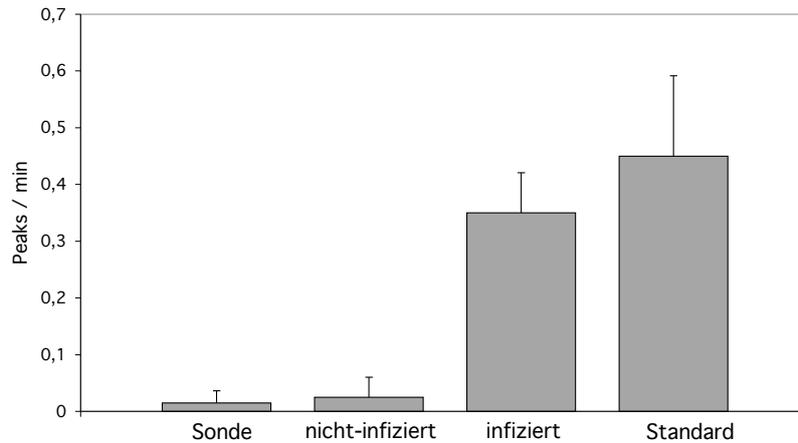


Abbildung 4.6: FCS-Nachweis von Prion-Rods nach der Aufreinigung nach McKinley et al. (1991). Als Sonde diente fluoreszenzmarkiertes SHa rec PrP(90-231), welches z. T. Selbstaggregation zeigt. Das Signal bei nicht-infizierten Tieren ist im Vergleich zu dem Signal in infizierten Tieren sehr gering. Als Standard wurden Prion-Rods eingesetzt. Hierbei handelt es sich um hochreine Prion-Rods in hoher Konzentration. Das Signal von der Positivkontrolle und der infizierter Tiere unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Ergebnisse von fünf unterschiedlichen Tieren, mit jeweils 20 Messungen.

4.3.1 Präparation von Prion-Rods aus Hirngewebe

In initialen Versuchen wurde 1 % und 10 % Hirnhomogenat in TBS als Probenmaterial verwendet. Es zeigte sich allerdings, dass vor dem sehr starken Hintergrund keine spezifischen Signale gemessen werden konnten. Exemplarisch sind in Abb. 4.5 Fluoreszenzfluktuationen der Sonde in Hirnhomogenaten gesunder und infizierter Tiere gezeigt. PrP ist ein sehr hydrophobes Molekül und bindet daher unspezifisch an viele Zellbestandteile. Zudem führen die vielen Zelltrümmer in der Lösung zur Streuung des Laserlichts. Auch hierdurch entstehen Peaks in den Fluoreszenzfluktuationen, also falsch-positive Signale. Somit eignet sich die Methode nur sehr begrenzt zur Anwendung in Zellhomogenaten, da spezifische Signale zu selten sind, um sie in der Diagnostik anwenden zu können.

Daher wurden Prion-Rods nach dem Aufreinigungsprotokoll von McKinley et al. (1991) isoliert und mit der FCS vermessen. Dieses Aufreinigungsprotokoll wurde gewählt, da die Anlagerung von PrP an amyloide Strukturen effizienter erfolgt als an amorphe Aggregate (Pitschke, 1999). Besonders wichtig ist dabei die Anwesenheit von Sarkosyl während der Proteolyse mit Proteinase K. Erst hierdurch kommt es zur Bildung von amyloiden Prion-Rods, liegen sie vorher doch oft als amorphe Plaques im Gewebe vor. Die Aufreinigung ermöglichte es zudem, PrP^C aus der Lösung durch Proteinase K -Verdauung zu entfernen. In Abb. 4.7 sind die Proben der verschiedenen Schritte der Aufreinigung in einem Silbergel aufgetragen. In der Probe „+ PK“, dem Endprodukt, kann man neben dem isoliertem

4 Ergebnisse

PrP 27-30, eine dominante Bande bei ca. 30 kDa sehen, welche von der eingesetzten Proteinase K stammt. Deutlich zu sehen ist die zunehmende Reinheit der Probe und die im letzten Schritt erfolgte Aufkonzentrierung des PrP 27-30. In FCS-Experimenten konnte ein Unterschied zwischen gesunden und infizierten Tieren festgestellt werden (Abb. 4.6). Für die FCS-Experimente wurden 4×10^{-3} Hirn-Äquivalente (H. Ä.) mit Cy2 markiertem SHa rec PrP(90-231) versetzt. Dabei wurde die Sonde auf 0,02% SDS mit einer Fluoreszenzintensität von ca. 25 relativer Einheiten verdünnt.

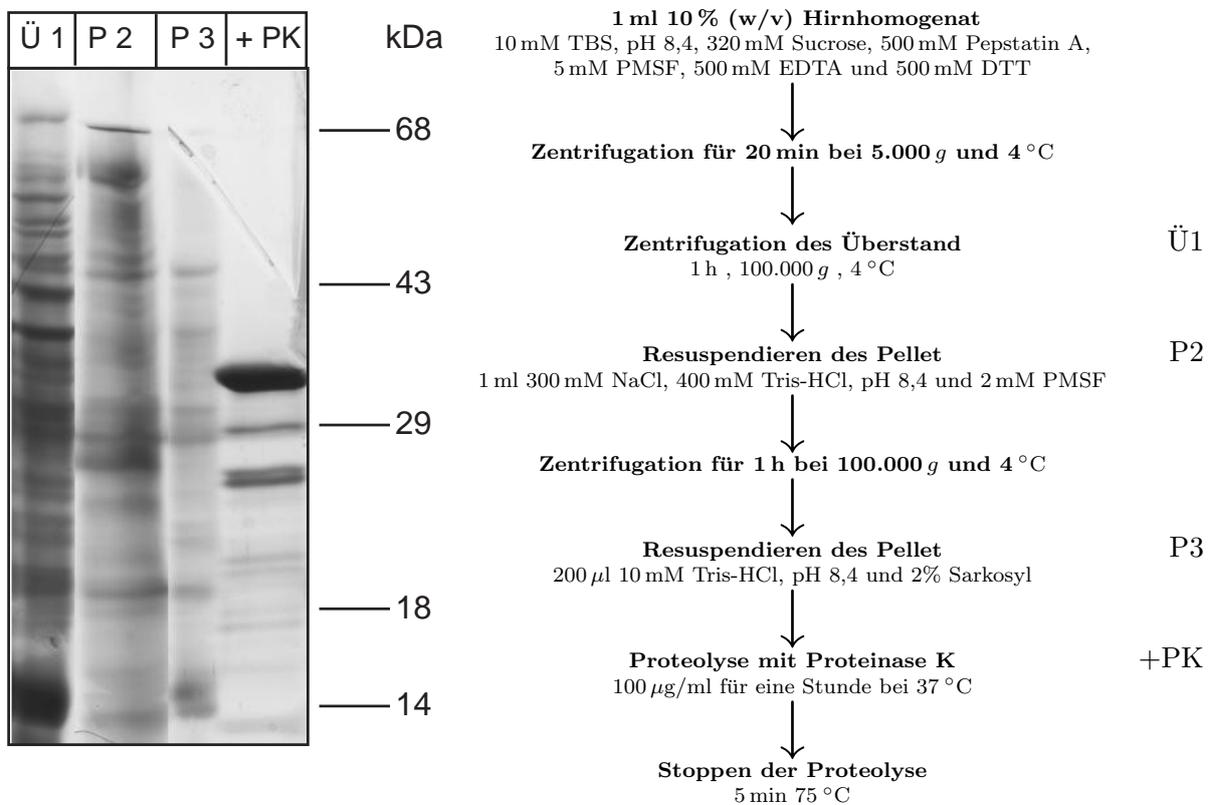


Abbildung 4.7: Analyse einer Aufreinigung von Prion-Rods nach dem Protokoll von McKinley *et al.* (1991) mit SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung. Ü1 ist der Überstand der ersten Zentrifugation. Bei der ersten Zentrifugation handelt es sich um eine schwache Zentrifugation mit der große Bestandteile, wie z. B. Zelltrümmer aus der Probe entfernt werden. Danach folgen zwei 100.000 g Zentrifugationen bei der unlösliches PrP^{Sc} sedimentiert und konzentriert wird. P2 und P3 sind die Pellets bei der Zentrifugationen mit 100.000 g. Zum Schluss folgt eine Proteolyse mit Proteinase K. Das Ergebnis ist in der Spur „+PK“ zu sehen. Die dominante Bande bei ca. 30 kDa stammt von der Proteinase. Mit jedem Reinigungsschritt nimmt die Reinheit der Probe zu. Im letzten Schritt erfolgt zudem eine Aufkonzentrierung des Signals. In der Spur mit „+PK“ ist die fünffache Menge aufgrund der Aufkonzentrierung während der Isolation aufgetragen, so dass hier auch PrP 27-30 zu sehen ist. In den restlichen Spuren sind gleiche Menge aufgetragen.

4.4 Optimierung des Messaufbaus

Aus der Literatur (Petersen, 1986; Petersen *et al.*, 1986) ist bekannt, dass durch eine Bewegung des Messvolumens durch die Probe eine erhebliche Steigerung der Nachweisempfindlichkeit von Aggregaten mittels der FCS erreicht werden kann. In enger Kooperation mit der Neuropathologie der Göttinger Universitätsklinik und dem Max-Planck-Institut in Göttingen wurde dieses Verfahren auf unsere Messungen übertragen (Bieschke, 2000; Bieschke *et al.*, 2000). Das Prinzip ist in Abb. 4.8 dargestellt. Umgesetzt wurde die Idee, indem die Messlösung in eine Glaskapillare von 50 mm Länge, 0,18 mm Wandstärke und einem Innenquerschnitt von 1,6 x 0,2 mm (Vogel GmbH, Giessen) gefüllt wurde. Die Enden der Kapillare wurden mit Siegelack auf einem Objektträger fixiert und dabei gleichzeitig verschlossen.

Das Scannen der Lösung wurde durch Ansteuerung des Positioniertisches des FCS-Messaufbaus über eine Makrosprache (Makro Express[®] 2000 Vers. 2.1, Insight Software Solutions, GB) realisiert. Innerhalb des Confocor Steuerprogramms (Carl Zeiss GmbH, Jena) wurde ein Proben­träger mit zwei mal fünf Punkten definiert, deren Abstand entlang der Kapillarrichtung 10 mm und quer zur Kapillare 10 μm betrug. Die Punkte

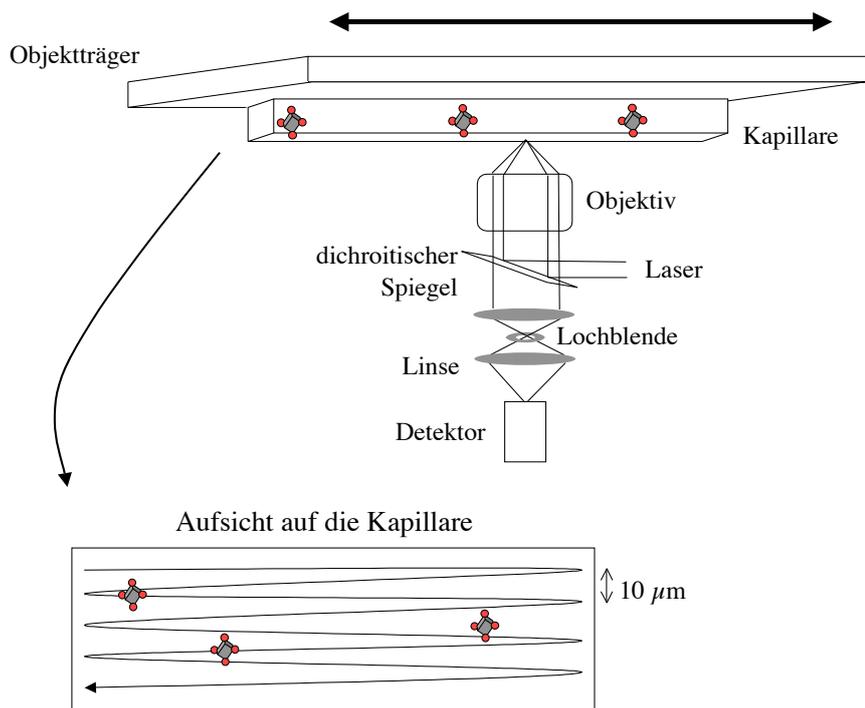


Abbildung 4.8: Detektion von Prion-Rods durch Scanning der Probe. In einer Glaskapillare wurde die zu vermessende Lösung mittels Siegelack eingeschlossen und auf einem Objektträger fixiert. Die Kapillare wurde über dem Objektiv derart bewegt, dass das Messvolumen mäanderförmig durch die Lösung wanderte.

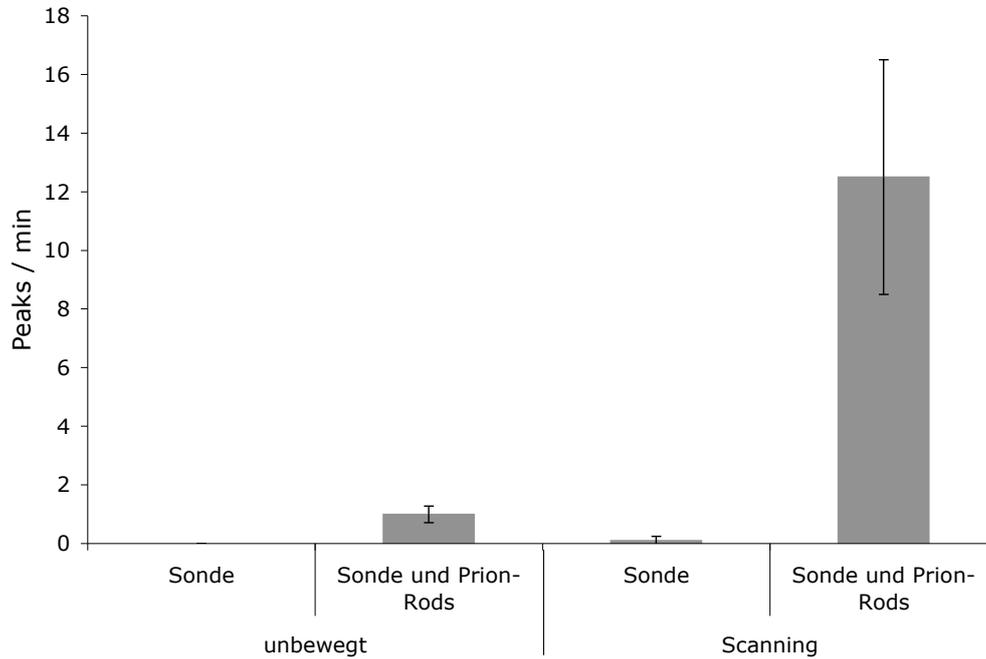


Abbildung 4.9: Steigerung der Sensitivität durch Verwendung eines bewegten Probenträgers. Durch das Scannen nach Aggregaten wird die Sensitivität um den Faktor 10 gesteigert, da Aggregate jetzt nicht mehr durch Diffusion alleine in das Messvolumen gelangen, sondern aktiv gesucht werden. Da Prion-Rods relativ groß sind, ist deren Diffusionskoeffizient sehr klein und somit findet ein Durchtritt durch das unbewegte Messvolumen nur selten statt. Durch die Bewegung des Messvolumens wird der Durchtritt der Aggregate durch das Messvolumen unabhängig vom Diffusionskoeffizienten. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 Messungen.

wurden so angesteuert, das die Kapillare relativ zum Mikroskop mäanderförmig bewegt wurde. Durch dieses Scannen konnte eine Steigerung der Peakhäufigkeit um den Faktor 10 erreicht werden. In Abb. 4.9 ist ein Vergleich zwischen unbewegtem und bewegtem Messaufbau gezeigt. Als Sonde diente Cy2 markiertes SHa rec PrP(90-231). Diese wurde auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 250 kHz in NaPi, 0,2% SDS verdünnt. Eine weitere Verdünnung auf 0,02% SDS, und damit auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz, erfolgte unter Zugabe von 1/10 des Volumens an Prion-Rods und NaPi. Hier wurde bei beiden Methoden die Anzahl der Peaks ermittelt um einen Vergleich beider Methoden zu erhalten.

Das Signal der Avalanche-Photodioden (APD) wurde durch eine Rohdatenerfassungskarte (Evotec) durchgeleitet, bevor es in die Hardwarekorrelatorkarte (Zeiss / Evotec) zur Korrelationsanalyse geleitet wurde. Mittels der Rohdatenerfassungskarte und Software

4 Ergebnisse

(LabView, National Instruments, Austin, USA) war es möglich, das Intensitätssignal der APD aufzunehmen und zu analysieren, welches mit dem ursprünglichen Messaufbau des Herstellers nicht möglich war. Die Intensitätssignale wurden mit einem eigens dafür entwickelten Programm ausgewertet (siehe Anhang).

Die Intensitätsverteilung freier Sondenmoleküle ist durch die mittlere Diffusionszeit der Sondenmoleküle und die Zahl der Fluorophore definiert. Die Software erstellt ein Histogramm der Fluoreszenzintensitäten und ermittelt den Wendepunkt des vom Maximum zu größeren Werten liegenden Abschnitts der Funktion (Abb. 4.10). Um den Wendepunkt wird in einem definierten Bereich eine Regressionsgerade gebildet und der X-Achsenabschnitt der Regressionsgerade bestimmt. Dadurch hat man einen Punkt definiert, der als Schwellenwert dient. Somit ist eine Trennung der Signale von Sonden- bzw. Zielmolekülen möglich und das Signal der Zielmoleküle kann quantifiziert werden. Eine detailliertere Auswertung des Signals der Zielmoleküle ist nicht möglich, da markierte Aggregate aufgrund der heterogenen Aggregatgröße schlecht definiert sind. Sie könnten durch eine Überlagerung der Verteilung für unterschiedliche Aggregatgrößen und Chromophorezahl quantifiziert werden, doch aufgrund der geringen Anzahl der detektierten Aggregate erscheint dies wenig praktikabel. Diese Art der Auswertung bringt Vorteile im Vergleich zu der von Bieschke (2000) beschriebenen Methode. Dort wird der Schwellenwert zur Trennung von Sonden- und Zielmolekülen durch die zwölffache Standardabweichung der logarithmischen Normalverteilung definiert. Die Normalverteilung ist gegeben durch die Intensitätsverteilung der freien Sonde. Diese Methode erbringt für die dort auftauchenden seltenen Ereignisse einen gut funktionierender Schwellenwert. Liegt jedoch eine im Verhältnis zum Sonden-signal hohe Anzahl an Signalen der Zielmoleküle vor, kann sich im Extremfall der Mittelwert und damit die zwölffache Standardabweichung derart stark verschieben, dass Signale, welche von Zielmolekülen stammen, nicht mehr betrachtet werden.

Die Trennung von Signal- und Zielmolekülen im Intensitätshistogramm hängt maßgeblich von der zeitlichen Auflösung, d.h. der Integrationszeit der Rohdatenerfassung, ab. Für eine maximale Trennung vom Sonden-hintergrund sollte das gesamte Signal, welches durch den Durchtritt eines Zielmoleküls durch das Meßvolumen erzeugt wird, in eine Integrationszeit fallen. Dies ist somit die minimale zeitliche Auflösung der Detektion. Ist die Integrationszeit größer als die mittlere Aufenthaltsdauer, so verringert sich das Signal / Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) durch Mittelung des Sonden-hintergrundes. Im Falle einer diffusionskontrollierten Bewegung bestimmt sich die mittlere Aufenthaltsdauer T eines Moleküls mit dem Diffusionskoeffizienten D im konfokalen Volumenelement mit dem Radius ω_0 nach

$$T = \frac{\omega_0}{3D} \quad (4.1)$$

Bei FCS-Messungen entspricht dies etwa dem Vierfachen der mittleren Diffusionszeit (Schwille, 1997), doch beim Scanning wird die mittlere Aufenthaltsdauer durch das Verhältnis von Fokusdurchmesser und Scanninggeschwindigkeit v bestimmt solange die Diffusionszeit $\tau_D > 10T$ ist (Bieschke, 2000).

$$T = \frac{\pi}{2v} \quad (4.2)$$

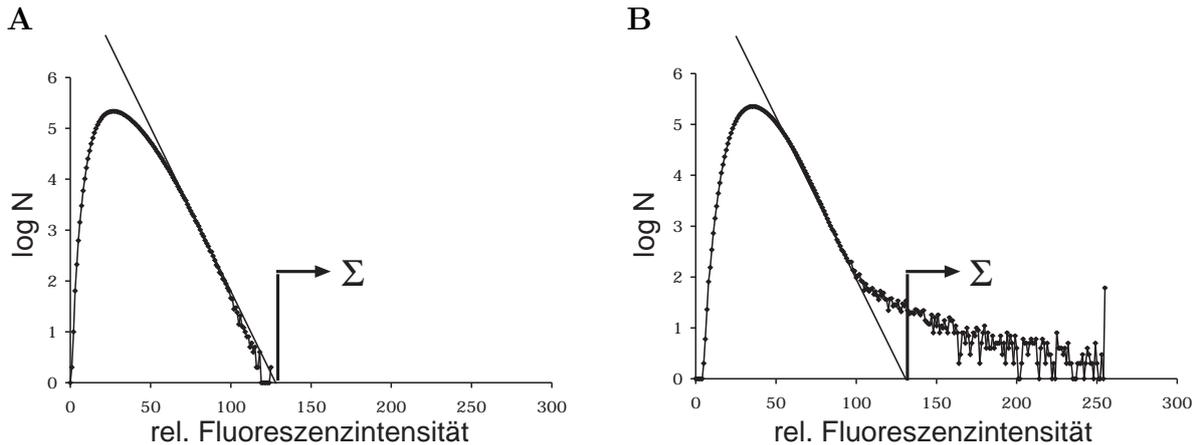


Abbildung 4.10: Prinzip der Auswertung bei Datenerfassung mittels einer Rohdatenerfassungskarte und bewegtem Messaufbau. Fluoreszenzintensitäten werden in ein Histogramm überführt. Die relative Fluoreszenz kann aufgrund technischer Bedingungen nur Werte bis 255 annehmen. Werte über 255 werden als 255-Wert gezählt. Durch den Wendepunkt wird eine Regressionsgerade gelegt und Fluoreszenzintensitäten größer als der X-Achsenabschnitt der Regressionsgerade werden summiert. **(A)** Sonde **(B)** Probe eines infizierten Tieres.

Für die Messungen mit bewegten Proben im erweiterten Confocor-Aufbau wurde eine Bewegungsgeschwindigkeit von 1 mm/s und daher eine Integrationszeit von 500 μ s gewählt. Somit verteilen sich Signale von Zielmolekülen auf maximal ein bis zwei Integrationszeiten.

In späteren Experimenten stand uns ein FCS-Gerät zur Verfügung, welches das „Scanning“ schon implementiert hatte, des Olympus 2-Strahl FCS (Evotec, Hamburg). Die Implementierung erfolgte auf Anregung einiger Arbeitsgruppen, u. a. auch durch unsere. Allerdings wird hier nicht die Probe über das Objektiv bewegt, sondern das konfokale Volumenelement wird durch einen sogenannten *Beams scanner* durch das Probenvolumen bewegt. Eine mäanderförmige Bewegung des konfokalen Volumenelements durch die Probe wird durch Überlagerung zweier Bewegungen erreicht. Der Tisch bewegt die Probe in X-Richtung und das konfokale Volumenelement wird in Y-Richtung durch die Probe bewegt. Die Bewegung des konfokalen Volumenelements erfolgt durch die Ablenkung des Lasers mittels eines „zitternden“ Spiegels. (Abb. 4.11)

Als Amplitude für die Y-Richtung wurde der Maximalwert von 100 μ m, der ohne Verzerrung des konfokalen Volumenelements eingestellt werden kann, mit einer Frequenz von 50 Hz gewählt. Die Tischbewegung in X-Richtung ist durch den Maximalwert von 1 mm definiert. Weitergehende Entwicklung der Software wird auf unser Anfragen eine längere Tischbewegung erlauben, wodurch das Scannen eines größeren Probenvolumen möglich wird. Das konfokale Volumenelement wurde mit einem Durchmesser von 0,4 μ m eingestellt. Durch die Frequenz von 50 Hz bestimmt die Bewegung in X-Richtung als schnellste Bewegung die Scanneigenschaften. Das konfokale Volumenelement bewegt sich demnach mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/s durch die Probe. Daher wurde als Integrationszeit 50 μ s gewählt. Hierdurch entsteht eine Überlappung der gemessenen

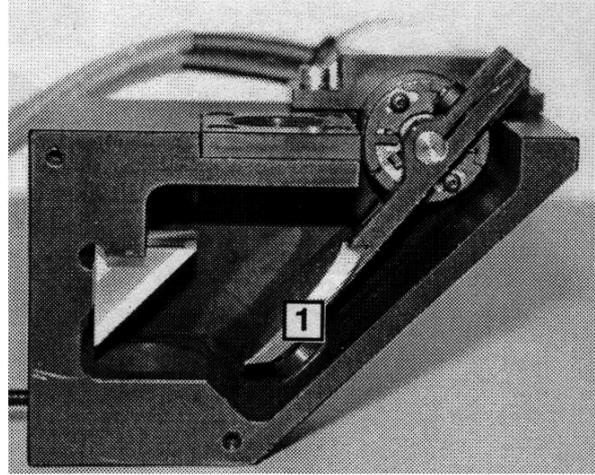
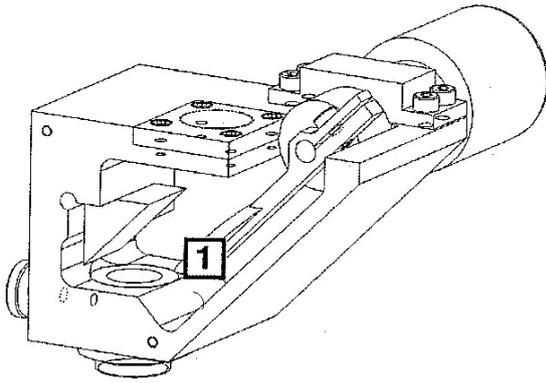


Abbildung 4.11: Beamscanner Beim Olympus 2-Strahl FCS, Evotec, Hamburg, wird eine mäanderförmige Bewegung des Volumenelements durch die Probe verwirklicht. Der einfallende Laserstrahl, sowie die detektierte Fluoreszenz, werden über einen Spiegel geleitet (1 in der Abbildung). Dieser Spiegel führt eine zitternde Bewegung in horizontaler Richtung aus. Da der Tisch sich in vertikaler Richtung bewegt, wird so eine mäanderförmige Bewegung durch die Probe erzeugt. Links eine schematische Abbildung und rechts ein Foto dieses Beamscanners. (Abb. aus dem Handbuch des Olympus 2-Strahl FCS, Evotec)

Volumenelemente pro Integrationszeitraum von einem halben Volumenelement. Diese Überlappung ist erwünscht, da anzunehmen ist, dass sowohl die Aggregatgröße als auch die lokale Lage der Aggregate einer Verteilung unterliegen. Somit könnten Aggregate z. T. nur unvollständig vom konfokalen Volumenelement abgedeckt sein. Eine Überlappung gewährleistet, dass alle Aggregate, die auf dem Weg des Messvolumens liegen, ein eindeutiges Signal liefern. Dafür nimmt man in Kauf, dass sehr große Aggregate während mehrere Integrationszeiten verteilt gemessen werden. Durch die Mäanderbewegung erfolgt an den maximalen Ausschlägen der Bewegung eine zusätzliche Überschneidung, während in der Mitte in etwa das Volumen eines halben Volumenelements nicht beobachtet wird. Doch dies ist durch Mehrfachmessungen und eine statistische Analyse vernachlässigbar, da sich während des mehrfachen Messzeitraums die Zielmoleküle bewegen. Schematisch ist die Bewegung des konfokalen Volumenelements in Abb. 4.12 gezeigt.

Im Confocor der Fa. Zeiss / Evotec konnte durch die Kapillare eine maximal mögliche Erfassung des Probenvolumens gewährleistet werden. Durch den Beamscanner kann hier auf die Kapillare verzichtet werden. Dies hatte zum Vorteil, dass das Verhältnis von Oberfläche und Volumen der Probe, und somit auch der Kontakt der Probe mit der Oberfläche des Probenträgers, verringert wird. Damit wurde die unspezifische Adhäsion der Aggregate an den Probenträger aufgrund ihrer starken Hydrophobizität vermindert. Durch die Adhäsion an die Probenträger werden Zielmoleküle aus der Lösung entfernt, was eine Verminderung der Sensitivität zur Folge hat.

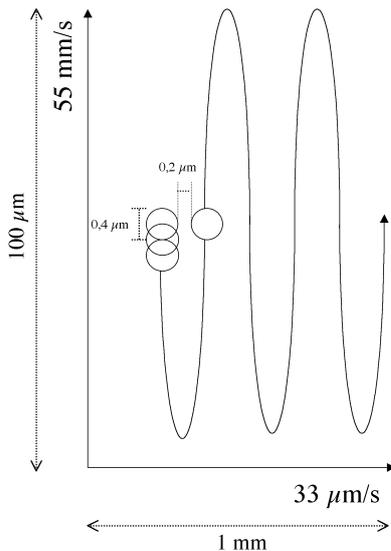


Abbildung 4.12: Scanningbewegung durch die Probe bei Verwendung des Olympus 2-Strahl FCS, Evotec, Hamburg. Wie erläutert wurde, wird die mäandrierende Bewegung durch die Überlagerung zweier Bewegungen erzeugt. In horizontaler Richtung erfolgt die Bewegung mit einer Geschwindigkeit von $33 \mu\text{m/s}$ über eine Strecke von 1 mm (maximale einstellbare Länge). In vertikaler Richtung erfolgt die Bewegung mit einer Amplitude von $100 \mu\text{m}$ mit 55 mm/s . Der Durchmesser des Messvolumens beträgt $0,4 \mu\text{m}$. Durch die Bewegung überlappen sich die Messvolumen an den maximalen Ausschlägen der Amplitude. In der vertikalen Mittelposition wird ein Raum von ca. $0,2 \mu\text{m}$ nicht erfasst. Allerdings wird eine Probe mehrfach gemessen, so dass dieser Freiraum durch geringe unterschiedliche Anfangspositionen beim Start der Bewegung abgedeckt wird. Zudem bewegen sich die gesuchten Aggregate in der Lösung, so dass bei einer Mehrfachmessung diese in das Messvolumen gelangen können.

4.5 Verwendung von Antikörpern als Sonde

4.5.1 Ergebnisse an Hirngewebe aus Hamstern

Wie schon erwähnt, hat SHa rec PrP(90-231) die intrinsische Eigenschaft zu aggregieren und damit zu unspezifischen Signalen zu führen. Durch seine starke Hydrophobizität entstanden weitere Probleme aufgrund unspezifischer Anlagerungen an Nicht-PrP-Moleküle, was insbesondere bei der Verwendung von Hirnhomogenat (Kap. 4.3) als Probenmaterial zu Problemen führte. Desweiteren wurden für 2D-FIDA Experimente, die zur Steigerung der Spezifität führen sollten, weitere Sonden benötigt. Daher wurden Antikörper als Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und getestet.

Als Antikörper wurde 3F4 gewählt, der als Standardantikörper beim PrP-Nachweis auf Blots verwendet wird. Dieser wurde mit Cy2 markiert und im FCS unter Scanning-Bewegung mit den Aufreinigungen nach dem Protokoll von [McKinley et al. \(1991\)](#) eingesetzt. Für die Messungen wurde das Confocor 1 der Fa. Zeiss/Evotec mit der bewegten Kapillare verwendet. Wiederum wurden $4 \cdot 10^{-3}$ H. Ä. mit Cy2 markiertem mAb 3F4 bzw. SHa rec PrP(90-231) versetzt, dabei wurde die SHa rec PrP(90-231)-Sonde auf $0,02 \%$ SDS und eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz verdünnt (Abb. 4.13). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper jeweils so eingesetzt, dass sie bei der Messung eine Fluoreszenzintensität von 30 bis 50 kHz erzeugten, wenn im Schnitt ein Fluorophor an einem Antikörper gebunden ist. Die Konzentration an Antikörper in der Lösung wurde somit im Vergleich zu den zuvor gemachten Experimenten erhöht. Durch diese Verdünnung wurde gewährleistet, dass so viele Antikörper wie möglich eingesetzt wurden, um das Gleichgewicht der Antikörperbindung soweit wie möglich auf die Seite der Bindung zu verschieben. Höhere Konzentrationen von

4 Ergebnisse

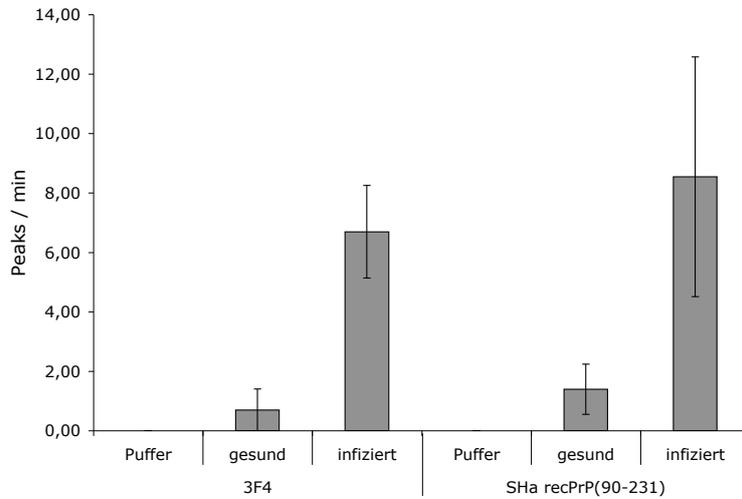


Abbildung 4.13: Einsatz von Antikörpern als Sonde. Prion-Rods werden im FCS entweder mittels Cy2 markiertem SHa rec PrP(90-231) oder Antikörper (hier mAb 3F4) nachgewiesen. Dies zeigt, dass Antikörper prinzipiell im FCS einsetzbar sind. Ihre Bindekonstanten reichen aus, um sie auch in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar an Moleküle zu binden. Desweiteren zeigt sich, dass Antikörper aufgrund ihrer geringen Selbstaggregation weniger falsch-positive Signale zeigen. Deshalb ist das Signal/Rausch-Verhältnis bei Antikörpern größer, obwohl mit ihnen eine geringere Signalstärke erreicht wird. Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 Messungen.

fluoreszenzmarkiertem Antikörper hätten zur Folge, dass die Bindung an ein Aggregat zu Fluoreszenzintensitäten führen würde, welche nicht mehr im linearen Bereich der APD lägen. Desweiteren würden diese Intensitäten nicht mehr registriert, da die Software nur Intensitäten bis zu einer gewissen Größe registriert. Dies liegt an der Speicherbegrenzung der Software welche aufgrund der Programmierung bei 255, der relativen Einheit für die Fluoreszenz im Histogramm liegt. Desweiteren könnte durch eine zu hohe Intensität die APD beschädigt oder gar zerstört werden. Im Extremfall erreicht man bei entsprechender Konzentration diese Intensitäten schon mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern alleine. Versuche, das Gleichgewicht der Antikörperbindung durch Zugabe von unmarkiertem Antikörper noch weiter auf die Seite der Bindung zu verschieben, schlugen fehl. Hier trat der gegenteilige Effekt ein, dass die Signalstärke abnahm (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass schon alle Epitope von Antikörper besetzt sind und durch Zugabe weiterer unmarkierter Antikörper von ihren Bindeplätzen auf den Prion-Rods verdrängt werden. Es sei erwähnt, dass die Signalstärke nicht von einer vorangegangenen Inkubation der Antikörper mit den Prion-Rods abhängig ist (Daten nicht gezeigt). Daher erfolgten Messungen direkt nach Mischen der Sonde und den Prion-Rods.

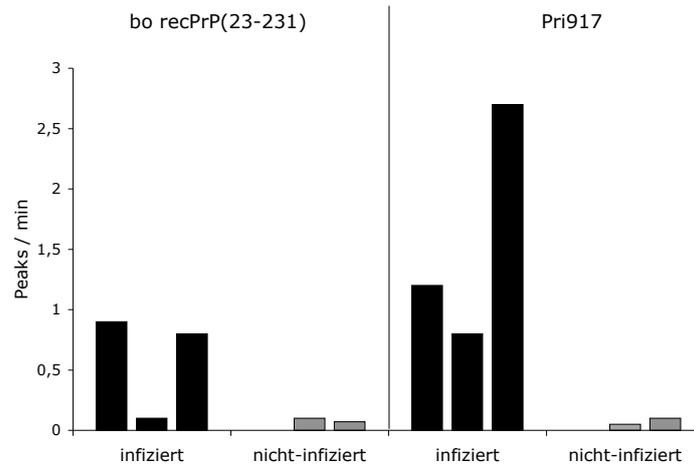


Abbildung 4.14: Nachweis von bovinen Prion-Rods. Bovine Prion-Rods wurden nach einem für PrP^{BSE} angepassten Protokoll von [McKinley et al. \(1991\)](#) aus Hirngewebe isoliert und mit Alexa-488 markiertem bo rec PrP(12-231) bzw. Alexa-488 markiertem mAb Pri 917 nachgewiesen. Als Kontrolle diente Gewebe von nicht-infizierten Rindern, welches der gleichen Behandlung unterzogen wurde. Proben von jeweils drei verschiedenen Tieren.

4.5.2 Ergebnisse mit bovinem Hirngewebe

Das Aufreinigungsprotokoll wurde auf bovines Hirngewebe übertragen. Aus der Literatur ([Oesch et al., 2000](#)) und aus persönlichen Mitteilungen von Leigh Thorne (VLA, Weighbridge) ist bekannt, dass PrP^{BSE} sehr viel sensitiver gegen Proteinase K ist als PrP^{Sc}. Deswegen wird eine 10fach geringere Menge von Proteinase K eingesetzt, um Prion-Rods zu erhalten. Das Aufreinigungsprotokoll von McKinley wurde entsprechend modifiziert. Der letzte Schritt, eine Proteinase K Proteolyse für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurde statt mit 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Zudem wurde kein Gesamt-Rinderhirn verwendet, sondern 1 ml eines 10% Homogenats in TBS der *Medulla oblongata*. Das Gewebe der Kontrolle stammte auch aus der *Medulla oblongata*, allerdings von gesunden Tieren.

Für den Nachweis im FCS wurden 20 μl der isolierten Prion-Rods mit Cy2 markiertem Pri-917, einem Antikörper der natives PrP^{BSE} gut erkennt, bzw. mit Cy2 markiertem bovinem rec PrP(12-231) versetzt. Bovines rec PrP(12-231) (bov rec PrP(12-231)) wurde dabei von 0,2% auf 0,02% SDS und auf eine Fluoreszenzintensität von ca. 25 kHz verdünnt. Die Proben wurden im Scanning-Messaufbau mit dem Confocor 1 gemessen. Auch hier konnten infizierte und nicht-infizierte Tiere unterschieden werden, obwohl die Signalintensität sehr viel geringer war als bei den Präparationen aus Hamsterhirngewebe (Abb. 4.14). Eine Probe eines infizierten Tieres zeigte allerdings keine erhöhten Signale. Eine Optimierung war erforderlich.

4 Ergebnisse

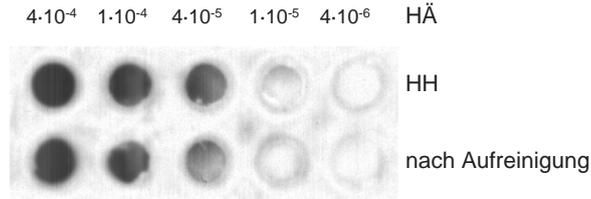


Abbildung 4.15: Bestimmung der Ausbeute aus der Aufreinigung von Prion-Rods mit dem Protokoll nach Beekes *et al.* (1995) Der Dot-Blot zeigt eine Konzentrationsreihe des Isolats und des Hirnhomogenates, welches einer entsprechenden Proteolyse mit Proteinase K unterzogen wurde. Das Hirnhomogenat wurde so behandelt, dass der Gehalt an Prion-Rods im Gehirn des Tieres abgeschätzt werden kann. Es zeigt den Gehalt an Prion-Rods im Gehirn vor der Aufreinigung. Eine densometrische Auswertung des Dotblots zeigte, dass die Aufreinigung eine Ausbeute von ca. 80% erzielt. HÄ = Hirnäquivalent, HH = Hirnhomogenat

4.6 Quantitative Aufreinigung von Prion-Rods

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die FCS-Methode prinzipiell auf die Detektion von Prion-Rods in Hirngewebe infizierter Tiere angewendet werden kann, so konnte jedoch die Signalstärke nicht überzeugen. Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um infizierte Tiere im terminalen Krankheitsstadium. Sie weisen einen hohen Titer an PrP^{Sc} bzw. PrP^{BSE}, so dass die schwachen Signalstärken etwas unbefriedigend sind und es einer Optimierung der Sensitivität bedarf. Da es für ein sensitives Testsystem unabdingbar notwendig ist, den Erreger so quantitativ wie möglich nachzuweisen, wurde ein Aufreinigungsprotokoll gewählt, welche die bisher höchste bekannte Ausbeute an Prion-Rods aus Hirngewebe erzielt (Beekes *et al.*, 1995). Nachteil dieser Methode ist eine geringe „Reinheit“ der Probe. Zur Etablierung der Integration dieser Aufreinigung in unser System wurde wieder auf Hirngewebe von Hamstern zurückgegriffen, da dieses uns in größerer Menge zur Verfügung stand. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Konzentration der Prion-Rods in Hirnäquivalenten (H. Ä.) angegeben. Ein H. Ä. entspricht dabei der Menge an Prion-Rods, die in einem Hirn vorkommen. Bei einem Tier im terminalem Krankheitsstadium enthält ein Hirn in etwa 20 bis 100 μg PrP^{Sc} (Prusiner *et al.*, 1983).

Es stellte sich heraus, dass ein wichtiges Kriterium für die hohe Ausbeute die Verwendung einer Ultraschallnase anstatt des bisher verwendeten Ultraschallbechers war. Nur damit konnten Ausbeuten bis 80% erzielt werden (Abb. 4.15). Ein Vorteil der Methode ist neben der hohen Ausbeute zudem, dass kaum noch exogen zugegebene Proteinase K im Isolat vorhanden ist und dass die Prion-Rods in einem Puffer der Wahl aufgenommen werden konnten. Bei der Aufreinigung nach McKinley *et al.* (1991) lagen die Prion-Rods im Anschluß in 2% Sarkosyl vor. Um eine Bindung der Sonden an die Prion-Rods zu ermöglichen musste zuvor das Sarkosyl verdünnt werden und damit indirekt die Prion-Rods. Auch konnten die Prion-Rods in geringeren Volumen aufgenommen werden, somit die Konzentration an Prion-Rods noch weiter erhöhend. Da die Prion-Rods mit der Ultraschallnase resuspendiert wurden gab es eine Volumenbegrenzung auf minimal 200 μl . Unter 200 μl konnte die Ultraschallnase nicht genügend in die Lösung eintauchen.

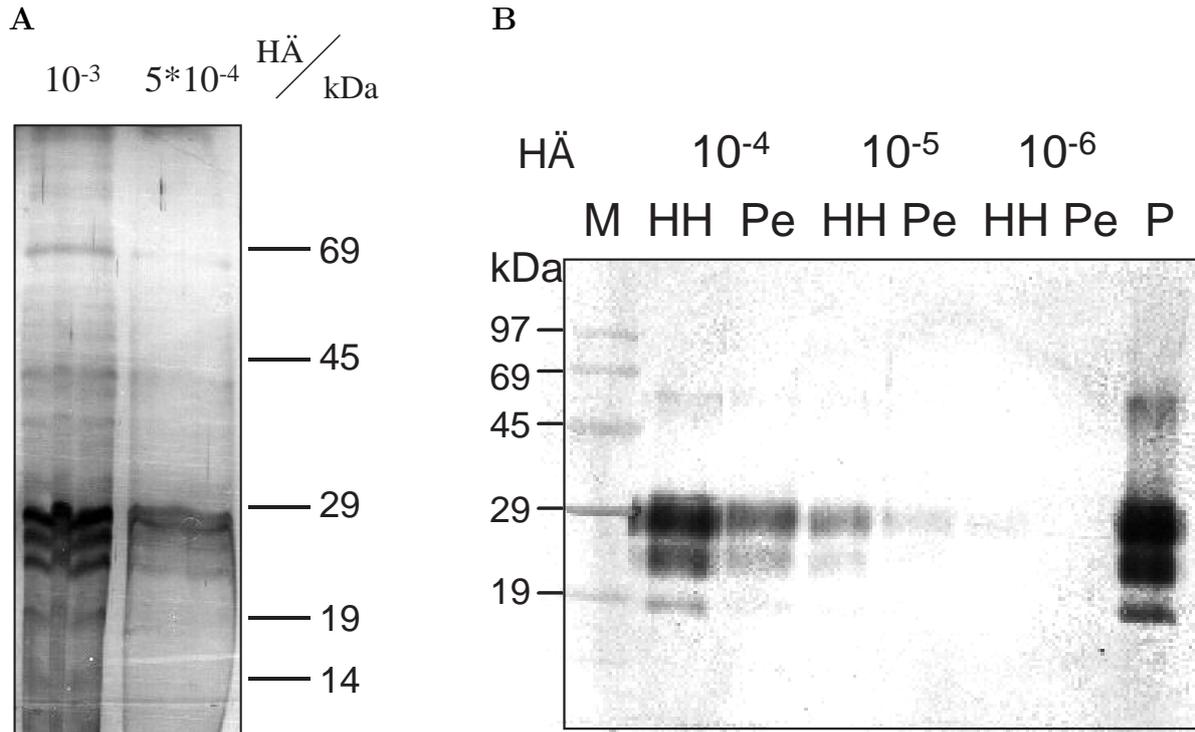


Abbildung 4.16: A Silberfärbung nach einer SDS-PAGE von einer Aufreinigung nach Beekes *et al.* (1995). Aufgetragen sind zwei verschiedene Konzentrationen (in Hirnäquivalenten (H. Ä.) einer Prion-Rods-Isolation. Die Silberfärbung verdeutlicht, dass dieses Protokoll keine hochreinen Proben an Prion-Rods liefert, neben PrP 27-30 bei 27 bis 30 kDa sind zahlreiche weitere Banden zu sehen. Allerdings erzeugt es die höchste Ausbeute aller bisher bekannten Protokolle. **B Western-Blot der Aufreinigung** Aufgetragen ist eine Konzentrationsreihe des Isolats und des Hirnhomogenates, welches einer entsprechenden Proteolyse mit Proteinase K unterzogen wurde. Hieraus kann die Ausbeute bestimmt werden (siehe auch Abb. 4.15. Ausbeute hier noch unter 80 %, später wurden höhere Ausbeuten um 80 % erreicht.), denn das Hirnhomogenat zeigt den ursprünglich Gehalt von PrP^{Sc} im Gehirn. Der Nachweis erfolgte mit 3F4 als primärer Antikörper und NBT/BCIP-Nachweis. M = Marker, HÄ = Hirnäquivalent, HH = Hirnhomogenat, Pe = Pellet, entspricht dem Isolat, P = Positivkontrolle

4.7 Antikörperscreening

Ein weiterer Schritt in der Optimierung des gesamten Verfahrens war die Wahl geeigneter Antikörper. Da sich die Bedingungen im FCS von denen im Blot unterscheiden, wurden alle verfügbaren Antikörper neu getestet. Rückschlüsse aus der Bindungsaffinität im Blot waren nicht möglich. Im Blot bestimmen denaturierende Bedingungen die Bindeaffinität, während im FCS native Bedingungen in Lösung vorherrschen, allerdings nach Proteolyse mit Proteinase K. Somit müssen für die FCS-Messungen Epitope der Prion-Rods erkannt werden. Da im weiteren Verlauf der Arbeit das neue Olympus Zwei-Strahl FCS von Evotec benutzt werden konnte, wurden zur Verfügung stehenden Antikörper sowohl mit grünen wie auch mit roten Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Alexa-488 und Alexa-633). Zunächst wurde überprüft, ob die Detektion der Aggregate einer zeitlichen Abhängigkeit

4 Ergebnisse

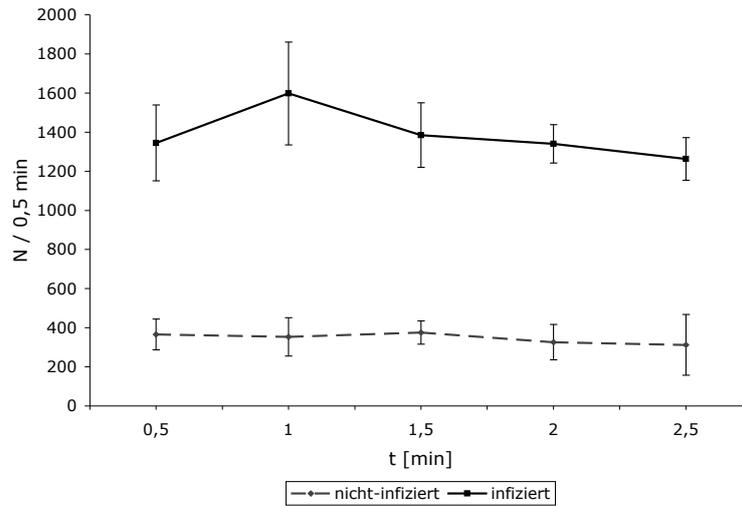


Abbildung 4.17: Zeitliche Änderung des Signals über den Messzeitraum. Alexa-488 markierter mAb SAF-37 wurde mit Prion-Rods inkubiert. Es erfolgten fünf Messungen zu je einer halben Minute. Weder in den Proben nicht-infizierter (- - -) noch in den Proben infizierter (—) Tiere ist eine signifikante Änderung des Signals über den Messzeitraum zu sehen. N ist die Anzahl der gezählten Ereignisse, wie unter Kap. 4.4 beschrieben. Ergebnisse aus drei Experimenten mit jeweils fünf Messungen.

unterlag, also ob es während einer Messung zu Verlust von Signalen kommt, z. B. aufgrund von Absinken sehr großer Prion-Rods. Alexa-488 markierter mAb SAF-37 wurde mit Prion-Rods inkubiert. Für die Messungen wurden jeweils $5 \cdot 10^{-3}$ H. Ä. Prion-Rods mit Antikörper gemischt, so dass im Endeffekt eine Fluoreszenzintensität von 30 bis 50 kHz vorlag. Die Signale zeigten jedoch keine Änderung während eines Messzeitraums von 2,5 Minuten (Abb. 4.17). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass während des Messzeitraums keine Änderung des Signals in der Lösung stattfindet. Im Folgenden wird der zeitliche Verlauf daher nicht mehr berücksichtigt.

Zum Vergleich der Qualität der verschiedenen Antikörper wurden diese an jeweils sieben Proben von infizierten und nicht-infizierten Tieren getestet. Im Verlauf der Untersuchung stellte sich heraus, dass die Signalstärke der Proben Schwankungen aufwies. Dies war begründet in unterschiedlichen Aufreinigungseffizienzen. Aufgrund der geringen Menge, die aufgereinigt wurde, konnten nicht alle Antikörper an einer Aufreinigung getestet werden. Für die Messungen wurden jeweils $5 \cdot 10^{-3}$ H. Ä. Prion-Rods mit Antikörper gemischt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier nur die vielversprechendsten Antikörper gezeigt. Für viele andere Antikörper ergab sich schon aus Vorversuchen, dass sie wenig geeignet waren. (Im Kapitel Material und Methoden können alle verfügbaren Antikörper nachgesehen werden.) Ausgewertet wurden die Daten, indem ein Schwellenwert ermittelt und alle Signale über diesem Schwellenwert summiert wurden (Kap. 4.4). Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit je zehn Messungen (Abb. 4.18).

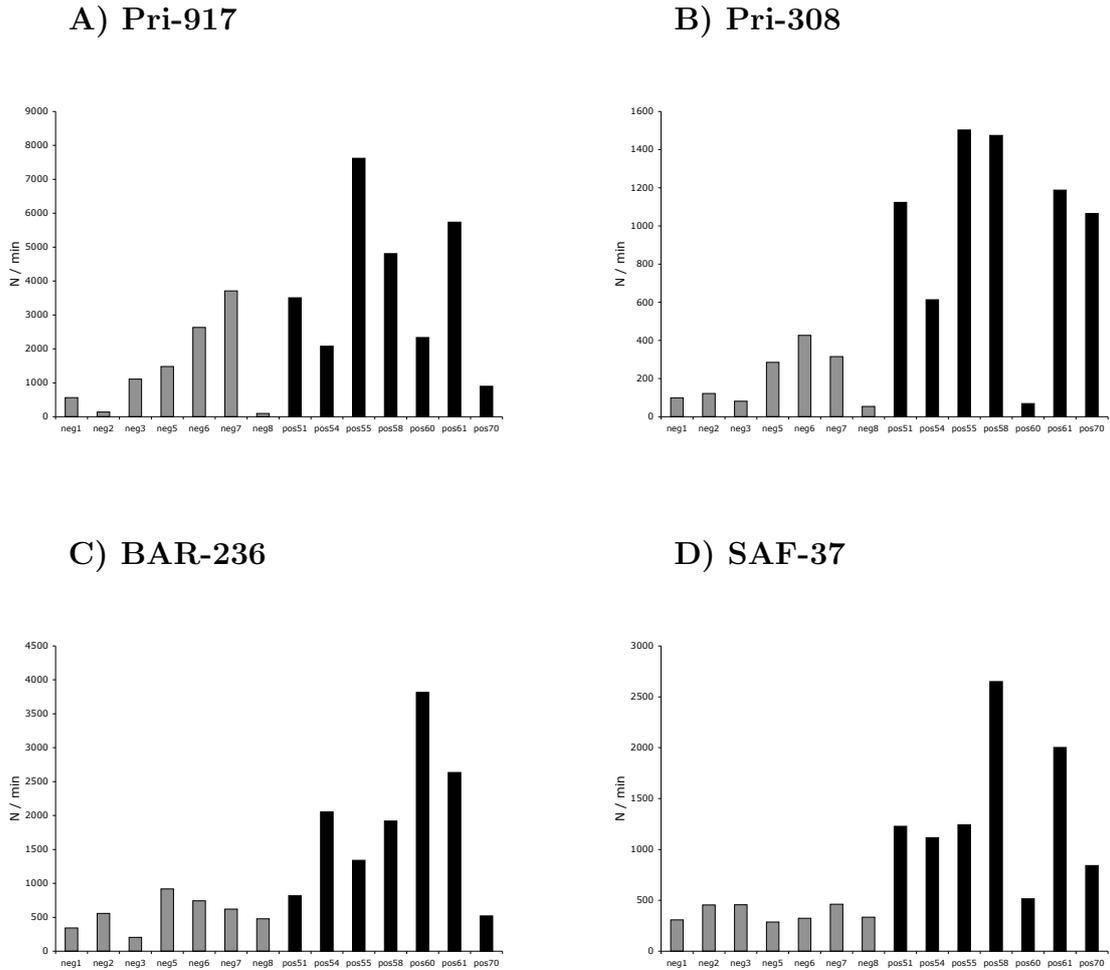


Abbildung 4.18: Vergleich der Bindung von A) Pri-917, B) Pri-308, C) BAR-236 und D) SAF-37 an verschiedene Hirngewebeproben infizierter (schwarz) und nicht-infizierter (grau) Hamster. Die Nummerierung der nicht-infizierten Tiere (negX) erfolgte willkürlich bei der Herstellung des Hirnhomogenats, die Nummerierung der infizierten Tiere (posXY) erfolgte durch M. Beekes, von dem wir die Proben erhielten. N ist die Anzahl der gezählten Ereignisse, wie unter Kap. 4.4 beschrieben.

Als Maß für die Qualität eines Antikörpers kann das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) betrachtet werden. Dieses wird aus dem Quotienten des Signals einer gemessenen Probe im Vergleich zu einer mit aufgereinigten Negative-Kontrolle gebildet. Zur Qualitätsabschätzung der Antikörper wurde aus allen ermittelten Werten der infizierten und nicht-infizierten Tiere Mittelwerte gebildet und aus diesen für die einzelnen Antikörper ein S/N-Wert gebildet (Tab. 4.1). Aus diesen Messungen ergibt sich, dass die aufgeführten Antikörper alle gleichberechtigt für das Meßsystem geeignet sind, es ergeben sich nur geringe Unterschiede. Der S/N-Wert wird hier zur Quantifizierung herangezogen. Hierbei werden „Ausrutscher,“ zwangsläufig nicht so stark gewichtet. Gerade diese stören aber bei einer späteren Diagnose, so das auch immer eine Beurteilung

| Sonde | S/N |
|---------------------|------|
| R-1 | 3,40 |
| Pri-917 | 4,27 |
| Pri-308 | 5,74 |
| BAR-236 | 3,93 |
| SAF-37 | 3,56 |
| SHa rec PrP(23-231) | 4,40 |

Tabelle 4.1: Vergleich der Qualität der verschiedenen Antikörper und SHa rec PrP(23-231) anhand des S/N-Wertes. Es zeigen sich keine großen Differenzen in den hier ausgewählten Antikörpern, dabei muss beachtet werden, dass es sich hier nur um die geeignetsten Antikörper handelt. Antikörper, die sich schon in Vorversuchen als unbrauchbar erwiesen, wurden nicht einbezogen.

nach "Augenschein,, erfolgen sollte. Hiernach erweisen sich dann die Antikörper SAF-37 und Pri-308 als die geeignetsten.

Leider gab es in allen Messungen große Probleme mit unspezifischer Bindung der Antikörper. Dieser hohe Hintergrund verhindert eine maximale Sensitivität des Systems, will man nur eine geringe Menge an Prion-Rods detektieren.

4.8 Sensitivität

Um die Sensitivität des Systems zu ermitteln wurde Hirnhomogenat infizierter Hamster in Hirnhomogenat gesunder Tiere verdünnt. Durch die Verdünnung mit Hirnhomogenat anstatt mit Puffer wurde gewährleistet, dass die Proteinkonzentration bei der Präparation von PrP 27-30 vergleichbar ist. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung von PrP 27-30. Ein Zwanzigstel der Aufreinigung wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörper gemischt und im FCS getestet (Abb. 4.19). Aufgetragen wurde das Signal der Proben, von der jeweils das Hintergrundrauschen subtrahiert wurde. Das Hintergrundrauschen wurde aus dem Mittelwert von Proben nicht-infizierter Tiere ermittelt. Somit können Schwankungen, welche aus Variationen der Justage und der Aufreinigung bzw. der Sonden-Charge resultieren, ausgeglichen werden. Die Verdünnung wurde in H. Ä. angegeben. Die gepunktete Linie ist die maximale Standardabweichung des Hintergrunds. Um eine sichere Abgrenzung von infizierten zu nicht-infizierten Proben zu gewährleisten kann man als Limit für die Sensitivität die doppelte Standardabweichung des Hintergrunds definieren (gestrichelte Linie). Somit liegt die Sensitivität dieses Systems, bezieht man die Standardabweichung der Proben mit ein, bei $1 * 10^{-8}$ H. Ä. Diese enthalten ungefähr 0,1 pg PrP^{Sc} (Prusiner, 1983). Dies sollte sich aber durch die Verwendung von zwei Antikörpern in einer 2D-FIDA-Analyse noch verbessern lassen.

Es stellt sich die Frage, warum sich die Sensitivitätswerte keiner lineare Abhängigkeit folgen, was bei einer einfachen Verdünnung zu erwarten wäre. Hier können mehrere Ursachen diskutiert werden. Zum einem könnte man annehmen, dass die Aufreinigung bei hohen Konzentrationen von PrP^{Sc} an ihre Grenzen stößte und die Effizienz abnimmt, bei niedrigen Konzentrationen an PrP^{Sc} die Effizienz gesteigert wird. In der Diskussion wird jedoch auch die Möglichkeit einer Amplifikation von PrP^{Sc} durch die Zugabe von PrP^C aus nicht-infektiösen Gewebe eingehend diskutiert. Evtl. ist auch eine Kombination der Effekte verantwortlich.

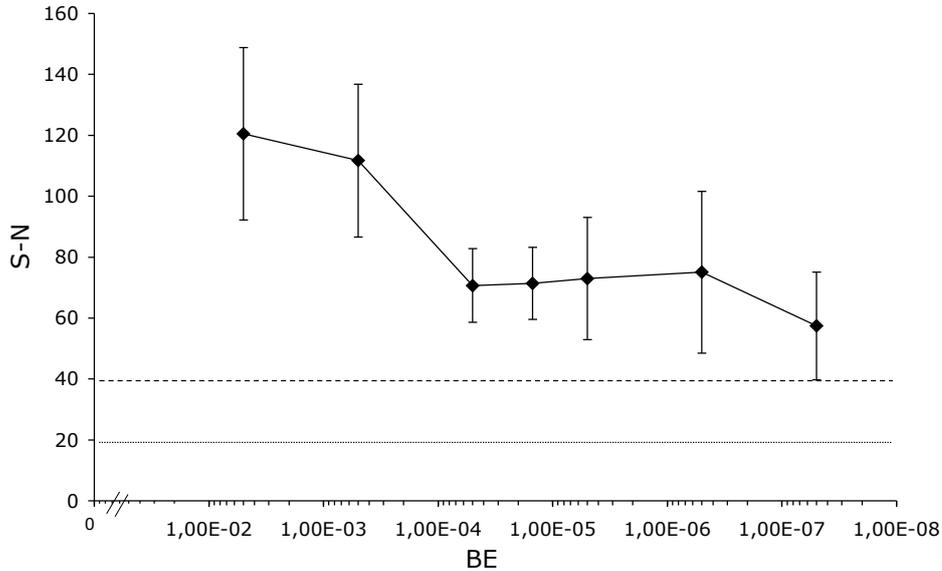


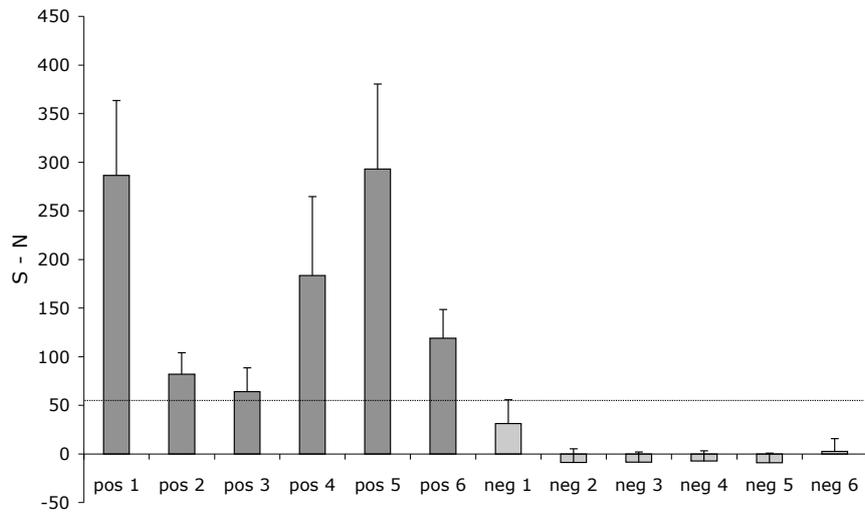
Abbildung 4.19: Sensitivitätsmessungen: Hirnhomogenat infizierter Hamster wurde in Hirnhomogenat gesunder Tiere verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung von PrP 27-30. Aufgetragen sind die S N-Werte gegenüber den in der entsprechenden Messung eingesetzten Hirnäquivalenten. Der S N-Wert wurde immer durch Subtraktion des Mittelwerts von Proben gesunder Tiere von denen infizierter Tiere ermittelt. Die maximal ermittelte Standardabweichung bei Proben gesunder Tiere wurde als gestrichelte Linie eingezeichnet, die Grenze zur Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren als gestrichelte Linie. Die Sensitivität liegt also bei $1 * 10^{-8}$ H. Ä. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 Messungen.

4.9 Analyse von verschlüsselten BSE-Proben

Um das bisher beschriebene System weiter zu testen, wurde eine Studie mit verblindeten Proben durchgeführt. Jeweils sechs Proben von infizierten und nicht-infizierten Tieren wurden verblindet aufgereinigt und getestet. Im Test wurde Alexa-633 markierter mAb Pri-308 und Alexa-488 markierter mAb R-1 (Abb. 4.20) als Antikörper verwendet. Für die Messungen wurden jeweils $5 * 10^{-3}$ H. Ä. Prion-Rods mit Antikörper gemischt. Zur besseren Darstellung wurden die Proben in den kommenden Abbildungen nach infizierten und nicht-infizierten Tieren sortiert und jeweils durchnummeriert. Die Daten stammen jeweils aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Messungen pro Tier. Auch hier wurde wieder der Mittelwert des Hintergrundsignal vom Signal subtrahiert. das Hintergrundsignal wurde anhand einer Negativkontrolle bestimmt. Als Hilfslinie wurde die maximale Standardabweichung als gestrichelte Linie eingezeichnet.

4 Ergebnisse

A



B

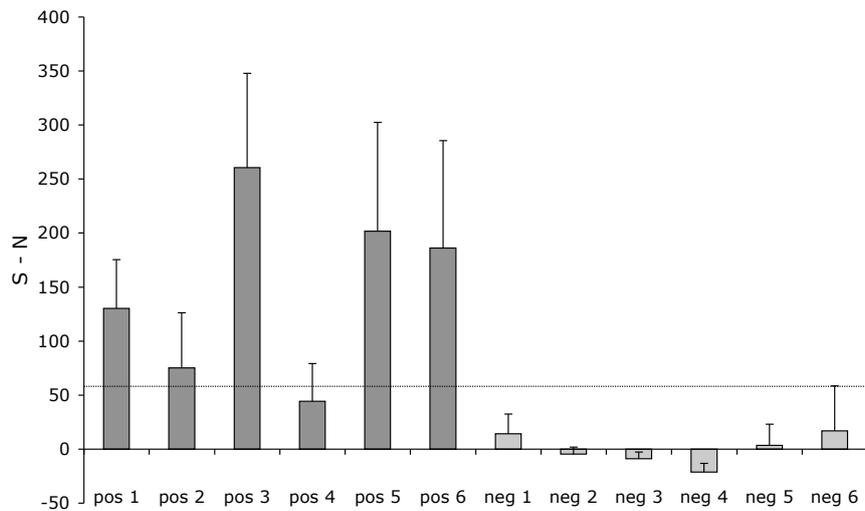


Abbildung 4.20: Verblindete Proben (1 bis 10) mit (A) Alexa-633 markierten mAb Pri-308 bzw. mit (B) Alexa-488 markierten mAb R-1 untersucht. In grau sind die Proben der nicht-infizierten Tiere dargestellt und in schwarz die der infizierten Tiere. Hier wurde der Mittelwert des Hintergrundsignal vom Signal subtrahiert (S N). Als Hilfslinie wurde die maximale Standardabweichung der negativ eingestuften Proben als gestrichelte Linie eingezeichnet. Bei beiden Antikörpern fällt auf, dass die Differenz der Signale zwischen Proben infizierter und nicht-infizierter Tiere nicht optimal ist. Es kommt, betrachtet man die Standardabweichungen, zur Überlappung zwischen beiden Gruppen. Ergebnisse aus jeweils zwei Experimenten a 10 Messungen.

4.9.1 Messungen mit 1D-FIDA

Bei beiden Antikörpern fällt auf, dass mittels des Tests ein Trend zur Differenzierung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren deutlich sichtbar ist. Leider kommt es zur Überlappung zwischen beiden Gruppen, wenn man die Standardabweichungen betrachtet (Abb. 4.20). So fällt Probe „neg 1“ beim Antikörper Pri-308 durch einen sehr hohen Wert auf, beim Antikörper R-1 die Proben „neg 1 und neg 6“. Bei beiden Antikörpern traten zudem bei den Werten der infizierten Tiere große Standardabweichungen auf. Da dies noch keine optimalen Ergebnisse darstellt, wurde im Folgenden versucht die Spezifität des Nachweises durch die gleichzeitige Verwendung zweier Antikörper zu steigern.

4.9.2 Messungen mit 2D-FIDA

Mit dem Zwei-Strahl-FCS der Fa. Evotec ist es möglich Zweifarbenanalysen (2D-Analyse) durchzuführen. Hier können zwei verschieden markierte Antikörper eingesetzt werden. Es werden nur Signale gewertet, die von beiden Antikörpern stammen, d. h. wenn beide Antikörper das gleiche Molekül erkannt haben. Aggregationsprozesse, an denen nicht beide Sonden gleichzeitig beteiligt sind, werden abgetrennt. Dies führt somit zu einer gesteigerten Spezifität. Dieses Verfahren wurde auch bei der Blindstudie angewandt. Die Auswertung der Daten erfolgte ähnlich wie bei den Messungen mit nur einem Antikörper (Kap. 4.4). Für die einzelnen Antikörper wurde ein Schwellenwert bestimmt und alle Datenpunkte, die über diesen Schwellenwerten liegen, summiert. Dies ist in Abb. 4.21 schematisch dargestellt. Die relative Fluoreszenzintensität eines Antikörpers wird jeweils auf der Abzisse bzw. Ordinate aufgetragen. Die Anzahl der gemessenen Ereignissen ist in der Z-Achse in Graustufen kodiert. Es handelt sich, wie schon zuvor bei der 1D-Analyse, um ein Histogramm der Fluoreszenzintensitäten. Die Bindung eines einzelnen Antikörpers an ein Aggregat, z. B. bei einer unspezifischen Bindung, oder auch die Aggregation eines einzelnen Antikörpers wird als Signal entlang einer der Achsen sichtbar. Binden beide Antikörper gleichzeitig an ein Aggregat, so bei der spezifischen Bindung an Prion-Rods, verdichten sich die Signale auf der Diagonalen, wie in Abb. 4.21 rechts zu sehen.

Die verschlüsselten Proben wurden der 2D-Analyse unterzogen. Von jeder Probe wird exemplarisch eine Originalmessung in einer 3D-Darstellung gezeigt (Abb. 4.23). Hier kann bei genauer Betrachtung trotz sehr starker Hintergrundsignale in Proben nicht-infizierter Tiere eine Differenzierung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren vorgenommen werden. Signale im Bereich hoher Fluoreszenzintensitäten treten bei nicht-infizierten Tieren nicht so häufig auf wie bei infizierten Tieren.

Bei der Auswertung der 2D-Daten (Abb. 4.24) wurden selbst die zuvor problematischen Proben „neg 1 und neg 6“ jetzt eindeutig als negativ bewertet. Alle Proben werden richtig zugeordnet. Somit weist der Test bei Tieren im terminalen Krankheitsstadium in dieser Studie eine Spezifität und Sensitivität von 100 % auf. Eine Kontrolle der Aufreinigung fand jeweils im Anschluß mittels Dot-Blot statt (Abb. 4.22).

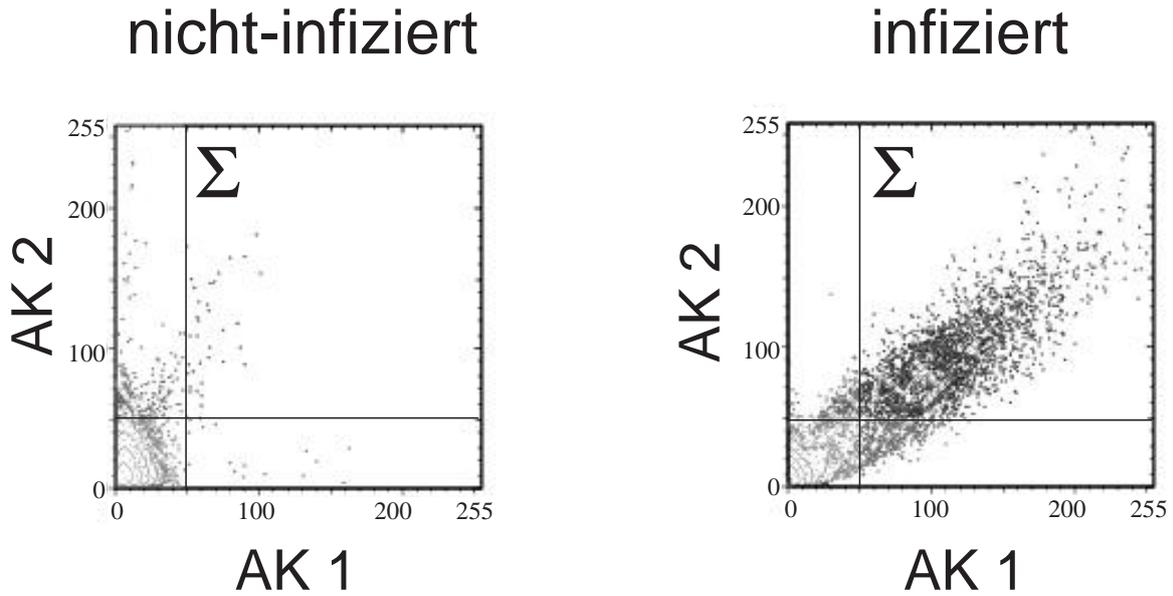


Abbildung 4.21: Prinzip der Auswertung einer 2D-Messung. Die Daten sind so dargestellt, dass die relative Fluoreszenzintensität jeweils eines Antikörpers auf der Abzisse bzw. Ordinate aufgetragen ist. Die Anzahl der gemessenen Ereignissen ist in der Z-Achse in Graustufen kodiert. Binden beide Antikörper an ein Molekül, diffundieren sie korreliert durch das Messvolumen des FCS. Die gleichzeitige Bindung wird in einer Diagonalen ersichtlich. (Hier rechts bei einer Probe eines infizierten Tieres zu sehen.) Bindet jeweils nur ein Antikörper oder zeigt dieser Selbst-Aggregation, dann wird dies in einer Geraden entlang einer der Achsen sichtbar. Dies kann hier z. B. links, bei der Probe eines nicht-infizierten Tieres beobachtet werden. Für die Auswertung wurde nun das „Rauschen“ der beiden Antikörper durch einen Filter „abgeschnitten“, hier angedeutet durch die Geraden (siehe auch Kap.4.4). Alle Signale oberhalb dieser Grenzen wurden summiert.

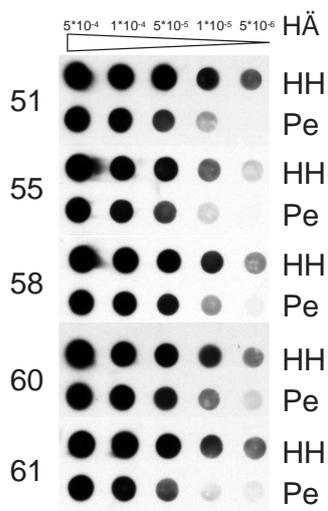
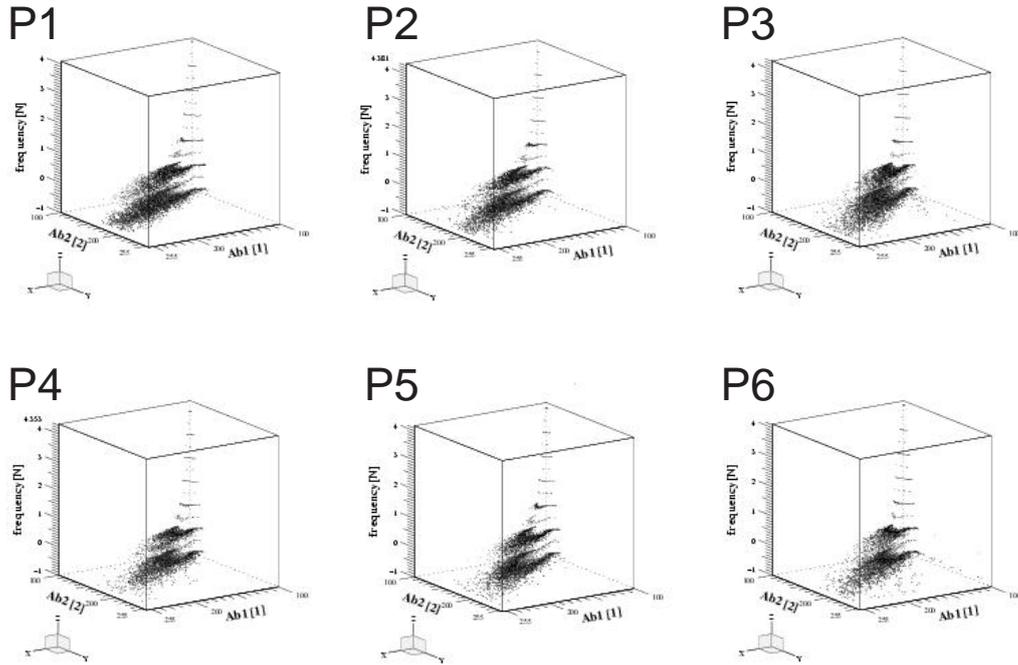


Abbildung 4.22: Kontrolle der Aufreinigung, welche in der verblindeten Studie für die 2D Messungen eingesetzt wurden. Nummerierung stammt von M. Beekes, wie schon zuvor in Abb. 4.18. Hier sind nur exemplarisch fünf Proben gezeigt, die zeigen, dass die Aufreinigung gut funktioniert hat. HÄ = Hirnäquivalent, HH = Hirnhomogenat, Pe = Pellet, entspricht dem Isolat, Erstantikörper: 3F4, Nachweis mit ECL

4 Ergebnisse

infiziert



nicht-infiziert

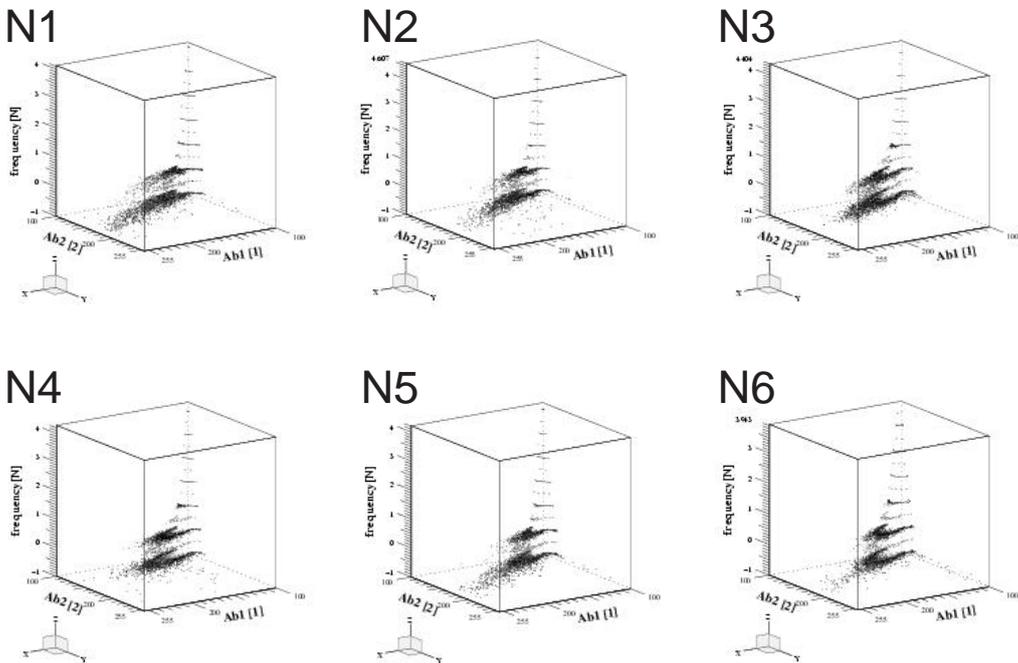


Abbildung 4.23: 3D-Darstellung jeweils einer exemplarischen Messung der verblindeten Proben. Auf der Abzisse sind die Signale des Alexa-488 markierte mAb Pri-308 aufgetragen und auf der Ordinate die des Alexa-633 markierte mAb R-1. In der Z-Achse ist die Häufigkeit der Fluoreszenzintensitäten kodiert.

4 Ergebnisse

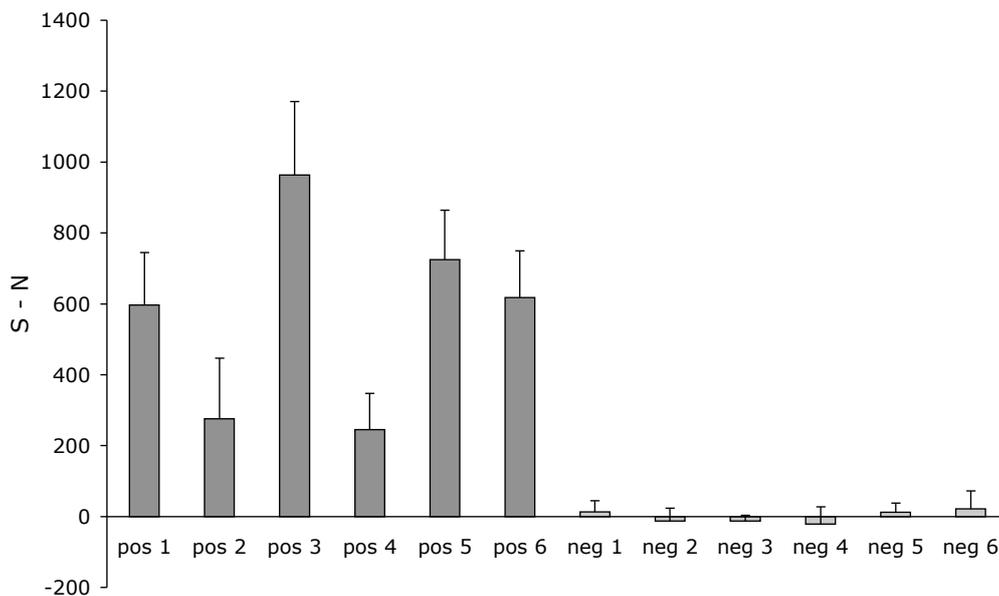


Abbildung 4.24: Verblindete Proben sowohl mit Alexa-488 markierten mAb R-1 als auch Alexa-633 markierten mAb Pri-308 untersucht. Die Schwankungen der Standardabweichungen sind geringer als bei den Messungen mit nur einem Antikörper. Alle Proben von nicht-infizierten Tieren liegen hier, ohne starke Abweichungen, im selben Bereich. In grau sind die Proben der nicht-infizierten Tiere dargestellt und in schwarz die der infizierten Tiere. Hier wurde wieder der Mittelwert des Hintergrundsignal vom Signal subtrahiert (S N). Ergebnisse aus jeweils zwei Experimenten a 10 Messungen.

4.10 Reduzierung des Hintergrunds

Eine gesteigerte Spezifität wurde durch die Einführung der Zweifarbenanalyse erreicht. Es ist zu hoffen, dass durch geeignetere Antikörper weiter optimiert werden kann. Für viele Anwendungen sollte die Sensitivität sollte noch weiter optimiert werden, denn bisherige Test verliefen an Tieren im terminalen Stadium der Krankheit mit einer hohen Konzentration an PrP^{Sc} im Gehirn. Letztendlich wäre es aber wünschenswert Tiere schon im präklinischen Stadium der Krankheit zu diagnostizieren. Zu diesem Zeitpunkt sind nur sehr geringe Mengen an PrP^{Sc} im Gehirn vorhanden.

Wie schon erwähnt weisen die Proben nicht-infizierter Tiere einen erheblichen Hintergrund auf. Vor diesem Hintergrund können Sensitivitätstest nur suboptimal verlaufen, da geringe Konzentrationen an Prion-Rods im Hintergrund verschwinden würden. Deshalb wurden verschiedenste Ansätze getestet um das unspezifische Hintergrundsignal zu reduzieren.

Als ineffizient erwiesen sich Experimente mit verschiedenen Detergenzien um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu vermeiden. Getestet wurden Tween-20, SDS und Sarkosyl in verschiedenen Konzentrationen. Weitere Experimente mit verschiedenen „Blocking“-Reagenzien, wie Milchpulver, BSA oder SuperBlock™ Blocking-Puffer (Pierce, Rockford, USA) erwiesen sich ebenso als ineffizient (Daten nicht gezeigt).

Andere Versuche zielten darauf ab, die Bestandteile zu beseitigen, an denen die Antikörper unspezifisch binden könnten, wobei Lipasen oder weitere Proteinase K Proteolysen eingesetzt wurden. Ebenso wie diese Enzyme, zeigten auch mechanische Hilfsmittel, wie zusätzliche Ultraschallung, keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Reduziert werden konnte der Hintergrund dagegen mittels eines weiteren Zentrifugationsschrittes. Proben eines infizierten und eines nicht-infizierten Tieres wurden 0, 0,5, 1, 2 und 4 Minuten lang bei 5.000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt und die jeweiligen Proben des infizierten Tieres auf einem Dot-Blot aufgetragen (Abb. 4.25 C). Prion-Rods verbleiben auch nach 4 Minuten Zentrifugation zum größten Teil im Überstand.

Überstände der gleichen Proben wurden in einer 2D-Analyse im FCS getestet. Abb. 4.26 zeigt exemplarisch 2D-Daten und Abb. 4.25 A und B die dazugehörige Auswertung. Das S/N-Verhältnis wurde jeweils aus der entsprechenden positiven und negativen Probe eines Zentrifugationsschrittes ermittelt. Die Reduzierung des unspezifischen Hintergrunds und das damit verbundene gesteigerte S/N-Verhältnis ist deutlich zu erkennen. Sehr schön ist die Zunahme der Differenz zwischen Proben infizierter und nicht-infizierter Tiere diesmal auch in den Originaldaten zu sehen (Abb. 4.26). Bedurfte dies zuvor noch einer genaueren Betrachtung (Abb. 4.23) so ist es nun auf dem ersten Blick ersichtlich. Die Daten in Abb. 4.25 A und B stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Messungen pro Zeitpunkt.

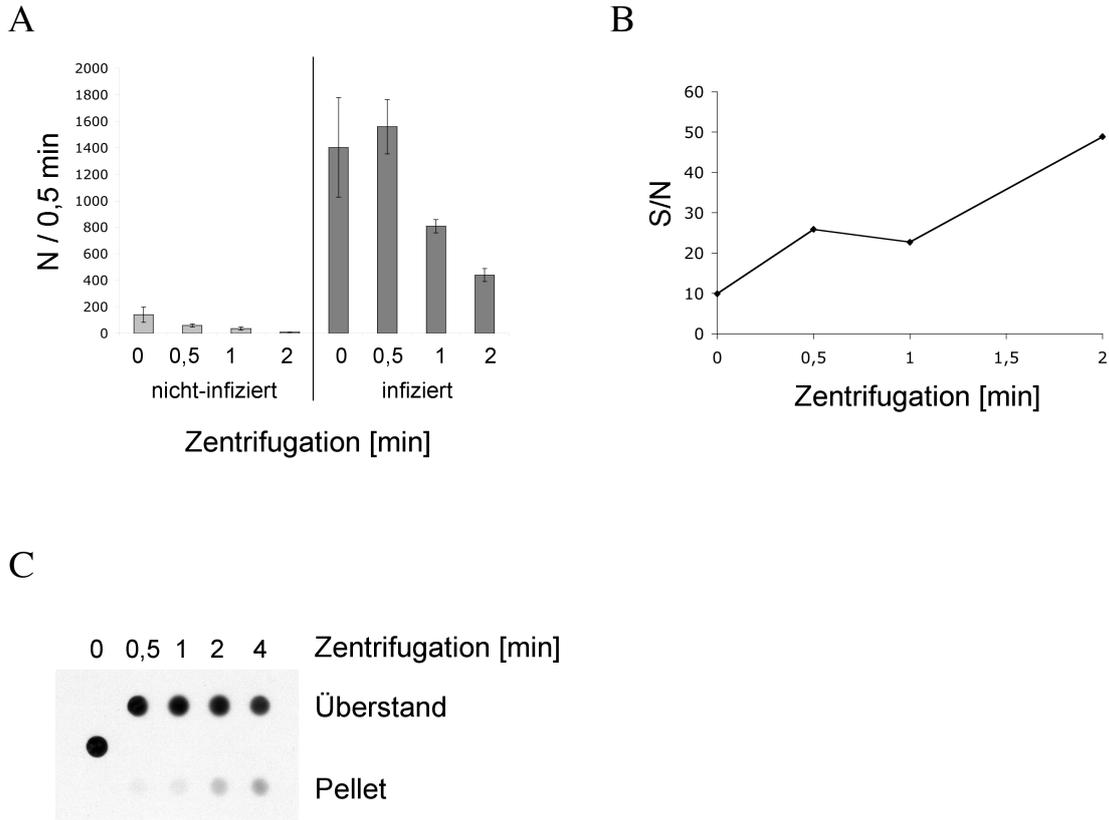


Abbildung 4.25: Optimierung des S/N-Verhältnisses durch Zentrifugation. Proben wurden bei 5.000 *g* für 0, 0,5, 1 und 2 Minuten zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt. **(A)** Der Überstand wurde mit Alexa-488 markierten mAb SAF und Alexa-633 markierten mAb Pri-308 versetzt und im FCS vermessen. Sowohl in Proben nicht-infizierter als auch infizierter Tiere sank das Signal, allerdings blieb das Signal unter den gegebenen Bedingungen bei den Proben infizierter Tiere erhalten, während es bei den Proben nicht-infizierter Tiere auf ein Minimum reduziert wurde. **(B)** Dies führte letztendlich zum Anstieg im S/N-Verhältnis, welches hier als Messwert zur Reduktion des Hintergrunds dient. N entspricht der Anzahl der Ereignisse wie in Abb. 4.21 beschrieben. **(C)** Der Dot-Blot zeigt deutlich, dass PrP 27-30 während der Zentrifugation im Überstand verbleibt. Erst bei längerer Zentrifugation geht auch PrP 27-30 ins Pellet.

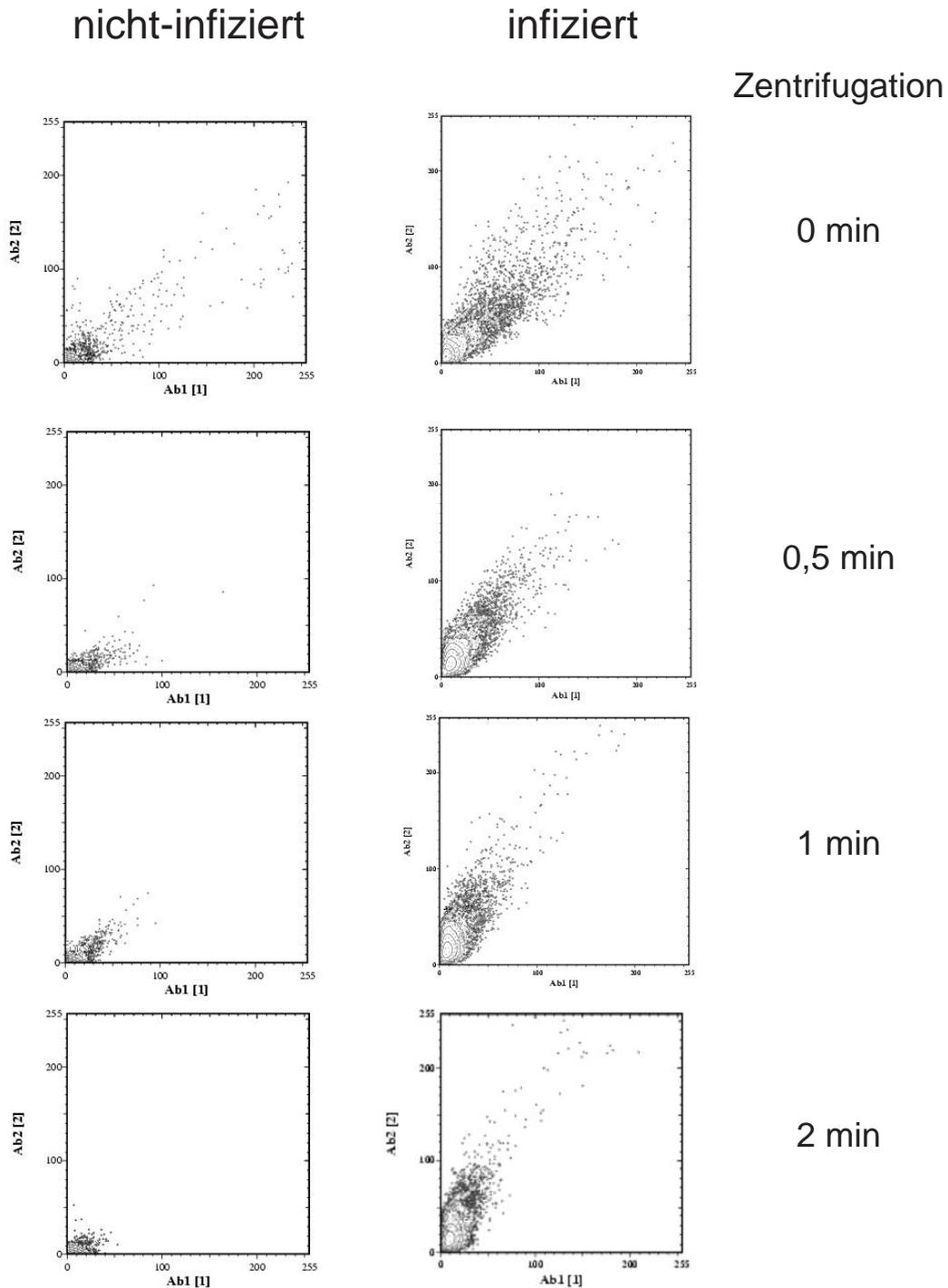


Abbildung 4.26: 2D-Daten von Proben infizierten und nicht-infizierten Tieren nach Zentrifugation. Proben wurden bei 5.000 g für 0, 0,5, 1 und 2 Minuten zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt und der Überstand mit Alexa-488 markiertem mAb SAF-37 und Alexa-633 markiertem mAb Pri-308 mittels FCS vermessen. Das unspezifische Signal verringert sich durch die Zentrifugation, während das spezifische Signal weitestgehend erhalten bleibt. Auf der Abzisse ist der Alexa-488 markierte mAb SAF-37 aufgetragen und auf der Ordinate der Alexa-633 markierte mAb R-1 Pri-308. Die Z-Achse, d. h. die Häufigkeit der Fluoreszenzintensitäten, ist in Graustufen kodiert.

4.11 Ergebnisse mit PrP^{BSE}

Um zu zeigen, dass das System auch auf PrP^{BSE} übertragbar ist wurde eine Aufreinigung von PrP^{BSE} durchgeführt und das Ergebnis analysiert. Der Nachweis von PrP^{BSE} ist schwieriger als der von PrP^{Sc}. Dies liegt zum einem daran, dass die Konzentration an PrP^{BSE} in Hirn von betroffenen Rindern geringer ist als die von PrP^{Sc} bei Hamster. Zum anderen weist PrP^{BSE} eine erhöhte Proteinase K Sensitivität auf, so dass eine Aufreinigung mit Proteinase K zum Verlust von Signal führt. Daher wurde PrP^{BSE} aus einer Aufreinigung ohne Proteolyse mit Proteinase K verwendet. PrP^{BSE} wurde uns als lyophilisiertes Pellet zur Verfügung gestellt, welche mittels Ultraschall in 600 μ l TBS resuspendiert wurden. Danach erfolgte ein Zentrifugation für eine Minute bei 5.000 g und der Überstand wurde abgenommen. Für den Nachweis im FCS mittels des mAb 12F10 wurden 10 μ l verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.27 dargestellt. Es ist ein Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Rindern zu erkennen. Die Ergebnisse sehen sehr vielversprechend aus, doch bedarf es noch Optimierungsbedarf. (Die Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Eva Birkmann.) Vor allem die 2D-Analyse verspricht gute Erfolge, doch fehlen bisher noch geeignete Antikörper.

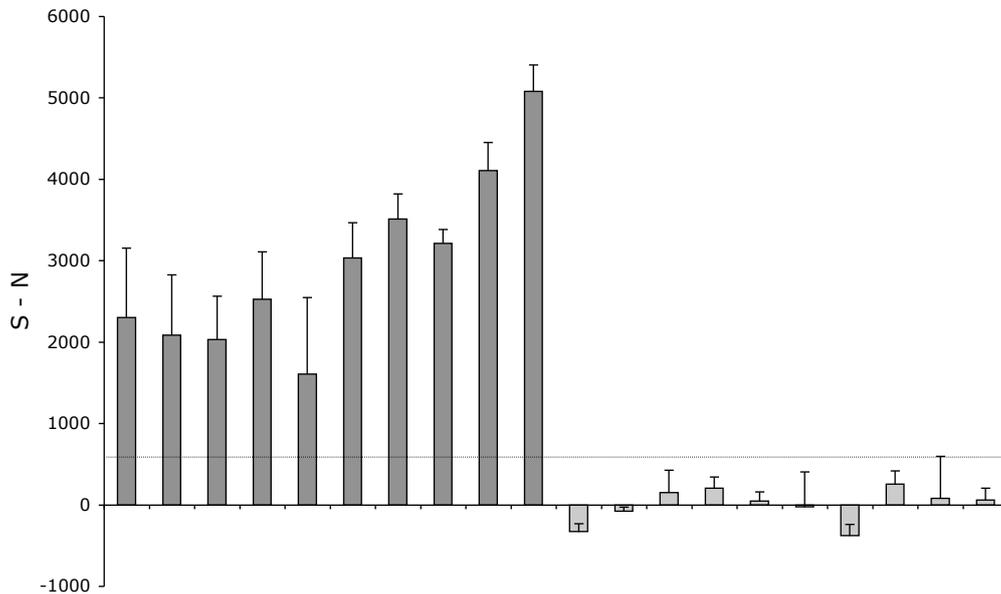


Abbildung 4.27: Nachweis von PrP^{BSE} mittels Alexa633 markiertem mAb 12F10. Proben von gesunden Tieren in hellgrau und Proben infizierter Tiere in dunkelgrau. Aufgetragen wurde wieder das Signal welches um das Hintergrundsignal korrigiert wurde (S-N). Die Ergebnisse stammen aus 2 Experimenten mit je zehn Messungen pro Probe.

5 Diskussion

Die Notwendigkeit eines diagnostischen Nachweises für Prionkrankheiten ist unbestritten. Eine aktive Überwachung der Prionkrankheiten im Tier kann im Sinne des Verbraucherschutzes nur durch ein Screening bzw. ständiger Überwachung aller Tierbestände gewährleistet werden. Zwar manifestieren sich Prionkrankheiten in einem breiten Spektrum an Symptomen und klinischen Befunden, aber bisher ist eine gesicherte Diagnose ohne Hirnbiopsie nicht möglich, und das auch nur dann, wenn die Tiere nicht im kritischen Frühstadium der Erkrankung sind.

Bis heute ist weder die Replikation des Erregers der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien noch die Pathogenese der Erkrankung geklärt. Als sicher gilt, dass das Prion-Protein, wenn nicht alleiniger, so doch Hauptbestandteil des infektiösen Agens ist. Das wichtigste Ereignis während der Replikation des Erregers ist der strukturelle Übergang von der zellulären, hauptsächlich α -helikalen Isoform PrP^C in die pathologische PrP^{Sc}-Form, die einen hohen β -Faltblatt-Strukturanteil aufweist und während des Krankheitsverlaufs zu Ablagerungen akkumuliert. Diese pathologische Ablagerung ist zur Zeit der einzige eindeutige, biochemische diagnostische Marker, der bei allen Erkrankten gefunden werden kann und der von allen auf dem Markt erhältlichen BSE-Tests zur Diagnose verwendet wird. Die bisher erhältlichen Testverfahren diagnostizieren die Krankheit erst mit Einsetzen des klinischen Bildes oder im günstigsten Falle einige Monate vorher (der genaue Zeitrahmen ist bisher nicht bekannt). Wünschenswert wären aber Testverfahren, die schon sehr viel früher die Krankheit diagnostizieren können. Vom diagnostischen Standpunkt aus ist daher ein möglichst empfindlicher Nachweis der pathologischen Aggregate sinnvoll. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bietet als Verfahren zur Detektion und Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung die geeignete Voraussetzung zum sensitiven Nachweis dieser Ablagerungen und damit einen direkten sensitiven Nachweis des Erregers.

Ziel dieser Arbeit war es, das Prinzip des Nachweisverfahrens von Amyloiden der Alzheimerischen Erkrankung mittels FCS (Pitschke *et al.*, 1998) auf die Prionerkrankungen von Tieren zu übertragen. Dabei sollte der Erreger direkt nachgewiesen werden und keine Epiphänomene der Krankheit. Obwohl PrP^{Sc} hauptsächlich im Hirngewebe und bestimmten lymphoretikulären Geweben, aber auch je nach Spezies in geringeren Mengen in anderen Geweben und Körperflüssigkeiten, akkumuliert, wurde in den hier durchgeführten ersten Experimenten der Nachweis von PrP^{Sc} in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) getestet. Da diese Studien keine vielversprechenden Ergebnisse lieferten, wurde in weiteren Studien zur Etablierung des Testsystems Hirnhomogenat des Syrischen Goldhamsters als Probenmaterial benutzt. Hirngewebe wurde deshalb verwendet, da im Hirn von infizierten Tieren die höchsten infektiösen Titer zu finden sind und somit höchste

Signalintensitäten liefern sollten.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass Hirnhomogenat vor einer Verwendung im Test erst prozessiert werden muss. Ein geeignetes quantitatives Aufreinigungsverfahren für Prion-Rods wurde etabliert und an die Methode adaptiert. Desweiteren wurde der Messaufbau für die Erfordernisse der diagnostischen Anwendung weiterentwickelt. Zu diesem Zweck wurden eine Scanvorrichtung und ein Verfahren zur quantitativen Auswertung der Fluoreszenzintensität einzelner Partikel entwickelt. Die technische Erweiterung des Messaufbaus führte zu einer entscheidenden Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und wurde im Laufe der Arbeit auch von der Industrie in ihre Angebotspalette aufgenommen (Mittlerweile bieten sowohl die Firma Zeiss als auch die Firma Evotec FCS mit entsprechender Vorrichtung an). PrP 27-30 konnte mit diesem System in einer Verdünnung von bis zu 10^{-8} H. Ä. nachgewiesen werden. Dies entspricht ungefähr 0,1 pg PrP^{Sc}. Die Spezifität konnte dagegen entscheidend durch die Etablierung eines zweidimensionalen Messaufbaus, d. h. eines gleichzeitigen Nachweises der Aggregate mit zwei unterschiedlichen Sonden, gesteigert werden. Wurden zuvor in einer kleinen Stichprobe 13 von 14 Proben richtig zugeordnet, wurden mit der 2D-Analyse alle Proben richtig erkannt.

Die für das System notwendigen fluoreszenten Sonden wurden hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität ausgesucht. Damit gelang es, in einer verblindeten Studie mit 100 % Spezifität erkrankte Tiere von gesunden zu unterscheiden (allerdings handelte es sich hier um eine kleine Stichprobe mit 12 Proben). Durch eine optimierte Vorbehandlung der Proben vor dem Test konnte die Sensitivität des Systems noch erheblich gesteigert werden. Letztendlich konnte das Testsystem auch auf PrP^{BSE} erfolgreich übertragen werden, so dass infizierte Rinder von nicht-infizierten Rindern unterschieden werden können. Dabei konnte auch auf eine Proteinase K-Proteolyse bei der Aufreinigung verzichtet werden. Somit konnte im Gegensatz zu PrP 27-30 PrP^{BSE} detektiert werden und ein Verlust an Proteinase K sensitivem PrP^{BSE} ausgeschlossen werden.

5.1 Optimierung der Messmethode

Verbesserung der Probenaufbereitung

Ziel der Arbeit war der Nachweis der Prion-Erreger, die mit Sicherheit im Gehirn vorkommen. Daher bot sich als Untersuchungsmedium Cerebrospinalflüssigkeit an. Dieses bietet gleich mehrere Vorteile. So handelt es sich um ein Ultrafiltrat, sozusagen um ein „sauberes“ Medium. Es enthält kaum Zellen oder Proteine die selbst fluoreszieren und eignet sich damit gut für fluoreszenzspektroskopische Methoden. Die Cerebrospinalflüssigkeit umspült das ZNS, d. h. sie steht in direktem Kontakt mit dem erregerhaltigen Gewebe und ist nicht, wie z. B. Blut, durch die Blut-Hirnschranke vom Hirn getrennt. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass Erreger aus dem Hirngewebe in die CSF übertreten, z. B. durch den Niedergang betroffener Zellen. Dies konnte schon von [Pitschke \(1999\)](#) für eine amyloide Erkrankung, der Alzheimerschen Erkrankung, gezeigt werden. Bei einer Studie an CJD-Patienten sah das Ergebnis weniger eindeutig aus. Nur in 21 % aller Fälle

wurde PrP^{CJD} in der CSF gefunden (Bieschke *et al.*, 2000), obwohl auch hier mit der FCS gearbeitet wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass im Fall der CJD nicht bei jedem Erkrankten PrP^{CJD} in die CSF übertritt. Ob dies auch für andere Prionkrankheiten gilt, bleibt abzuwarten, denn die Verteilung des Erregers im Körper unterscheidet sich bei den verschiedenen Prionkrankheiten (Kap. 1.6). Die Studie zeigte aber, dass es prinzipiell zum Übertritt von PrP^{CJD} in die CSF kommen kann. Die Studie zeigt zudem die hohe Sensitivität der FCS-Methode, da die mittels FCS ermittelte Menge an PrP^{CJD} unterhalb der Detektionsgrenze eines Westernblots lag.

Bei Tieren kann die CSF als Untersuchungsmedium nicht alle ihre Vorteile nutzen. Während die Entnahme von CSF bei Menschen eine Routinemethode ist, gestaltet sich diese bei Tieren jedoch recht schwierig. Man gewinnt meistens verunreinigten Liquor, wie wir ihn z. T. auch bei unseren Proben erhalten haben. Die häufigsten Verunreinigungen erfolgten durch Blut und Gewebefetzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Liquor von Tieren nicht unbehandelt verwendet werden kann (Kap. 4.2). Für die Nutzung müsste dieser zuvor prozessiert werden. So könnte PrP^{BSE} bzw. PrP^{Sc} aus dem Liquor isoliert und aufkonzentriert werden. Vielversprechende Ansätze, die verfolgt werden können, ergeben sich aus dieser Arbeit durch eine Aufreinigung mittels Proteinase K oder aber durch eine spezifische Fällung des Erregers mittels Wolframat (Safar *et al.*, 1998). Diese Ansätze wurden jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die Etablierung des Prion-Nachweis mittels FCS sollte zunächst mit Untersuchungsmedien durchgeführt werden, bei denen der Erreger auf jeden Fall und in hoher Konzentration vorkommt. Ein geeigneteres Untersuchungsmedium zur Etablierung eines Testsystems schien Hirngewebe zu sein. Für Hirngewebe gibt es gesicherte Erkenntnisse, dass PrP^{Sc} in jedem infizierten Tier zu finden ist. Zudem liegen im Hirn die höchsten Infektiositätstitere im gesamten Körper terminal erkrankter Tiere vor. Während des Krankheitsverlaufs ist der Erreger im Hirn als erstes in der *Medulla oblongata* nachweisbar (Kap. 1.6). Daher sollte für die Isolation des Erregers Hirnhomogenat dieser Region eingesetzt werden. Auch andere Tests benutzen die *Medulla oblongata* zum Nachweis (so Biorad und Prionics). Ein weiterer Vorteil der *Medulla oblongata* ist, dass sie bei Tieren, im Gegensatz zum Liquor, nach der Schlachtung leicht zu entnehmen ist. Bei Hamstern wurde allerdings, aufgrund der geringen Größe des Gehirns und den damit verbundenen Schwierigkeiten die *Medulla oblongata* zu entnehmen, das gesamte Hirn verwendet.

Es wurde gezeigt, dass es nicht ausreicht Hirngewebe zu homogenisieren und ohne weitere Behandlung einzusetzen (Kap. 4.3). Auch hier musste erst eine vorangehende Aufreinigung und Aufkonzentrierung erfolgen. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erlangen, sollte bei der Aufreinigung die Ausbeute an PrP^{Sc} und dessen Aufkonzentrierung maximal sein. Die Methode von Beekes *et al.* (1996) erfüllt diese Anforderungen und wurde daher übernommen und dem Testsystem angepasst (Kap. 4.3.1).

Verbesserung der Messmethode

Ein Schritt in der Optimierung der Messmethode ist die Wahl geeigneter Sonden zu Detektion. Um die pathologischen Aggregate fluorezenzspektroskopisch nachweisen zu können, müssen sie spezifisch durch fluoreszierende Sonden markiert werden. Dies lässt sich entweder durch die Inkorporation fluoreszenzmarkierter monomerer Prionproteine in Prionaggregate nach dem Mechanismus der keiminduzierten Aggregation oder durch die Bindung spezifischer Antikörper realisieren. Beide Strategien haben ihre konzeptionellen Vor- und Nachteile.

Die Markierung durch monomeres Prionprotein nutzt die unterschiedlichen Aggregationskinetiken von monomerem PrP in Anwesenheit von Aggregaten bzw. in deren Abwesenheit. Die Anlagerung von monomerem PrP an Aggregate erfolgt schneller als die *de novo* Bildung großer Aggregate aus diesen Monomeren (Pitschke *et al.*, 1998; Schäfer, 1997). Prinzipiell lassen sich mit dieser Strategie auch sehr kleine Aggregate nachweisen, da durch die Anlagerung von Monomeren ein Aggregatwachstum induziert wird. Potentiell wird so eine hohe Sensitivität der Detektion erreicht. In der Praxis ist jedoch die Sensitivität mit monomerem Prionprotein als Sonde durch die Kontamination der Sonde mit Aggregaten aufgrund deren intrinsischer Selbstaggregation stark eingeschränkt. Zudem besteht ein konzeptioneller Nachteil darin, dass die Sonde eine geringe Spezifität aufweist, da sich monomeres PrP an alle amyloiden Strukturen anlagert. Hier kann mit Detergenzien eine erhöhte Spezifität erreicht werden. So kann durch geeignete Lösungsmittelbedingungen z. T. zwischen den amyloiden Strukturen differenziert werden, dieses geschieht aber auf Kosten der Sensitivität (Pitschke, 1999). Sind die Grundlagen der Replikation des Prionproteins einmal verstanden, so wird auch eine spezifische Anlagerung von unspezifischen Wechselwirkungen differenziert werden können und die Beschränkungen des monomeren PrP als Sonde aufgehoben sein.

Die Ansprüche an eine Sonde sind hohe Spezifität und Affinität. Beide Bedingungen werden von Antikörpern erfüllt. So konnten sogar bei nanomolarer Sondenkonzentration noch Aggregate nachgewiesen werden (Kap. 4.8). Die hohe Bindungsaffinität der Antikörpersonden gegen Aggregate ist sicher u. a. durch die Vielzahl an potentiellen Bindungsstellen am Aggregat bedingt. Die lokale Konzentration von Bindungspartnern für den Antikörper, der bereits an ein Aggregat gebunden hat, ist sehr viel größer als die Gesamtkonzentration des PrP in Lösung. Löst sich ein Antikörper vom Aggregat, so findet sich sofort in lokaler Nähe eine weitere Bindungsstelle. Zudem bilden Antikörper selten Aggregate.

Antikörper bieten gegenüber PrP als Sonde einen weiteren Vorteil. Wie schon erwähnt bindet PrP nur gut an amyloide Strukturen (Pitschke, 1999), für Antikörper gilt dies nicht. Daher kann mit Antikörper auch an amorphe Aggregate von PrP binden, die, wie in Kap. 1.2 erwähnt, wahrscheinlich vor allem im Frühstadium der Krankheit einen erheblichen Teil von PrP^{Sc} ausmachen.

Die hohe Affinität der Antikörpersonden kann jedoch auch zu Problemen führen. Die Bindung von Antikörpersonden an PrP^C, das entweder frei in Lösung oder an der Oberfläche von Zellen oder Zellbestandteilen vorliegt, kann zum größten Teil ausgeschlossen werden, da dies durch die vorgeschaltete Behandlung des Untersuchungsmaterials entfernt wird. Allerdings sind die Sonden hochspezifisch gegenüber dem jeweiligen Bin-

dungsepitop. Doch für die meisten Antikörper liegen diese Epitope nicht auf der nativen pathologischen Aggregatform, sondern auf dem denaturierten Protein. Daher fehlt vielen Antikörpern die maximale Spezifität und Affinität für die pathologische Aggregatform. Es musste daher nach geeigneten Antikörpern gesucht werden. Auf bisherige Erfahrungen mit verschiedenen Antikörpern konnte nicht zurückgegriffen werden, da alle anderen auf Antikörpern basierenden Verfahren die Aggregatform von PrP nicht erkennen. Zusätzlich muss noch beachtet werden, dass ein Unterschied in der Bindung der Antikörper frei in Lösung oder in einem Blot, d. h. nach Denaturierung, besteht, so dass auch von diesem Standpunkt aus keine Erfahrungen transferiert werden können.

Auch bei einer 2D-Analyse, bei der zwei Sonden gleichzeitig eingesetzt werden, kann die hohe Affinität der Antikörpersonden zu Problemen führen, wenn man diese in Kombination mit monomerem PrP als Sonde benutzt. PrP-Sonden und Aggregate konkurrieren hier um die Bindung der Antikörper-Sonde. Dadurch verringert sich die Konzentration der Antikörpersonde, welche effektiv zur Bindung an Aggregate zur Verfügung steht. Dies verringert wiederum die Markierungsdichte der Aggregate. Aufgehoben wird der Effekt nur z. T. durch eine Bindung des PrP-Antikörper-Sonden-Komplexes an Aggregate. In Anbetracht der dargestellten Argumentation scheint daher der Einsatz von zwei verschiedenen Antikörpern als Sonden ideal.

Neben der Wahl einer geeigneten Sonde wurde im Laufe dieser Arbeit die Messmethode auch durch einen verbesserten Messaufbau und anschließender Auswertung optimiert. Die bei [Pitschke et al. \(1998\)](#) durchgeführte Auswertung der Fluoreszenzintensitäten bestand im wesentlichen aus dem Zählen von Fluoreszenz-Peaks. Die Bewertung dessen, was ein Peak ist, erfolgte durch den Experimentator und unterlag daher einer gewissen Subjektivität. Die hier entwickelte Methode der Intensitätsanalyse verläuft dagegen vollständig automatisiert und ist daher objektiver. Sie wurde in einer ähnlichen Art und Weise schon bei [Bieschke et al. \(2000\)](#) angewandt und wurde in der vorliegenden Arbeit noch verbessert (Kap. 4.4). Zugleich bietet diese Methode neben der Objektivität noch den Vorteil, dass eine weitergehende Analyse der Daten ermöglicht wird. Denkbar in diesem Zusammenhang wäre z. B. die Wichtung der Fluoreszenzintensitäten. Es könnte sinnvoll erscheinen, dass hohe Fluoreszenzintensitäten stärker gewichtet werden als niedrige, da diese von großen Aggregaten stammen sollten. Die Wichtung könnte z. B. in der Art erfolgen, dass bei der Analyse des Histogramms die Häufigkeiten mit der zugehörigen Fluoreszenzintensität multipliziert werden. Ob dies tatsächlich sinnvoll ist, muss noch eruiert werden, denn wie weiter unten erläutert wird, bilden sich Aggregate erst im Laufe der Pathogenese nach einem langsamen Prozess. Wie mittlerweile diskutiert und weiter unten erläutert wird, sind für die Infektiosität und die Ausbreitung wahrscheinlich eher lösliche Multimere verantwortlich. Andererseits könnte dann durch die Wichtung evt. eine Aussage über das Krankheitsstadium gemacht werden. So könnte festgestellt werden, ob eher kleinere Multimere oder große Aggregate vorliegen.

Eine einfache Intensitätsanalyse erlaubt die Separierung und Quantifizierung von Signalen der Zielmoleküle, nämlich den Aggregaten. Damit ist die Intensität als Parameter zur direkten Differenzierung von gebundenen und freien Sondenmolekülen geeignet. Limitierend ist u. a. die Zahl der Moleküldurchtritte durch das Messvolumen. Die In-

tensität als Messparameter kann auch genutzt werden, wenn die Probe während der Messung relativ zum Messfokus, oder der Messfokus relativ zur Probe, bewegt wird. Durch das Scannen der Probe wurde die Diffusionsbewegung der Moleküle von einer Flussbewegung überlagert. Für Moleküle, deren diffusionsbedingte Eintrittsfrequenz in das Messvolumen klein gegenüber ihrer dortigen Aufenthaltsdauer ist, also für sehr große Moleküle, kann die Detektionsempfindlichkeit durch Vergrößerung des Messvolumens, d. h. durch Scannen der Probe, erhöht werden. Vor allem kann hierdurch die Diffusion der Moleküle vernachlässigt werden. Unter optimalen Bedingungen hängt die Zahl der detektierten Ereignisse dann massgeblich vom durchmessenen Volumen und von der Anzahl der Aggregate ab. Somit sollte durch Scannen eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Steigerung um den Faktor 10 bis 20 erreicht (Kap. 4.4).

Die Detektion eines einzelnen Moleküls wird über einen Schwellenwert definiert, der das Signal vom Rauschhintergrund trennt. Im Falle der Aggregatdetektion bildet das Signal der ungebundenen fluoreszenzmarkierten Sonden in einem Kontrollmedium, z. B. ein Puffer oder aber eine Aufreinigung eines nicht-infizierten Tieres, den Hintergrund, vor dem das Zielmolekül detektiert werden muss. Dabei ist das Verhältnis von spezifischem Signal zum Rauschhintergrund (S/N) der entscheidende Parameter, der die Effizienz der Detektion eines Moleküls bestimmt (Barnes *et al.*, 1995). Dementsprechend ist eine Markierung der Aggregate mit einer hohen Zahl an Sondenmolekülen anzustreben. In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzintensitäten über einem Schwellenwert als Signal definiert. Dabei konnten bei Kontrollmessungen die Fluoreszenzintensitäten zuweilen erheblich schwanken. Diese Schwankungen werden vermutlich durch Löschungseffekte und unspezifische Wechselwirkungen verursacht. Durch die Implementierung eines dynamischen Schwellenwertes (Kap. 4.4) konnte hierbei eine verbesserte Abtrennung des Signals erfolgen, als durch einen konstanten Schwellenwert, z. B. wie bei Bieschke (2000). Bei einem konstanten Schwellenwert besteht die Gefahr, durch Setzen eines zu hohen Schwellenwertes, spezifische Signale zu verlieren.

Die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen kann durch die Verwendung zweier Sonden und Koinzidenzmessung noch verbessert werden. Durch zwei unabhängige Bindungspartner ist die Spezifität der Detektion gegenüber der Verwendung einer Sonde erhöht. Die unspezifische Bindung einer der Sonden kann hierbei leicht abgetrennt werden. Die 2D-Analyse dieser Arbeit lieferte dann auch sogleich ein erheblich besseres Messergebnis im Vergleich zur Einzelauswertung. 12 von 12 Tieren wurden in einer verblindeten Studie richtig diagnostiziert (Kap. 4.9.2).

Zusammenfassend wurde die Messmethode vielfach optimiert. So wurde ein effizientes Aufreinigungsprotokoll etabliert und die begrenzte Eignung von PrP als Sonde, aufgrund unspezifischer Anlagerung und Selbstaggregation, konnte durch die Nutzung von Antikörpern als Sonde umgangen werden. Zusätzlich wurde das Detektionsverfahren auf die besonderen Erfordernisse des Nachweises in femtomolarer Konzentration weiterentwickelt. Als maßgeblich für eine sensitive Detektion erwies sich hier einerseits die Einführung des Scannings und andererseits die 2D-Analyse. Beides führte zu einer erheblich gesteigerten Sensitivität und Spezifität.

5.2 Sensitivität im Vergleich zu anderen bereits auf dem Markt befindlichen Methoden

Bei dem hier durchgeführten Vergleich der auf dem Markt befindlichen Tests muss beachtet werden, dass die Bestimmung der Sensitivitäten an unterschiedlichen Spezies und z. T. an PrP^{Sc} bzw. PrP 27-30 stattgefunden hat. Wie schon erwähnt, unterscheidet sich je nach Spezies PK-Resistenz, Vorkommen und Menge von PrP^{Sc}, so dass ein direkter Vergleich mit allen beschriebenen Testverfahren eigentlich nicht möglich ist. Trotzdem können vorläufige Einschätzungen zur Sensitivität getroffen werden.

Ein Vergleich mit den Testsystemen von den Firmen Prionics, Biorad und Enfer zeigt (siehe auch Tab.5.1), dass der hier entwickelte Test, zumindest nach den ersten Ergebnissen, mit der gleichen Spezifität (100%) erkrankten Tieren im terminalem Stadium erkennt, aber bei weitem sensitiver ist. Der Prionics Schnelltest beruht auf einem Westernblot-Verfahren. Seine Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 30 ng bovinem PrP 27-30. Die beiden anderen Tests beruhen auf der ELISA-Technik. Der Test der Firma Biorad ist ca. 30 Mal sensitiver als der Prionics-Test und 10 mal sensitiver als der Enfer-Test, kann also ca. 1 ng bovines PrP 27-30 detektieren (Deslys *et al.*, 2001). Dies entspricht der Sensitivität, die beim Nachweis von PrP 27-30 mittels Slotblot (Winklhofer *et al.*, 2001) erreicht wurde. In dem hier entwickelten System wird eine Sensitivität bis $1 * 10^{-8}$ H. Ä. erreicht (Kap. 4.8), was ungefähr 0,1 pg PrP^{Sc} entspricht. Dies bedeutet, dass das hier entwickelte Verfahren um den Faktor 10.000 bis 300.000 sensitiver ist als die zur Zeit kommerziell erhältlichen Tests.

Eine Menge von $1 * 10^{-8}$ H. Ä. entspricht in etwa der Sensitivitätsgrenze, welche schon einmal mittels eines FCS basierenden Nachweisverfahrens bei Hamstern ermittelt wurde (Bieschke *et al.*, 2000). Dort wurde als Sensitivitätsgrenze $1 * 10^{-7}$ H. Ä. ermittelt. Dies bestätigt unsere Ergebnisse. Allerdings kann anhand der Veröffentlichung nur eine grobe Abschätzung der Sensitivität von Bieschke *et al.* (2000) erfolgen, da die Sensitivitätsmessungen an einer nicht genau definierten Menge PrP 27-30 erfolgte. Statt Konzentrationsangaben wurden Verdünnungswerte angegeben. Doch aus den mitaufgelisteten Westernblots läßt sich abschätzen, dass dort ebenfalls PrP 27-30 bis zu $1 * 10^{-7}$ H. Ä. detektiert werden konnte.

Eine ähnliche Sensitivität wurde auch von Wadsworth *et al.* (2001) mittels einer Fällung von PrP^{Sc} und anschließendem hochempfindlichem Westernblotsystem bei nvCJD erreicht. Von den weiteren, schon veröffentlichten Testverfahren erreicht der Nachweis von PrP^{Sc} mittels zeitaufgelöster dissoziationsgesteigertem Fluoroimmunoassay (time-resolved dissociation enhanced fluoroimmunoassay, DELFIA) bei Hamstern (Safar *et al.*, 1998; Völkel *et al.*, 2001) die höchste Sensitivität. Die bei diesem Verfahren eingesetzte Technik vermindert Hintergrundfluoreszenz vollständig, so dass hier hohe Sensitivitäten erreicht werden können. Mit $1 * 10^{-8}$ H. Ä. (Kap. 4.8) wird mit dem hier entwickelten Test 0,1 pg in 10 µl nachgewiesen, also 10 pg/ml. Damit liegt der Test im Bereich der Sensitivitätsgrenze von 50 pg/ml, welche mittels DELFIA erreicht wird. Allerdings wird beim DELFIA-Test PrP^{Sc} nachgewiesen. Da in der vorliegenden Arbeit PrP 27-30 nachgewiesen wird, verliert der Test im Vergleich zum DELFIA-Test evtl. Signale, da dort noch PK sensitives PrP^{Sc} nachgewiesen wird. Bei entsprechender Aufreinigung von PrP^{Sc} und in Kombination mit einer 2D-Analyse sollte mittels des hier vorgestellten

Tabelle 5.1: Vergleich der Sensitivitäten verschiedener Testsysteme. Der Gehalt an PrP^{Sc} wurde abgeschätzt; 1 μg Hirngewebe enthält ungefähr 10 pg PrP^{Sc} (Prusiner *et al.*, 1983). Die hier erreichte Nachweisgrenze ist grau hinterlegt.

| H. Ä. | Hirn [μg] | PrP ^{Sc} [pg] | Firma | Zitat |
|---------------|------------------------|------------------------|---------------|--|
| $1 * 10^{-2}$ | 10000 | 100000 | | |
| $1 * 10^{-3}$ | 1000 | 10000 | Prionics | Oesch <i>et al.</i> (2000) |
| $1 * 10^{-4}$ | 100 | 1000 | Biorad, Enfer | Deslys <i>et al.</i> (2001) Winklhofer <i>et al.</i> (2001) |
| $1 * 10^{-5}$ | 10 | 100 | | |
| $5 * 10^{-6}$ | 5 | 50 | | |
| $1 * 10^{-6}$ | 1 | 10 | | |
| $5 * 10^{-7}$ | 0,5 | 5 | | Wadsworth <i>et al.</i> (2001) |
| $1 * 10^{-7}$ | 0,1 | 1 | | Bieschke (2000) |
| $5 * 10^{-8}$ | 0,05 | 0,5 | | Safar <i>et al.</i> (1998) Völkel <i>et al.</i> (2001) |
| $1 * 10^{-8}$ | 0,005 | 0,1 | | Lee <i>et al.</i> (2000) dieser Ansatz |

Verfahrens die Sensitivität noch gesteigert werden können. Zudem ließen sich beiden Techniken kombinieren und somit der Hintergrund, welcher die Sensitivität limitiert, noch weiter verringern.

Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass bei der Messung der Sensitivität unverdünnte Proben S/N-Verhältnisse von 7 bis 8 aufweisen (Kap. 4.8). Später wurde gezeigt, dass durch eine geeignete Behandlung der Hintergrund gesenkt wurde und somit bei einer 2D-Analyse S/N-Verhältnisse von 20 bis 40 erreicht werden konnten (Kap. 4.10). Insofern könnte man annehmen, dass eine noch höhere Sensitivität erreicht werden könnte, wenn Sensitivitätsmessungen mit einer 2D-Analyse und Aufreinigung ohne PK gemacht werden. Leider konnte die Sensitivitätsbestimmung mittels 2D-Analyse aufgrund technischer und logistischer Probleme nicht durchgeführt werden. Trotzdem veranschaulichen die gezeigten Ergebnisse (Kap. 4.8) das Potential der Methode.

Amplifikation

Interessanterweise nimmt die Sensitivität, wie sie in Kap. 4.8 mittels Spikingexperimenten ermittelt wurde, nicht linear ab wie man es erwarten würde (Abb. 4.19). Vergleicht man die gemessenen Werte mit denen, die zu erwarten sind, dann fällt auf, dass bei jeder Verdünnung um den Faktor 10 auch ein um den Faktor 10 erhöhter Wert als zu erwarten vorliegt (Abb. 5.1). Zu erklären wäre dieser Effekt mit einer Amplifikation wie bei Saborio *et al.* (2001) beschrieben (s.a. Kap. 5.4). Im Prinzip macht man sich die Prionreplikation zu Nutze. Dabei gibt man zu dem vorhandenen PrP^{Sc} weiteres PrP^C,

welches in PrP^{Sc} umgewandelt wird, und erhöht somit die Menge an PrP^{Sc} .

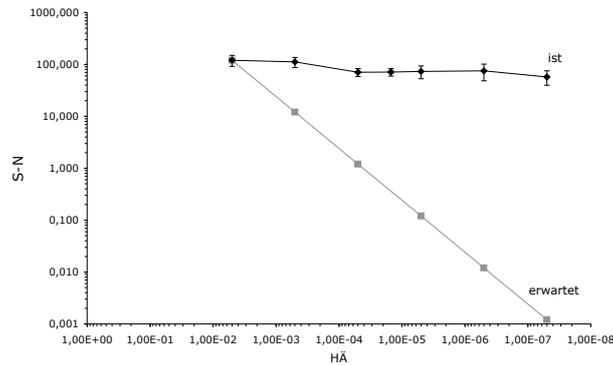
In der Einleitung wurden die verschiedenen Hypothesen der Prionreplikation gegenübergestellt (Kap. 1.5). Ein Monomer ist hiernach nicht in der Lage, PrP^{C} stabil in PrP^{Sc} umzuwandeln. Erst wenn sich genügend Monomere zu einer keimkritischen Größe zusammengefunden haben, übertrifft die Geschwindigkeit des Aufbaus der Keime die des Abbaus. Autokatalytische Reaktionen haben typischerweise eine exponentielle Beschleunigung des Wachstums. Um eine exponentielle Beschleunigung in das Modell einfließen zu lassen, muss man voraussetzen, dass sowohl der Katalysator als auch das Produkt für weitere Reaktionsschritte zur Verfügung stehen. Bei dem Katalysator handelt es sich um den Keim und bei dem Produkt um die gewachsene Kette bzw. Fibrille. Da bei einer Fibrille ein Wachstum nur an den Enden erfolgt, kann dies nur erreicht werden, wenn die Kette immer wieder zerbricht, die Bruchstücke aber nicht die kritische Größe des Keimes unterschreiten. Masel *et al.* (1999) hat dieses Modell in eine mathematisch lösbare Form überführt und kann damit einige Details im Verlauf einer Prionkrankheit erklären.

Um also eine Amplifizierung eines vorhandenen Signals zu ermöglichen, müssen nach einer Mischung von PrP^{Sc} und PrP^{C} die daraus gebildeten PrP^{Sc} -Aggregate wieder zerkleinert werden, um von neuem, nach erneuter Zugabe von PrP^{C} , wachsen zu können. Das Prinzip einer solchen „Protein-PCR“ formulierte Eigen schon im April 2001 (Eigen, 2001). Es wäre vorstellbar, dass nach dem Verdünnen von PrP^{Sc} in Hirnhomogenat gesunder Tiere sich PrP^{C} an PrP^{Sc} anlagert. Bei der Aufreinigung von PrP 27-30 wird erst in den letzten zwei Schritten PrP^{C} abgetrennt. Vorher verbliebe evtl. genug Zeit zur Amplifikation des vorhandenen PrP^{Sc} , zumal während der Aufreinigung bei jedem Schritt eine Behandlung mit Ultraschall erfolgt. Dieses war bei der Veröffentlichung von Saborio *et al.* (2001) ein unerlässlicher Bestandteil der Amplifikation, da hierdurch Aggregate zerkleinert werden und somit mehr Angriffsfläche zur Replikation zur Verfügung steht.

Interessanterweise ist die Amplifikation jedesmal in etwa so groß wie die Verdünnung. Sie beträgt im Durchschnitt $65\% \pm 17\%$ von der Verdünnung. Dies ist auch eine Beobachtung die schon von anderen Gruppen gemacht wurde (Bieschke, nationale TSE-Plattform 2002, Berlin). Es ist auch nicht weiter verwunderlich, denn es gibt mindestens einen limitierenden Faktor und das ist der Gehalt an PrP^{C} im nicht-infizierten Hirn welches sich an PrP^{Sc} aus dem infizierten Hirn anlagern kann. Weitere limitierende Faktoren können hier aber nicht ausgeschlossen werden. Weiterführend von diesem Experiment ist die Möglichkeit gegeben, falls es sich um eine Amplifikation handelt, zu überprüfen, ob exogenes PrP^{C} für eine Amplifikation ausreicht (anstatt Hirnhomogenat). Wenn nicht, kann man Fraktionen des Hirnhomogenats zusätzlich dazugeben und sich so auf die Suche nach dem Faktor X machen (Kap. 1.5.2).

Es sei betont, dass es sich hier um ein theoretisches Gedankenmodell handelt. Ob hier tatsächlich eine Amplifikation vorliegt müsste noch evaluiert werden. Wäre dem so, hieße dies aber auch, dass die Sensitivität nicht bei dem hier ermitteltem Wert liegen würde. Überprüfen ließe sich diese Arbeitshypothese mit einem Experiment, bei dem das hier gemachte Experiment (Kap. 4.8), einem Spiking-Experiment bei dem Hirnhomogenat infizierter Tiere in Hirnhomogenat nicht-infizierter Tiere verdünnt wird,

A



B

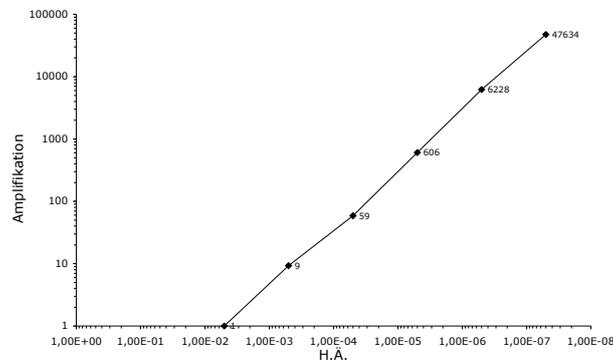


Abbildung 5.1: Theoretische Betrachtung zur Messung der Sensitivität. Die Nichtlinearität der Messung der Sensitivität ließe sich durch eine Amplifikation wie bei [Saborio et al. \(2001\)](#) beschrieben erklären. In **(A)** wurde ausgehend vom Wert der unverdünnten Probe berechnet, wie sich das Signal rein theoretisch betrachtet hätte vermindern sollen (erwartet). Die hier dargestellten Werte entsprechen also in keiner Weise experimentell ermittelten Werten! Zum Vergleich wurden die experimentell ermittelten Werte aufgetragen (ist). In **(B)** wurde die Differenz zwischen ermittelten und erwarteten Werten aufgetragen. Es sei nochmal betont, dass es sich hier um ein theoretisches Gedankenmodell handelt.

verglichen wird mit einer Verdünnung von infiziertem Hirnhomogenat in Puffer. Wird während der Aufreinigung die Proteinase K Konzentration entsprechend an die geringere Konzentration an Protein angepasst sollte aus dem Vergleich ein Rückschluss auf eine mögliche Amplifikation möglich sein. Dabei müssen sowohl Western-Blot als auch FCS-Analysen herangezogen werden. Bleibt bei beiden Methoden das Signal beim Experiment mit der Verdünnung im Hirnhomogenat relativ konstant, nimmt aber bei der Verdünnung in Puffer linear ab (vgl. Abb. 5.1.A), so liegt eine Amplifikation vor. Diese Experimente wurden in der dieser Arbeit aus logistischen und organisatorischen Gründen nicht mehr durchgeführt.

5.3 Nachweis von PrP^{BSE}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mittels FCS Prion-Rods im Hirn von Hamstern mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden können, wurde das Verfahren auf Rinder übertragen. Der Nachweis von PrP^{BSE} ist schwieriger als der von PrP^{Sc}, da die Konzentration von PrP^{BSE} im Hirn betroffener Rindern geringer ist, als die von PrP^{Sc} bei Hamstern (Oesch *et al.*, 2000). Zudem weist PrP^{BSE} eine erhöhte Proteinase K Sensitivität auf, so dass eine Aufreinigung mit Proteinase K zum Verlust von Signalen führt. Daher wurde PrP^{BSE} aus einer Aufreinigung ohne Proteolyse mit Proteinase K verwendet. Voraussetzung zum Nachweis von PrP^{BSE} im FCS war die Einführung von Antikörpern als Sonde, da PrP als Sonde nur gut in amyloide Strukturen inkorporiert, welche, wie zuvor erläutert, erst durch die Behandlung mit Proteinase K entstehen. Hier konnte in initialen Versuchen gezeigt werden, dass das System auch bei Rindern angewendet werden kann (Kap. 4.11). Da hier der Nachweis von PrP^{BSE} nur mit einem Antikörper erfolgte, kann angenommen werden, dass bei einer 2D-Analyse das Ergebnis eindeutiger ausfällt. Leider fehlte ein geeigneter zweiter Antikörper um dies zu eruieren.

5.4 Ausblick

Das Detektionsverfahren auf Basis der FCS-Methode ermöglicht es, mit hoher Spezifität und Sensitivität pathologische Prion-Aggregate im Gewebe von erkrankten Tieren nachzuweisen. Grundlage für eine erfolgreiche Weiterentwicklung des Verfahrens ist die Erhöhung der Signalintensität. Zum Erreichen dieses Ziels eignen sich mehrere Entwicklungsstrategien, die im Folgendem vorgestellt werden.

Alternativen der Erregerisolation

Eine mögliche Strategie wäre es, die Erregerausbeute bei der Isolation des Erregers zu erhöhen. Wie von Safar *et al.* (1998) beschrieben, liegt PrP^{Sc}, je nach Erregerstamm, nur in geringen Mengen als Proteinase K resistentes Material vor. Für PrP^{BSE} gilt, dass es zehn Mal sensitiver gegen Proteinase K ist als PrP^{Sc} (Oesch *et al.*, 2000). Unbekannt ist noch, wie hoch der Anteil des PK sensitiven PrP^{BSE} ist. Weitergehende Untersuchungen scheiterten am Fehlen eines geeigneten Antikörpers (persönliche Mitteilungen, S.B. Prusiner).

Um das Proteinase K sensitive PrP^{Sc} bzw. PrP^{BSE} nicht zu verlieren, sollte eine Aufreinigung ohne Proteinase K verwendet werden. Die von Safar *et al.* (1998) beschriebene Fällung mit Wolframat ist hierfür gut geeignet. Wolframat fällt unter bestimmten Bedingungen PrP^{Sc} spezifisch, nicht aber PrP^C. Die Ausbeuten scheinen sehr hoch zu sein. Nachteilig wäre diese Methode nur, solange man monomeres Prionprotein als Sonde verwendet, denn dieses lagert sich besser an amyloide Strukturen als an amorphe Aggregate an (Pitschke, 1999). Bei der Wolframatfällung werden, im Gegensatz zu der hier verwendeten Methode, keine amyloiden Prion-Rods gebildet, da diese bei den meisten Prionerkrankungen erst durch die Proteolyse mit Proteinase K in Anwesenheit von

Sarkosyl gebildet werden (McKinley *et al.*, 1991).

In dieser Arbeit wurde schon Proben von PrP^{BSE} benutzt, die ohne Proteolyse mittels Proteinase K dargestellt worden sind (Kap. 4.11). Doch verspricht das Protokoll von Safar *et al.* (1998) eine spezifische Aufreinigung mit sehr hoher Ausbeute an PrP^{Sc}. Hier müsste noch evaluiert werden, welches Protokoll das geeignetere ist.

Wahl anderer Gewebe als Probenquelle

Eine weitere Strategie wäre, anderes Gewebe als Hirngewebe zu untersuchen. Dies könnte vor allem im Hinblick auf eine *in vivo* Diagnose nützlich sein, z.B. zur Anwendung beim Menschen, oder aber um den Durchseuchungsgrad von Tierbeständen zu ermitteln.

Bei der oralen Aufnahme des Erregers findet man diesen im Laufe der Infektion zuerst in anderen Organen, bevor er das Gehirn erreicht. Allerdings unterscheiden sich je nach Wirtsart sowohl die Titer, als auch die betroffenen Organe. So konnte nach einer oralen Infektion von Mäusen mit einem mausadaptierten Scrapiestamm schon nach etwa 25 Tagen Infektiosität in der Milz gefunden werden, aber erst nach etwa 100 Tagen im Gehirn (Eklund, 1967). Bei einem mit hamsteradaptierten Scrapiestamm oral infizierten Hamster steigt die Infektiosität in Milz und Gehirn zur gleichen Zeit gleichermaßen an (Casaccia *et al.*, 1989). Zudem ist die Ausbreitung auch abhängig vom Erregerstamm. Bei Mäusen, die oral mit einem GSS-Stamm infiziert werden, steigt die Infektiosität im Gegensatz zum mausadaptierten Erregerstamm, in Milz und Gehirn etwa zur gleichen Zeit gleichermaßen an (Kuroda *et al.*, 1983).

Bei Scrapie-infizierten Schafen und Ziegen konnte Infektiosität im ZNS, in der Plazenta (Pattison *et al.*, 1972), in Fruchthüllen und Fruchtwasser (Pattison *et al.*, 1974), sowie im lymphatischen Gewebe (Hadlow *et al.*, 1974) nachgewiesen werden. Infektiosität findet man bei Schafen im lymphoreticulären System bevor entsprechende Titer im ZNS zu finden sind (Baldauf *et al.*, 1997; Beekes *et al.*, 1996). Also bietet sich das lymphoreticuläre System bei Schafen als eine alternative Gewebequelle für das Testverfahren an, da hier auch frühere Krankheitsstadien erkannt werden können. Für eine Biopsie würden natürlich nur Organe in Frage kommen, welche leicht zu entnehmen sind und das Tier durch die Entnahme nicht töten. Hier würden sich vor allem die Tonsillen anbieten (Schreuder *et al.*, 1998). Bei Schafen scheint auch die *Membrana nictans*, das dritte Augenlid, für gesicherte *in vivo* Diagnosen geeignet zu sein (O'Rourke *et al.*, 2000). Leider ist unbekannt ab welchem Stadium der Infektion Infektiosität in der *Membrana nictans* gefunden werden kann. Dieses müsste noch genauer evaluiert werden.

Bei Rindern wird hingegen keine Infektiosität in Milz und Lymphknoten gefunden. Hier findet man PrP^{Sc} im lymphoreticulären System nur in den Peyer'schen Plaques (Wells *et al.*, 1998). Die periphere Ausbreitung des Erregers nach oraler Infektion müsste hier noch genauer untersucht werden.

Amplifizierung des Signals

Ein anderer möglicher Versuchsansatz könnte sein, das Signal zu amplifizieren. Die Amplifikation wurde schon in Kap. 5.2 diskutiert, soll hier aber als gezielte Optimie-

rungsmöglichkeit nocheinmal diskutiert werden.

Die Amplifikation könnte in einem gesteuertem Prozess, einer „Protein-PCR“, z. B. mit rekombinantem PrP oder PrP^C einer Isolation von PrP^{Sc} nachgeschaltet werden, unabhängig davon, welche Methode der Aufreinigung verwendet wird. Eine Alternative bestünde darin, nicht das Produkt der Aufreinigung zu amplifizieren, sondern PrP^{Sc} zu amplifizieren bevor man es aufreingt. Dies würde nach dem gleichen Prinzip wie von [Eigen \(2001\)](#) beschrieben funktionieren. [Saborio et al. \(2001\)](#) zeigte kurz nach der Veröffentlichung des Prinzips der „Protein-PCR“ ([Eigen, 2001](#)) wie man dies mit einfachen Mitteln durchführen kann. Hirnhomogenat infizierter Hamster wurde mit Hirnhomogenat gesunder Hamster gemischt und mit Ultraschall behandelt, um dann erneut Hirnhomogenat gesunder Hamster dazu zugeben. Hierdurch wurde mit wenigen Zyklen PrP^{Sc} erheblich amplifiziert. Dieses Prinzip ließe sich leicht in das hier vorhandene System integrieren. Die Amplifikation vor der Aufreinigung ist einer nachgeschalteten Amplifikation vorzuziehen, da man geringste Mengen PrP^{Sc} nachweisen möchte. Hat man nur geringste Mengen bestünde die Gefahr, während der Aufreinigung einer nachgeschalteten Amplifikation, diese zu verlieren. Auch eine Kombination beider Amplifikationen ist nicht ausgeschlossen.

Alternative Messprinzipien

Eine weitere Methode zur Steigerung der Sensitivität wäre das dreidimensionale Immobilisieren der Aggregate durch Polymerisieren der zu untersuchenden Probe. Dies könnte z. B. mit Polyacrylamid oder flüssigem Glas geschehen. Hierdurch würde man die Proben auch einem dreidimensionalen Scanning zugänglich machen, um auf diese Weise nicht nur einen kleinen Teil, sondern alle Prionaggregate in der Lösung zu detektieren. Durch die bisher verwendete Methode kann nur in einem kleinen Zeitraum gemessen werden, bevor die Aggregate zu Boden sinken und dann für die Detektion nicht mehr zugänglich sind. Dieser Zeitraum würde durch die Polymerisation unendlich verlängert und das gesamte Probenvolumen könnte getestet werden. Damit würde die Methode zu einer realen Einzelmolekülmessung werden, denn sogar ein einziges Aggregat im Probenvolumen sollte damit detektiert werden können.

Eine weitere Strategie zur Signalvermehrung könnte eine Auflösung der Aggregate sein. Die Diffusionszeiten von Aggregaten können in FCS z. T. bis zu einigen Millisekunden betragen ([Bieschke et al., 2000](#); [Pitschke et al., 1998](#); [Schäfer, 1997](#)) und enthalten dementsprechend bei grober Abschätzung 10^3 bis 10^5 Monomere. Dies stimmt damit überein, dass eine infektiöse Dosis ungefähr aus 10^5 bis 10^6 Monomeren besteht ([Prusiner, 1991](#)).

Unter der Annahme, dass sich ein Aggregat aus 10^5 Monomeren in $10 \mu\text{l}$ befindet, würde die Solubilisierung des Aggregats in die Monomere zu einer Konzentration derselbigen im Atto-Molaren Bereich führen. Im Extremfall konnten aber mittels FCS schon Konzentrationen von bis zu 10^{-21} M gemessen werden ([Korn et al., 2000](#)). FCS Messungen an einem Molekül können aufgrund unzureichender Statistik nicht durchgeführt werden (wohl aber die hier durchgeführten Messungen), aber durch die Solubilisierung des Aggregats

kann eine ausreichend hohe Konzentration für FCS-Messungen erreicht werden. Damit ergeben sich neue Verfahren für den Nachweis von PrP^{Sc} mittels FCS. Dies würde allerdings voraussetzen, dass die Aufreinigung von PrP^{Sc} frei von PrP^C ist, da das zu einer Kreuzreaktion führen würde. Oder aber man braucht einen Antikörper, der nur PrP^{Sc} erkennt, nicht aber PrP^C. Alternativ könnten die Aggregate nicht in Monomere gelöst werden sondern nur bis zur kritischen Keimgröße (s. Kap. 1.5.3).

Denkbar wäre z.B. die Anlagerung von zwei geeigneten Antikörpern an ein PrP-Molekül mit anschließender Detektion mittels Kreuzkorrelation. Bei gegenseitiger sterischer Behinderung der Antikörper könnten Fab-Fragmente oder sogar Mini-Antikörper genutzt werden; oder man beobachtet die Verdrängung von fluoreszenzmarkiertem PrP an Antikörpern durch PrP^{Sc}. Allerdings werden hier schon höhere Konzentrationen von PrP^{Sc} benötigt. Auch die Anwendung des Nanopartikel Immunoassays (NPIA) von Meyer-Almes (2001) wäre denkbar, ebenso eine Kombination des Zeitaufgelösten Dissoziations gesteigerten Fluoroimmotest (DELFI) (Safar *et al.*, 1998; Völkel *et al.*, 2001) mit dem FCS oder die Kombination von FCS mit Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Beim FRET binden zwei Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen. Erfolgt die Bindung in enger Nachbarschaft und hat man die Fluoreszenzfarbstoffe entsprechend gewählt, kann ein Farbstoff angeregt werden und die aufgenommene Energie auf den zweiten Farbstoff übertragen werden. Dessen Fluoreszenz kann dann gemessen werden. Beim DELFI wird ein Farbstoff gewählt, der sehr viel länger als übliche Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz abstrahlt. Wird die Probe angeregt, lässt man die Zeit verstreichen, die übliche Fluoreszenzfarbstoffe fluoreszieren, erst dann erfolgt die Detektion. Der Förster-Transfer würde genauso wie DELFI zu einer fast vollständigen Reduzierung des Hintergrunds führen und damit zu einer gesteigerten Sensitivität.

Beim NPIA werden im Prinzip Nanopartikel mit Antikörpern besetzt. Der Analyt, im vorliegendem Falle PrP^{Sc}, bindet an die Antikörper. Ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper bindet wiederum an den Analyten und somit würde schon bei einer sehr geringen Konzentration an Analyt eine spezifische Fluoreszenzerhöhung und erhöhte Diffusionszeit beobachtet werden können. Zudem kann so auch die Bindung ein Antikörper an ein kleines Molekül beobachtet werden. Die Voraussetzung, dass nur die Bindung eines großen Moleküls an ein kleines, fluoreszenzmarkiertes Molekül beobachtet werden kann, wird so eliminiert. Im Prinzip würden schon ein bis zwei gebundene Analyte für einen Effekt ausreichen.

Ein Vorteil beim Nachweis von monomerem bzw. oligomerem PrP^{Sc} liegt darin, dass evtl. das infektiöse Agens direkt nachgewiesen werden könnte, da sich die Hinweise verdichten, dass aggregiertes PrP^{Sc} ein Produkt der Pathogenese ist. Der Prozess der Pathogenese und Aggregatbildung verläuft in einem langem Zeitraum. Die Infektiosität wird aber wahrscheinlich durch multimerisiertes, lösliches PrP^{Sc}, sei es nun ein Dimer oder ein Hexamer, vermittelt (Wille *et al.*, 2002).

6 Zusammenfassung

Transmissible spongiforme Enzephalopathien sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die sowohl sporadisch, infektiös als auch genetisch bedingt sein können. Als sicher gilt, dass das Prionprotein, wenn nicht alleiniger, so doch Hauptbestandteil des infektiösen Agens ist. Aggregiertes Prionprotein ist der bisher einzige spezifische Marker für TSEs neben dem Infektiositätstest.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verfahren der keiminduzierten Aggregation als Nachweis von Aggregaten in Lösung auf den Nachweis von Prion-Rods in Tieren zu übertragen. Das Detektionsverfahren sollte im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität gesteigert und Antikörper als Sonden für den Nachweis zugänglich gemacht werden, um die Limitierungen aufzuheben, welche durch PrP als Sonde entstanden.

Als erster Schritt war daher die Isolation des Erregers aus dem Tier notwendig. Zu diesem Zweck wurde zunächst Hirngewebe als geeignetes Untersuchungsmedium ermittelt und nachfolgend ein effizientes Aufreinigungsprotokoll etabliert. Zusätzlich wurde das Detektionsverfahren auf die besonderen Erfordernisse des Nachweises in femtomolarer Konzentration weiterentwickelt. Als maßgeblich für eine sensitive Detektion erwies sich hier einerseits die Einführung des Scannings und andererseits die 2D-Analyse. Beides führte zu einer erheblich gesteigerten Sensitivität und Spezifität. PrP 27-30 konnte bis zu $10 \text{ fg}/\mu\text{l}$ nachgewiesen werden.

Die begrenzte Eignung von PrP als Sonde, aufgrund unspezifischer Anlagerung und Selbstaggregation, konnte durch die Nutzung von Antikörpern als Sonde umgangen werden. Dabei konnte sich auch zunutze gemacht werden, dass Antikörper auch an amorphe Aggregate von PrP binden, die, wie in Kap. 1.2 erwähnt, wahrscheinlich vor allem im Frühstadium der Krankheit einen erheblichen Teil von PrP^{Sc} ausmachen. Man ist also nicht mehr auf amyloide Strukturen angewiesen, wie bei der Nutzung von PrP als Sonde (Pitschke, 1999). Dies war auch Voraussetzung, dass die Methode von ha PrP 27-30 auf PrP^{BSE} transferiert werden konnte.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, welches einen spezifischen und hochsensitiven Nachweis des Erregers der TSEs erlaubt und sich leicht zu einem Hochdurchsatz-Testverfahren weiterentwickeln läßt. Mit diesem System kann nun eine Diagnose von TSE sowohl bei Schafen und Ziegen als auch bei Rindern erfolgen. Ob dieses System, im Gegensatz zu den bisher erhältlichen Tests, die Krankheit schon im präklinischen Stadium erkennt, muß noch evaluiert werden. Doch die hohe Sensitivität dieses Systems läßt dies durchaus möglich erscheinen.

7 Literatur

- Alper, T. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764–766. [1.3](#)
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. and Wells, G. A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of bse in british cattle. *Nature* 382(6594), 779–88. [1.7.4](#)
- Baldauf, E., Beekes, M. and Diringer, H. (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* 78(Pt 5), 1187–97. [5.4](#)
- Barnes, M.D., Whitten, W.B. and Ramsey, J.M. (1995). Detecting single molecules in liquids. *Anal Chem* 367, 418A–423A. [5.1](#)
- Basler, K. (1986). Scrapie and cellular prp isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417–428. [1.3](#)
- Beekes, M., Baldauf, E., Cassens, S., Diringer, H., Keyes, P., Scott, A. C., Wells, G. A., Brown, P., Gibbs, C. J., Jr. and Gajdusek, D. C. (1995). Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J Gen Virol* 76(Pt 10), 2567–76. [3.6](#), [3.6.2](#), [3.7](#), [4.15](#), [4.6](#), [4.16](#)
- Beekes, M., Baldauf, E. and Diringer, H. (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77(Pt 8), 1925–34. [5.1](#), [5.4](#)
- Beekes, M., McBride, P. A. and Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79(Pt 3), 601–7. [1.6.2](#)
- Bieschke, J. (2000). *Aggregationsanalyse durch Fluoreszenz - Korrelations - Spektroskopie*. Dissertation Universität Carolo-Wilhelmina. [3.9.3](#), [4.4](#), [4.4](#), [4.4](#), [5.1](#), [5.1](#)
- Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M. and Kretzschmar, H. (2000). Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10), 5468–73. [4.4](#), [5.1](#), [5.1](#), [5.2](#), [5.4](#)
- Birkmann, E. (2000). *Einfluß von Sequenzvariationen auf die Struktur und das Aggregationsverhalten rekombinanter Prion-Proteine*. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. [4](#)

- Blättler, T (1997). Prp-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389, 69–73. 1.6
- Bolton, D. C., Meyer, R. K. and Prusiner, S. B. (1985). Scrapie prp 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* 53(2), 596–606. 1.4.2
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Charnay, Y., Salmona, M. and Tagliavini, F. (1996). Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *C R Acad Sci III* 319(8), 733–6. 1.7.4
- Bradley, M. E. (1996). Bovine spongiform encephalopathy - distribution and update on some transmission and decontamination studies. In *Bovine spongiform encephalopathies* (Gibbs, C., Hrsg.) S. 11. Springer New York. 1.7.4
- Bradley, M. E. (1997). Animal prion disease. In *Prion diseases* (Collinge, J., Hrsg.) S. 89. Oxford University Press Oxford. 1.7.4
- Bradley, R. and Wilesmith, J. W. (1993). Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (bse). *Br Med Bull* 49(4), 932–59. 1.7.4
- Britische Landwirtschaftsministerium, W3 (1997). www.maff.gov.uk/animalh/bse. Britische Landwirtschaftsministerium. 1.7.4
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. and Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344 Pt 1, 1–5. 1.4.3
- Bruce, M.E. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in sine congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 72, 595–603. 1.7.3
- Casaccia, P., Ladogana, A., Xi, Y. G. and Pocchiari, M. (1989). Levels of infectivity in the blood throughout the incubation period of hamsters peripherally injected with scrapie. *Arch Virol* 108(1-2), 145–9 Using Smart Source Parsing. 5.4
- Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J. and Lansbury, P. T., Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol* 2(12), 807–17. 1.5.3
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* i, 3821–3829. 1.3
- Cohen, A.S. (1967). Preliminary chemical analysis of partially purified amyloid fibrils. *Lab. Invest.* 15, 66–83. 1.1
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. and Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264(5158), 530–1. 1.5.3
- Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* 67, 793–819 Using Smart Source Parsing. 1.5.3, 1.3
- Come, J. H., Fraser, P. E. and Lansbury, P. T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13), 5959–63. 1.5.3

- Cousens, S.N. (1997). Sporadic creutzfeldt-jacob disease in the united kingdom: analysis of epidemiological surveillance data for 1970-1996. *Br. Med. J.* 315, 389–395. [1.7.2](#)
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227(258), 561–3. [1.3](#)
- Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J. and Moynagh, J. (2001). Screening slaughtered cattle for bse. *Nature* 409(6819), 476–8. [5.2](#), [5.1](#)
- Dickinson, A.G. (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front. Biol.* 44, 209–241. [1.7.3](#)
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. and Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein prp(29- 231): the n terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25), 13452–7. [1.5.1](#)
- Donnelly, C. A. (1997). Recent trends in the bse epidemic. *Nature* 389, 903. [1.7.1](#)
- Ehrenberg, M. and Rigler, R. (1976). Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. *Q Rev Biophys* 9(1), 69–81. [3.9.1](#)
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* 63(1), A1–18. [1.5.3](#), [1.5.3](#), [1.3](#), [1.4](#)
- Eigen, M. (2001). Bse und das prion-problem. *Spektrum der Wissenschaft* S. 40–49. [5.2](#), [5.4](#)
- Einstein, A. and v. Smoluchowski, M. (1897). *Untersuchung über die Theorie der Brownschen Bewegung, Abhandlung über die Brownsche Bewegung und verwandte Erscheinungen*. Verlag Harri Deutsch Frankfurt. [3.9.1](#)
- Eklund, C. M. (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J. Infect. Dis.* 117, 15–22. [5.4](#)
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28(21), 8380–8. [1.4.2](#)
- EU-Direktorat für Verbraucherpolitik und Gesundheitsschutz, W3 (1999). europa.eu.int/comm/dg24/health/bse. [1.8.2](#)
- Finkenstaedt, M., Szudra, A., Zerr, I., Poser, S., Hise, J. H., Stoebner, J. M. and Weber, T. (1996). Mr imaging of creutzfeldt-jakob disease. *Radiology* 199(3), 793–8. [1.8.1](#)
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1996). Prion protein (prp) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of prp knockout mice to scrapie. *Embo J* 15(6), 1255–64. [1.5.1](#)
- Food Standard Agency, W3 (2002). www.bsereview.org.uk. BSE-Kontrollberichte der Food Standard Agency. [1.6](#), [1.7](#)
- Foster, J. D., Bruce, M., McConnell, I., Chree, A. and Fraser, H. (1996). Detection of bse infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet Rec* 138(22), 546–8. [1.8.2](#)

- Foster, J. D., Hope, J. and Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* 133(14), 339–41. [1.7.4](#), [1.8.2](#)
- Foster, J. D., Hope, J., McConnell, I., Bruce, M. and Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice. *Ann N Y Acad Sci* 724, 300–3. [1.8.2](#)
- Gajdusek, D. C. and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in new guinea - the endemic occurrence of "kuru" in the native population. *New Eng. J. Med.* 257, 974–978. [1.7.1](#)
- Gibbs, C. (1979). Strain variation in the viruses of creutzfeldt-jacob disease and kuru. In *Slow transmissible diseases of the nervous system*. (Prusiner, S. B., Hrsg.) S. 87. Academic Press New York. [1.7.3](#)
- Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M. and Kretzschmar, H. A. (2000). Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch Virol Suppl* 16, 161–71 Using Smart Source Parsing. [3.9.3](#)
- Glenner, G.G. (1980). Amyloid deposits and amyloidoses: The β -fibrilloses. *New Engl. J. Med.* 302, 1283–1291;1333–1343. [1.1](#)
- Griffith, O. H. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043–1044. [1.3](#)
- Hadlow, W. J., Eklund, C. M., Kennedy, R. C., Jackson, T. A., Whitford, H. W. and Boyle, C. C. (1974). Course of experimental scrapie virus infection in the goat. *J Infect Dis* 129(5), 559–67. [5.4](#)
- Harris, D. A. (1999). Cell biological studies of the prion protein. *Curr Issues Mol Biol* 1(1-2), 65–75 Using Smart Source Parsing. [1.4.2](#)
- Hayashi, R. (1992). Serial computed tomographic and electroencephalographic studies in creutzfeldt-jacob disease. *Acta. Neurol. Scand.* 85, 161–165. [1.8.1](#)
- Herdegen, T., Tölle, T.R. and Bähr, M. (1997). *Klinische Neurobiologie: Molekulare Pathogenese und Therapie von neurobiologischen Erkrankungen*. Spektrum Verlag GmbH Heidelberg. [1.1](#)
- Hjelmeland, L. M. and Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol* 104, 305–18 Using Smart Source Parsing. [3.5](#)
- Hörnlimann, B., Riesner, D. and Kretzschmar, H. A. (2001). *Prionen und Prionkrankheiten*. Walter de Gruyter Berlin. [1.6.1](#)
- Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C. J., Lee, K. H. and Harrington, M. G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335(13), 924–30. [1.8.1](#)
- Huang, Z., Prusiner, S. B. and Cohen, F. E. (1996). Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 207, 49–67 Using Smart Source Parsing. [1.2](#), [1.5.1](#)
- James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B. and Cohen, F. E. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the

- infectious fragment of the scrapie isoform. Proc Natl Acad Sci U S A 94(19), 10086–91. [1.5.1](#)
- Jansen, K. (1998). *Biophysikalische Analyse von Aggregationsintermediaten des Prion-Proteins*. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. [4](#)
- Johnson, C.T. (1988). Bovine spongiform encephalopathy. Vet. Rec. 122, 142. [1.8.2](#)
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1997). CooH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. Proc Natl Acad Sci U S A 94(6), 2333–8. [1.4.2](#)
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein x binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. Proc Natl Acad Sci U S A 94(19), 10069–74. [1.5.2](#)
- Kask, P., Palo, K., Ullmann, D. and Gall, K. (1999). Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. Proc Natl Acad Sci U S A 96(24), 13756–61. [3.9.2](#)
- Kellings, K. (1995). *Analys of residual nucleic acids in scrapie prions with differing degrees of aggregation*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. [1.3](#)
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. and Riesner, D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. J Gen Virol 73(Pt 4), 1025–9. [1.3](#)
- Klitzman, R. (1984). The natural incubation period of kuru and the episodes of transmission in three clusters of patients. Neuroepidemiology 3(3-20). [1.7.1](#)
- Korn, K., Wennmalm, S., Foerster, H. H., Hahn, U. and Rigler, R. (2000). Analysis of the rnae t1 mediated cleavage of an immobilized gapped heteroduplex via fluorescence correlation spectroscopy. Biol Chem 381(3), 259–63. [5.4](#)
- Krakauer, D. C., Pagel, M., Southwood, T. R. and Zanotto, P. M. (1996). Phylogenesis of prion protein. Nature 380(6576), 675. [1.5.2](#)
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. and DeArmond, S. J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. Am J Pathol 122(1), 1–5. [1.4.1](#)
- Kuroda, Y., Gibbs, C. J., Jr., Amyx, H. L. and Gajdusek, D. C. (1983). Creutzfeldt-jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low-density lymphocytes. Infect Immun 41(1), 154–61. [5.4](#)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature 227(259), 680–5. [3.1](#)
- Lansbury, P. T., Jr. and Kosik, K. S. (2000). Neurodegeneration: new clues on inclusions. Chem Biol 7(1), R9–R12. [1.5](#), [1.5.3](#)
- Lee, D. C., Stenland, C. J., Hartwell, R. C., Ford, E. K., Cai, K., Miller, J. L., Gilligan, K. J., Rubenstein, R., Fournel, M. and Petteway, S. R., Jr. (2000). Monitoring plasma processing steps with a sensitive western blot assay for the

- detection of the prion protein. *J Virol Methods* 84(1), 77–89. [5.1](#)
- Magde, D., Elson, E. L. and Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 29, 705–711. [3.9.1](#)
- Marsh, R. F. and Kimberlin, R. H. (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. ii. clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J Infect Dis* 131(2), 104–10. [1.3](#)
- Masel, J., Jansen, V. A. and Nowak, M. A. (1999). Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem* 77(2-3), 139–52. [5.2](#)
- McGowan, J.P. (1914). *Investigation into the disease of sheep called 'scrapie' with special reference to its association with sarcosporidiosis*. Dissertation Edinburgh and east of Scotland College of Agriculture. [1.7.3](#)
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35(1), 57–62. [1.5.1](#)
- McKinley, M. P., Meyer, R. K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A. and Prusiner, S. B. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 65(3), 1340–51. [3.6](#), [3.6.2](#), [4.6](#), [4.3.1](#), [4.7](#), [4.5.1](#), [4.14](#), [4.6](#), [5.4](#)
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D. and Prusiner, S. B. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35(17), 5528–37. [2.7](#)
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. and Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211(4489), 1437–8. [3.3](#)
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. and Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* 54(1), 63–74 Using Smart Source Parsing. [1.5.1](#)
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. and Riesner, D. (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J Gen Virol* 72(Pt 1), 37–49. [1.3](#)
- Meyer-Almes, F. J. (2001). Nanopartikel immunoassays: A new method for use in molecular diagnostics and high throughput pharmaceutical screening based on fluorescence correlation spectroscopy. In *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Rigler, R. and Elson, E. S., Hrsg.) S. 204–224. Springer Berlin Heidelberg. [5.4](#)
- Miura, T., Hori-i, A., Mototani, H. and Takeuchi, H. (1999). Raman spectroscopic study on the copper(ii) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* 38(35), 11560–9. [1.4.3](#)
- Morgan, K. L., Nicholas, K., Glover, M. J. and Hall, A. P. (1990). A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain. *Vet Rec* 127(15), 373–6. [1.7.4](#)

- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. and Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289(5486), 1925–8. [1.4.3](#)
- Moussavian, M., Potolicchio, S. and Jones, R. (1997). The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy. *N Engl J Med* 336(12), 873–4; discussion 874–5. [1.8.1](#)
- Moynagh, J. and Schimmel, H. (1999). Tests for bse evaluated. bovine spongiform encephalopathy. *Nature* 400(6740), 105. [1.8.2](#)
- Oesch, B. (1985). A cellular gene encodes scrapie prp(27-30) protein. *Cell* 40, 735–746. [1.3](#), [1.4.1](#)
- Oesch, B., Doherr, M., Heim, D., Fischer, K., Egli, S., Bolliger, S., Biffiger, K., Schaller, O., Vandeveld, M. and Moser, M. (2000). Application of prionics western blotting procedure to screen for bse in cattle regularly slaughtered at swiss abattoirs. *Arch Virol Suppl* 16, 189–95 Using Smart Source Parsing. [4.5.2](#), [5.1](#), [5.3](#), [5.4](#)
- O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Besser, T. E., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Wells, G. A., Ryder, S. J., Parish, S. M., Hamir, A. N., Cockett, N. E., Jenny, A. and Knowles, D. P. (2000). Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* 38(9), 3254–9. [1.8.2](#), [5.4](#)
- Otto, M., Beekes, M., Wiltfang, J., Bahn, E., Poser, S. and Diringer, H. (1998). Elevated levels of serum s100 beta protein in scrapie hamsters. *J Neurovirol* 4(5), 572–3. [1.8.1](#)
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. and et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23), 10962–6. [1.5.1](#)
- Pattison, I.H. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Path.* 71, 101–108. [1.5.2](#)
- Pattison, I. H. (1965). Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec* 77(47), 1388–90. [1.8.2](#)
- Pattison, I. H. (1991). Origins of bse. *Vet Rec* 128(11), 262–3. [1.7.3](#)
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. and Watson, W. A. (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec* 90(17), 465–8. [5.4](#)
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. and Watson, W. A. (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J* 130(4), lxx–lxxvii. [5.4](#)
- Petersen, N. O. (1986). Scanning fluorescence correlation spectroscopy. i. theory and simulation of aggregation measurements. *Biophys J* 49(4), 809–15. [3.9.3](#), [4.4](#)
- Petersen, N. O., Johnson, D. C. and Schlesinger, M. J. (1986). Scanning fluorescence correlation spectroscopy. ii. application to virus glycoprotein aggregation. *Biophys J* 49(4), 817–20. [3.9.3](#), [4.4](#)

- Pitschke, M. (1999). *Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnoseverfahrens von spongiformen Encephalopathien und der Alzheimer Erkrankung*. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. 1.9, 4, 4.1, 4.1, 4.2, 4.3.1, 5.1, 5.1, 5.4, 6
- Pitschke, M., Prior, R., Haupt, M. and Riesner, D. (1998). Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 4(7), 832–4. 1.8.3, 1.9, 4, 5, 5.1, 5.4
- Post, K., Pitschke, M., Schafer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B. and Riesner, D. (1998). Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem* 379(11), 1307–17. 1.9, 4
- Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowmann, K.A., Cochran, S.P. and McKinley, M.P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942–6950. 1.3
- Prusiner, S. B. (1983). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6675–6679. 1.5.1, 4.8
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252(5012), 1515–22. 5.4
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Downey, D. E. and Groth, D. F. (1981). Determination of scrapie agent titer from incubation period measurements in hamsters. *Adv Exp Med Biol* 134, 385–99 Using Smart Source Parsing. 1.3
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F. and Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35(2 Pt 1), 349–58. 4.6, 5.1
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A. and et al. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous prp isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63(4), 673–86. 1.5.3
- Qian, H. (1990). On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys Chem* 38(1-2), 49–57. 3.9.2
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1997). Nmr characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mprp(23-231). *FEBS Lett* 413(2), 282–8. 1.5.1
- Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1998). Prion protein nmr structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20), 11667–72. 1.5.1
- Rigler, R., Mets, Ü, Widengren, J. and Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high countrate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur Biophys J* 22, 169–175. 3.9.1

- Robey, W. G., Jackson, R., Walters, R. L., Brackett, J. M., Harrington, C. A. and Killian, W. R. (1998). Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed bse symptomatic cattle. *Vet Rec* 143(2), 50–1. [1.8.2](#)
- Saborio, G. P., Permanne, B. and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411(6839), 810–3. [5.2](#), [5.1](#), [5.4](#)
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 268(27), 20276–84. [1.5.1](#)
- Safar, J., Wang, W., Padgett, M. P., Ceroni, M., Piccardo, P., Zopf, D., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr. (1990). Molecular mass, biochemical composition, and physicochemical behavior of the infectious form of the scrapie precursor protein monomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16), 6373–7. [1.4.2](#)
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have prp(sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4(10), 1157–65. [1.5.2](#), [5.1](#), [5.2](#), [5.1](#), [5.4](#), [5.4](#)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. volume second edition. Cold Spring harbor Laboratory New York. [3.1](#)
- Schaarschmidt, H. (1994). Neuron-specific enolase concentration in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke*. 25, 558–565. [1.8.1](#)
- Schäfer, O. (1997). *Biophysikalische Analyse verschiedener Aggregationszustände von rekombinantem Prion-Protein*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. [1.9](#), [4](#), [5.1](#), [5.4](#)
- Schicker, E. (1997). *Klinische Befunden bei Kühen mit Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE)*. Dissertation Universität Zürich. [1.7.4](#)
- Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P. and Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and prpsc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec* 142(21), 564–8. [1.8.2](#), [5.4](#)
- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 245(4), 362–74. [1.5.2](#)
- Schwille, P. (1997). *Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*. Dissertation Universität Carolo-Wilhelmina. [4.4](#)
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. and Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* 72(4), 1878–86. [3.9.4](#)
- Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26), 14279–84. [1.5.2](#)

- Scott, P. R., Aldridge, B. M., Clarke, M. and Will, R. (1989). Bovine spongiform encephalopathy in a cow in the united kingdom. *J Am Vet Med Assoc* 195(12), 1745–7. [1.8.2](#)
- Scott, P. R., Penny, C. D. and Sargison, N. D. (1995). Bovine spongiform encephalopathy in a holstein cow born in the united kingdom during september 1989. *Can Vet J* 36(5), 310–1. [1.8.2](#)
- Sigurdson, C.J. (1991). Epidemiology of scrapie in iceland and experience with control measures. In *Sub-acute spongiform encephalopathies*. (Bradley, R., Hrsg.). Commission of the EC. Kluwer Academic Dordrecht, NL. [1.7.3](#), [1.8.2](#)
- Skegg, D. C. (1996). Sacred cows, science and uncertainties. *Nature* 382(6594), 755–6. [1.7.4](#)
- Stahl, N., Boulton, T. G., Ip, N., Davis, S. and Yancopoulos, G. D. (1994). The tails of two proteins: the scrapie prion protein and the ciliary neurotrophic factor receptor. *Braz J Med Biol Res* 27(2), 297–301. [1.5.1](#)
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B. and Avraham, D. (1995). Cholesterol depletion and modification of cooh-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129(1), 121–32. [1.4.2](#)
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1994). Transmission of creutzfeldt-jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21), 9936–40. [1.5.2](#)
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric prp transgenes implicates the interaction of cellular prp with another protein. *Cell* 83(1), 79–90. [1.5.2](#)
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. and Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 176(1), 21–30. [1.4.1](#), [1.4.2](#)
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. and Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25), 14945–9. [1.4.2](#)
- Völkel, D., Zimmermann, K., Zerr, I., Bodemer, M., Lindner, T., Turecek, P. L., Poser, S. and Schwarz, H. P. (2001). Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic cjd or other neurologic diseases. *Transfusion* 41(4), 441–8. [5.2](#), [5.1](#), [5.4](#)
- Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J. and Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant creutzfeldt-jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358(9277), 171–80. [5.2](#), [5.1](#)

- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D. and Harris, D. A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* 275(11), 7455–8. [1.4.3](#)
- Weissmann, C. (1994). The prion connection: now in yeast? *Science* 264(5158), 528–30. [1.4.1](#), [1.1](#)
- Wells, G. (1996). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy. In *Bovine spongiform encephalopathy - the BSE dilemma*. (Gibbs, C., Hrsg.) S. 28. Springer New York. [1.7.4](#)
- Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., Chaplin, M. J., Stack, M. J. and Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (bse): an update. *Vet Rec* 142(5), 103–6. [5.4](#)
- Westphal, K.P. (1985). Computed tomography during creutzfeldt-jacob disease. *Neuroradiology* 27(362-364). [1.8.1](#)
- Wientjens, D. P. (1996). Risk factors for creutzfeldt-jacob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 46, 1287–1291. [1.7.3](#)
- Wilesmith, J. (1996). Recent observation on the epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. In *Bovine spongiform encephalopathy - the BSE dilemma*. (Gibbs, C., Hrsg.) S. 45. Springer New York. [1.7.4](#), [1.8.2](#)
- Wilesmith, J. W., Hoinville, L. J., Ryan, J. B. and Sayers, A. R. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. *Vet Rec* 130(10), 197–201. [1.7.4](#)
- Will, R. G., Ironside, J. W., Hornlimann, B. and Zeidler, M. (1996). Creutzfeldt-jakob disease. *Lancet* 347(8993), 65–6. [1.7.3](#)
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. and Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6), 3563–8. [5.4](#)
- Winklhofer, K. F., Hartl, F. U. and Tatzelt, J. (2001). A sensitive filter retention assay for the detection of prp(sc) and the screening of anti-prion compounds. *FEBS Lett* 503(1), 41–5. [5.2](#), [5.1](#)
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K. (2000). Nmr solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1), 145–50. [1.2](#), [1.5.1](#)
- Zeidler, M., Stewart, G. E., Barraclough, C. R., Bateman, D. E., Bates, D., Burn, D. J., Colchester, A. C., Durward, W., Fletcher, N. A., Hawkins, S. A., Mackenzie, J. M. and Will, R. G. (1997). New variant creutzfeldt-jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350(9082), 903–7. [1.8.1](#)
- Zerr, I., Bodemer, M. and Weber, T. (1997). The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy. *N Engl J Med* 336(12), 874; discussion 874–5. [1.8.1](#)

A Programmmlistings

A.1 Listing zur Histogrammerzeugung

Mithilfe dieses Listings können die Fluoreszenzfluktuationskurven des Confocor 1 in ein Histogramm überführt werden.

```
#!/usr/bin/perl

foreach (@ARGV)
{
    open (INPUT, $_);
    $count = 0;
    while (<INPUT>)
    {
        if ($count > 216)
        {
            print ;
        }
        $count++;
    }
    close (INPUT);
}
}
```

A.2 Listing zum Umgang mit Daten aus Rohdatenerfassungskarte

Dieses Programm wurde zur Analyse der Daten benutzt, welche mittels der Rohdatenerfassungskarte von Evotec aufgenommen wurden. Mit diesem Programm werden die Binärdaten in ASCII-Daten umgewandelt und ein Schwellenwert berechnet.

```

/*
 * BINAUSWERTUNG
 *
 *
 *
 * This program is free software, you can modify and redistribute it
 * under the terms of the GNU General Public License
 *
 * See the file COPYING on any GNU FTP mirror for details,
 * or contact the
 * Free Software Foundation at fsf@gnu.org.
 *
 * 00/07/15 initial version
 *
 */

#include <sys/stat.h>
#include <unistd.h>

#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <math.h>

void usage(char **argv)
{
    fprintf(stderr, "\n\t%s_(version_1.0)\n\n", argv[0]);
    fprintf(stderr, "usage:_%s_<options>_infile_<outfile>\n\n", argv[0]);
    fprintf(stderr, "  _valid_options:_-a_<ASCII>_:::source=ASCII\n");
    fprintf(stderr, "  _-w_<width>_:::histogramm_block_width\n");
    fprintf(stderr, "  _-m_<minimum>_:::minimum_from_which_will_be_count\n");
    fprintf(stderr, "  _-x_<maximum>_:::maximum_from_which_will_be_count\n");
    fprintf(stderr, "  _-p_<maximum>_:::point_for_regression_line\n");
    fprintf(stderr, "  _-c_:::convert_binary_data_to_ASCII\n");
    fprintf(stderr, "  _-t_<treshold>_:::_=threshold_copied_to_output\n");
    fprintf(stderr, "  _-f_<tracefile>_:::ASCII_data_points_output_file\n");

    fprintf(stderr, "  _-q_:::quiet_mode_\n\n");
    exit (1);
}

```

```

}

int main (int argc, char **argv)
{
    FILE *infile, * outfile, * tracefile ;
    char *infile, *outfile=NULL, *tracefname=NULL, option, *myname;
    int inflen, outflen=0, traceflen=0, filesize, point, npoints, i;
    int quiet=0, trace=0;

    int histwin=1, histmin=-1, histmax=-1,
    ascii=0, points=0, thresh=0, convert=0;
    int maxpoint, minpoint;

    int ynull;

    int wpx, dnum, maximum,poi;
    long sumx=0, sumx2=0;
    float sumy=0.0, sumxy=0.0;
    float b0, b1, count;
    float hist [256], histdata [256];

    float average, sigmasq, sigma, sumpoints, sumsquare, wpy;

    struct stat stat_buf;

    if (argc < 2) {
        usage(argv);
    }

    /* skip argv[0] */
    myname = argv[0];
    argc--;
    argv++;

    /*
     * chew down option list
     */
    while (argc > 0) {
        if (argv[0][0] == '-') {
            option=argv[0][1];
            switch (option) {
                case 'a':
                    /*
                     * using ascii files
                     */
                    argc--;
                    argv++;
                    ascii = 1;

```

```

break;
case 'w':
    /*
     * histogram width
     */
    argc--;
    argv++;
    if (sscanf(argv[0], "%d", &histwin) == 0) {
        histwin = 1;
        break;
    } else
        fprintf(stderr, "Using_histogram_width_%d\n", histwin);
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'm':
    /*
     * minimum
     */
    argc--;
    argv++;
    if (sscanf(argv[0], "%d", &histmin) == 0) {
        histmin = -1;
        break;
    }
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'x':
    /*
     * maximum
     */
    argc--;
    argv++;
    if (sscanf(argv[0], "%d", &histmax) == 0) {
        histmax = -1;
        break;
    }
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'p':
    /*
     * festlegen des "Point of Interest" an der die
     * Regression der Geraden (fuer Cut-Off) bestimmt wird
     */
    argc--;
    argv++;
    if (sscanf(argv[0], "%d", &poi) == 0) {

```

```

        poi = 1;
        printf("using_poi=1");
        break;
    } else
        fprintf(stderr, "Using_WPX=%d\n", poi);
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'q':
    /*
     * no yadda
     */
    quiet=1;
    argc--;
    argv++;
    break;
case 't':
    /*
     * set treshhold
     */
    convert=1;
    argc--;
    argv++;
    if (sscanf(argv[0], "%d", &thresh) == 0) {
        thresh = 0;
        printf("using_thresh=1");
        break;
    } else
        fprintf(stderr, "Using_tresh=%d\n", thresh);
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'c':
    /*
     * convert to ascii
     */
    convert=1;
    argc--;
    argv++;
    break;
case 'f':
    /*
     * set trace outfile name
     */
    convert=1;
    trace=1;
    argc--;
    argv++;

```

```
#if 0
```

A Programmmlistings

```
    if (sscanf(argv[0], "%s", tracefname) == 0) {
        tracefname = "trace.out";
        printf("using_trace_file_trace.out\n");
    } else
        fprintf(stderr, "Using_trace_file_%s\n", tracefname);
#else
    traceflen = strlen(argv[0]) + 1;
    tracefname = (char *) malloc(traceflen * sizeof(char));
    strcpy(tracefname, argv[0]);
#endif

    argc--;
    argv++;
    break;
case 'h':
    /*
     * damn the trolls
     */
    usage(&myname);
    /* NOTREACHED */
    break;
default:
    /*
     * confused
     */
    fprintf(stderr, "unknown_option!\n");
    argc--;
    argv++;
    break;
}
} else {
    break;
}
}

if (argc == 0) {
    usage(&myname);
}

/*
 * allocate stuff, open files
 */
inflen = strlen(argv[0]) + 1;
infname = (char *) malloc(inflen * sizeof(char));
strcpy(infname, argv[0]);

if (argc > 1) {
    outflen = strlen(argv[1]) + 1;
    outfname = (char *) malloc(outflen * sizeof(char));
    strcpy(outfname, argv[1]);
}
```

```

}

if (!quiet) {
    fprintf(stderr, "input_file:_%s\n", infname);
    if (outflen)
        fprintf(stderr, "output_file:_%s\n", outfname);
    else
        fprintf(stderr, "output_to_stdout\n");
}

if (( infile = fopen(infname, "r")) == NULL) {
    perror("could_not_open_input_file");
    exit(1);
}

if ( outflen && ((outfile = fopen(outfname, "w")) == NULL)) {
    perror("could_not_open_output_file");
    exit(1);
}

if (tracefname && ((tracefile = fopen(tracefname, "w")) == NULL)) {
    perror("could_not_open_trace_file");
    exit(1);
}

/*
 * figure out file size
 */

if (stat(infname, &stat_buf) != 0) {
    perror("infile_stat");
    exit(1);
}

filesize = stat_buf.st_size ;
npoints= filesize ;

if (!quiet) {
    fprintf(stderr, "Input_file:_%s,_size_%d_npoints_%d\n",
            infname, filesize , npoints);
}

/*
 * init stuff ...
 */
maxpoint = 0;
minpoint = 256;

```

```

sumpoints = 0.;
sumsquare = 0.;

memset(histdata, 0, 256*sizeof( float ));
memset(hist, 0, 256*sizeof( float ));

/*
 * read data, accumulate to histogram, record min/max
 */
for ( i=0; i<npoints; i++) {
    if ( ascii ) {
        if ( fscanf( infile , "%d\n", &point) == EOF) {
            break;
        }
        point /= 20;
    } else {
        if ( ( point = fgetc( infile )) == EOF) {
            perror("EOF_on_infile");
            break;
        }
        if (convert && point >= thresh)
            if ( trace)
                fprintf ( tracefile , "%d\t%d\n",i,point);
            else
                fprintf ( stdout, "%d\t%d\n",i,point);
    }
}

#if 0
    if (point > 255 || point < 0) {
        fprintf ( stderr , "data_point_out_of_range,_trying_ASCII!\n");
        ascii =1;
        break;
    }
#endif

/* Hier passiert 's*/
histdata[point]++;

/* damn lies */
sumpoints += point;
sumsquare += point*point;

if (maxpoint < point) maxpoint = point;
if (minpoint > point) minpoint = point;
points++;
}

```

```

/*
 * calculate average and standard deviation
 */
average = sumpoints / points;
sigmasq = (sumsquare - 2.*average*sumpoints +
           points*average*average)/(points - 1);
sigma   = sqrt(sigmasq);

/*
Maximalen Y-Wert bestimmen und Y-Werte logarithmieren
*/
maximum=0;
for (i=0; i<256; i++) {
    if (histdata[i]>0) {
        histdata[i]=log10(histdata[i]);
    }
    if (histdata[i] > histdata[maximum]) maximum=i;
}
maximum++;
if (!quiet) {
    fprintf(stderr, "Maximales_y_wert=%f\n", histdata[maximum]);
}

/*
 * Daten des Wendepunktes bestimmen
 * Y-Wert des WP ist Maximum/sqrt(e)
 */
wpy = histdata[maximum] * M_SQRT1_2; /* = max/sqrt(e) */

if (poi = 1) {
    for (i=maximum; i<256; i++) {
        if (wpy <= histdata[i] && wpy > histdata[i+1]) {
            wpx=i; /* x-Koordinate zu wpy */
        }
    }
} else {
    wpx=poi;
}

if (!quiet) {
    printf("Y-Wert_am_WP=%f\n", histdata[wpx]);
}

```

A Programmmlistings

```

/* Steigung am Punkt wpx bestimmen */

dnum = 4;
/* Anzahl der Punkte die links und rechts
 * von wpx aus beruecksichtigt werden sollen */
for (i=0; i<=2*dnum; i++) {
    sumx += wpx-dnum+i;
    sumy += histdata[wpx-dnum+i];
    sumx2 += pow((wpx-dnum+i),2.0);
    sumxy += histdata[wpx-dnum+i]*(wpx-dnum+i);
}

/*
 * b0: Achsenabschnitt der Ausgleichsgeraden,
 * b1: Steigung derselben
 */
b1 = (sumxy - ((sumx * sumy) / (float)(2*dnum+1) )) /
      (sumx2 - (pow(sumx,2.0)/(float)(2*dnum+1)));
b0 = (sumy - (b1 * sumx)) / (float)(2*dnum+1);

if (!quiet) {
    fprintf (stderr , "x-Wert_des_WP_...=%d\ ny-Wert_am_WP_...=%f\n",
              wpx, histdata[wpx]);
    fprintf (stderr , "min.:_%d,_max.:_%d\n", minpoint, maxpoint);
    fprintf (stderr , "average:_%f,_sigma:_%f\n", average, sigma);
}

/*
 * Bestimmung des x-Achsenabschnitts
 * Y=0 X=? Y=b1*X+b0 => X=ynull=(Y-b0)/b1
 */

ynull = (0-b0)/b1;

/*
 * integrate significant range with ynull as cut-off
 */
count = 0;
histmin = ynull;
histmax = maxpoint;
if (!quiet) {
    printf ("Using_min._%d_as_cut-off_\n", histmin);
}

```

```

for (i=histmin; i<=histmax; i++) {
    count += histdata[i];
}

/*
 * wichtige Daten fuer die Weiterverarbeitung uebergeben
 */
if (!convert){
printf("Number_of_points_after_cut-off=%f\n", count);
    /* Integrierte bins nach cut-off */
printf("Achsenabschnitt=%f\nSteigung=%f\n", b0, b1);
    /* Daten fuer Ausgleichsgerade */
printf("Geradengleichung_fuer_Gnuplot=%f*x+%f\n", b1, b0);
    /*Geradengleichung die an Gnuplot uebergeben wird */
}

/*
 * reduce histogram by binning into histwin wide classes
 */
for (i=0; i<=maxpoint; i++) {
    hist[i/histwin] += histdata[i];
}

/*
 * print histogram
 */
if (!convert) {
for (i=0; i<=maxpoint/histwin; i++) {
    fprintf(stdout, "bin_%d: %f\n", i*histwin+histwin/2, hist[i]);
}}

/*
 * done ...
 */
fclose ( infile );
if ( outflen )
    fclose ( outfile );

return 0;
}

```

A.2.1 Mehrerer Dateien gleichzeitig auswerten

Möchte man mehrere Dateien, die mit der Rohdatenerfassungskarte erstellt wurden, gleichzeitig auswerten, so hilft folgendes Listing. Dieses Listing erzeugt zudem zusätzlich

Diagramme der Fluoreszenzfluktuationen der einzelnen Messungen.

```
#!/bin/sh
#
# zuerst werden einige Unterprogramme (functions) definiert
#####
#
#####
# mehrere Originaldaten aufeinmal in ASCII-Files umwandeln
#####
#
function multibinauswertung (){
    nice -16 binauswertung -f $i.dat $i
}
#
# Aus ASCII-Files werden Postscript-Plots erstellt
#####
#
function createplots (){
    head -n4 ~/bin/defaultplots.txt | sed -e 's/dummy/'$i.ps'/ ' \
    -e 's/schrott/'$i.dat'/ ' > $i.out ; gnuplot $i.out
}
#
# PS-Dateien werden in JPGs mit ps2jpg umgewandelt
# JPGs werden skaliert und horizontal ausgerichtet
#####
#
function convertjpg (){
for i in $i.jpg; do nice -20 convert -rotate 90 -geometry
    60% $i 'echo $i | sed -e 's/.jpg/.new.jpg/';
done
}
#
#
#####
# hier gehts los, die Funktionen werden mit dem Parametern von der
# Eingabe gestartet, d.h. mit den uebergebenen Dateinamen
#####
#
for i in $*;do
#
# erstellen eines log-files
#####
    echo processing $i >> originaldatenverarbeitung.log
#
# Aufruf der Funktionen
#####
    multibinauswertung
```

```

createplots
nice -20 ps2jpg *.ps
convertjpg
#
#
# Entfernen der ueberfluessigen Dateien
#####
#
rm -f *.out
rm -f *.ps
rm -f *.dat
rm -f $i.jpg
done

exit 0

```

A.2.2 Graphische Darstellung des Histogramms

Dieses Listing erzeugt eine graphische Darstellung des ermittelten Histogramms, inklusive des eingezeichneten Schwellenwerts,

```

#!/bin/sh
#
# Skript zur Automatisierung der Auswertung binaerer Daten,
# die mit hochaufloesender Karte am FCS gemessen werden
#

mkdir ergebnis
#Datei in Variable einlesen
for datei in $*;

#binaeres Datenformat umwandeln und Auswertung einleiten
do
~/bin/binauswertung -q -t 50 $datei > ergebnis/$datei.dat

#Verteilung der Ergebnisse auf einzelne Files
# ".peaks" enthaellt die Anzahl der bins nach dem Cut-Off
# ".gleichung" enthaellt die Geradengleichung,
# ".hist" enthaellt das Histogramm

CUTOFF='grep cut-off= ergebnis/$datei.dat | sed 's/^.*= \?//''
GLEICHUNG='grep Gnuplot ergebnis/$datei.dat | sed 's/^.*= \?/plot /''

#Verteilen der Ergebnisse in einzelne Dateien
echo $CUTOFF > ergebnis/$datei.peaks
echo $GLEICHUNG > ergebnis/$datei.gleichung

```

```
grep bin ergebnis/$datei.dat > ergebnis/$datei.hist
```

```
#Gnuplot erstellen mit Histogrammdateien und Geradengleichung
```

```
echo "set title \" $datei\";" > ergebnis/temp.plt
echo "set xlabel \"bin\";" >> ergebnis/temp.plt
echo "set ylabel \"log H\";" >> ergebnis/temp.plt
echo "load \"ergebnis/$datei.gleichung\";" >> ergebnis/temp.plt
echo "replot \"ergebnis/$datei.hist\" using 2:4;" >> ergebnis/temp.plt
echo "set yrange [0:10];" >> ergebnis/temp.plt
echo "set terminal postscript;" >> ergebnis/temp.plt
echo "set output \"ergebnis/$datei.ps\";" >> ergebnis/temp.plt
echo "replot;" >> ergebnis/temp.plt
gnuplot ergebnis/temp.plt
rm ergebnis/temp.plt
```

```
done;
```

A.3 Analyse der 2D-Daten

Mit diesem Listing können die 2D-Dateien (2DCD*), die von der Software des Olympus 2-Strahl FCS erzeugt werden, in Dateien XYZ-Dateien umgewandelt werden. Diesen Dateien können dann in graphischen Analyseprogrammen, wie z. B. Origin oder PlotMTV, verwendet werden.

```
#!/bin/sh
# the next line restarts using cs_wish \
exec tclsh "$0" -- "$@"

set input [lindex $argv 1]
set output [lindex $argv 2]
set limit [lindex $argv 3]
puts $input
puts $output
puts $limit

set fid [open $input r]
set maxx 0
set maxy 0
set maxz 0
while {[gets $fid line] != -1} {
    set ok [regexp "([0-9]+)-([0-9]+)-([0-9]+)" $line match x y zz]
    if {$ok>0} {
        set z($x,$y) $zz
        # fuer eigene Skalierung
        set maxx $limit
    }
}
```

```

    set maxy $limit
    # fuer automatische Skalierung
    set maxz [expr {$zz>$maxz?$zz:$maxz}]
}
}
close $fid
puts "maxx=$maxx"
puts "maxy=$maxy"
puts "maxz=$maxz"
set max [expr {$maxx>$maxy?$maxx:$maxy}]

set fid [open $output w]
puts $fid "\$_DATA=CONTOUR_Name=$output"
puts $fid "\n%_toplabel=\ "$input\"""
puts $fid "%_ylabel=\ "Ab2 \[2\]"
puts $fid "%_xlabel=\ "Ab1 \[1\]"
puts $fid "%_zlabel=\ "frequency\[N\]"
#puts $fid "% grid"
puts $fid "%_equalscale"
#puts $fid "% contfill "
puts $fid "%_cmin=-1"
set dummy [expr {log10($maxz)}]
set cmax [expr {round($dummy/10.+5)*10}]
#set cmax [expr {round($maxz/10.+5)*10}]
puts $fid "%_cmax=$cmax"
puts $fid "%_cstep=0.1"
#puts $fid "% cstep=[expr {int($cmax/50.)}]"
puts $fid "\n%_xmin=0_xmax=$max_nx=[expr_{1+$max}]"
puts $fid "%_ymin=0_ymax=$max_ny=[expr_{1+$max}]"
#puts $fid "% zmin=0 zmax=$maxz"
puts $fid "%_zmin=-1_zmax=$dummy"

for {set x 0} {$x<=$max} {incr x} {
    # puts -nonewline $fid [format "%3d " $x]
    for {set y 0} {$y<=$max} {incr y} {
        if {[info exists z($x,$y)]} {
            #puts $fid "$z($x,$y) "
            set dummy [expr {log10($z($x,$y))}]
            puts $fid "$dummy_"
        } else {
            puts $fid "-1_"
        }
    }
}
}
puts $fid "\$_END"
close $fid

```

A.3.1 Mehrere 2D-Dateien gleichzeitig verarbeiten

Möchte man mehrere 2D-Dateien gleichzeitig verarbeiten, hilft folgendes Listing.

```
#!/bin/sh
# usage: CMD limit file
#
for i in $*;do
cp $i $i.tmp
2dfida $i.tmp $i.tmp.mtv $1
rm -f $i.tmp
done
```

A.3.2 Erzeugen von Tabellen aus 2D-Daten

Dieses Listing erzeugt eine Tabellen mit den Häufigkeiten aller angegeben Dateien. Dies vereinfacht die Handhabung bei der Datenanalyse.

```
#!/usr/bin/perl
#
#
$j=0;
foreach $foo (@ARGV) {
    $file [$j]=$foo;
    $j++
}
#
#
for ($i=0; $i<$j; $i++) {
    #print "open file $file [$i]\n";
    open (FILE, $file [$i ]) || die " $file [$i ]:_ $!";
    $k=0;
    while (<FILE>) {
        # $data[$i][$k]= $_;
        #($data[$i][$k]) = /\s(1)\s/;
        ($dummy,$schmock,$schrott) = split(/\s+/);
        $data[$i][$k]= $schrott;
        $k++;
    }
}
#
#
for ($l=0; $l < 256; $l++) {
    for ($i=0; $i<$j; $i++) {
        if ($data[$i][$l] eq "") {
            print "_0";
        }
    }
}
```

```
    } else {  
        print "$data[$i][$1]";  
    }  
}  
print "\n";  
}
```

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AD | Alzheimer Demenz |
| AS | Aminosäure |
| BSA | bovines Rinderalbumin |
| BSE | Bovine Spongiforme Enzephalopathie |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| CJD | Creutzfeldt-Jacob Erkrankung |
| CWD | Chronische Auszehrungskrankheit |
| Da | Dalton |
| d. h. | das heißt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| fCJD | Familiäre Creutzfeldt-Jacob Erkrankung |
| FCS | Fluoreszenz-Korreloations-Spektroskopie |
| FIDA | Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| Gl. | Gleichung |
| GPI | Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol |
| GSS | Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom |
| h | Stunde |
| H. Ä. | Hirn-Äquivalent |
| HH | Hirnhomogenat |
| iCJD | iatrogene Creutzfeldt-Jacob Erkrankung |
| i. c. | intra cerebral |
| IgG | Immunoglobulin G |
| i. p. | intra perental |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| min | Minute |
| mind. | mindestens |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| NaPi | Natrium-Phosphat-Puffer |
| NMR | Kernspinresonanz |
| nvCJD | neue Variante der Creutzfeldt-Jacob Erkrankung |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Pe | Pellet |
| PK | Proteinase K |
| PMSF | Phenylmethylen-sulfonylfluorid |
| PrP | Prionprotein |
| PrP ^C | zelluläres Prionprotein |
| PrP ^{BSE} | pathologische BSE-Isoform des Prionproteins |
| PrP ^{Sc} | pathologische Scrapie-Isoform des Prionproteins |
| rpm | Umdrehungen / Minute |
| rec PrP | rekombinantes Prionprotein |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| sCJD | spontane Creutzfeldt-Jacob Erkrankung |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SHa | syrischer Goldhamster |
| s. o. | siehe oben |
| s. u. | siehe unten |
| Tab. | Tabelle |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TSE | Transmissible Spongiforme Enzephalopathie |
| Tris | Tris-methylaminomethan |
| u. a. | unter anderen |
| Ü | Überstand |
| ü. N. | über Nacht |
| w/v | Anteil Gewicht vom Volumen |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, September 2002