

Nachweis einzelner pathologischer Proteinaggregate mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie als diagnostische Methode für BSE und Scrapie

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Eva Birkmann

aus Korschenbroich

Düsseldorf 2005

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf

Abgabedatum

Tag der mündlichen Prüfung

18. Juli 2005

Betreuer:

Prof. Dr. D. Riesner

2. Gutachter:

Prof. Dr. H. Bünemann

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf,

(Eva Birkmann)

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	1
1.3	Wichtige Formen von Prion-Krankheiten	2
1.3.1	Scrapie	2
1.3.2	Bovine spongiforme Enzephalopathie	3
1.3.3	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	4
1.3.4	Chronisch zehrende Krankheit	5
1.4	Natur des TSE-Erregers	6
1.5	Zelluläres Prion-Protein	6
1.6	Krankheitsassoziiertes Prion-Protein	7
1.7	Prion-Stämme	9
1.8	Replikationshypothesen	10
1.9	Artenbarriere	11
1.10	Erregerausbreitung	13
1.11	Diagnose von Prion-Krankheiten	14
1.11.1	Diagnose humaner Prion-Krankheiten	14
1.11.2	Histopathologische und Immunohistochemische Diagnose	15
1.11.3	Nachweis von Infektiosität	15
1.11.4	Molekulare Diagnose	15
1.12	Nachweis von Prion Aggregaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	17
1.13	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	21
	Umgang mit infektiösem Material	21
	Gewebematerial und aufgereinigte BSE-Proben	21
2.1	Chemikalien	22

2.2	Puffer und Lösungen	22
2.3	Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.4	Semi-Dry-Blot (Westernblot)	24
2.5	Dot-Blot	25
2.6	Immunologischer Proteinnachweis	25
2.7	Silberfärbung von Proteingelen	26
2.8	Homogenisierung von Hirngewebe	27
2.9	NaPTA-Fällung	27
2.10	Thioflavin-Test	27
2.11	Proteolyse mittels Proteinase K	28
2.12	Präparative Ultrazentrifugation	29
2.13	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	29
2.14	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	29
2.14.1	Prinzip der FCS-Messungen	29
2.14.2	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse	31
2.14.3	FIDA-Scanning	32
2.14.4	Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß	33
2.14.5	Zweifarbenganalysen (2D-FIDA)	34
2.14.6	Durchführung der FCS-Messungen	34
3	Ergebnisse	37
3.1	Untersuchungen zur Proteinase K - Resistenz von natürlichem und krankheitsassoziiertem Prion-Protein	37
3.1.1	Proteinase K - Konzentrationsreihen in Hirnhomogenat-Proben von Hamster und Rind	37
3.1.2	Untersuchung der Mengenvariationen an Proteinase K - resistenten PrP in Hirnhomogenaten von Hamster und Rind	40
3.2	Aufreinigung von pathologischem Prion Protein aus Hirngewebe ohne Proteolyse	41
3.2.1	Aufreinigung von PrP ^{Sc} aus Hamsterhirngewebe ohne Proteolyse	41
3.2.2	Aufreinigung von PrP ^{BSE} aus <i>medulla oblongata</i> – Gewebe des Rindes ohne Proteolyse	45
3.3	Etablierung einer FIDA-Auswertungsmethode	48
3.4	Screening verschiedener PrP-bindender Antikörper als Sonde zur Detektion pathologischer PrP-Aggregate via FIDA	50
3.5	Optimierung der Aufbereitung von Pelletfraktionen aus Aufreinigungen von pathologischem PrP aus Hirngewebe	52

3.6	Analyse von Scrapie- und BSE-Proben mittels 2D-FIDA	55
3.6.1	Analyse von PrP ^{Sc} -Proben und Negativkontrollen mittels 2D-FIDA	55
3.6.2	Analyse von PrP ^{BSE} -Proben und Negativkontrollen mittels 2D-FIDA	56
3.7	Entwicklung einer neuen Analysestrategie mittels Immobilisierung von pathologischen Prionaggregaten und Nachweis mittels 2D-FIDA	57
3.8	Beschichtung von Glasoberflächen mit Capture-Proteinen	58
3.9	Immobilisierung von pathologischen PrP-Aggregaten	59
3.10	Optimierung des Messansatzes von immobilisierten Aggregaten mittels 2D-FIDA	63
3.11	2D-FIDA-Reihenmessungen von PrP^{Sc} und PrP^{BSE} im Immobilisierungsansatz	65
4	Diskussion	69
4.1	Notwendigkeit einer neuartigen Diagnostik für Prion- Krankheiten	69
4.2	Notwendigkeit einer Diagnostik ohne Proteolyse als Voraussetzung einer Frühdiagnose	71
4.3	Der Aggregationszustand als geeigneter Parameter zur Diagnose von Prion-Krankheiten	73
4.4	Nachweis von PrP ^{Sc} und PrP ^{BSE} ohne Proteolyse mittels 2D-FIDA in Suspension	75
4.5	Entwicklung einer neuen Strategie zum Aggregatnachweis – SPILA (Single Particle Immunosorband Laserscanning Assay)	78
4.6	Anwendung von SPILA auf das Scrapie-Hamstermodell und Übertragung auf BSE	79
4.7	Potentialvergleich vom SPILA mit handelsüblichen BSE- Diagnostikverfahren	82
4.8	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CDI	konformationsabhängiger Immunotest
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD	Chronic Wasting Disease
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer
FIDA	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse eindimensional (1D) & zweidimensional (2D)
gÄ	Grammäquivalent
HH	Hirnhomogenat
NaPTA	Phosphorwolframat
PBS	Phosphatpuffer
PK	Proteinase K
PrP	Prion-Protein
PrP ^{BSE}	BSE-assoziierte Form des Prion-Proteins
PrP ^C	zelluläre Form des Prion-Proteins
PrP ^{CJD}	Creutzfeldt-Jakob-assoziierte Form des Prion-Proteins
PrP ^{CWD}	Chronic Wasting Disease-assoziierte Form des Prion-Proteins
PrP ^{Sc}	krankheitsassoziierte (im Speziellen: Scrapie-assoziierte) Form des Prion-Proteins
rekPrP	in <i>E. coli</i> exprimierte Form des Prion-Proteins
resPrP	Proteinase K-resistentes Fragment der krankheitsassoziierten Form des Prion-Proteins
sCJD	Sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
senPrP	Proteinase K-sensitive Form der krankheitsassoziierten Form des Prion-Proteins
SHa	syrischer Goldhamster
SPILA	Single Particle Immunosorbent Laserscanning Assay
TBST	Tris Buffered Sodium Tween
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
vCJD	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Unter Neurodegeneration versteht man das Absterben von Nervengewebe, insbesondere von Neuronen. Im engeren Sinne sind neurodegenerative Erkrankungen dadurch gekennzeichnet, dass der degenerative Prozess eigenständig und meist progressiv verläuft. Da der Verlust von Neuronen in der Regel irreversibel und daher besonders schwerwiegend ist, kommt es häufig zum selektiven Verlust funktioneller Strukturen z.B. des *nucleus caudatus* bei Chorea Huntington oder des dopaminergen Systems bei der Parkinson-Krankheit. Im Fall der Alzheimer-Erkrankung und der Prion-Krankheiten sind dagegen verschiedene Hirnbereiche betroffen.

1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Die übertragbaren (transmissiblen) spongiformen Enzephalopathien (TSE) sind eine besondere Gruppe von neurodegenerativen Krankheiten, da sie einen infektiösen Charakter aufweisen. Abgeleitet aus der außergewöhnlichen Form des Erregers (siehe Kap. 1.4) werden TSE auch als Prion-Krankheiten bezeichnet. Sie können bei Menschen und Tieren auftreten (Tab. 1.1). TSE sind durch eine lange Inkubationszeit gekennzeichnet, manifestieren sich in Symptomen wie Bewegungs- und Koordinationsstörungen sowie Demenz und führen schließlich zum Tod. Histopathologisch sind neben degenerativen Veränderungen der grauen Hirnsubstanz in Form von schwammartigen (spongiformen) Veränderungen häufig extrazelluläre amyloide Plaques zu beobachten. Die spongiformen Erscheinungen werden durch Vakuolisierung des Neuropils verursacht und gehen meist mit dem Verlust an Neuronen und der Schwellung von Astrozyten einher (Roberts & Clinton, 1992). Da Prion-Krankheiten nicht nur infektiös sondern auch spontan oder genetisch bedingt auftreten können, stellen sie eine außergewöhnliche Gruppe von Erkrankungen dar.

Tab. 1.1 Überblick über wichtige Prion-Krankheiten bei Mensch und Tier

Krankheit	Manifestation	Wirt	Erstmals beschrieben von
Scrapie (Traberkrankheit)	sporadisch, infektiös	Schaf, Ziege	J.G. Leopoldt, D
Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD)	sporadisch, genetisch, infektiös	Mensch	H.G. Creutzfeld, A. Jakob, D
Gerstmann-Sträussler- Scheinker-Syndrom (GSS)	genetisch, sporadisch	Mensch	J.G. Gerstmann & E. Sträussler, AUS
Kuru	infektiös	Mensch	V. Zigas, AUS, C. Gajdusek, USA
Chronic Wasting Disease (CWD)	infektiös	Hirscharten, Rentier	E.S. Williams, USA
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	genetisch	Mensch	E. Lugaresi, R. Medori & P. Gambetti, I
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	infektiös	Rind	G.A.H. Wells & J.W. Wilesmith, GB
Neue Variante der CJD (vCJD)	infektiös	Mensch	R. G. Will, UK

1.3 Wichtige Formen von Prion-Krankheiten

1.3.1 Scrapie

Scrapie ist eine Prion-Krankheit, die bei Schafen und Ziegen auftritt. Sie wurde bereits 1759 von dem Veterinärmediziner Leopoldt als Trab (später: Traberkrankheit) beschrieben. Scrapie tritt weltweit als Tierseuche in fast allen schafhaltenden Ländern auf. Bereits 1898 wurden erstmals pathologische Veränderungen im Hirn erkrankter Schafe entdeckt. Scrapie kommt in weiblichen wie männlichen Schafen vor und tritt überwiegend im Alter von zwei bis fünf Jahren auf (Dickinson, 1976; Sigurdson, 1991). Es wird vermutet, dass die meisten Infektionen während der Geburt, durch Hautläsionen oder Bindehäute aus dem infektiösen Fruchtwasser, oder unmittelbar nach der Geburt durch Verzehr der infektiösen Plazenta geschehen (Pattison *et al.*, 1974). Danach wäre das Alter der betroffenen Tiere beim Einsetzen der Symptome mit der Inkubationszeit mehr oder weniger identisch.

Die Symptome beinhalten Juckreiz, Bewegungsstörungen, Verhaltensänderungen und Zittern. Durch den stetigen Juckreiz scheuern bzw. kratzen sich betroffene Tiere bis zum Verlust der Wolle, wovon sich historisch der Name Scrapie (kratzen: engl. to scrape) ableitet (Abb. 1.1). Im weiteren Verlauf werden die Tiere nervös sowie aggressiv und trotz anhaltenden Appetits tritt häufig ein Gewichtsverlust auf.

Scrapie ist speziesübergreifend auf die Maus (Chandler, 1961) und auf den Syrischen Goldhamster (Marsh & Kimberlin, 1975) übertragbar. Experimente mit Mäusen und Hamstern sind wegen der viel kürzeren Inkubationszeit heute wesentliche *in vivo* Modellsysteme für die Grundlagenforschung an Prion-Krankheiten.

Eine Übertragung von Scrapie auf den Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Gemäß epidemiologischer Beobachtungen besteht selbst in Ländern mit intensiver Schafhaltung keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Scrapie und dem Vorkommen irgendeiner Form transmissibler spongiformer Enzephalopathien des Menschen.



Abb. 1.1 An Scrapie erkranktes Schaf

1.3.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Von besonderer ökonomischer Bedeutung ist die erstmals Mitte der 80iger Jahre aufgetretene **Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)**, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Verfütterung von nicht ausreichend dekontaminierten Schlachtabfällen Scrapie-infizierter Schafskadavern in Form von Tiermehl an Rinder zurückzuführen ist (Wells *et al.*, 1991).

Meist werden bei an BSE erkrankten Rindern zunächst Symptome wie Gewichtsverlust oder verminderte Milchleistung festgestellt. Später folgen Verhaltensstörungen, Bewegungsstörungen sowie Sensibilitätsstörungen. 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 Reize wie laute Geräusche und Licht. Beim Fortschreiten der Krankheit stellen sich motorische Störungen ein (Abb. 1.2). So haben betroffene Tiere oft Schwierigkeiten sich zu erheben (Wilesmith *et al.*, 1992). Das maximale Alter eines betroffenen Rindes, betrug 18 Jahre (Britisches Landwirtschaftsministerium), das minimale Alter belief sich auf 20 Monate (Bradley & Wilesmith, 1993), so dass die genaue Bestimmung der Inkubationszeit schwer einschätzbar ist. Die experimentell festgestellte Inkubationszeit bei oraler Infektion betrug im Mittel drei Jahre. Bei entsprechenden Versuchen wurde gezeigt, dass bei oraler Verabreichung ein Gramm Hirngewebe von BSE-erkrankten Kühen ausreichen, um ein Tier zu infizieren (Anderson *et al.*, 1996).

In Zusammenhang mit dem Auftreten von BSE wurde auch bei verschiedenen Zootieren, wie z.B. Antilopen und Großkatzen, Prion-Krankheiten beobachtet, die höchstwahrscheinlich ebenfalls durch Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl und Tierbestandteilen verursacht wurden (Sigurson & Miller, 2003).



Abb. 1.2 An BSE erkrankte Kuh

1.3.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die häufigste bei Menschen auftretende Prion-Krankheit ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD). Die Häufigkeit des Auftretens (Inzidenz) beträgt 0,3 bis 1,3 Fälle auf eine Million Einwohner pro Jahr. Sie kann sporadischen, familiären oder iatrogenen Ursprungs sein. Die sporadisch auftretende Form sCJD macht 80% bis 90% aller CJD-Fälle aus. Rund 10 % aller CJD-Fälle sind familiären Ursprungs (fCJD) und werden autosomal-dominant vererbt. Die seltenen iatrogenen Fälle (iCJD) als Folge „medizinischer Unfälle“ waren auf die Verwendung unzureichend dekontaminierten Operationsbestecks, die Verabreichung kontaminierter Wachstumshormone sowie Augenhornhaut (*Cornea*)- und Hirnhaut (*Dura mater*)-Transplantaten zurückzuführen (Brown *et al.*, 1994).

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 der elektrischen Hirnsignale im Elektroenzephalogramm (EEG) im Vergleich zu gesunden Menschen. Bei den Betroffenen treten die Symptome im Alter von 40 bis 80 Jahren auf (Roos *et al.*, 1973).

Ende 1996 wurde in Großbritannien erstmalig eine Variante der CJD (vCJD) identifiziert, welche jüngere Patienten im Alter von 20 bis 30 Jahren betraf und einen ungewöhnlichen klinischen Phänotyp aufwies. Hierbei traten psychiatrische Symptome früher auf und der klinische Verlauf war verlängert. Durch die lokale Häufung der vCJD-Fälle in Großbritannien, wurde vermutet, dass vCJD mit BSE in Zusammenhang stehen könnte (Abb.1.3) und womöglich durch den Verzehr von BSE kontaminierten Nahrungsmitteln verursacht wurde. Vergleichende Untersuchungen der Erreger, welche ergaben, dass sich die Erreger bei BSE und vCJD mehr ähneln als bei vCJD und CJD (Collinge *et al.*, 1996 b), unterstützen diese Vermutung. Zudem zeigten Makaken, die mit BSE infiziert wurden, ähnliche Läsionsmuster im Hirn wie Patienten, die an vCJD erkrankt waren (Lasmézas *et al.*, 1996).

Angaben zur Inkubationszeit liegen naturgemäß nur bei iCJD-Fällen vor. Bei direktem Kontakt des Hirns mit dem infektiösen Agens, z.B. durch neurochirurgische Instrumente beträgt die Inkubationszeit 15 – 18 Monaten, bei Transplantationen zwischen einem und 30 Jahren. Aufgrund der epidemiologischen Daten wird bei der vCJD eine minimale Inkubationszeit von 4,5 Jahren angenommen.

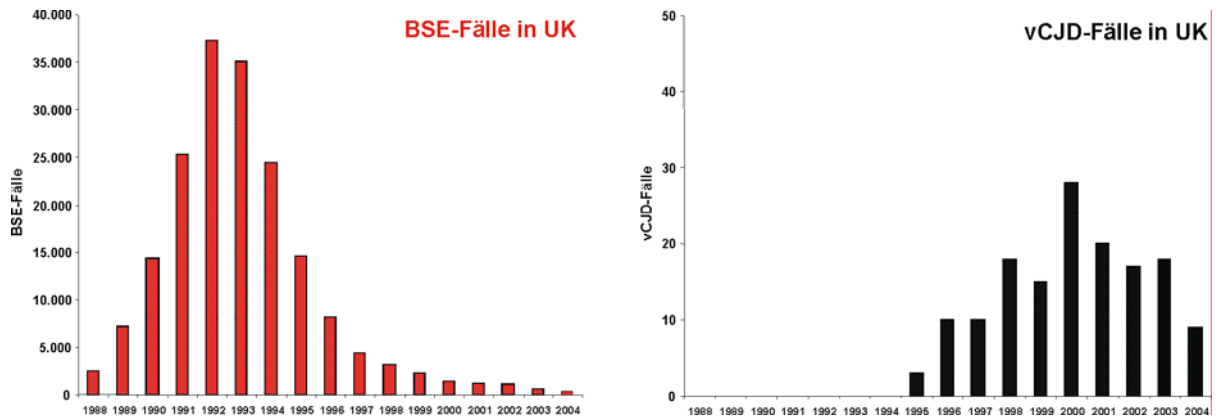


Abb. 1.3 BSE- und vCJD-Fälle in Großbritannien

Anzahl der gesicherten BSE- und vCJD-Fälle in Großbritannien (UK) im Verlauf von 1988 bis 2004

Quelle: für BSE-Fälle: OIE World Organisation for Animal Health, DEFRA (UK) – Stand 1/2005;

für vCJD-Fälle: UK Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit – Stand 1/2005

1.3.4 Chronisch zehrende Krankheit

Die chronisch zehrende Krankheit (chronic wasting disease, CWD) bestimmter nord-amerikanischer Hirscharten wurde erstmalig bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren beobachtet. Erwachsene Tiere litten an fortschreitendem Gewichtsverlust sowie Verhaltensstörungen (Abb. 1.4). Histopathologische Untersuchungen des Hirngewebes zeigten schließlich, dass es sich um eine Prion-Krankheit handelte. Seit 2000 hat das Thema in den USA und Kanada stark an Aktualität gewonnen, da immer mehr Fälle vor allem wildlebender Hirsche festgestellt wurden. In Wyoming wurden umfangreiche Studien getätigt, welche eine Inzidenz bei betroffenen Hirscharten von 1 - 6 % ergaben.

Erste Symptome konnten bereits bei ein- bis zweijährigen Tieren festgestellt werden, was auf eine minimale Inkubationszeit von 1,5 Jahren schließen lässt. Andererseits konnten Symptome bei einem bestimmten Hirsch erst im Alter von 15 Jahren beobachtet werden, wobei sich aber nicht ermitteln ließ, in welchem Alter sich das Tier infiziert hatte. Der klinische Verlauf der CWD ist variabel und dauert zwischen einigen Wochen und einem Jahr (zur Übersicht: Salman, 2003).



Abb. 1.4 An CWD erkrankte Hirschkuh

1.4 Natur des TSE-Erregers

Die Frage nach der Natur des TSE-Erregers wurde lange Zeit kontrovers diskutiert und konnte erst kürzlich abschließend geklärt werden. Die ersten Hypothesen gingen davon aus, dass es sich bei dem Erreger um einen Virus handelt, wobei der Begriff des „slow virus“ geprägt wurde (Gajdusek, 1977). Jedoch konnten weder Viren noch Viroide isoliert werden. Der Erreger besitzt eine ungewöhnlich hohe Resistenz gegen jede Art chemischer und physikalischer Verfahren (beispielsweise UV-Strahlung), welche Nukleinsäuren modifizieren oder zerstören (Alper *et al.*, 1967, Prusiner *et al.*, 1980, McKinley *et al.*, 1983). Schließlich konnte die Infektiosität durch protein-denaturierende Methoden inaktiviert werden (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner, 1982). Diese Ergebnisse ließen die Frage aufkommen, ob der Erreger zur Replikation ohne Nukleinsäuren fähig ist. Der Erreger erwies sich zusätzlich als besonders resistent gegen Proteolyse mit Proteinase K. Diese Eigenschaft war die Grundlage der gezielten Reinigung, woraufhin gezeigt werden konnte, dass die Hauptkomponente des Erregers aus Protein besteht (Prusiner *et al.*, 1980). Prusiner prägte daraufhin den Begriff „Prion“ abgeleitet aus „**proteinaceous infectious particle**“ (Prusiner, 1982). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Nukleinsäuren mit mehr als 50 Nukleotiden nicht in genügender Menge vorhanden war, um in jeder infektiösen Einheit überhaupt mit wenigstens einem einzigen Molekül vertreten zu sein (Kellings *et al.*, 1992).

Durch Proteinsequenzierung wurde ein körpereigenes Protein, codiert auf Chromosom 20 (Oesch *et al.*, 1985), als Hauptkomponente des Erregers identifiziert. Dieses 33 bis 35 kDa schwere Protein, welches auch im gesunden Organismus exprimiert wird, wurde daraufhin als Prion-Protein bezeichnet (PrP³³⁻³⁵). Die Prion-Proteine, die aus gesunden und kranken Tieren präpariert wurden, unterschieden sich weder in ihrer Aminosäure-Sequenz (Stahl *et al.*, 1993) noch in ihren posttranslationalen Modifikationen. Das Prion-Protein tritt demnach in zwei Isoformen auf, von denen die eine sowohl im gesunden als auch im erkrankten Tier vorhanden ist (PrP^C), während die andere Form strikt erregersassoziiert ist und als Scrapie-Isoform (PrP^{Sc}) bezeichnet wird.

1.5 Zelluläres Prion-Protein

In seiner zellulären Form kommt das Prion-Protein als membranassoziiertes Protein vor, welches über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran lokalisiert ist. 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). Da die größte Menge an PrP-mRNA in Nervenzellen vorliegt (Kretzschmar *et al.*, 1986), ist auch die PrP^C-Menge im Gehirn größer als in den anderen Organen. Relativ zu anderen Proteinen gesehen ist der PrP^C-Level im Gehirn allerdings gering. So macht PrP^C weniger als 0,1 % des Gesamtproteins des Zentralen Nervensystem (ZNS) aus (Oesch *et al.*, 1985; Turk *et al.*, 1988).

PrP besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen, welche nicht immer gleichermaßen besetzt sind, so dass eine heterogene Verteilung des Glykosylierungsmusters besteht. Das Molekulargewicht des zellulären PrP beträgt je nach Glykosylierung 33-35 kDa (Oesch *et al.*, 1985). Im N-terminalen Bereich besitzt das PrP acht Aminosäuren umfassende Wiederholungssequenzen (Oktarepeats). In den meisten Spezies treten fünf dieser Oktarepeats auf. Beim Rind wurden zwei verschiedene Sequenzen gefunden, wobei es sich einmal um fünf (Yoshimoto *et al.*, 1992) und einmal sechs Oktarepeats (Goldmann *et al.*, 1991) handelte.

Strukturell weist PrP^C hohe α -helikale Anteile (42%) auf (Pan *et al.*, 1993) und liegt in wässriger Lösung unter Einfluss vom milden Detergenzien in löslicher Form vor, wie es für Membranproteine zu erwarten ist.

Die natürliche Funktion des PrP^C ist bis heute noch weitgehend unklar. Da transgene Mäuse, bei denen das PrP-Gen homozygot deletiert wurde, lebensfähig sind und nur schwache Symptome zeigten (Bueler *et al.*, 1992), wurde dem Prion-Protein keine essentielle Funktion zugesprochen. Dennoch konnten bei PrP-knock-out-Mäusen eine Reihe von Funktionsänderungen diagnostiziert werden. Hierzu zählen leichte Veränderungen des Schlafrhythmus (Tobler *et al.*, 1996) und Ataxie bei älteren Tieren, die auf den Verlust von Purkinje-Zellen zurückzuführen waren (Sakaguchi *et al.*, 1996). Auch sind die Aktionspotentiale der Neuronen gegenüber denen normaler Mäuse verzögert (Collinge *et al.*, 1994) und der Cu-Gehalt im Hirn von transgenen Mäusen ist signifikant geringer als in Wildtyp-Mäusen. Zellkulturen zerebraler Zellen von knock-out-Tieren sind zudem weniger resistent gegen oxidativen Stress. Da PrP^C unter physiologischen Bedingungen 5-6 Kupferionen in der N-terminalen Oktarepeatregion binden kann (Miura *et al.*, 1999), lag die Vermutung nahe, dass PrP eine Funktion in der Regulierung des Kupferhaushaltes spielen könnte. Daraufhin konnte auch eine Superoxiddismutaseaktivität gezeigt werden, die 15 – 30 % der Aktivität bisher beschriebener Superoxiddismutasen besitzt (Brown *et al.*, 1999a).

1.6 Krankheitsassoziiertes Prion-Protein

Zelluläres PrP^C und krankheitsassoziiertes PrP^{Sc} sind hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung identisch (Stahl *et al.*, 1993). Es konnten jedoch Unterschiede in der Struktur sowie der physikalischen und biochemischen Eigenschaften gefunden werden. So bildet PrP^{Sc} unlösliche Aggregate, die sowohl amorph als auch in Form amyloider Fibrillen vorliegen können (Merz *et al.*, 1981). Die Infektiosität korreliert mit diesem aggregierten Zustand, da PrP^{Sc}, welches disaggregiert und in Lösung gebracht wird, seine Infektiosität verliert (Riesner *et al.*, 1996).

Die Primärstruktur von PrP^C und PrP^{Sc} ist identisch, jedoch konnten in vergleichenden Strukturuntersuchungen mittels Circular dichroismus und Infrarotspektroskopie deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur gezeigt werden. Während PrP^C einen großen α -helikalen Anteil besitzt, weist PrP^{Sc} einen verringerten α -Helix-Anteil (30%) und einen deutlich erhöhten β -Faltblattanteil von 43% auf (Pan *et al.*, 1993,

Safar *et al.*, 1993). PrP^C und PrP^{Sc} stellen demnach Konformationsisomere dar (Abb. 1.5).

PrP^{Sc} weist eine erhöhte Resistenz gegen Proteinase K (PK)-Verdauung auf. Während der Proteolyse durch Proteinase K wird ein ca. 68 Aminosäuren umfassendes N-terminales Fragment des PrP^{Sc} abgespalten. Der verbleibende Rest wird entweder aufgrund seines Molekulargewichts als PrP 27-30 oder aufgrund seiner Resistenz gegen proteolytischen Abbau als resPrP bezeichnet. Es bildet sehr regelmäßige amyloide Stäbchen (Prion-Rods) aus und ist weiterhin infektiös. PrP^C ist hingegen vollständig PK-sensitiv und wird innerhalb weniger Minuten zu kurzen Oligopeptiden abgebaut (McKinley *et al.*, 1983). Die PK-Resistenz wird in den meisten diagnostischen Testsystemen als Marker für krankheitsassoziiertes Prion-Protein eingesetzt. Von Safar und Kollegen (1998) konnte jedoch erstmalig pathologisches Prion-Protein nachgewiesen werden, welches nicht PK-resistent war (senPrP^{Sc}). Der Anteil dieses senPrP^{Sc} am gesamten pathologischen PrP variierte hierbei zwischen verschiedenen Hamster-Scrapie-Stämmen (siehe Kap. 1.7) zwischen 5% und 90%. Das bedeutet, dass in einigen Scrapie-Stämmen nur 10% des pathologischen Prion-Proteins auch PK-Resistenz aufweist. Ob senPrP^{Sc} auch infektiös ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

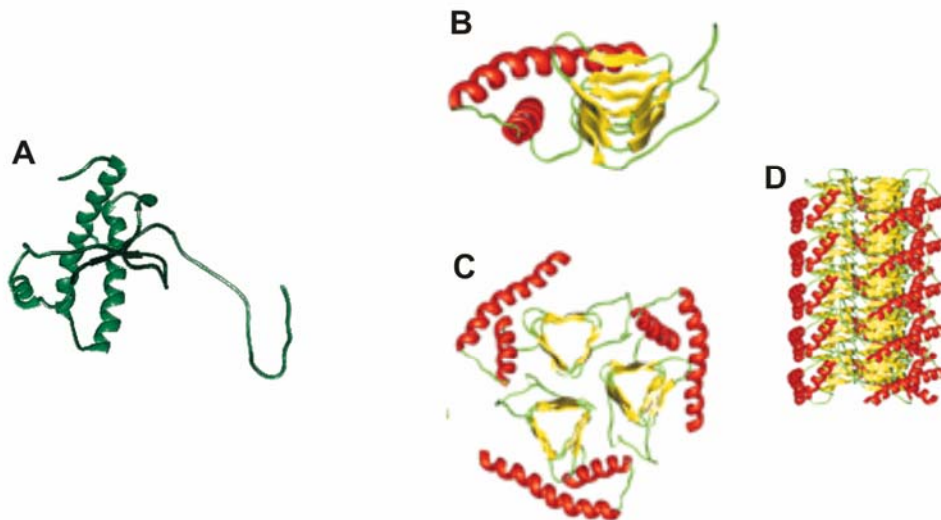


Abb. 1.5 Vergleich der strukturierten Core-Bereiche von PrP^C und PrP^{Sc}

A NMR-Struktur von rekombinatem SHa PrP (90-231) (verändert nach Liu *et al.*, 1999), welche allgemein als Struktur von PrP^C angenommen wird, da mittels Vergleich mit 1D-NMR-Spektren von natürlichem PrP^C aus Kälberhirn keine signifikanten Unterschiede ergaben (Hornemann *et al.*, 2004). **B** Modell der Struktur von PrP(27-30), welches auf elektronenmikroskopischen Daten von 2D-Kristallen beruht. **C** Es wird angenommen, dass PrP^{Sc} Trimere ausbildet, welche in der Lage sind, **D** Fibrillen zu bilden (Govaerts *et al.*, 2004).

In Tabelle 1.2 sind die wesentlichen biochemischen und strukturellen Unterschiede zwischen PrP^C und PrP^{Sc} zusammengefasst.

Tab. 1.2 Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Eigenschaft	Zelluläre Isoform (PrP ^C)	Scrapie Isoform (PrP ^{Sc})
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Protease K-Sensitivität	vollständig abbaubar	teilweise C-terminal resistent
Sekundärstruktur	überwiegend α - helikal	überwiegend β - Faltblatt
Löslichkeit	löslich in milden Detergenzien	unlöslich
Aggregationszustand	monomer	hochmolekulare Aggregate

In Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies aus der der Erreger stammt, wird die krankheitsassoziierte PrP-Isoform PrP^{Sc} bei Scrapie, PrP^{BSE} bei BSE und PrP^{CWD} bei CWD genannt.

1.7 Prion-Stämme

Bereits 1961 stellte man fest, dass sich die Erkrankungsformen bei den Wiederkäuern unterscheiden (Pattison, 1961). Die genauere Definition der Erregerstämme hat sich erst im Laufe der Jahre entwickelt. TSE-Erregerstämme lassen sich danach anhand von sieben Kriterien unterscheiden: Klinische Symptomatik, Inkubationszeit, Übertragbarkeit, histopathologische Läsionsprofile, Inaktivierungsverhalten, PK-Resistenz von PrP^{Sc} und resultierende Spaltstellen, sowie PrP^{Sc}-Glykosylierungsmuster. Als Erklärungsansätze für das Auftreten unterschiedlicher Scrapie-Stämme hat sich die Hypothese durchgesetzt, dass die Stammeigenschaften durch verschiedene Konformationen des Prion-Proteins in der krankheitsassoziierten Isoform begründet sind. Diese Hypothese wurde aus Ergebnissen des konformationsabhängigen Immunotests (CDI) abgeleitet (Safar *et al.*, 1998). Dieser Test macht sich die Zugänglichkeit eines konformationsabhängigen Epitops im PrP zu nutze. Die Bindung eines Antikörpers an dieses Epitop ist also von der jeweiligen Konformation des Prion-Proteins abhängig. Hierdurch konnten acht verschiedene, an den Syrischen Goldhamster adaptierte, Scrapie-Stämme unterschieden werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass PrP^{Sc} immer im aggregierten Zustand vorliegt, so dass die Zugänglichkeit der Epitope sich aus einer Kombination der Proteinkonformation und der sich ergebenden Wechselwirkungen durch den aggregierten Zustand zusammensetzt. Ein weiterer Befund des CDI ist, dass die verschiedenen Inkubationszeiten der Scrapie-Stämme mit der Abbaubarkeit des PrP^{Sc} im Gehirn negativ korreliert sind. Umso leichter also PrP^{Sc} abgebaut werden kann, umso länger sind die Inkubationszeiten.

Das Auftreten verschiedener Erregerstämme konnte auch für BSE gezeigt werden. Hier manifestierten sich die Unterschiede im Auftreten und der Verteilung von amyloiden Plaques sowie von verschiedenen Glykolisierungsmustern. Ein neuer von der bisher bekannten BSE unterscheidbarer Stamm wurde als BASE (**b**ovine **a**myloide

spongiforme encephalopathie) bezeichnet, da im Gegensatz zu bisher beschriebenen BSE-Charakteristika amyloide Plaques auftraten (Casalone *et al.*, 2004). Auch konnten zwei BSE-Stämme durch Infizierung von Mäusen mit Hirnhomogenat verschiedener an BSE erkrankter Rinder identifiziert werden. Die Unterschiede bestanden bei Inkubationszeiten, PrP-Glykolisierungsmustern und in der Histopathologie (Lloyd *et al.*, 2004).

1.8 Replikationshypothesen

Stanley Prusiner formulierte die Prion-Hypothese, welche besagt, dass das infektiöse Agens proteinartigen Charakter hätte, d.h. er postulierte ein oder mehrere Proteine als Hauptkomponente des Erregers (Prusiner, 1982). Nach Entdeckung der beiden Isoformen des Prion-Proteins wurde diese Hypothese dahingehend erweitert, dass die Replikation von PrP^{Sc} auf der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} beruht (Prusiner *et al.*, 1990). Danach ist ausschließlich das Prion-Protein in der PrP^{Sc} – Isoform Träger der Infektion und durch direkte Interaktion in der Lage, die Umwandlung von PrP^C in weiteres PrP^{Sc} zu katalysieren. Das Besondere an dieser Hypothese war, dass hier nach ein Krankheitserreger zur Replikation ohne codierende Nukleinsäure im Stande sein sollte.

Experimentelle Befunde, die für die Prion-Hypothese sprachen, festigten sich zunehmend. So sind PrP-knock-out-Mäuse (PrP^{0/0}) nicht mit Scrapie infizierbar und können die Krankheit auch nicht weitergeben (Bueler *et al.*, 1992). Dies bedeutet, dass sich der Erreger ohne endogenes PrP^C nicht replizieren kann. Als Erklärung für die erbliche Krankheitsform wurden in dem Zusammenhang Mutationen des PrP-Gens, die PrP^C destabilisieren und somit die spontane Umwandlung in PrP^{Sc} erleichtern, diskutiert. Bei Untersuchungen in dieser Richtung konnten eine ganze Reihe von Mutationen im PrP-Gen des Menschen nachgewiesen werden (Prusiner, 1997). Auch bei Schafen konnte ein Einfluss auf die Suszeptibilität für Infektionen mit Prionen durch Polymorphismen im PrP-Gen festgestellt werden (Belt *et al.*, 1995; O'Rourke *et al.*, 1997).

Um die Prion-Hypothese letztendlich zu beweisen, wurden vielfältige experimentelle Ansätze verfolgt, welche zum Ziel hatten *in vitro* nicht-infektiöses Prion-Protein in die infektiöse Form zu überführen. Kürzlich konnte tatsächlich gezeigt werden, dass es möglich ist, rekombinantes Prion-Protein (rekPrP) *in vitro* in eine infektiöse Form zu überführen (Legname *et al.*, 2004). Verkürztes rekPrP (AS 89-230) bildet in hohen Konzentrationen durch Inkubation unter teildenaturierenden Bedingungen fibrilläre Strukturen aus. Die auf diese Weise generierten rekPrP-Fibrillen wiesen eine geringe Infektiosität auf und wurden daher als „synthetische Prionen“ bezeichnet. Die geringen Infektiositätsdosen der synthetischen Prionen konnten allerdings lediglich in transgenen Mäusen, welche eine gleichermaßen verkürzte Form des Prion-Proteins überexprimierten, nach deutlich verlängerten Inkubationszeiten nachgewiesen werden. Nach einer zweiten Passage in Wildtyp-Mäuse, konnte dann aber nahezu kein Unterschied in der Inkubationszeit in Vergleich zu natürlicher Infektiosität festgestellt

werden. Hiermit wurde erstmalig ausschließlich mit nicht infektiösem Prion-Protein Infektiosität *in vitro* generiert.

Der genaue Mechanismus, durch den PrP^{C} in PrP^{Sc} konvertiert, ist bisher nicht genau bekannt. Es wurden jedoch zwei Modelle vorgeschlagen, das Heterodimer-Replikationsmodell und das Modell der keiminduzierten Polymerisation (Abb. 1.6).

Das Heterodimermodell besagt, dass PrP^{Sc} an eine destabilisierte Form von PrP^{C} (PrP^*) bindet, wodurch ein Heterodimer gebildet wird. Durch die Wechselwirkung wird die Umwandlung von PrP^* zu PrP^{Sc} induziert und es entsteht ein Homodimer. Nach Dissoziation stehen zwei PrP^{Sc} Monomere zur Katalyse weiterer Umwandlungen bereit (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994).

Nach dem Modell der keiminduzierten Polymerisation muss zunächst ein Polymerisationskeim gebildet werden oder exogen z.B. durch eine Infektion zugegeben werden, damit die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} thermodynamisch günstig wird und schnell ablaufen kann (Jarrett & Lansbury, 1993).

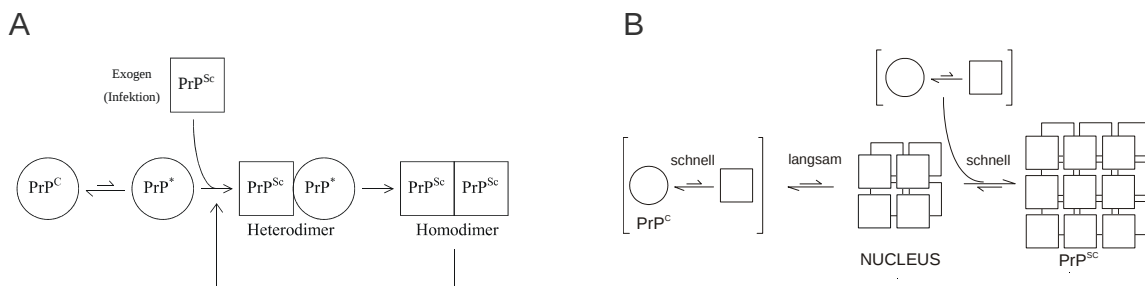


Abb. 1.6 Replikationsmodelle

A) Heterodimermodell nach Cohen *et al.* (1994)

B) Modell der keiminduzierten Polymerisation nach Jarret & Lansbury (1993)

1.9 Artenbarriere

Als Artenbarriere wird die relativ hohe Resistenz einer Spezies gegen die TSE-Erreger anderer Spezies bezeichnet. Diese Resistenz äußert sich in extrem langen Inkubationszeiten, welche z.T. länger sein können als die durchschnittliche Lebenszeit der Spezies, so dass es nie zum Ausbruch der Krankheit kommen kann. Untersuchungen der Spezies-Barriere führten zu der Annahme, dass die Interaktion zwischen den PrP-Molekülen eine entscheidende Rolle spielt, weil homologe PrP-Moleküle effizienter PrP^{Sc} bilden können als heterologe (Prusiner *et al.*, 1990). Bei Mäusen zum Beispiel lassen sich mit dem Hamster-Prion nur in seltenen Fällen Scrapie-Symptome auslösen (Priola & Chesebro, 1995). Transgene Mäuse, die statt der Maus-PrP-Sequenz die Hamster-PrP-Sequenz besitzen, erkrankten dagegen innerhalb von zwei Monaten nach Infektion mit dem Hamster-Prion (Scott *et al.*, 1989). Dies spricht dafür, dass die Spezies-Barriere in der Primärsequenz begründet ist.

Übertragungen über die Artenbarriere hinweg sind jedoch in vielfältiger Form möglich und an den Beispielen der Übertragbarkeit von BSE und Scrapie in Abb. 1.7 zusammengefasst.

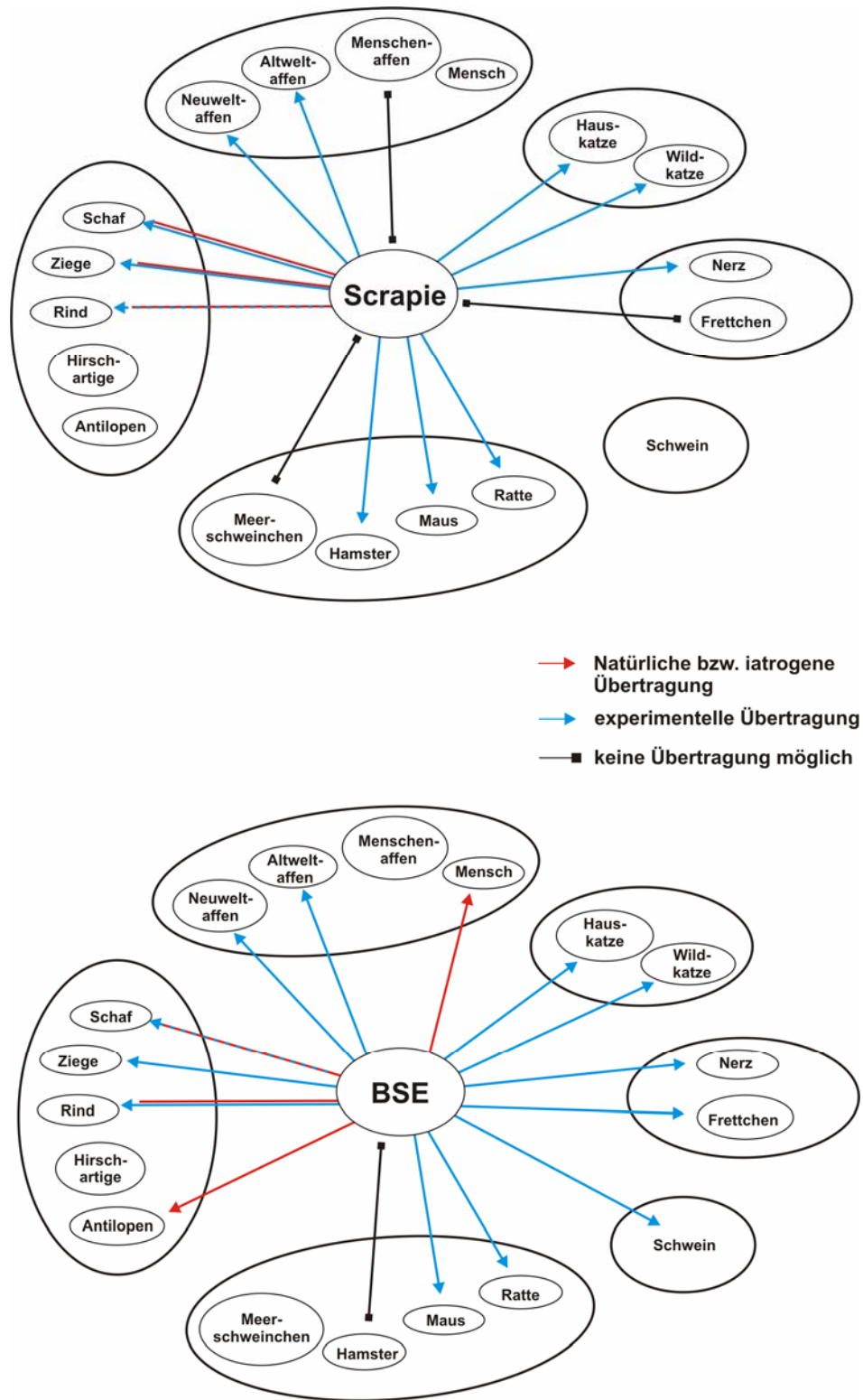


Abb. 1.7 Übersicht über verschiedene Formen der Übertragbarkeit von BSE und Scrapie

Die iatrogene und/oder natürliche Übertragbarkeit ist mit roten Pfeilen, die experimentelle mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Ein gestrichelter Pfeil steht für einen bisher nicht sicher nachgewiesenen Übertragungsweg. Ist die Übertragung auf eine Spezies unter experimentellen Bedingungen nicht möglich, so ist dies durch einen doppelt durchgestrichenen Pfeil dargestellt. (Abb. verändert nach Groschup in Hörnlimann, 2001)

1.10 Erregerausbreitung

Prion-Krankheiten sind zwar neurodegenerative Krankheiten, jedoch repliziert und akkumuliert PrP^{Sc} bei oraler Infektion im lymphatischen Gewebe früher im Krankheitsverlauf als im Zentralen Nervensystem (Aguzzi, 2003). Die Ausbreitung des Erregers verläuft über PrP^{C} -exprimierende Gewebe (Blättler, 1997). Bei oraler Infektion scheint der Erreger über den Darm, hier hauptsächlich durch die Peyer Plaques, adsorbiert und in die Blutbahn und die Lymphflüssigkeit zu gelangen. Von dort aus wird der Erreger in lymphatische und anderen Organe transportiert, wo PrP^{Sc} erstmalig repliziert und akkumuliert, bevor es über die peripheren Nerven ins Zentrale Nervensystem transportiert wird. Dieser Weg ist aus Infektiositätsstudien verschiedener Organe in unterschiedlichen Stadien des Krankheitsverlaufs ableitbar (Aguzzi, 2003; Kimberlin & Walker, 1989) (Abb. 1.8).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PrP^{Sc} -Oligomere in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke direkt zu passieren und somit sowohl ins Hirngewebe als auch in die Cerebrospinalflüssigkeit zu gelangen (Banks *et al.* 2004).

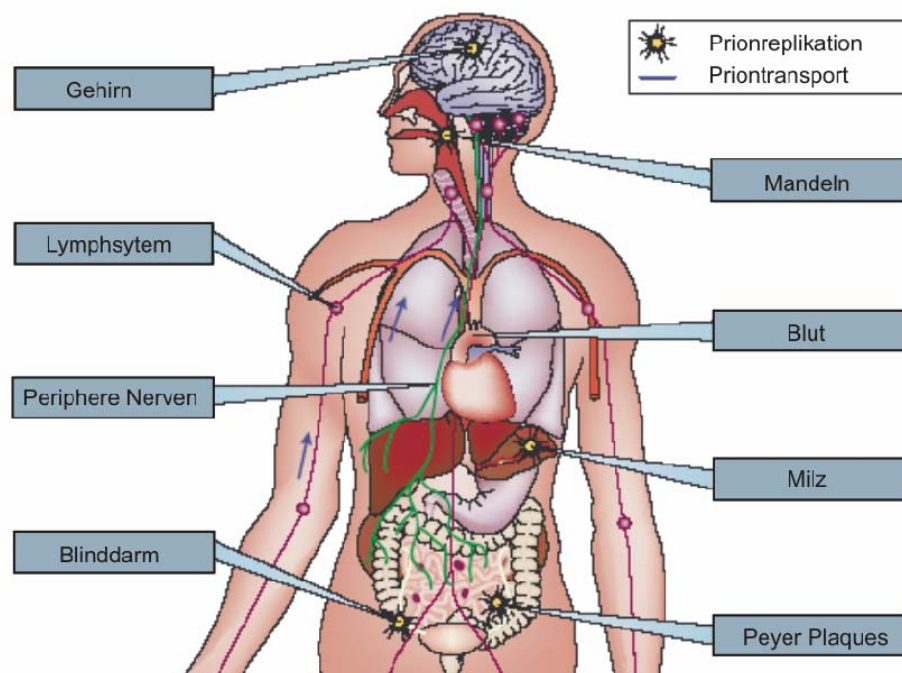


Abb. 1.8 Mögliche Transportwege von Prionen nach oraler Aufnahme

Oral aufgenommenes PrP^{Sc} wird vom Darm, dort hauptsächlich von den Peyers Plaques, adsorbiert und in die Blutbahn sowie in lymphathische Flüssigkeiten transportiert. Nach einem Replikationsschritt in peripherem Gewebe wie Milz, Blinddarm, Mandeln oder anderen Lymphgeweben, wird der Erreger meist über periphere Nerven ins Gehirn transportiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, das PrP^{Sc} direkt über die Blut-Hirnschranke ins Gehirn gelangt. (Abb. verändert nach Soto 2004)

Die periphere Ausbreitung des Scrapie-Erregers verläuft in verschiedenen Spezies und abhängig von der Infektionsroute 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 in Schafen erzielt worden. Hingegen finden sich bei experimentell oral mit BSE infizierten Rindern infektiöse Titer nur in den Peyers Plaques und nicht in Milz oder Lymphknoten.

Unabhängig von der Route, auf welcher PrP^{Sc} transportiert wird, ist unumstritten, dass infektiöses Erregermaterial in verschiedenen peripheren Organen und Körperflüssigkeiten enthalten sein kann (Übersicht: Soto 2004)

1.11 Diagnose von Prion-Krankheiten

Auch wenn es bisher keine Therapie für Prion-Krankheiten gibt, so ist es doch erforderlich diagnostische Ansätze zu entwickeln, um mögliche Übertragungspotentiale z.B. über Bluttransfusionen oder Transplantate ausschließen zu können, und somit gesunde Individuen zu schützen. Auch die Tatsache, dass Prion-Krankheiten zwar nur in eingeschränkter Form jedoch in nicht unerheblichem Maße über die Artengrenze übertragbar sind, macht eine verlässliche Diagnostik bei Tieren notwendig. Gerade das Auftreten der vCJD in Zusammenhang mit BSE zeigt, welche Gefahr von kontaminierten Nahrungsmitteln ausgeht (Kap.1.3.3). Hierbei sind Gefahrenpotenziale nicht nur in tierischen Nahrungsmitteln, sondern auch in pharmazeutischen Produkten zu sehen. So enthalten viele pharmazeutische Produkte 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 Glycerol und Fettalkohole eingesetzt. Diese werden aus Talg hergestellt, welcher gängigerweise durch Ausschmelzen von Schlachtabfällen gewonnen wird. Auch werden für die Produktion gentechnologisch synthetisierter Medikamente oft Rinderprodukte wie fötales Kälberserum oder Rinderalbumin gebraucht.

1.11.1 Diagnose humaner Prion-Krankheiten

Zurzeit gibt es keinen Test, um Prion-Krankheiten sicher und selektiv am lebenden Tier oder gar beim Menschen zu diagnostizieren. Beim Menschen werden Prion-Krankheiten normalerweise anhand der klinischen Symptome diagnostiziert und *post mortem* mittels histopathologischer Untersuchungen des Hirngewebes bestätigt.

Bisher ist PrP^{Sc} der einzig sichere Marker für Prion-Erkrankungen. Jedoch ist der direkte Nachweis von PrP^{Sc} in Körperflüssigkeiten mit den Standardnachweisverfahren noch nicht möglich. Es steht somit kein krankheitsspezifischer, einfach durchzuführender Test zur Verfügung. Ein Ansatz zur Diagnostik von sCJD besteht mit dem so genannten 14-3-3 Test, welcher einen Surrogatmarker, das 14-3-3 Protein, im Liquor nachweist (Hsich *et al.*, 1996). Dieser Ansatz erwies sich jedoch für die vCJD als nicht geeignet (Will *et al.*, 2000). Alle momentan bekannten Surrogatmarker sind Ausdruck eines neuronalen Untergangs oder einer Astrozytenaktivierung und können deshalb nicht allein zur Diagnose von humanen Prion-Krankheiten herangezogen

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

1.11.2 Histopathologische und Immunohistochemische Diagnose

Historisch betrachtet wurden die Prion-Krankheiten zunächst histopathologisch diagnostiziert. Die histopathologischen Besonderheiten sind u.a. die schwammartigen Veränderungen, welche beim Absterben der Neuronen durch Vakuolisierung entstehen, astrozytische Gliose und amyloide Plaques. Letztere treten jedoch nicht bei allen Prion-Krankheiten auf (Prusiner, 1998). Die Methodik lieferte fundamentale Ergebnisse für die gesamte Prionforschung, wie die Unterscheidung von Prion-Stämmen sowie den Zusammenhang von vCJD und BSE.

Die rein histochemischen Untersuchungen wurden, nachdem es hinreichend gute Antikörper gegen das Prion-Protein gab, durch die *in situ* Immunohistochemie ergänzt. Hiermit war es nicht nur möglich die Diagnose zu bestätigen, sondern auch die Verteilung von Plaques im Gehirn und lymphoiden Gewebe zu bestimmen. Die Immunohistochemie ist für die *post mortem* Diagnose sehr gut geeignet und kann infizierte Tiere eindeutig identifizieren. Jedoch ist die Methode sehr zeitaufwendig und somit für einen hohen Durchsatz nicht geeignet.

1.11.3 Nachweis von Infektiosität

Bis heute ist der Bioassay die einzige Methode, um Infektiosität direkt nachzuweisen. Somit ist der Bioassay für die Grundlagenforschung eine der wichtigsten Anwendungen. Die Nachteile für diagnostische Zwecke liegen auf der Hand. Trotz der Entwicklung von Tiermodellen wie transgenen Mäusen, welche PrP auch anderer Spezies überexprimieren, ist die Inkubationszeit des Bioassays bis zum eindeutigen Ergebnis sehr lang.

1.11.4 Molekulare Diagnose

Der einzige bisher bekannte spezifische Marker für alle Prion-Krankheiten ist PrP^{Sc}. Als Hauptkomponente des infektiösen Agents hat sich die molekulare Diagnostik auf PrP^{Sc} oder spezieller resPrP^{Sc} konzentriert. Die meisten routinemäßig eingesetzten Schnelltests nutzten demnach die partielle proteolytische Resistenz von PrP^{Sc} in Kombination mit immunologischen Nachweismethoden. Hierbei ist die Präparation der Proben ein kritischer Schritt, welcher großen Einfluss auf die diagnostische Sensitivität und Spezifität hat.

Eine andere Strategie ist der Nachweis von Surrogat-Markern, wobei zu Zeit jedoch noch umfangreiche Differenzialdiagnosen durchgeführt werden müssen. Somit konnte bisher keine selektive TSE-Diagnostik mittels Surrogatmarkern etabliert werden.

Momentan sind fünf Schnelltests zur BSE-Diagnostik von der europäischen Kommission zugelassen. Alle fünf basieren auf dem Nachweis von resPrP^{Sc} aus Hirnstamm- oder Rückenmarksgewebe.

- **Prionics-Check-Western**

Das resPrP^{Sc} wird im Prionics-Check Western (Prionics, Schweiz) mittels Western-Blot-Analyse mit anschließender immunologischer Umsetzung unter Einsatz des Anti-PrP-Antikörpers (6H4) detektiert. Als Kriterium für eine positive Probe wird das Auftreten eines PrP-immunoreaktiven Signals mit dem für PrP²⁷⁻³⁰ typischen Molekulargewicht und Drei-Banden-Muster herangezogen (Schaller *et al.*, 1999).

- **Enfer-Test**

Beim Enfer-Test handelt es sich um einen einfachen ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Das resPrP^{BSE} wird via ELISA mit polyklonalen Anti-PrP-Antikörpern und Enzym-gekoppelten Zweitantikörper analysiert. Die Detektion erfolgt mittels Chemolumineszenz (Moynagh & Schimmel, 1999).

- **Prionics-Check-LIA**

Der Prionics-Check LIA (Prionics, Schweiz) basiert auf einem Sandwich-ELISA aus resPrP^{BSE} und Anti-PrP-Antikörpern (6H4 und unbekannter Detektionsantikörper). Die Analyse erfolgt über Chemolumineszenz mit spezifischen Schwellenwert-Bedingungen (Biffiger *et al.*, 2002).

- **PLATELIA-Test**

Beim PLATELIA-Test (CEA/BioRad) erfolgt die Probenaufbearbeitung mittels Proteolyse gefolgt von Fällungs- und Zentrifugationsschritten. Diese dienen der Anreicherung von resPrP^{BSE}. Der Nachweis erfolgt über ein Sandwich-ELISA mit resPrP^{BSE} und zwei monoklonalen Anti-PrP-Antikörpern (Saf34 und 12F10). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt über eine Quantifizierung einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion mit spezifischen Schwellenwert-Kriterien (Grassi *et al.*, 2000).

- **Konformationsabhängiger Immunotest (CDI)**

Die Probenbehandlung beim CDI (Inpro, USA) erfolgt mittels Phosphorwolframat (NaPTA)-Fällung. Prinzipiell wäre keine Proteolyse nötig. Die aktuellen Protokolle beinhalten allerdings eine milde PK-Behandlung. Das Prinzip des CDI beruht auf der Bindungseffizienz eines PrP-konformations-spezifischen Antikörpers, welcher ein Epitop erkennt, das bei der PrP^C-Isoform sowie bei denaturiertem PrP exponiert wird, in der PrP^{BSE}-Isoform jedoch nicht. Die Quantifizierung der Bindungseffizienzen zwischen nativem und denaturiertem Zustand wird als Wert für den resPrP^{BSE}-Gehalt herangezogen (Safar *et al.*, 2002).

1.12 Nachweis von Prionaggregaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Grundlage für ein neues diagnostisches Verfahren wurde in unserem Labor entwickelt. Die Methode basiert auf der Detektion von Protein-Aggregaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Nachzuweisende Aggregate werden dabei durch Anlagerung von fluoreszierenden Sonden markiert. Im Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer (FCS) wird ein Laserstrahl in die zu messende Probe fokussiert. Dabei regt der Laserstrahl die Sonden zu starkem Fluoreszenzlicht an, welches mithilfe einer konfokalen Optik registriert wird. Aufgrund der optischen Eigenschaften des Systems ist ein Einzelmolekülnachweis der markierten Partikel möglich. Nicht gebundene Sonden, die aufgrund der hohen Beweglichkeit schnell durch den Laserstrahl diffundieren, strahlen nur geringe Fluoreszenz-Intensität mit hoher Fluktuationsrate aus, während Partikel mit mehreren gebundenen Sonden länger im Laserstrahl verweilen und dadurch eine lang anhaltende hohe Intensität so genannte Fluoreszenzpeaks oder Fluoreszenzburst ausstrahlen. Daher können die Partikel eindeutig erkannt und nachgewiesen werden. Das Verfahren konnte in unserer Arbeitsgruppe auf die Detektion von A β -Aggregaten angewandt werden, welche 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).

Anschließend wurde das System auf Prion-Partikel angepasst (Schäfer, 2002). Dazu wurde ein Messsystem genutzt, welches auf zwei Laser erweitert (2D-Analyse) war (FCS: Olympus 2-Strahl, Evotec, Hamburg) und eine Scanning-Einheit besaß. Die Scanning-Einheit ermöglicht es das konfokale Messvolumen durch die Probe zu bewegen und die Probe somit zu scannen. Die Nutzung des Zweistrahlensystems ermöglicht, dass zwei Sonden (im speziellen Fall zwei unterschiedliche Anti-PrP-Antikörper) mit verschiedenen antigenen Determinanten benutzt werden können und die gleichzeitige Bindung über Kreuzkorrelation der Signale bestimmt wird. Somit führen nur Signale zu einem positiven Ergebnis, wenn beide Sonden gleichzeitig an ein Partikel gebunden sind. Diese Analyse wird als 2D-Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (2D-FIDA) bezeichnet. Schäfer (2002) konnte somit durch 2D-FIDA unter Einsatz von aufgereinigtem resPrP^{Sc} aus Hirngewebe eine 100%ige Spezifität und Sensitivität bei der Diagnose von mit Scrapie-infizierten und gesunden Hamstern erreichen.

Versuche diese Methode zur Diagnose von CJD-Patienten zu nutzen, wobei Prion-Partikel in Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden sollten, führte jedoch nur zu einer Sensitivität von 20 % (Bieschke *et al.*, 2000).

1.13 Fragestellung

PrP^{Sc} ist das einzige Markermolekül für eine Erkrankung, welches bei jeder Form der TSE gefunden wurde. Somit ist es der einzig wirklich sichere Marker und für die Diagnose von Prion-Erkrankungen bestens geeignet. PrP^{Sc} liegt im infektiösen Gewebe immer in aggregierter Form vor. Andere Eigenschaften, welche oft zur Charakterisierung von PrP^{Sc} herangezogen werden wie z.B. die Proteinase K - Resistenz, sind nur teilweise mit der pathologische Isoform assoziiert (Safar *et al.*, 1998).

Um eine empfindliche Erkennung von Prion-Krankheiten realisieren zu können, muss sichergestellt werden, dass es bei der Präparation des zu untersuchenden Materials keine Verluste an pathogenem PrP^{Sc} gibt. Sämtliche zurzeit verwendeten BSE-Schnelltests nutzen als Hauptkriterium den Nachweis von Proteinase K (PK)-resistentem PrP. Die Menge des PK-resistenten PrP^{Sc} schwankt allerdings sehr stark - einerseits von Hirn zu Hirn, andererseits auch innerhalb eines Hirnes von Areal zu Areal (Safar *et al.*, 2005). Das bedeutet zwangsläufig, dass die Verwendung eines PK-Verdauungsschrittes bei der Aufreinigung von PrP^{Sc} im Speziellen von PrP^{BSE} zu einer nicht unerheblichen Verminderung der Sensitivität führt. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, PrP^{Sc} bzw. PrP^{BSE} unter Verzicht auf einen proteolytischen Schritt aus geeignetem Gewebe zu isolieren bzw. möglichst weit anzureichern.

Zum Nachweis des Aggregationszustandes stand die Methode der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) zur Verfügung. Diese Methode wurde in unsere Arbeitsgruppe auf den Nachweis von A β -Aggregaten im Liquor von Menschen und mittels Proteolyseschritt isolierten Prionaggregaten aus Hamsterhirngewebe, etabliert. Dabei wurden die Aggregate mit fluoreszierenden Sonden gemischt und in Suspension im Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer mittels FIDA untersucht. Nicht gebundene Sonden diffundieren schnell durch das konfokale Volumenelement und erzeugen dabei nur geringe Fluoreszenzintensitäten mit hohen Fluktuationsraten, während Aggregate mit einer Vielzahl gebundener Sonden länger verweilen und dadurch länger anhaltende hohe Intensitäten erzeugen. Mit diesem Ansatz kann der Aggregationszustand von Proteinen, als charakteristische Größe nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es nun, ein diagnostisches Verfahren für BSE zu entwickeln, welches es ermöglicht einzig anhand des aggregierten Zustands einzelne PrP^{Sc}-Partikel nachzuweisen, unabhängig davon, ob das PrP^{Sc} auch die Eigenschaft der PK-Resistenz aufweist. Dieser Ansatz sollte es ermöglichen, die Gesamtheit des pathologischen PrP nachweisen zu können, ohne auf den nicht PK-resistenten Anteil des PrP^{Sc} verzichten zu müssen. Weiterhin sollte es ermöglicht werden die Prion-Partikel einzeln zu detektieren und damit kein Summensignal über die komplette Probe zu messen. Somit würde theoretisch ein einziger pathologischer Partikel in der Probe ausreichen, um eine Infektion nachweisen zu können.

Um sich dem Ziel der BSE-Diagnostik zu nähern, sollte das Verfahren zunächst unter Verwendung von PrP^{Sc} aus Hamsterhirngewebe entwickelt und anschließend auf BSE übertragen werden.

2 Material und Methoden

Umgang mit infektiösem Material

Alle Arbeiten wurden im S2-Labor durchgeführt. Für alle Pipettierschritte mit infektiösem Material wurden „safe seal“-PCR-Spitzen (Biozym, Hessisch-Oldendorf) verwendet. Arbeiten mit infektiösem Material erfolgten ausschließlich unter der Werkbank (Hera safe, Kendro Laboratories). Probenträger für Messungen im Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer (FCS) wurden unter der Werkbank mit infektiösen Material befüllt und verschlossen.

Zur Dekontamination wurde der Festabfall in doppelte Lagen Polyamid-Vernichtungsbeutel (Greiner) für vier Stunden bei 134 °C in wassergesättigtem Dampf autoklaviert. Flüssigabfall wurde auf 2 M Natronlauge (NaOH) eingestellt, mindestens 24 Stunden inkubiert und anschließend mit Salzsäure (HCl) neutralisiert oder unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert.

Nicht autoklavierbare Geräte und Küvetten wurden für mindestens eine Stunde in 1 M NaOH eingelegt und dann mit 10 mM NaPi, pH 7,2 neutralisiert.

Gewebematerial und aufgereingte BSE-Proben

Hirngewebe von Scrapie-infizierten bzw. BSE-infizierten Tieren sowie nicht-infizierten Kontrolltieren wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

Tab. 2.1 Quellen der Gewebeproben

Material	Spezies	Institut
Hirngewebe	Syrischer Goldhamster	RKI Berlin, D (M. Beekes) & UCSF, San Francisco, USA (S. Prusiner)
<i>medulla oblongata</i> Gewebe	Rind	VLA Weighbridge, GB (R. Jackmann) & Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems
aufgereinigte BSE-Proben mit Negativkontrollen	Rind	VLA Weighbridge, GB (R. Jackmann)

2.1 Chemikalien

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

2.2 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphatpuffer)

0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH_2PO_4
8 g/l	NaCl
1,15 g/l	Na_2HPO_4

PBS wurde von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

NaPi (Natriumphosphatpuffer)

100 mM	Na_2HPO_4
100 mM	NaH_2PO_4

wurden durch Titration auf den pH-Wert von 7,2 eingestellt.

TBST (Tris Buffered Sodium Tween)

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
0,01 %	Tween 20

Bicarbonatpuffer (10x)

1 M	Na_2CO_3
1 M	NaHCO_3

wurden durch Titration auf den pH-Wert von 8,3 eingestellt.

2.3 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) in einer Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Fransisco, USA) mit vertikalen Plattengelen. Zunächst wurde ein 12%iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgegossen und ein 3%iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet.

Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 180 V und dann für ca. zwei bis drei Stunden bei 210 V. Zur Molekulargewichtsbestimmung der Probe wurde ein Marker mit Proteinstandard (Tab. 2.2) aufgetragen.

Acrylamid-Stammlösung (30 : 0,8)

30 %	Acrylamid
0,8 %	N,N'-Methylenbisacrylamid

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

10 x Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli

0,25 M	Tris/HCl pH 8,3
1,9 M	Glycin
ad 2 l	H ₂ O _{deion.}

Bei der Elektrophorese wurde eine 1:10-Verdünnung eingesetzt, der anschließend SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt wurde.

Trenngel

380 mM	Tris/HCl, pH 8,8
12 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)
0,1 %	SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 %	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
0,1 %	APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

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

Auftragspuffer nach Laemmli

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

Proteinstandard

Es wurde der Rainbow™ Molekulargewichtsmarker von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

Tab. 2.2 Molekulargewichte des Proteinstandards

gefärbte Proteine	Molekulargewicht [kDa]
Lysozym	14,3
Trypsin-Inhibitor	20,1
Carboanhydrase	30,0
Ovalbumin	45,0
Rinderserumalbumin	66,0
Phosphorylase b	97,0
Myosin (H-chain)	220,0

2.4 Semi-Dry-Blot (Western-Blot)

Beim Western-Blot werden die Proteine nach SDS-PAGE (Kap. 2.3) auf eine Polyvinylfluorid- (PVDF)-Membran übertragen. Hier wurde eine PVDF-Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg) mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet, was einem Ausschlussvolumen von > 10 kDa entspricht. Das Trenngel, sechs Chromatographiepapiere (Whatman, 3MM Chr) und die ethanolgetränkte PVDF-Membran wurden in Laemmli-Puffer ohne SDS geschwenkt. Die „Semi-Dry Electrophoretic Transfer cell“ (Biorad, Hercules, USA) wurde in der folgenden Reihenfolge von der Kathode zur Anode aufgebaut: drei Chromatographiepapiere – PVDF-Membran – Gel – drei Chromatographiepapiere. Der Transfer wurde für eine Stunde bei 1,5 mA/cm² und maximal 25 V durchgeführt.

2.5 Dot-Blot

Beim Dot-Blot Verfahren werden die Proben unter Vakuum auf eine Polyvinylfluorid-(PVDF) Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Durch ein an die Dot-Blot-Apparatur mit 96 Probenlöchern (S&S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) angelegtes Vakuum wurden die Proben auf die Membran gesogen. Zuvor wurde die Membran mit Ethanol getränkt und zusammen mit einem Chromatographiepapier in TBST-Puffer geschwenkt. Der Aufbau der Apparatur bestand aus unterer Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen Lochplatte. In die Probenlöcher wurden zunächst 100 µl H₂O_{deion.} vorgelegt und anschließend die Probe aufgetragen. Durch das Vakuum wurden die Proben durch die Membran gesogen, wobei die Proteine auf die Membran übertragen wurden. Anschließend wurde einmalig mit H₂O_{deion.} gespült, so dass keine Probe an der Wand verblieb. Die Detektion der Proteine erfolgte durch den in Kapitel 2.6 erläuterten immunologischen Nachweis. Da für die Antikörpererkennung eine Denaturierung der Proteine nötig ist, wurde die Membran fünf Minuten in 1%iger KOH-Lösung geschwenkt.

2.6 Immunologischer Proteinnachweis

Zunächst wurden verbleibende freie Bindeplätze für Proteine auf der PVDF-Membran durch Schwenken der Membran in 5 % Milchpulver (Oxiod, Hampshire, England) in TBST-Puffer für eine Stunde (optional ü. N.) abgesättigt. Die Membran wurde dann kurz mit TBST-Puffer gewaschen.

Für den spezifischen Proteinnachweis wurden die in Tab. 2.3 aufgelisteten Antikörper (AK) in den angegebenen Verdünnungen in gelöst TBST-Puffer verwendet. Die Membran wurde zwei Stunden (optional ü. N.) in der Erstantikörper-Lösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde zwei mal zehn Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für ein bis zwei Stunden in der entsprechenden Zweitantikörper-Lösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Daraufhin erfolgte zweimaliges Waschen mit TBST-Puffer für je dreißig Minuten, um die Membran von ungebundenem Zweitantikörper zu befreien.

Tab. 2.3 Antikörper zum Nachweis denaturierter Prion-Proteine im Blot-System

Protein	Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
bovines PrP	6H4 ^{*1}	1:5.000	RAM ^{*3}	1:5.000
SHa PrP	3F4 ^{*2}	1:10.000	SAM ^{*4}	1:10.000

^{*1} 6H4 (Prionics; Schweiz)

^{*2} 3F4 (Kasscak *et al.*, 1987)

^{*3} RAM: Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus AK (ICN Biomedicals, Inc, Aurora, Ohio)

^{*4} SAM: Peroxidase-gekoppelter Schaf-anti-Maus AK (Amersham, Chalmont, GB)

Der Nachweis erfolgte mittels Chemolumineszenz-Reaktion (Abb. 2.1). Hierzu wurde die Membran für eine Minute mit dem ECL-PlusTM-Detektions-Reagenz (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) benetzt. Hierbei wird durch die Zweitantikörper-

gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol im alkalischen Medium katalysiert. Luminol zeigt bei alkalischer Oxidation mit H_2O_2 starke Lumineszenz. Die Lumineszenz wurde nach einer Expositionszeit von 30 Sekunden bis zehn Minuten mit Röntgenfilmen (HyperfilmTM ECL, Amersham, Buckinghamshire, GB) detektiert.

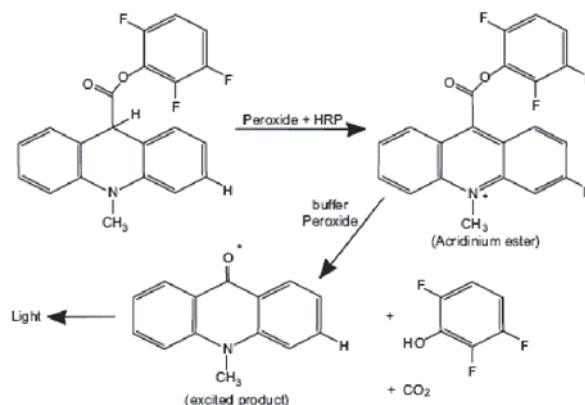


Abb. 2.1 Chemolumineszenzreaktion

Reaktionsmechanismus für den immunologischen Proteinnachweis

2.7 Silberfärbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Silberfärbung von Proteingelen nach Heukeshoven und Kollegen (1986) kann eine Nachweisempfindlichkeit von 50 ng Protein pro Bande erreicht werden. Die Silberfärbung ermöglicht eine qualitative, jedoch keine quantitative Aussage über die nachgewiesenen Proteine zu.

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

2.8 Homogenisierung von Hirngewebe

Bei Verwendung von Hamsterproben wurde das komplette Hirn homogenisiert. Sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt und die Puffer auf 4 °C vorgekühlt. 4 ml PBS mit Proteinase-Inhibitor-Mix (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) wurden auf ein Gramm Hirngewebe gegeben und 30 Sekunden mittels Homogenisator (PowerGen 125, Fisher Scientific) auf der niedrigsten Leistungsstufe und anschließend noch zweimal 30 Sekunden auf der höchsten Leistungsstufe homogenisiert. Anschließend wurden 5 ml PBS mit 4 % Sarkosyl auf das Homogenat gegeben und weitere drei mal für 30 Sekunden auf der niedrigsten Leistungsstufe des PowerGen-Homogenisators homogenisiert, so dass ein 5%iges Hirnhomogenat (w/v) in PBS mit 2 % Sarkosyl resultierte. Das Homogenat wurde eine Minute bei 5.000 x g zentrifugiert, um grobe Gewebefragmente abzutrennen. Der Überstand wurde als Hirnhomogenat eingesetzt.

Bei Rinderhirnproben wurde nur die *medulla oblongata*, auch als verlängertes Rückenmark bezeichnet, verwendet. Die *medulla oblongata* ist der letzte Teil des Gehirns, der in das Rückenmark übergeht. Die Homogenisierung wurde analog der Hamsterproben durchgeführt, nur wurde PBS mit 8 % Sarkosyl anstatt mit 4 % eingesetzt, so dass ein 5%iges Homogenat (w/v) in PBS mit 4 % Sarkosyl resultierte.

Die Homogenate wurden entweder direkt verwendet oder bei -70 °C gelagert.

Als einheitliche Größe zur Bestimmung der eingesetzten Hirnmenge wird im Folgenden die Einheit Gramm-Äquivalent (gÄ) benutzt. Ein Gramm-Äquivalent entspricht der Menge, welche zuvor äquivalent zu einem Gramm Hirn-Gewebe war.

2.9 NaPTA-Fällung

Die Aufreinigung mittels NaPTA-Fällung erfolgte in modifizierter Weise nach dem Protokoll von *Safar und Kollegen* (1998). Für die NaPTA-Fällung wurden 500 µl Hirnhomogenat auf 50 U/ml Benzonase (Merck, Darmstadt) und 1 mM MgCl₂ eingestellt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat auf 0,25 % NaPTA (Phosphotungstic acid sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 10,6 mM MgCl₂ eingestellt und im Fall von Hamsterproben über Nacht, bei Rinderproben für vier Stunden bei 37°C geschüttelt. Der Fällungsansatz wurde anschließend für 30 min bei 14.000 x g zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Das Pellet wurde mit 200 µl PBS 250 mM EDTA pH8 bei 37°C für 30 min geschüttelt und anschließend bei 14.000 x g für 30 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt kann optional mit PBS 50 mM EDTA 0,1 % Sarkosyl wiederholt werden.

2.10 Thioflavin-Test

Thioflavin T (ThT - Abb. 2.2 A) ist ein ursprünglich in der Histologie genutzter Thiazol-farbstoff. Zu den färbbaren Strukturen gehören Mucopolysaccharide, Nukleinsäuren und insbesondere eine Reihe von Einschluss-Strukturen amyloider Fibrillen. ThT weist dabei durch die Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Ände-

rungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese zeigen sich durch batho- und hyperchrome Verschiebungen der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber dem freien Farbstoff (Abb. 2.2 B-C) (LeVine, 2003).

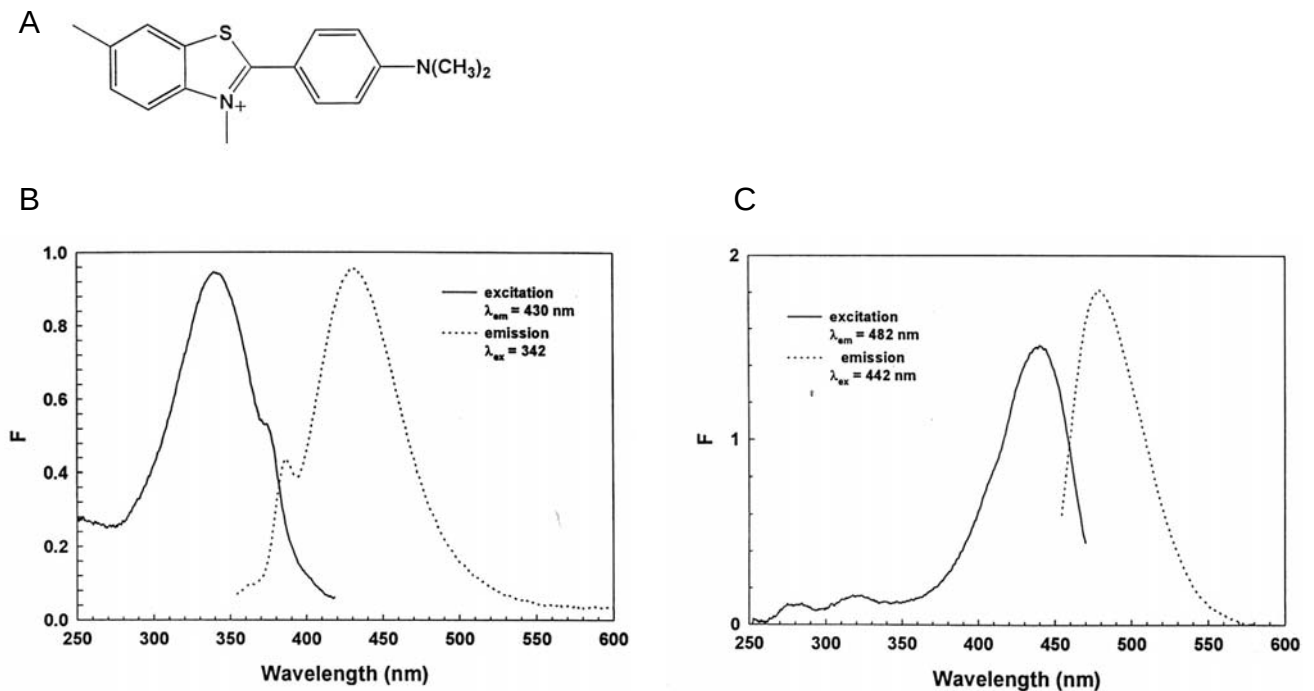


Abb. 2.2 Thioflavin-Test

- A) Struktur von Thioflavin T
- B) Fluoreszenzspektrum von freiem ThT
- C) ThT/Fibrillen-Komplex

Zur Charakterisierung der mittels NaPTA-Fällung aufgereinigten Proben wurden $2,5 \times 10^{-2}$ gÄ in PBS suspendiert und in den Thioflavin-Test eingesetzt. Dazu wurden die Proben in einer 96-Well-Platte auf 5 μ M Thioflavin eingestellt und Fluoreszenzspektren (Excitation: 445 nm; Emission: 455-660 nm) im Fluorimeter Tecan SAFIRE (Tecan GmbH, Crailsheim) aufgenommen.

2.11 Proteolyse mittels Proteinase K

Zur Bestimmung des Anteils Proteinase K-resistenten PrPs wurde die jeweilige Probe soweit nicht anders beschrieben auf eine Proteinase K - Konzentration (Boehringer Mannheim GmbH) von 5 μ g/ml eingestellt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe dem der Probe entsprechenden Volumen Auftragspuffer mit 5 mM PMSF und fünfminütiges Kochen gestoppt.

2.12 Präparative Ultrazentrifugation

Proteinaggregate können mittels eines Saccharose-Gradienten nach ihrer Dichte getrennt werden. Hierzu wurde in einem Zentrifugen-Röhrchen (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, USA) ein Saccharose-Gradient stufenweise mit je 300 µl Saccharose-lösung mit 45 % - 30 % - 25 % - 20 % -15 % - 10 % hergestellt und mit der Probe überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für eine Stunde bei 4°C bei 200.000 x g (TLS-55 Rotor, Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge, Palo Alto, USA). Im Anschluss wurde der Gradient zu Proben mit einem Volumen von je 200 µl fraktioniert abgenommen und untersucht. Die Saccharosekonzentrationen der resultierenden Fraktionen wurden mit Hilfe eines Refraktometers (Bausch und Lomb, USA) bestimmt.

2.13 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen erfolgte über eine kovalente Bindung des Succinimidylesters des Farbstoffs an freie Aminogruppen. Als Farbstoff dienten Alexa-488 und Alexa-633 (Molecular Probes, Oregon, USA).

Im Markierungsansatz wurden 25 bis 50 µg Protein (hier ganze Antikörper oder Fab-Fragmente) und 5 µg Fluoreszenzfarbstoff (hier Alexa 488 und Alexa 633) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 10x Bicarbonatpuffer auf 1x Bicarbonatpuffer eingestellt. Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei der Reaktionsansatz mehrfach gemischt wurde. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Abtrennung des freien Farbstoffs erfolgte mittels Größenausschlußverfahren in Zentrifugenröhrchen (Biomax Ultrafree, 10 kDa, Millipore, Bedford, USA) durch Zentrifugationsschritte bei 14.000 x g und 10 °C für jeweils 1,5 Stunden. Diese enthalten Membranen mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa. Beim Größenausschlußverfahren passiert der freie Farbstoff die Membran, während die markierten Proteine zurückgehalten werden. Der Ansatz wurde achtmal mit jeweils 450 µl 100 mM Natriumbicarbonatpuffer pH 8,3 gewaschen.

2.14 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

2.14.1 Prinzip der FCS-Messungen

Das analytische Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde vor mehr als 25 Jahren entwickelt (Ehrenberg & Rigler, 1976). Mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie kann man die Diffusionszeit von autofluoreszenten oder fluoreszenzmarkierten Molekülen in Lösungen geringer Konzentration (im nanomolaren Bereich) bestimmen. Basierend auf den Diffusionszeiten kann auf das Molekulargewicht der Moleküle oder Aggregate zurückgeschlossen werden. Das Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie greift auf eine statistische Auswertung von Fluoreszenzfluktuationen zurück, welche auf der Brownschen Molekularbewegung beruhen.

In einem Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer (FCS) wird ein Laser über einen Farbteiler in die Probe fokussiert. Die Fluorophoren, im Idealfall genau eins, die sich zu diesem Zeitpunkt in dem ausgeleuchteten Volumenelement befinden, werden angeregt. Die Fluoreszenz, die zurückgestrahlt wird, kann über einen Photomultiplier detektiert werden. Mit Hilfe der konfokalen Abbildungstechnik wird das detektierte Fluoreszenzlicht durch eine Lochblende auf ein kleines Volumen von weniger als einem Femtoliter beschränkt. Dies entspricht etwa dem Volumen einer *E. coli*-Zelle. Die Fluoreszenzintensität im Beobachtungsvolumen wird in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Somit kann die Diffusion der Moleküle in Form von Fluoreszenzfluktuationen beobachtet werden. Aus dem Intensitätssignal lässt sich anhand der Aufenthaltssdauer des Teilchens im Beobachtungsvolumen die Diffusionszeit berechnen und aus der Amplitude die Anzahl der Teilchen bestimmen. Diese Werte werden mit Hilfe der statistischen Methode der Autokorrelation berechnet. Die Autokorrelationsfunktion (Gl. 2.1) stellt die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität als Funktion der Diffusionszeit und der Partikelzahl dar. Bei der Korrelationskurve wird die Korrelation gegen die Zeit aufgetragen. Die Diffusionszeit kann aus der halben Höhe abgelesen werden (Abb. 2.3).

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau}{k^2 \cdot \tau_{diff}}} \right)$$

mit

- k = Strukturparameter (Verhältnis von Radius und Höhe des Beobachtungsvolumens)
- N = mittlere Anzahl der Moleküle im Beleuchtungsfokus
- τ = Korrelationszeit
- τ_{diff} = mittlere Diffusionszeit der Moleküle durch den Fokus

Gleichung 2.1 Autokorrelationsfunktion für Einkomponentensystem

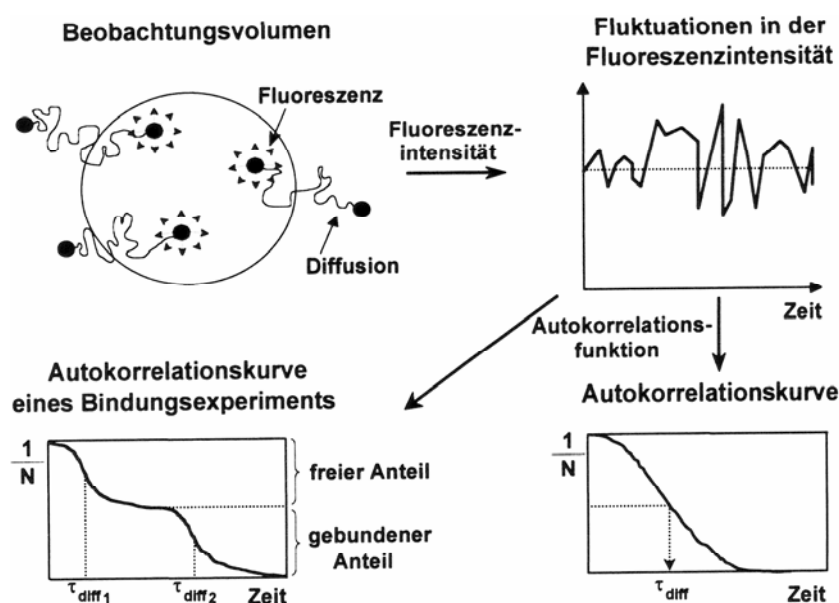


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des FCS- Mess- und Auswertungssystems
(nach Boomen et al., 1999)

2.14.2 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 $W(\sim r)$ im dreidimensionalen Raum nach:

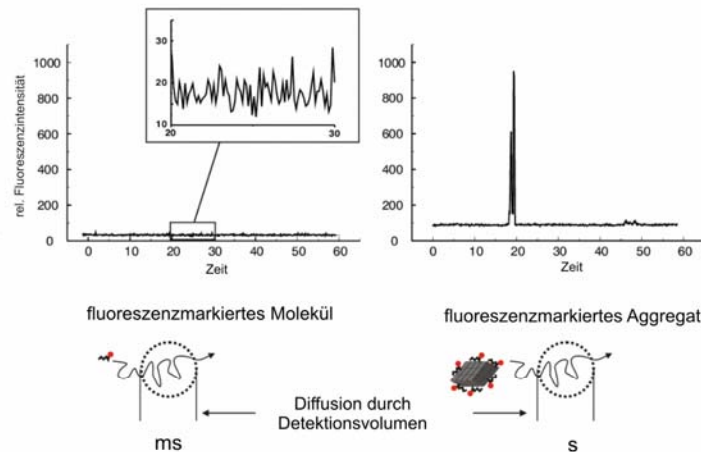
$$cpms = \int_{Vol} W(\vec{r}) d\vec{r} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

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.

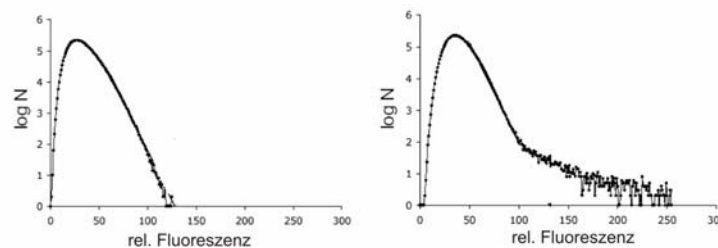
Im Falle einer Aggregation bzw. bei der Bindung fluoreszierender Moleküle an vorhandene Aggregate steigt die relative Helligkeit der Moleküle. Vernachlässigt man das Quenching der fluoreszierenden Moleküle und deren Verdeckungseffekt im wachsenden Aggregat, so ist die Steigerung der relativen Helligkeit 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 (Abb. 2.4).

A. Fluoreszenzfluktuationen



B. Fluoreszenz-Häufigkeits-Verteilungen

**Abb. 2.4 Fluoreszenzfluktuationen und Fluoreszenz-Häufigkeit-Verteilungen**

- A.** Charakteristische Fluoreszenzfluktuationen von fluoreszenzmarkierten Einzelmolekülen und hochfluoreszenten Aggregaten
- B.** Histogrammdarstellung der Häufigkeit (log N) des Auftretens relativer Fluoreszenzeinheiten im Messintegral von fluoreszenzmarkierten Einzelmolekülen und hochfluoreszenten Aggregaten

2.14.3 FIDA-Scanning

Die Durchtrittszeit großer Moleküle durch das konfokale Volumenelement kann durch „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). Dass dies gerade bei der Suche nach Aggregaten erfolgreich eingesetzt werden kann, konnte schon von Schäfer (2002) und Bieschke (2000) gezeigt werden. Dabei 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.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FCS Olympus 2 Strahl (Evotec, Hamburg) ist ein Beams Scanner implementiert, der es zulässt, eine mäanderförmige Bewegung des Volumenelements durch die Probe zu vollziehen (Abb. 2.5).

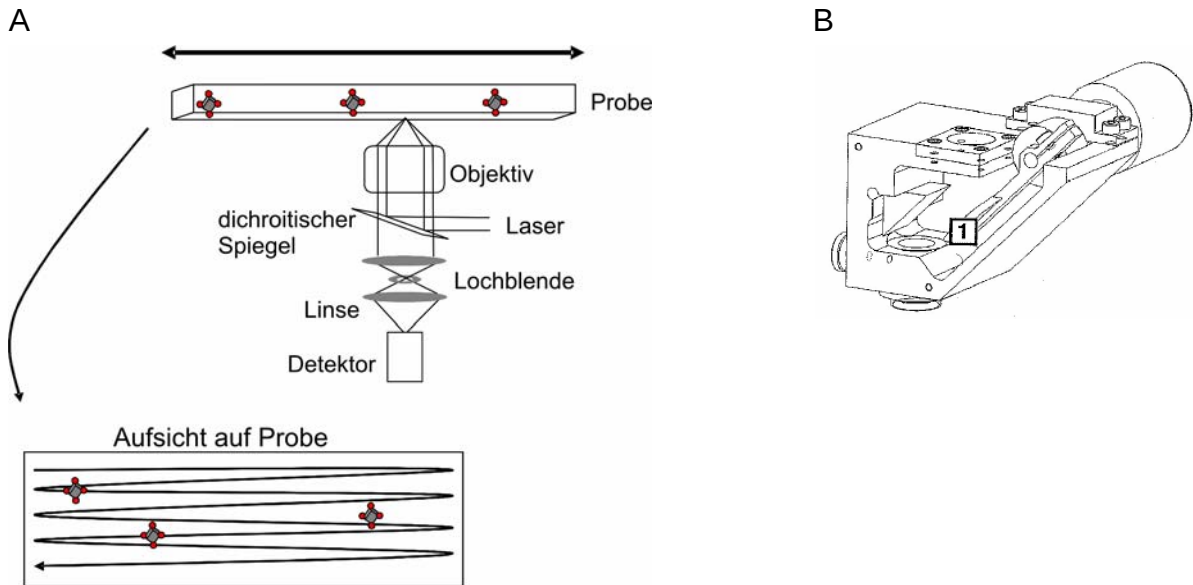


Abb 2.5 Schematische Darstellung des Messaufbaus unter Beamscanner-Einstellungen

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 (A). Dieser Spiegel führt eine zitternde Bewegung in horizontaler Richtung aus (1 in der Abbildung B). Da sich der Tisch in vertikaler Richtung bewegt, wird so eine mäanderförmige Bewegung durch die Probe erzeugt.

2.14.4 Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß

Die Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß ermöglicht es eine Ausgleichsgerade durch eine Messdatenfolge zu legen. Der mathematische Hintergrund ist, dass die Summe der Quadrate der Abstände aller Punkte von der gesuchten Geraden minimal wird (Gleichungen 2.3).

$$y = a + bx$$

n: Anzahl der Wertepaare

x_i : X-Meßwert des i-ten Wertepaares

y_i : Y-Meßwert des i-ten Wertepaares

i: Laufindex von 1 bis n

$$a = \frac{1}{n} \left(\sum y_i - b \cdot \sum x_i \right)$$

$$b = \frac{\left(\sum x_i y_i \right) - \left(\frac{\left(\sum x_i \right) \cdot \left(\sum y_i \right)}{n} \right)}{\left(\sum x_i^2 \right) - \left(\frac{\left(\sum x_i \right)^2}{n} \right)}$$

Gleichungen 2.3 Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß

2.14.5 Zweifarbenanalysen (2D-FIDA)

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 nur diese Spezies in die Kreuzkorrelation ein. Zudem ist der Übergang zweier Fluoreszenzphotonen in den Triplettzustand auch dann voneinander unabhängig, wenn diese an dasselbe Molekül gebunden sind. Somit enthält das Kreuzkorrelationssignal keinen Triplettanteil (Schwille *et al.*, 1997).

Auch FIDA-Messungen sind mit einer Zweifarbenanalyse möglich. Alle Molekülspezies, beide Monomere und das Heterodimer, sind klar voneinander zu unterscheiden. Im Falle eines Aggregationsprozesses würden Aggregationen einer einzelnen Molekülspezies getrennt betrachtet werden können. Im diagnostischen Ansatz kann daher durch 2D-FIDA die Spezifität erhöht werden, da nur solche pathologische Aggregate in die Auswertung eingehen an die zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Sonden gebunden sind (Schäfer 2002).

2.14.6 Durchführung der FCS-Messungen

Die FIDA-Messungen wurden am Olympus 2-Strahl FCS der Fa. Evotec durchgeführt. Nach einer Messung werden die Fluoreszenzfluktuationen automatisch in Fluoreszenz-Intensität-Verteilungen umgerechnet und stehen nur in diesem Format zur Verfügung. Die zeitlich aufgelösten Fluoreszenzfluktuationen stehen mit der Standard-Apparatur somit nicht mehr zur Verfügung. Um auf diese für die Interpretation der Daten jedoch relevante Information zugreifen zu können, wurden die Daten durch eine Rohdatenerfassungskarte (Evotec) geleitet, um eine Speicherung der Fluoreszenzfluktuationsdaten zu möglich.

Als Probengefäße wurden Assay-Chips mit 28 Messwells (Evotec, Hamburg) verwendet. Standardmäßig wurden die FIDA-Messungen für 30 Sekunden, mit einer Integrationszeit von 50 μ s und den Beamscoreinstellungen (50 Hz mit einer Amplitude von 100 μ m und einer Tischbewegung von 1 mm), durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wird vom Gerät in kHz ausgegeben.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte ein diagnostischer Ansatz für den Nachweis von Prion-Krankheiten entwickelt werden, welcher den Hauptbestandteil des Erregers das PrP in seiner pathologischen Isoform (PrP^{Sc}) direkt nachweist. Um Verluste an PrP^{Sc} zu vermeiden, sollte der Nachweis ohne Verwendung eines proteolytischen Schrittes möglich sein. Daher wurde zunächst die quantitative Bedeutung der Proteolyse in Bezug auf die verschiedenen PrP-Isoformen analysiert.

3.1 Untersuchungen zur Proteinase K - Resistenz von natürlichem und krankheitsassoziiertem Prion-Protein

Die Eigenschaft der Proteinase K – Resistenz des Prion-Proteins in der pathologischen Isoform, wird in den meisten kommerziellen Diagnosetests als krankheitsassoziiertes Marker herangezogen. Es konnte jedoch von Safar und Kollegen (1998) gezeigt werden, dass es pathologisches Prion-Protein gibt, welches nicht Proteinase K resistent ist (senPrP^{Sc}). Der Anteil des senPrP^{Sc} am gesamten pathologischen PrP schwankt zwischen verschiedenen Scrapie-Stämmen von 5 % bis 95 %, war aber zwischen verschiedenen infizierten Tieren des gleichen Scrapie-Stammes konstant. Für PrP^{BSE} liegen Daten in Bezug auf das Verhältnis von senPrP^{BSE} zum gesamten pathologischen PrP bisher nicht vor. Um zu untersuchen, wie es sich mit der Menge an Proteinase K resistentem PrP bei BSE-infizierten Rindern (resPrP^{BSE}) und im Vergleich dazu bei Scrapie-infizierten Hamstern (resPrP^{Sc}) verhält, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

3.1.1 Proteinase K - Konzentrationsreihen in Hirnhomogenat-Proben von Hamster und Rind

Um zu testen, welche Proteinase K - Menge nötig ist, um das komplette PrP^C aus Hirnhomogenat-Proben abbauen zu können, wurden Proteinase K - Konzentrationsreihen in Hirnhomogenat-Proben von Hamstern und Rindern durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 10%iges (w/v) Hirnhomogenat mit Proteinase K - Konzentrationen von 1 bis 100 µg/ml Proteinase K für eine Stunde bei 37 °C verdaut. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe gleich behandelt, jedoch keine Proteinase K zugesetzt. Zur Analyse von Rinderproben wurde nur Gewebe aus der *medulla oblongata* verwendet, da dort der Erreger während der BSE-Pathogenese als erstes in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Beekes *et al.*, 1996). Bei Hamstern ist diese Region sehr klein, so dass für Experimente wenig Probenmaterial zur Verfügung stünde. Daher wurde bei Hamstern das gesamte Hirn verwendet.

Als einheitliche Größe zur Bestimmung der eingesetzten Hirnmenge wird im Folgenden die Einheit Gramm-Äquivalent (gÄ) genutzt. Ein Gramm-Äquivalent entspricht der Menge, welche zuvor äquivalent zu einem Gramm Hirngewebe war.

In Abbildung 3.1 sind Western-Blot-Analysen der Proteinase K - Konzentrationsreihen in nicht-infiziertem und infiziertem Hirnmaterial syrischer Goldhamster (SHa) sowie Rinder gezeigt. PrP^{Sc}, PrP^{BSE} als auch PrP^C zeichnen sich nach SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse durch drei charakteristische Proteinbanden aus, welche aus den unterschiedlichen Besetzungsgraden der Glykolisierungsstellen resultieren (Hope *et al.*, 1986). Bei den Hamsterproben waren 1 µg/ml Proteinase K ausreichend, um das PrP^C des Hirnhomogenats komplett abzubauen (Abb. 3.1A). Bei Proben von Scrapie-infizierten Hamstern ist die charakteristische Verkürzung von resPrP^{Sc} auf ein Molekulargewicht von 27-30 kDa bei den mit Proteinase K behandelten Proben zu beobachten (Abb. 3.1B). Bei Proben, welche mit einer geringeren Menge Proteinase K behandelt wurden, ist dagegen ein leichter Shift zu höheren Molekulargewichten sichtbar.

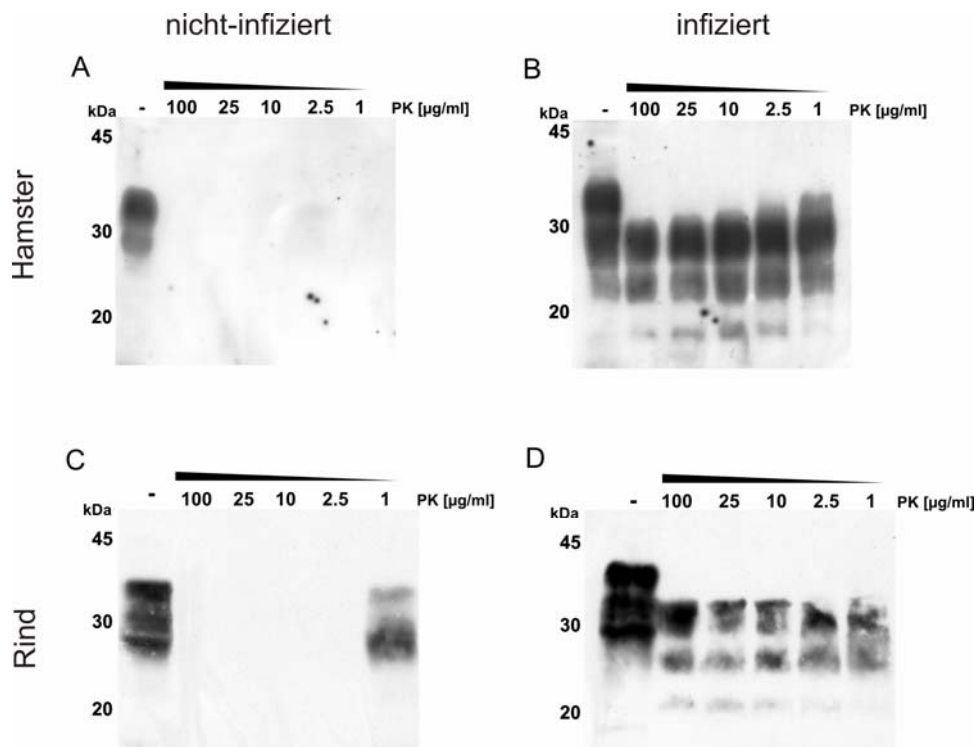


Abb. 3.1 Western-Blot-Analysen von Proteinase K - Konzentrationsreihen in Hamster- und Rinderproben

Die Western-Blot-Analysen zeigen Proteinase K – Konzentrationsreihen (1 – 100 µg/ml) in Hirnhomogenat (10% w/v) von nicht-infizierten (A) und Scrapie-infizierten (B) Hamstern sowie nicht-infizierten (C) und BSE-infizierten (D) Rindern. Es wurden jeweils $1,5 \times 10^{-3}$ gÄ pro Probe für die Western-Blot-Analysen eingesetzt. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe gleichbehandelt jedoch keine Proteinase K zugesetzt (-).

Die Western-Blot-Analyse der Proteinase K - Verdünnungsreihe in Rinderproben zeigt, dass 2,5 µg/ml Proteinase K nötig waren, um PrP^C in *medulla oblongata* Proben komplett abzubauen (Abb. 3.1C). Im Falle von BSE-infizierten Rindern trat bei

Proteinase K behandelten Proben erwartungsgemäß die spezifische Verkürzung zu resPrP auf (Abb. 3.1D). Beim Vergleich von Proben nicht-infizierter Rinder mit Proben BSE-infizierter Rinder, welche mit geringen Proteinase K - Mengen (1 µg/ml) behandelt wurden, wurde zunächst auffällig, dass das bovine PrP^C in nicht-infizierten Proben eine prominente verkürzte PrP-Bande aufweist. Proteinase K - resistentes PrP^{BSE} weist zwar im Vergleich ein etwas höheres Molekulargewicht auf (Abb. 3.1D), dennoch ist hier Potential für die Verwechslung mit pathologisch-assoziiertem resPrP^{BSE} gegeben. Hieraus ist zu schließen, dass bei der Proteolyse des natürlichen PrP^C auch ein verkürztes Zwischenprodukt auftritt.

Um beurteilen zu können, wie sich die Proteolyse auf andere Proteine in den Hirnhomogenat-Proben auswirkt, wurden gleichbehandelte Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung auf den Gesamtproteingehalt untersucht (Abb. 3.2). Mit steigender Proteinase K - Konzentration nimmt der Gesamtproteingehalt ab. Hier wird deutlich, dass bei einer Proteolyse mit 1 µg/ml Proteinase K in Hirnhomogenat zwar große Teile der Proteine abgebaut wurden, jedoch bei weitem nicht alle. Für die Silbergelanalyse wurden jeweils 5×10^{-3} gÄ Hirnhomogenat eingesetzt, so dass die resPrP-Banden nicht detektierbar sind, da die PrP-Mengen unter der Nachweisgrenze der Färbung liegen.

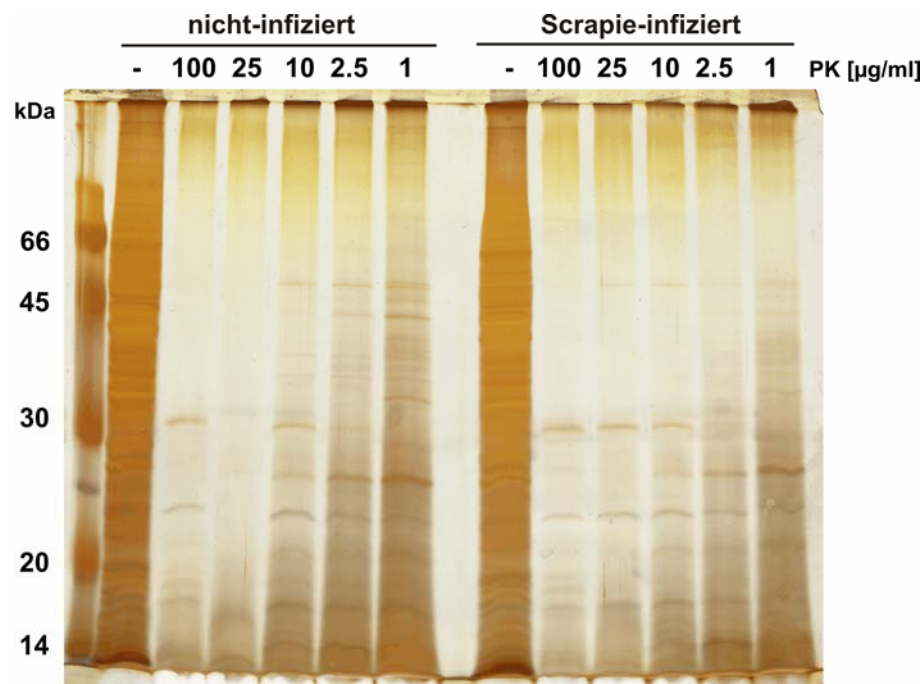


Abb. 3.2 Silberfärbung nach SDS-PAGE einer Proteinase K - Konzentrationsreihe in nicht-infizierten und Scrapie-infizierten Hamsterhirnhomogenaten

Die Silberfärbung nach SDS-PAGE zeigt eine Proteinase K – Konzentrationsreihe (1 – 100 µg/ml) in Hirnhomogenat (10 % w/v) von nicht-infizierten und Scrapie-infizierten Hamstern, welche für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Zusatz von Proteinase K gleichbehandelt (-). Es wurden jeweils 5×10^{-3} gÄ Hirnhomogenat pro Probe in der SDS-PAGE eingesetzt.

3.1.2 Untersuchung der Mengenvariationen an Proteinase K - resistentem PrP in Hirnhomogenaten von Hamster und Rind

Um die Variationsbreite von resPrP-Mengen zwischen verschiedenen infizierten Tieren zu untersuchen, wurde Hirnhomogenat verschiedener Scrapie-infizierter Hamster und BSE-infizierter Rinder einer Proteolyse mit 5 µg/ml Proteinase K für eine Stunde bei 37 °C unterzogen und anschließend per Western-Blot-Analyse untersucht. Als Kontrollen dienten Aliquots der jeweiligen Probe, welche mit Ausnahme der Proteinase -Zugabe gleichermaßen behandelt wurden. Diese Ansätze wurden für Scrapie-infizierte und nicht-infizierte Hamster sowie BSE-infizierte und nicht-infizierte Rinder vergleichend durchgeführt (Abb. 3.3).

Hierbei zeigte sich, dass die Menge an Proteinase K - resistentem PrP (resPrP) zwischen verschiedenen Scrapie-infizierten Hamstern kaum variierte. In allen Proben traten vergleichbar große Mengen an resPrP^{Sc} auf (Abb. 3.3A). Bei BSE-infizierten Rindern war hingegen eine beachtliche Variationsbreite der resPrP^{BSE}-Mengen zu beobachten (Abb. 3.3B). Bei Rind 3 lag die potentiell vorhandene resPrP^{BSE}-Menge sogar unter der Nachweisgrenze des verwendeten Western-Blot-Systems, wohingegen bei Rind 1 vergleichsweise große Mengen an resPrP^{BSE} nachweisbar waren. Bei den Negativkontrollen von Hamster- und Rinder-Proben war erwartungsgemäß kein resPrP nachweisbar. Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass die eingesetzte Proteinase K - Menge von 5 µg/ml deutlich unter den in kommerziellen Tests durchschnittlich eingesetzten Proteinase K - Menge lag.

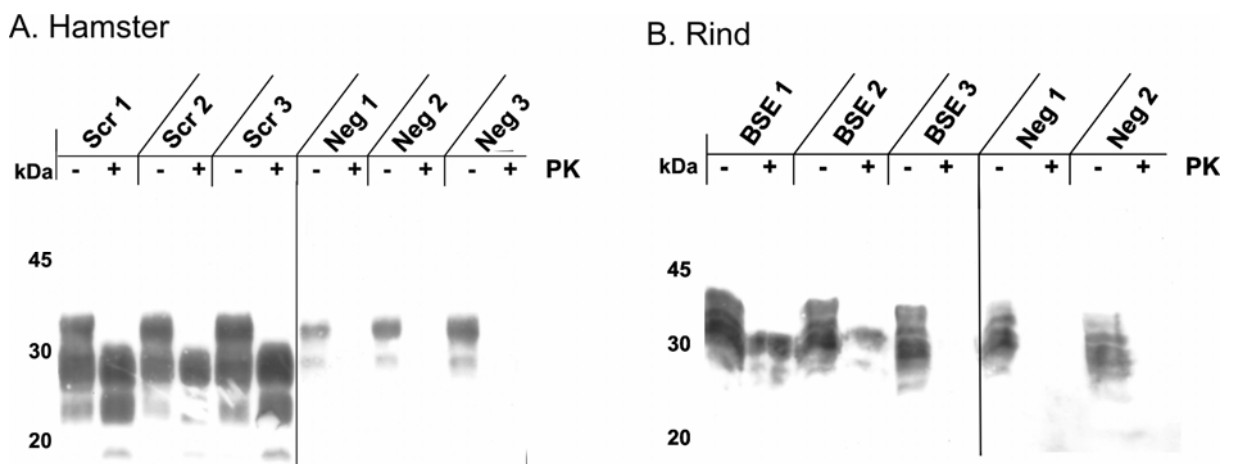


Abb. 3.3 Western-Blot-Analysen verschiedener infizierter und nicht-infizierter Hamster- und Rinder-Proben nach proteolytischer Behandlung

Die Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE zeigt Hirnhomogenat-Proben (10 % w/v) von verschiedenen infizierten und nicht-infizierten Tieren, welcher einer proteolytischen Verdauung mit 5 µg/ml Proteinase K für 1 h bei 37 °C unterzogen wurden (+). Als Kontrollen sind gleichbehandelte Proben jedoch ohne Proteinase K - Zusatz aufgetragen (-). Es wurden jeweils 5 x 10⁻³ gÄ Hirnhomogenat pro Probe in der SDS-PAGE eingesetzt. In Abb. **A** sind die Analysen mit Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Hamsterproben in Abb. **B** mit BSE-infizierten und nicht-infizierten Rinderproben dargestellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass bei BSE-infizierten Rindern eine große Variationsbreite der mittels Western-Blot-Analysen nachweisbaren resPrP^{BSE} Menge auftrat, wohingegen bei Scrapie-infizierten Hamstern (Scrapie Stamm 263 K) kaum Unterschiede zwischen den detektierten resPrP^{Sc}-Mengen beobachtet werden konnten. Dies belegt eindeutig die Notwendigkeit eine diagnostische Methode für BSE zu entwickeln, welche nicht auf die Verwendung eines proteolytischen Schrittes angewiesen ist.

3.2 Aufreinigung von pathologischem Prion Protein aus Hirngewebe ohne Proteolyse

Das Prinzip der verwendeten Aufreinigung beruht auf einer selektiven Fällung von Prion-Protein-Aggregaten und verfolgt folgende Ziele: i) Aufkonzentrierung des PrP^{Sc}; ii) Befreiung der Probe von störenden Verunreinigungen; iii) Verzicht auf proteolytische Behandlung; iiiii) Trennung des pathologischen PrP^{Sc} von immer vorhandenem PrP^C. Um diese Ziele zu erreichen, wurde ein Aufreinigungsprotokoll nach Safar und Kollegen (1998) modifiziert. Die Modifikationen bestanden aus der Einführung eines DNA/RNA Verdauungsschrittes durch den Zusatz von Benzonase, sowie der Einführung von Waschschritten zur Erhöhung des Aufreinigungsgrades.

3.2.1 Aufreinigung von PrP^{Sc} aus Hamsterhirngewebe ohne Proteolyse

Zur Aufreinigung (Abb. 3.4) wurde Hamsterhirngewebe in PBS mit 2 % Sarkosyl unter Einsatz eines Homogenisators (PowerGen 125, Fisher Scientific) zu 5 % (w/v) Homogenat verarbeitet. Dieses wurde für eine Minute bei 5.000 x g zentrifugiert, um große Gewebefragmente zu sedimentieren. Dem Überstand wurde Benzonase (Merck, Darmstadt) zu einer resultierenden Konzentration von 50 U/ml zugesetzt, um unter Schütteln (45 Minuten bei 37 °C) DNA und RNA abzubauen. Danach wurde die Probe auf 0,25 % NaPTA und 10,6 mM MgCl₂ eingestellt und der Fällungsansatz über Nacht bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Das Pellet wurde mit 250 µl PBS 250 mM EDTA für mindestens 30 Minuten bei 37 °C gewaschen und anschließend erneut für 30 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift kann, wenn nötig mehrmals wiederholt werden. Der Einsatz von PBS 250 mM EDTA pH 8 als Waschpuffer erbrachte einen erheblich größeren Aufreinigungseffekt, im Vergleich zu bekannten Waschpuffern mit nur 50 mM EDTA, welche u.a. von Wadworth und Kollegen (2001) für die PrP-Aufreinigung aus menschlichem Hirngewebe von CJD-Patienten beschrieben wurden.

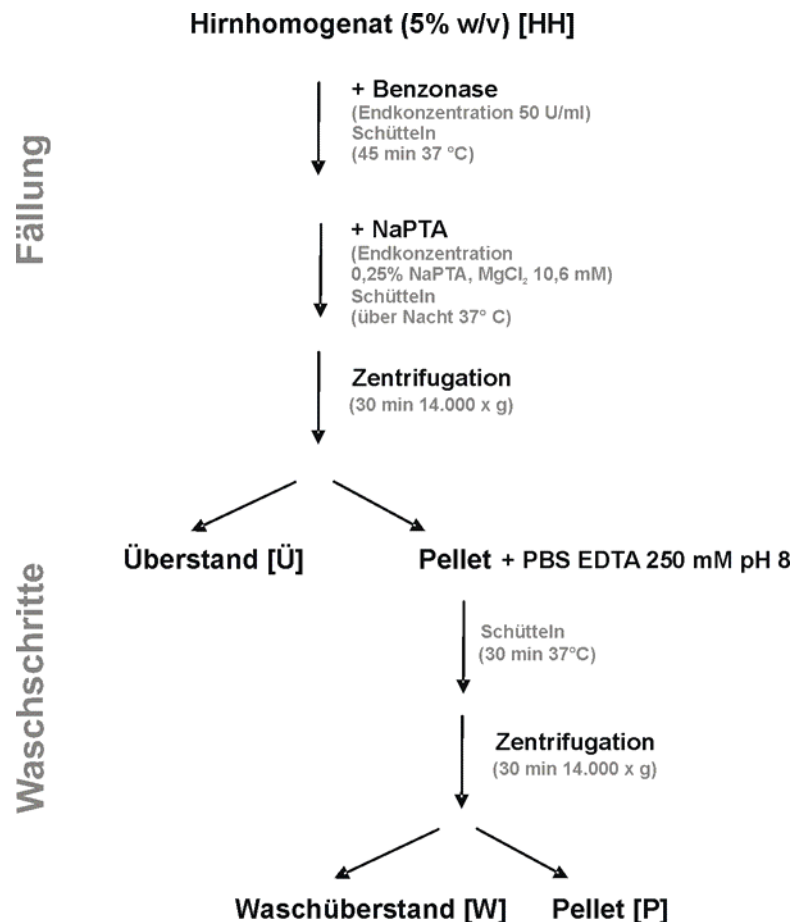


Abb. 3.4 Schematische Darstellung des Aufreinigungsansatzes ohne Proteinase K mittels NaPTA-Fällung

Eine Western-Blot-Analyse der Aufreinigungsschritte der NaPTA-Fällung von Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Hirnproben ist in Abb. 3.5 dargestellt. In der Pelletfraktion der Aufreinigung aus Hirngewebe des Scrapie-infizierten Hamsters war eine große PrP-Menge nachweisbar. Ein Vergleich mit der Pelletfraktion der Probe des nicht-infizierten Hamsters, welche kein PrP aufwies, lässt den Schluss zu, dass es sich beim PrP der Scrapie-infizierten Probe ausschließlich um pathogenes PrP handelt. Darauf deutet auch die Proteinase K - Resistenz des größten Teils des gefällten PrPs hin. Abb. 3.5B zeigt, dass PrP^C fast vollständig im Überstand verbleibt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Fällung große Teile des vorhandenen pathogenen PrPs selektiv im Gegensatz zum natürlichen PrP^C aufkonzentriert werden konnten. In den Waschschritten trat dabei kein Verlust an pathogenem PrP auf.

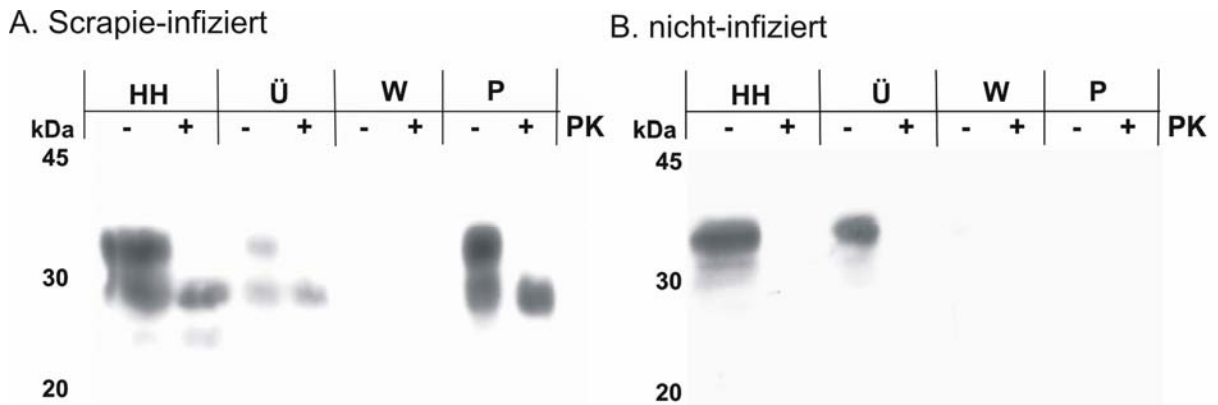


Abb. 3.5 Western-Blot-Analyse der NaPTA-Fällung zur Proteinase K - freien Aufreinigung von pathogenem PrP aus Scrapie-infiziertem Hamsterhirn

Die Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE zeigt jeweils gleiche Mengen (1×10^{-3} gÄ) der einzelnen Aufreinigungsschritte der NaPTA-Fällung. **HH**: Hirnhomogenat-Ausgangskontrolle, **Ü**: Überstand, **W**: Waschschriftüberstand, **P**: resultierendes Pellet. Von jedem Schritt sind jeweils Kontrollen, welche proteolytisch für eine Stunde bei 37 °C mit 5 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt wurden (+) aufgetragen. Die Aufreinigung ist einmal mit Scrapie-infiziertem Hirnhomogenat vom Hamster (**A**) und zum Vergleich mit einer nicht-infizierten Hirnprobe (**B**) dargestellt.

Um den Aufreinigungseffekt der Fällung untersuchen zu können, wurden die einzelnen Aufreinigungsschritte mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung untersucht (Abb. 3.6). Für jeden Schritt wurde die gleiche Menge an Hirnmaterial in Grammäquivalenten ($2,5 \times 10^{-3}$ gÄ) aufgetragen. Dabei ist der starke Aufreinigungseffekt durch Vergleich des Ausgangsmaterials mit der Pelletfraktion ersichtlich (Abb. 3.6 A-B). Um beurteilen zu können, wie sauber das resultierende Pellet im Bezug auf andere Proteine ist, mussten komplette, aus der Fällung resultierende, Pellets ($2,5 \times 10^{-2}$ gÄ) für eine Silbergel-Analyse eingesetzt werden (Abb. 3.6 C). Das für PrP spezifische Bandenmuster ist im Fällungsansatz der Scrapie-infizierten Hamster als prominente Banden von 33-35 kDa zu identifizieren. In den Negativkontrollen trat dieses Bandenmuster nicht auf, was mit den Western-Blot-Analysen korreliert, da hier auch kein PrP^C in den Pelletfraktionen nachgewiesen werden konnte. Es trat eine weitere prominente Proteinbande, mit einem Molekulargewicht von 66 kDa auf, welche nicht weiter analysiert wurde. Weiterhin sind einige weniger prominente Protein-Banden zu sehen. Der Aufreinigungsgrad variierte zwischen gleich behandelten Proben aus bisher nicht geklärten Gründen z.T. erheblich, so dass der in Abb. 3.6 C gezeigte Reinheitsgrad nicht immer erreicht werden konnte.

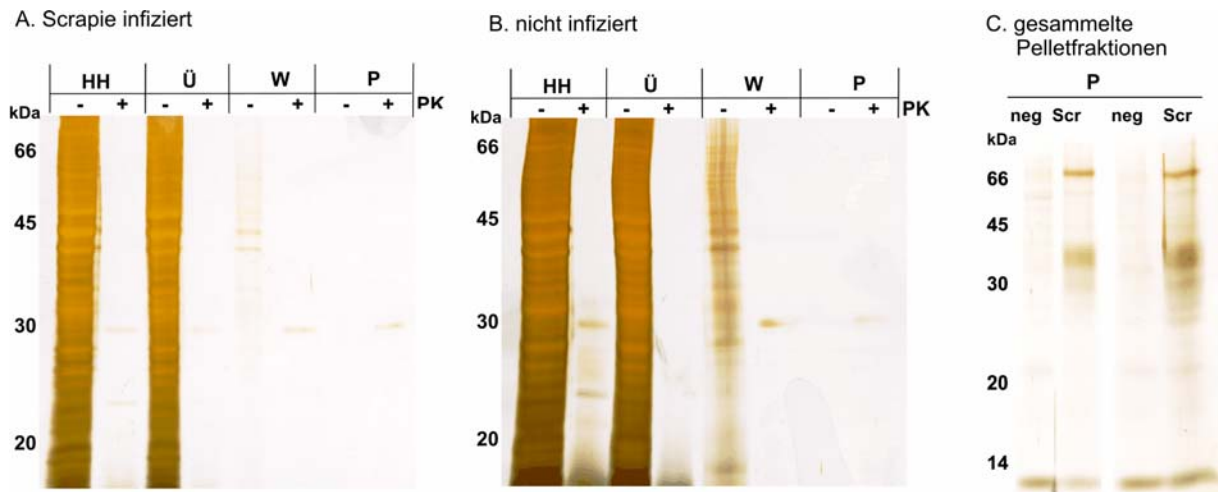


Abb. 3.6 SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der NaPTA-Fällung zur Proteinase K - freien Aufreinigung von pathogenem PrP^{Sc}

Die Silberfärbung nach SDS-PAGE zeigt jeweils gleiche Mengen ($2,5 \times 10^{-3}$ gÄ) der einzelnen Aufreinigungsschritte der NaPTA-Fällung. Die Aufreinigung ist mit Scrapie-infiziertem Hirnhomogenat vom Hamster (**A**) und zum Vergleich mit einer Hirnprobe eines nicht-infizierten Hamsters (**B**) dargestellt. **HH**: Hirnhomogenat-Ausgangskontrolle, **Ü**: Überstand, **W**: Waschschriftüberstand, **P**: resultierendes Pellet. Von jedem Schritt sind jeweils Kontrollen, welche proteolytisch für eine Stunde bei 37 °C mit 5 µg/ml Proteinase K behandelt wurden (+) aufgetragen. In Abb. **C** sind jeweils gesammelte Pelletfraktionen von unabhängigen Aufreinigungen zweier Scrapie-infizierter und zum Vergleich zweier nicht-infizierter Hamsterhirnproben aufgetragen ($2,5 \times 10^{-2}$ gÄ).

Um die aus der Aufreinigung resultierenden PrP^{Sc}-Mengen zu bestimmen, wurde der PrP-Gehalt mittels Dot-Blot über einen rekPrP-Mengenstandard bestimmt (Abb. 3.7). Durch densitometrische Auswertung ergab sich, dass aus einem Gramm Hirngewebe 400 µg PrP^{Sc} mittels NaPTA-Fällung präpariert werden konnten. Literaturwerte besagen, dass durchschnittlich 500 µg resPrP^{Sc} in einem Gramm Hirngewebe eines Scrapie-infizierten Hamsters im terminalen Krankheitsstadium vorhanden sind (Lee *et al.*, 2000). Im Folgenden werden Hirngewebsproben, welche mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt wurden, im Fall von mit Scrapie-infizierten Hamstern als PrP^{Sc}-Probe bzw. und bei nicht-infizierten Kontrolltieren als negSHA-Probe bezeichnet.

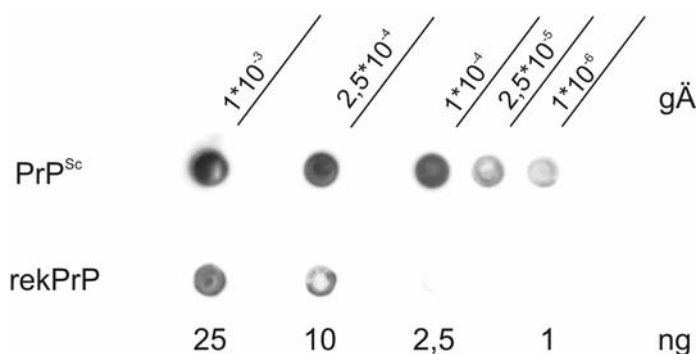


Abb. 3.7 Bestimmung der PrP^{Sc} Ausbeute mit NaPTA-Fällung

Der Dot-Blot zeigt einen rekPrP Mengenstandard und eine Verdünnungsreihe, des aus der NaPTA-Fällung resultierenden PrP^{Sc} Pellets einer Scrapie infizierten Hamsterhirnprobe.

Die PrP^{Sc}-Proben und negSHA-Proben wurde mittels Thioflavin-Test in Hinblick auf den amyloiden Charakter untersucht. Als fibrilläre Positivkontrolle wurden 1,5 µg

Fibrillen aus rekPrP eingesetzt. Die rekPrP Positivkontrolle wurde von Jan Stöhr zur Verfügung gestellt und zuvor mittels Elektronenmikroskopie in Bezug auf den fibrillären Charakter bestätigt. Im Thioflavin-Test wurden $2,5 \times 10^{-2}$ gÄ PrP^{Sc}-Probe und negSHa-Probe eingesetzt (Abb. 3.8).

Es wird deutlich, dass die PrP^{Sc}-Probe nach Fällung amyloiden Charakter besitzt, da das Fluoreszenzsignal des Thioflavin-Tests im Vergleich zur negSHa-Probe eine fünffache Erhöhung zeigt.

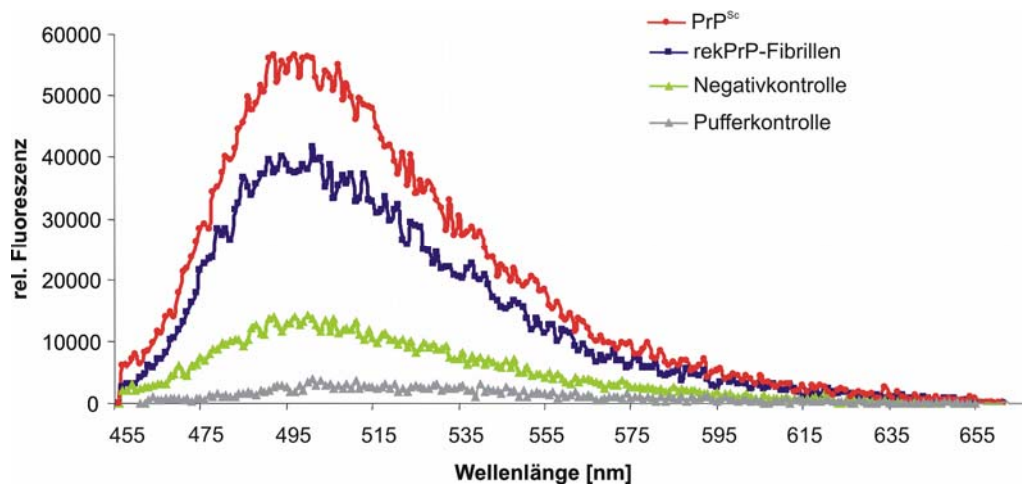


Abb. 3.8 Thioflavin-Test des aus einer NaPTA-Fällung resultierenden Pellets

Im Thioflavin-Test wurden $2,5 \times 10^{-2}$ gÄ PrP^{Sc}-Probe und negSHa-Probe eingesetzt. Die Scrapie-Probe weist ein fünfmal höheres Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Negativkontrolle auf, welches den amyloiden Charakter der Probe beschreibt.

3.2.2 Aufreinigung von PrP^{BSE} aus *medulla oblongata* – Gewebe des Rindes ohne Proteolyse

Die Aufreinigung von PrP^{BSE} aus *medulla oblongata*-Gewebe des Rinderhirns ohne Proteolyse entspricht prinzipiell der in Kap.3.2.1 beschriebenen PrP^{Sc}-Aufreinigung aus Hamsterhirn. Unterschiede bestehen hinsichtlich der Sarkosylkonzentration, welche bei der Homogenisierung des *medulla oblongata*-Gewebes eingestellt wurden. Bei Rindergewebe wurde im Gegensatz zum Hamster 4% Sarkosyl eingesetzt, da sich bei geringeren Sarkosylkonzentrationen im Ausgangshomogenat die Aufreinigungseffizienz und die PrP^{BSE}-Ausbeute in großem Maße verringerten. Zusätzlich wurde die Fällungsdauer auf vier Stunden reduziert. Bei der Aufreinigung waren zwei Waschschritte erforderlich, um einen für nachfolgende FIDA-Messungen notwendigen Reinheitsgrad zu erreichen.

In Abbildung 3.9 ist eine Western-Blot-Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte der Fällung für eine Gewebeprobe eines BSE-infizierten Rindes und einer Kontrollprobe aus *medulla oblongata* –Gewebe abgebildet. Durch den Vergleich der mit Proteinase K behandelten BSE-Hirnhomogenatkontrolle mit der nicht behandelten (Abb. 3.9 A)

wird deutlich, dass die BSE-infizierte Probe nur einen geringen resPrP^{BSE}-Anteil enthält.

Bei der Negativkontrolle (Abb. 3.9 B) ist deutlich zu sehen, dass das komplette PrP^C im Überstand verbleibt und das Pellet im Hinblick auf die Western-Blot-Nachweisgrenze PrP^C-frei ist. Im Fall der BSE-Probe waren im ersten Waschschriff geringe PrP-Mengen nachweisbar. Der Vergleich der Pelletfraktionen der BSE-Probe mit der Kontroll-Probe lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem PrP im Pellet der BSE-Probe um pathogenes PrP^{BSE} handelte. Die Tatsache, dass diese Probe nur einen geringen resPrP^{BSE}-Anteil aufweist, lässt weiterhin den Schluss zu, dass dieses PrP zum größten Teil senPrP^{BSE} ist.

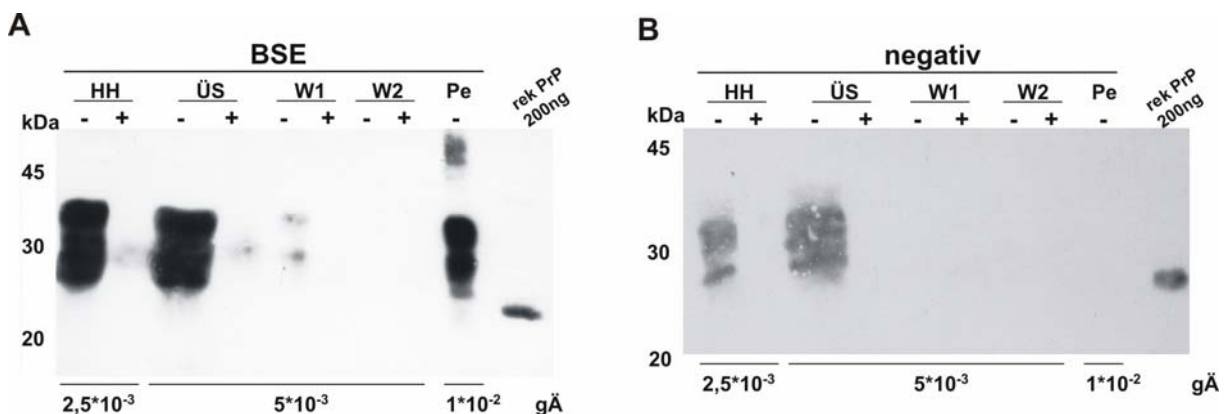


Abb. 3.9 Western-Blot-Analyse der NaPTA-Fällung zur Aufreinigung von pathogenem PrP^{BSE} aus *medulla oblongata* –Gewebe eines BSE-infizierten Rindes

Die Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE zeigt die jeweils angegebenen Mengen (2,5x10⁻³ – 1x10⁻² gÄ) der einzelnen Aufreinigungsschritte der NaPTA-Fällung. Die Aufreinigung wurde mit BSE-infiziertem *medulla oblongata* Gewebe vom Rind (A) und zum Vergleich mit einer nicht-infizierten Kontrollprobe (B) durchgeführt. HH: Hirnhomogenat-Ausgangskontrolle, ÜS: Überstand, W1-2: Waschschriffüberstand, P: resultierendes Pellet. Von jedem Schritt sind jeweils Kontrollen, welche proteolytisch für eine Stunde bei 37 °C mit 5 µg/ml PK behandelt wurden (+) aufgetragen. Als Kontrolle ist in beiden Fällen 200 ng bovines rekombinantes PrP(29-231) aufgetragen (rekPrP).

Um die PrP-Ausbeuten der Aufreinigung von PrP^{BSE} bestimmen zu können, wurde eine vergleichende Dot-Blot Analyse der aus der NaPTA-Fällung resultierenden Pellets durchgeführt. Hierzu wurden jeweils Pellets der Aufreinigungen aus BSE-Proben im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollproben analysiert und die Ausbeute hinsichtlich verschiedener Waschschriffkombinationen gezeigt (Abb. 3.10). Dabei stellte sich heraus, dass sich durch die Waschschriffe mit PBS 250 mM EDTA pH 8 im Gegensatz zu Waschschriffen mit PBS 50 mM EDTA 0,1 % Sarkosyl die Ausbeuten erheblich steigern ließen. Auch traten nur geringe PrP-Verluste bei der Durchführung von zwei Waschschriffen gegenüber einem auf.

In Proben nicht-infizierter Rinder war, wie auch bei den Hamsterproben kein PrP^C in der Pelletfraktion der Fällung nachweisbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich mittels Proteolyse-freier NaPTA-Fällung 15 µg pathologisches PrP^{BSE} aus einem Gramm *medulla oblongata* eines BSE-

infizierten Rindes aufreinigen ließen. Dies entspricht einer mehr als 35fach geringeren Menge als dies bei Fällungen von PrP^{Sc} aus Hamsterhirnen der Fall ist.

Im Folgenden werden *medulla oblongata* - Proben, welche mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt wurden, bei mit BSE-infizierten Rindern als PrP^{BSE} -Probe und bei nicht-infizierten Kontrolltieren als negBov-Probe bezeichnet.

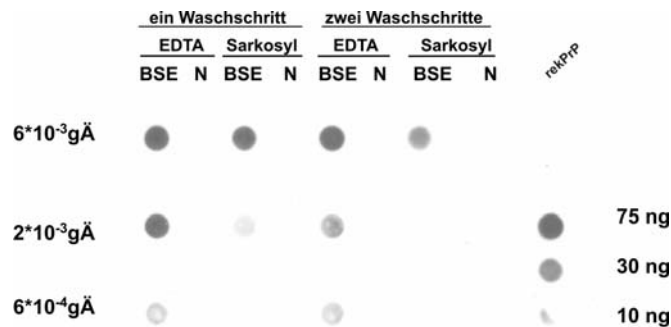


Abb. 3.10 Bestimmung der PrP^{BSE} Ausbeute mittels NaPTA-Fällung

Der Dot-Blot zeigt Verdünnungsreihen resultierender Pellets aus NaPTA-Fällungen von BSE-infizierten (**BSE**) und nicht-infizierten (**N**) *medulla oblongata* Homogenaten von Rindern. Es wurden jeweils $6 \times 10^{-3} - 6 \times 10^{-4} \text{ gÄ}$ eingesetzt. Bei den Fällungen wurden jeweils die Waschschriffe in Bezug auf Häufigkeit: ein Waschschriff und zwei Waschschriffe sowie Waschpufferbedingungen variiert. Als Waschpuffer wurden zum einen PBS 250 mM EDTA pH 8 (**EDTA**) und zum anderen PBS 50 mM EDTA 0,1 % Sarkosyl (**Sarkosyl**) eingesetzt. Als Mengenstandard dient eine Verdünnungsreihe (10-200 ng) aus bovinem rekombinaten PrP.

Von Roy Jackman (VLA England) wurde freundlicherweise auch ohne proteolytische Behandlung aufgereinigtes PrP^{BSE} -Material zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigungspellets wurden ebenfalls in Bezug auf die Ausbeute mittels Dot-Blot-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute bei dieser Aufreinigung $2,5 - 5 \mu\text{g PrP}^{\text{BSE}}$ aus einem Gramm *medulla oblongata* beträgt (Abb. 3.11).

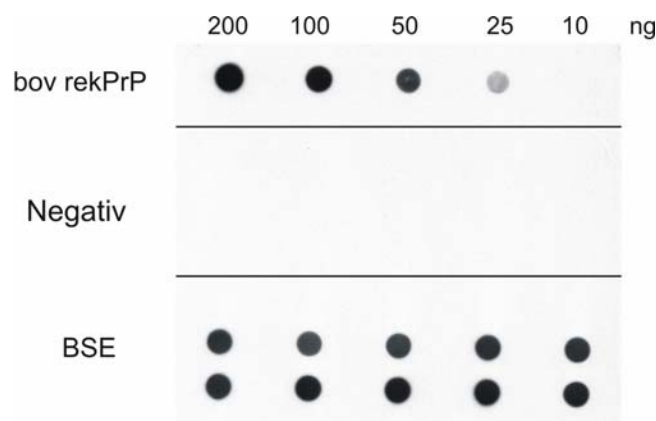


Abb. 3.11 Bestimmung der PrP^{BSE} Ausbeute mittels Aufreinigung nach Jackman

Der Dot-Blot zeigt $2 \times 10^{-2} \text{ gÄ}$ von je 10 Aufreinigungspellets BSE-infizierter (**BSE**) und nicht-infizierter (**Negativ**) *medulla oblongata*-Proben des Rindes. Als Mengenstandard dient eine Verdünnungsreihe (10-200 ng) aus bovinem rekombinaten PrP.

3.3 Etablierung einer FIDA-Auswertungsmethode

Mit der Methode der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) können höhere Proteinaggregate in Lösung nachgewiesen werden. Dazu werden die Aggregate durch fluoreszierende Sonden markiert und anschließend im Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer gemessen. Dabei wird ein Laserstrahl in die Probe fokussiert und mittels konfokaler Abbildungstechnik die Fluoreszenzfluktuation in einem Volumen von einem Femtoliter detektiert. In aggregathaltigen Proben treten im Vergleich zu Proben ohne Aggregate hochfluoreszente Intensitätspeaks auf. Somit können einzelne Aggregate in Lösung nachgewiesen werden (vgl. Kap. 2.14). Bei einer Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) wird die Verteilung der mittels des FCS detektierten Photonen pro Messintegral als Histogramm der Fluoreszenzintensitätshäufigkeiten dargestellt. Wird ein Laser eingesetzt und somit eine Sonde untersucht spricht man von 1D-FIDA. Durch die Nutzung von zwei Lasern können zwei Sonden unabhängig voneinander beobachtet und die Signale kreuzkorreliert werden (2D-FIDA). Der Ansatz der 2D-FIDA wurde von Schäfer (2002) erfolgreich zum Nachweis von resPrP^{Sc}-Aggregaten angewandt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein diagnostischer Ansatz zum Nachweis von pathogenen Prion-Aggregaten ohne Proteolyse entwickelt werden, wobei auf die Nachweis-Methodik mittels 2D-FIDA zurückgegriffen wurde. Da zu diesem Zweck keine genaue Charakterisierung der Intensitätsverteilung (siehe Kap. 2.14) der FIDA-Daten erforderlich ist, sondern lediglich intensiv fluoreszierende Komponenten über einem Schwellenwert detektiert werden sollen, wurde eine Auswertemethode zur Quantifizierung der aggregatspezifischen Signale etabliert. Dabei werden die mittels FCS detektierten Fluoreszenzintensitätsfluktuationen (Abb. 3.12. A), wie beschrieben als Histogramm der Fluoreszenzintensitätshäufigkeiten dargestellt (Abb. 3.12 B).

Um das Auftreten von Aggregaten nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmen zu können und eine Verringerung der Datenkomplexität zu erreichen, wurde folgende Auswertungsmethodik entwickelt. Das Verfahren soll das Hintergrundsignal, welches durch monomere fluoreszierende Sonden verursacht wird, von aggregatspezifischen Signalen trennen und die aggregatspezifischen Signale quantifizieren. Dazu wird der erste Wendepunkt nach dem Maximum der Fluoreszenz-Intensitäts-Häufigkeits-Verteilung bestimmt. Nachfolgend wird anhand der Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß (Kap. 2.14) eine Ausgleichsgerade durch die Messwerte um den Wendepunkt berechnet. Zur mathematisch Ermittlung der Ausgleichsgeraden fordert man, dass die Summe der Quadrate der Abstände aller Punkte von der gesuchten Geraden minimal wird. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse wird als Schwellenwert (cut off) gewählt, um Fluoreszenzintensitäten, die durch ungebundene Sondenmoleküle verursacht werden, von denen durch hochmarkierte Aggregate verursachten zu trennen. Alle Signale oberhalb des so bestimmten „cut off“ wurden summiert, um eine quantitative Größe für die aggregatspezifischen Signale zu erhalten (Abb. 3.12 B). Im Falle von Messungen mit zwei verschieden markierten Sonden (2D-FIDA) stellte sich empirisch

heraus, dass als der x-Wert des Wendepunkts selbst als „cut off“ besser geeignet war, um die spezifischen Signale vom Hintergrundsignal zu trennen. Bei 2D-FIDA-Messungen wurden nur Messwerte über den jeweiligen „cut offs“ beider Messkanäle summiert (Abb. 3.12 C).

Jede Probe wurde mehrmals gemessen und die Mittelwerte der Summen gebildet.

Zu diesen Auswertemethoden wurden freundlicherweise von Andreas Wilm (Arbeitsgruppe Bioinformatik, Institut für physikalische Biologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) Auswerteprogramme entwickelt, die unter Linux als Tcl-Skripte arbeiten. Somit stehen anwendbare Programme zur automatisierten Datenauswertung von FIDA-Daten zur Verfügung.

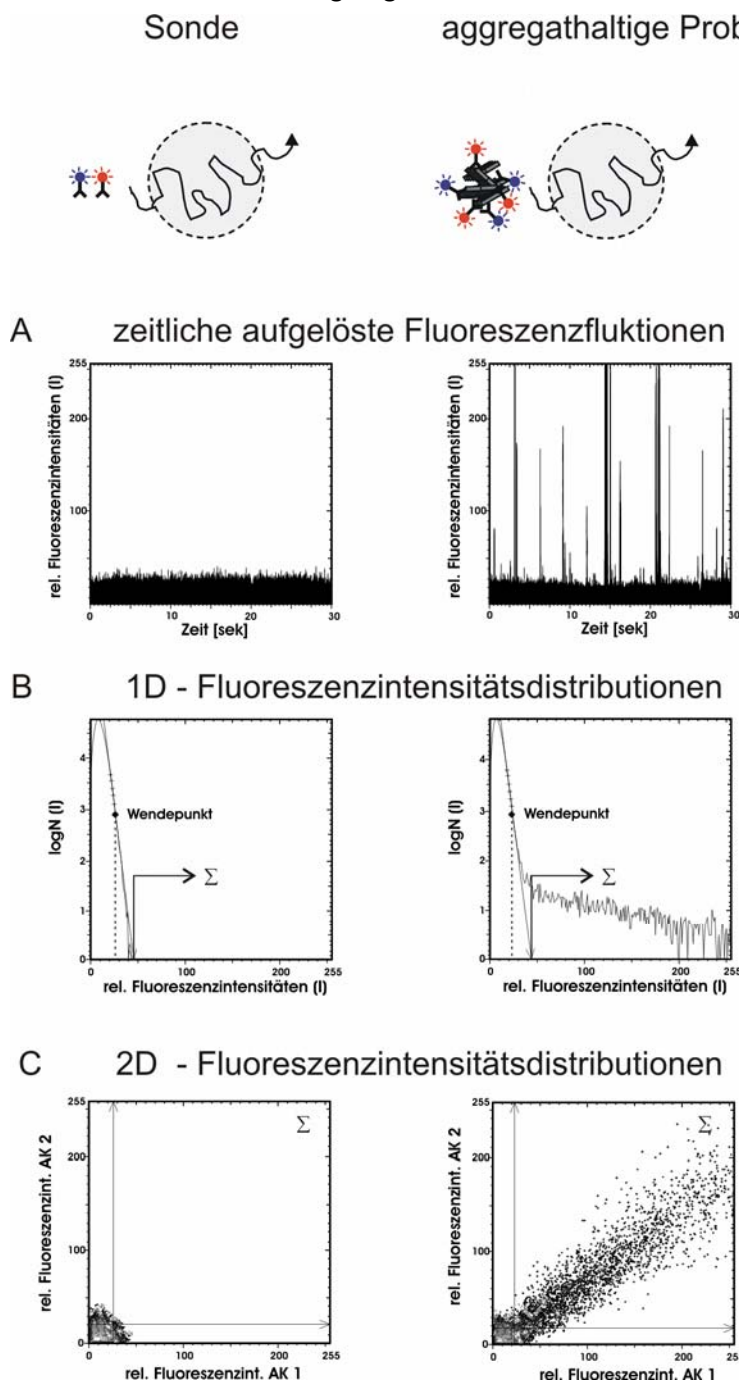


Abb. 3.12 Prinzip des Nachweises von Aggregaten in Lösung mittels FIDA und Auswertung von 1D- und 2D-FIDA-Daten

Bei FIDA-Messung fluoreszenzmarkierter Sonden, treten nur geringe Intensitäten in den Fluoreszenzfluktationen auf. Binden Sonden an spezifische Aggregate, sind hochfluoreszente Aggregate die Folge, welche hohe Intensitäten im Vergleich zu monomeren Sonden erzeugen. Diese machen sich durch Peaks in den detektierten Fluoreszenzfluktationen bemerkbar (A). Werden die Häufigkeiten dieser Fluoreszenzintensitäten ($\log N$) nun in ein Histogramm überführt, kann eine quantitative Auswertung dieser hohen Intensitäten, welche durch die Aggregate erzeugt werden, vorgenommen werden. Dazu wird mittels der Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß eine Ausgleichsgerade durch die Messwerte um den Wendepunkt berechnet und der Schnittpunkt der Gerade mit der x-Achse als „cut off“ definiert. Alle Werte über dem „cut off“ werden summiert und die Summe als quantitative Größe zur Beschreibung der Aggregatanzahl herangezogen (B). Bei 2D-FIDA-Messungen wird jeweils der x-Wert des Wendepunktes der 1D-Verteilung als „cut off“ herangezogen. Nur Werte über beiden cut offs werden summiert und als quantitative Größe für spezifische Aggregate herangezogen (C).

3.4 Screening verschiedener PrP-bindender Antikörper als Sonde zur Detektion pathologischer PrP-Aggregate via FIDA

Um native pathologische Prionaggregate in Lösung mittels FIDA-Messungen nachweisen zu können, müssen Sonden gefunden werden, welche Affinität zur nativen PrP^{Sc}-Isoform besitzen. Hierzu wurden verschiedene PrP-bindende Antikörper fluoreszenzmarkiert und in FIDA-Messungen mit PrP^{Sc}-Proben bzw. PrP^{BSE}-Proben eingesetzt.

Von Schäfer (2002) konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von zwei Sonden in 2D-FIDA-Messungen unspezifische Hintergrundsignale reduziert werden konnten. Daher wurden jeweils zwei Sonden, bei denen eine Affinität zur PrP^{Sc}-Isoform gefunden wurde, in Kombination in 2D-FIDA-Messungen eingesetzt, um eine geeignete Sondenkombination bestimmen zu können. Dabei war es wünschenswert, dass die Sonden (z.B. Antikörper) verschiedene Epitope des Prion-Proteins binden, um die Spezifität des Messansatzes zu erhöhen. Diese Eigenschaft ist nicht essentiell, da die nachzuweisenden Aggregate immer mehrere dieser Epitope aufweisen. Ein Aggregat ist folglich in der Lage mehrere Sonden, welche das gleiche Epitop erkennen, zu binden. Die wesentliche Anforderung ist demnach, dass die Sonden eine Affinität zur nativen PrP^{Sc}- bzw. PrP^{BSE}-Isoform besitzen. Rückschlüsse aus Bindeaffinitäten in Blot-Systemen waren jedoch nicht möglich, da die Prion-Proteine dort denaturiert vorliegen, während die Prion-Aggregate in FIDA-Messungen in nativer PrP^{Sc}- bzw. PrP^{BSE}-Isoform vorliegen.

Im Folgenden wurden verschiedene PrP-spezifische Antikörper und Aptamere fluoreszenzmarkiert und hinsichtlich der oben beschriebenen Anforderungen analysiert. Zu diesem Zwecke wurden PrP^{Sc}- bzw. PrP^{BSE}-Proben und entsprechende Negativkontrollen (Aufreinigung siehe Kap. 3.2) mit den zu Verfügung stehenden Sonden via FIDA untersucht.

Für die FIDA-Messungen wurden jeweils $2,5 \times 10^{-3}$ gÄ PrP^{Sc}- bzw. PrP^{BSE}-Probe mit fluoreszenzmarkierten Sonden auf eine resultierende Fluoreszenzintensität von 50-100 kHz eingestellt und zehnmal für 30 Sekunden gemessen. Die Messungen wurden mit den in Kap 3.3 beschriebenen Methoden ausgewertet. In Abb. 3.13 sind die Ergebnisse der Sonden dargestellt, bei denen eine spezifische Bindung an PrP^{Sc}-Proben nachgewiesen werden konnte. Hierbei stellte sich die Antikörperkombination aus D13 und R1 für den Nachweis von nativen Prion-Aggregaten aus Scrapie-infizierten Hamstern als die am besten geeignete Antikörper-Kombination der getesteten Sonden heraus.

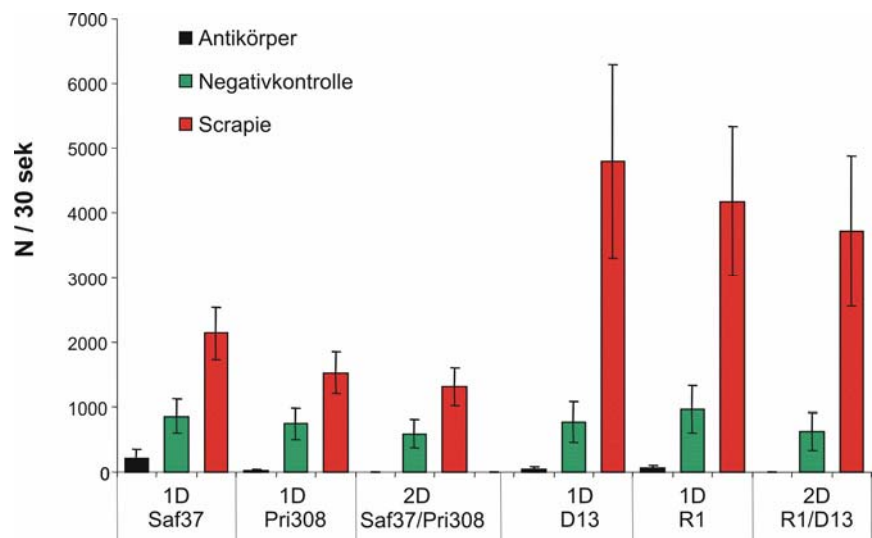


Abb. 3.13 Antikörpertest zum Nachweis von PrP^{Sc}-Proben via FIDA

Zum Vergleich der Bindung von fluoreszenzmarkierten Pri308, Saf32, D13 und R1 an PrP^{Sc}-Proben (rot) und Negativkontrollen (grün) mit $2,5 \times 10^{-3}$ gÄ wurden entsprechende FIDA-Messungen durchgeführt und ausgewertet (Kap. 3.3). Desweiteren wurden die Antikörper ohne Target gemessen (schwarz). Die resultierenden Mittelwerte von zehn 30-Sekunden-Messungen sind im Diagramm aufgetragen. Zum einen wurden die Antikörper einzeln mit 1D-FIDA ausgewertet (1D) und geeignete Antikörperkombinationen wurden mit 2D-FIDA analysiert (2D).

Der gleiche Messansatz wurde mit PrP^{BSE}-Proben und Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei stellte sich die Antikörperkombination aus Saf32 und 12F10 für den Nachweis von nativen PrP^{BSE}-Proben als am besten geeignete Kombination der getesteten Sonden heraus.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller für BSE-Proben getesteter Sonden ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1
Sonden, welche auf ihre Eignung zum Nachweis von PrP^{BSE} mittels FIDA getestet wurden

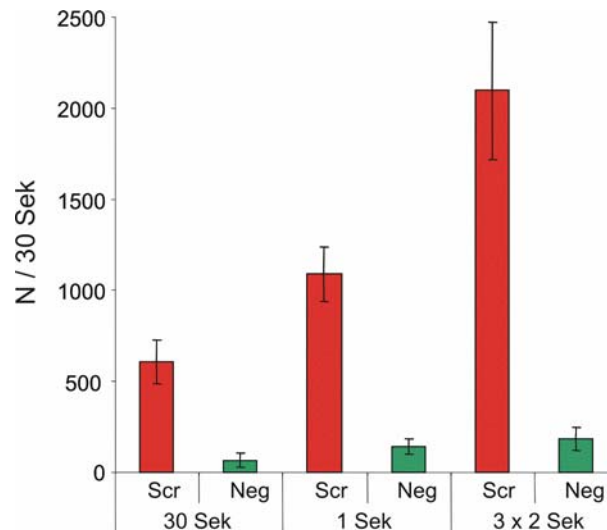
Sonde	Epitop	geeignet für FIDA	Quelle
12F10	142-160	++	Krasemann <i>et al.</i> , 1999
Saf32	Oktarepeat	++	Rodolfo <i>et al.</i> , 1999
Saf61	142-160	-	Demart <i>et al.</i> , 1999
Saf84	160-170	-	Demart <i>et al.</i> , 1999
Pri308	142-160	-	Demart <i>et al.</i> , 1999
4H11	unbekannt	-	Prof. Schätzl, München
RNA-Aptamer A	23-52	-	Weiss <i>et al.</i> 1997
RNA-Aptamer B	23-52	-	Weiss <i>et al.</i> 1997

3.5 Optimierung der Aufbereitung von Pelletfraktionen aus Aufreinigungen von pathologischem PrP aus Hirngewebe

Bei FIDA-Messungen pathologischer PrP-Aggregate aus Hirngewebe stellte sich heraus, dass eine spezifische Aggregatverteilung nötig ist, um signifikante Unterschiede zwischen den Proben infizierter und nicht-infizierter Tiere messen zu können. Um sich dieser Anforderung zu nähern, wurden verschiedene Resuspendierungsmethoden auf das Pellet der Aufreinigung mittels NaPTA-Fällung (siehe Kap. 3.2) angewandt. Um die Wirkung der Resuspendierungsmethoden auf die Aggregatverteilung zu untersuchen, wurde diese mittels Dichtegradientenzentrifugation (Saccharosegradienten-Zentrifugation) analysiert.

Auf das PrP^{Sc}-Pellet aus der NaPTA-Fällung wurden 200 µl PBS pipettiert. Anschließend wurde das Pellet zur Resuspendierung verschiedenen Ultraschallbedingungen ausgesetzt. Die Ultraschallung erfolgte unter gleicher Leistungsstärke für: i) 30 Sekunden in einem Ultraschallbad, ii) eine Sekunde Ultraschallpuls mittels Ultraschall-Nadelsonde (Sonificator Labsonic U, Braun Dissel, Melsungen, D) iii) drei mal zwei Sekunden Ultraschallung mittels Ultraschall-Nadelsonde. Beim Einsatz der Nadelsonde wurde die Ultraschall-Sonde direkt in den Puffer eingetaucht. Ein Teil der Suspension (10 µl entspricht $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ) wurde mittels 2D-FIDA analysiert (Abb. 3.14) und der verbleibende Anteil der Suspension (190 µl entspricht $2,375 \times 10^{-2}$ gÄ) wurde über einen Saccharose-Stufen-Gradienten (10 % - 45 %) geschichtet und für eine Stunde bei $200.000 \times g$ im Ausschwingrotor (TLS-55) ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert und die Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse auf ihren PrP-Gehalt analysiert (Abb. 3.15 B). Zur Analyse der resultierenden Saccharose-Konzentration wurde ein Gradient mit Puffer überschichtet, zentrifugiert und anschließend die fraktionierten Proben refraktrometrisch analysiert (Abb. 3.15 A).

Die 2D-FIDA-Messungen ergaben, dass die Suspendierung mit 3 x 2 Sekunden Ultraschall mit der Ultraschallsonde das beste Resultat lieferte (Abb. 3.14). Zum Vergleich wurden gleich behandelte Negativkontrollen nicht-infizierter Hamster mittels 2D-FIDA gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass der durch die negativen Proben verursachte Hintergrund leicht, jedoch nicht signifikant variierte.



**Abb. 3.14 2D-FIDA-Messungen verschieden suspendierter Aufreinigungspellets
Scrapie-infizierter und nicht infizierter Hamsterhirnproben**

In den 2D-FIDA Messungen wurden Alexa488-markierter Antikörper R1 und Alexa633-markierter Antikörper D13 in Kombination mit jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ von PrP^{Sc}-Proben und negSHa-Proben eingesetzt. Die Proben wurden zuvor unterschiedlichen Suspendierungsbedingungen ausgesetzt. Diese variierten von 30 Sekunden im Ultraschallbad bis hin zu einer Sekunde bzw. dreimal zwei Sekunden mit Ultraschall-Nadel-Sonde. Die Mittelwerte von jeweils zehn 30-Sekundenmessungen pro Probe wurden aufgetragen.

Die Analyse von Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation zeigte, dass die Aggregate nach unterschiedlicher Suspendierung verschiedene Verteilungsmuster aufwiesen (Abb. 3.15 B).

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen, dass der Einsatz der Bechersonde ein distinktes PrP-Aggregat-Verteilungsmuster verursachte, wobei die Aggregate zum einen bei 10 % und zum anderen bei 45 % Saccharose akkumulierten. Dies ließ den Schluss zu, dass bei dieser Behandlung einerseits sehr kleine PrP-Einheiten aus dem Pellet abgelöst wurden, und andererseits große PrP-Aggregate verblieben. Von Tzaban und Kollegen (2002) wurde beschrieben, dass PrP^C aus Hirnhomogenat nicht-infizierter Hamster bei 10 % Saccharose akkumuliert. Hierdurch lässt sich ableiten, dass das pathologische PrP, welches nach Sonifikation bei 10 % Saccharose akkumuliert, aus monomeren PrP-Einheiten besteht. Dies erklärt, dass bei den FIDA-Messungen wenige große Aggregate detektiert wurden, da monomeres oder oligomeres PrP nicht ausreichend fluoreszenzmarkierte Antikörper binden kann, um hohe Fluoreszenzintensitäten zu verursachen. Eine andere Deutungsmöglichkeit für die PrP-Akkumulation bei 10 % Saccharose wäre das Flotieren von PrP-Aggregaten durch Adhäsion mit Lipiden. Dieses Flotieren trat jedoch immer nur dann auf, wenn SDS in der Suspension vorhanden war (Riesner *et al.*, 1996). Da dieser Ansatz kein SDS beinhaltete, ist es jedoch gerade im Zusammenhang mit den FIDA-Ergebnissen wahrscheinlicher, dass es sich tatsächlich um monomeres PrP handelte. Hieraus folgt, dass sich die Suspendierungsmethode mittels 30 Sekunden Sonifikation im Ult-

raschallbad weniger eignete, um eine für FIDA-Messungen optimierte Aggregatverteilung zu erreichen.

Die Verteilungen von PrP-Aggregaten, welche durch Ultraschallung mittels Nadelsonde hervorgerufen wurde, unterschieden sich weniger stark voneinander. In beiden Fällen traten kaum Aggregate bei niedrigen Saccharosekonzentrationen auf, was darauf schließen lässt, dass das Pellet im Ganzen zerschlagen wurde und daher viele große Aggregate entstanden und nicht wie im Ultraschallbad jeweils kleine Bruchstücke vom Pellet abgelöst wurden. Bei 3 x 2 Sekunden Ultraschallung mittels Ultraschallsonde tritt eine gleichmäßigere Verteilung geringer Mengen von Aggregaten über den kompletten Saccharosekonzentrationsbereich auf, dies könnte ein Grund für das bessere Ergebnis in den FIDA-Messungen sein.

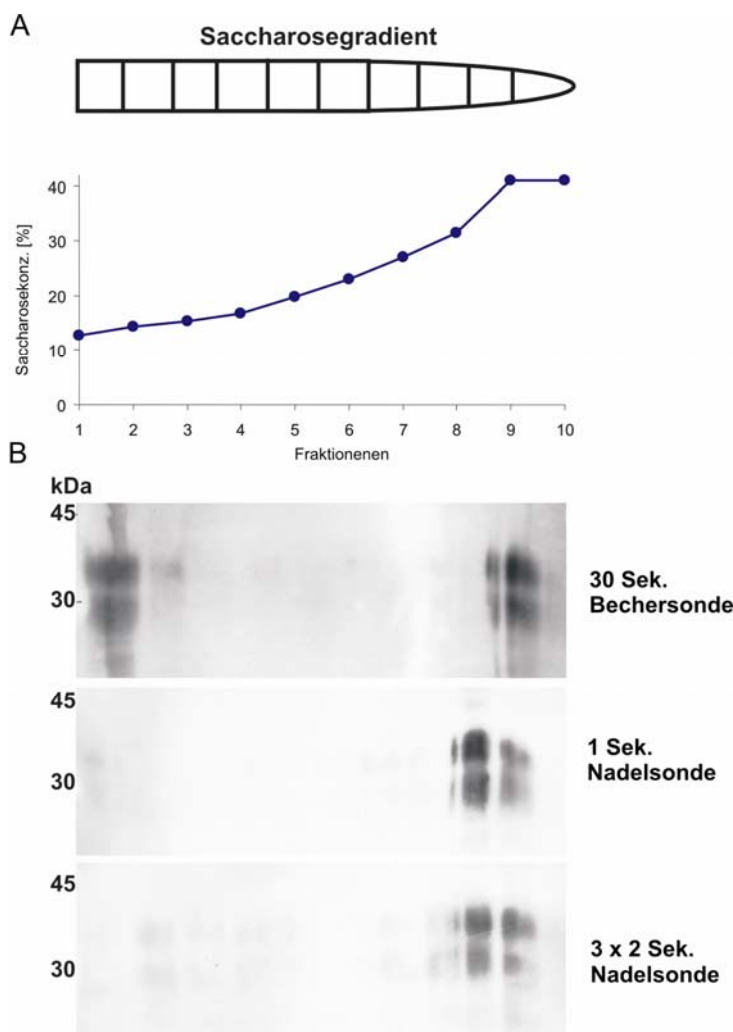


Abb. 3.15

A. Bestimmung der Saccharosekonzentrationen nach präparativer Ultrazentrifugation

Ein Saccharosekonzentration-Stufen-Gradient wurde mit PBS überschichtet und für eine Stunde bei $200.000 \times g$ zentrifugiert. Der Gradient wurde in zehn Fraktionen geerntet und die Saccharosekonzentration der Fraktionen refraktometrisch bestimmt.

B. Western-Blot-Analyse der Fraktionen von verschieden resuspendierten Aufreinigungspellets Scrapie-infizierter Proben

Jeweils ein aus der NaPTA-Fällung von Scrapie-Proben resultierendes Pellet wurde unter verschiedenen Ultraschallbedingungen suspendiert. Diese variierten von 30 Sekunden im Ultraschallbad bis hin zu einer Sekunde bzw. dreimal zwei Sekunden mittels Nadelsonde. Die resultierenden Suspensionen wurden über einen Saccharosegradient (10 %-45 %) geschichtet und für eine Stunde bei $200.000 \times g$ ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

Für die Suspendierung aus der NaPTA-Fällung von Scrapie-Hirnhomogenaten resultierender Pellets ist eine Ultraschallbehandlung von drei mal zwei Sekunden mittels Ultraschall-Nadel-Sonde am besten geeignet. Im Vergleich zu den anderen Ultraschallungsarten erhält man hiermit eine Aggregatverteilung, welche für 2D-FIDA-Messungen die besten Ergebnisse lieferte.

3.6 Analyse von Scrapie- und BSE-Proben mittels 2D-FIDA

Um die bisher beschriebenen Systemkomponenten aus Proteinase K - freier Aufreinigung, Suspendierung des resultierenden Pellets und für 2D-FIDA-Messungen geeigneten Sonden in Kombination zu testen, wurden jeweils sechs Proben von infizierten und nicht-infizierten Tieren aufgereinigt, resuspendiert und in Messreihen mittels 2D-FIDA durchgeführt.

3.6.1 Analyse von PrP^{Sc}-Proben und Negativkontrollen mittels 2D-FIDA

Für die 2D-FIDA-Messreihe von PrP^{Sc}-Proben und negSHa-Proben wurden die Antikörper D13 und R1 fluoreszenzmarkiert und als Sonden eingesetzt. Für die Messungen wurden jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ des aus der NaPTA-Fällung resultierenden Pellets eingesetzt, wobei dieses zuvor durch drei zwei-sekündige Ultraschallpulse mittels Ultraschallsonde resuspendiert wurde. Die entsprechenden Negativkontrollen nicht-infizierter Tiere wurden gleichbehandelt. Es wurden jeweils zehn 2D-FIDA-Messungen für 30 Sekunden durchgeführt und die Messungen nach der in Kap. 3.3 entwickelten Methode ausgewertet. Die so berechneten Mittelwerte der 2D-FIDA-Messungen sind in Abb. 3.16 dargestellt. Die Scrapie-infizierten Hamster konnten signifikant von den nicht-infizierten unterschieden werden (Abb. 3.16). Die zuvor entwickelten Systemkomponenten konnten somit zu einem diagnostischen Ansatz im Hamster-Modellsystem zusammengeführt werden.

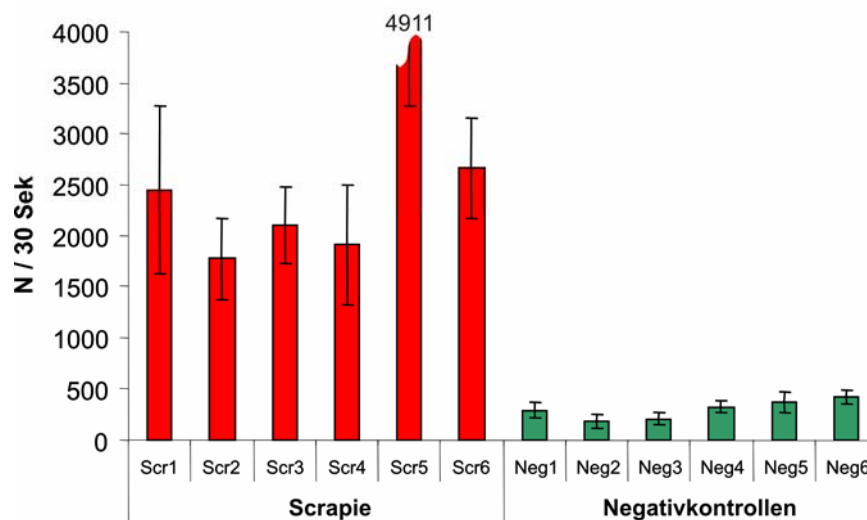


Abb. 3.16 2D-FIDA Reihenmessung von Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Hamsterhirnproben

In den 2D-FIDA Messungen wurden Alexa488-markierter Antikörper R1 und Alexa633-markierter Antikörper D13 in Kombination mit PrP^{Sc}-Proben von sechs Scrapie-infizierten und negSHa-Proben von sechs nicht-infizierten Hamstern eingesetzt. Es wurden jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ verwendet. Die Proben wurden zehnmal für 30 Sekunden gemessen und wie unter Kap.3.3 beschrieben ausgewertet. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Auswertungsergebnisse wurden im Histogramm aufgetragen.

3.6.2 Analyse von PrP^{BSE}-Proben und Negativkontrollen mittels 2D-FIDA

Der gleiche Messansatz wurde mit aufgereinigten BSE-Proben und entsprechenden nicht-infizierten Negativkontrollen des Rindes, welche freundlichst von der Arbeitsgruppe von Roy Jackman (VLA, England) zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Die Proben wurden ebenfalls ohne Proteinase K - Verdauung aufgereinigt. Die zur Verfügung gestellten Aufreinigungs-Pellets (0,33 gÄ) wurden in 300 µl PBS mittels drei zwei-sekündigen Ultraschallpulsen resuspendiert und $2,2 \times 10^{-2}$ gÄ für die 2D-FIDA-Messungen eingesetzt. Als fluoreszenzmarkierte Sonden dienten die Antikörper Saf32 und 12F10. Auch für die Rinderproben wurden jeweils zehn 2D-FIDA-Messungen für 30 Sekunden durchgeführt und die einzelnen Messungen nach der in Kap. 3.3 entwickelten Methode ausgewertet. Die so berechneten Mittelwerte der 2D-FIDA-Messungen sind in Abb. 3.17 dargestellt.

BSE-infizierte Rinderproben konnten signifikant von nicht-infizierten unterschieden werden, somit konnte zum ersten Mal ein diagnostisches System demonstriert werden, welches ohne Einsatz von Proteinase K BSE-Infektionen signifikant nachzuweisen kann.

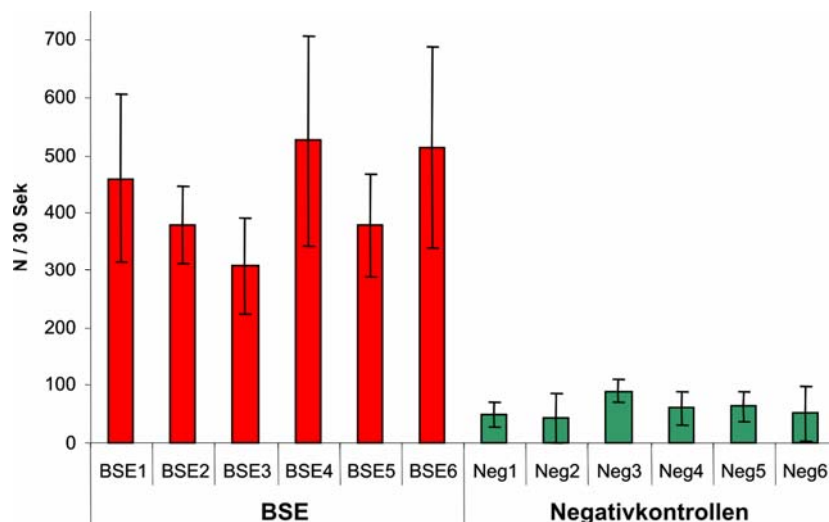


Abb. 3.17 2D-FIDA-Messungen BSE-infizierter und nicht-infizierter Rinderhirnproben

In den 2D-FIDA-Messungen wurden Alexa488-markierter Antikörper 12F10 und Alexa633-markierter Antikörper Saf32 in Kombination mit jeweils $2,2 \times 10^{-2}$ gÄ aufgereinigtem Homogenat der *medulla oblongata* von sechs BSE-infizierten und sechs nicht-infizierten Rindern eingesetzt. Die Proben wurden jeweils zehnmal für 30 Sekunden gemessen und wie unter Kap.3.3 beschrieben ausgewertet. Die Mittelwerte der Auswertungsergebnisse wurden mit Standardabweichungen im Histogramm aufgetragen.

Aufgrund des Messsystems treten sowohl bei den Scrapie-infizierten Hamsterproben als auch bei den BSE-infizierten Rinderproben durch eine nicht gleichmäßige Aggregatverteilung in Suspension relativ große Standardabweichungen auf. Bei der FIDA-Methodik handelt es sich um ein System zum Einzelmolekülnachweis. In einer Suspension sind nicht immer gleich viele und gleich fluoreszente Aggregate im konfokalen Messvolumen. Auch bei Anwendung des Scanning - Mechanismus, welcher wie in Kap. 2.14.3 beschrieben für alle Messungen eingesetzt wurde, schlägt sich die

ungleiche Aggregatverteilung in den hohen Standardabweichungen nieder. Trotz der großen Standardabweichungen ist immer noch eine signifikante Unterscheidung von Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Tieren möglich, was die prinzipielle Anwendbarkeit des Systems bestätigt. Signifikant bedeutet in diesem Fall, dass jede einzelne positive Probe mit Standardabweichung sich mit keiner der Negativkontrollen mit Standardabweichung überschneidet.

3.7 Entwicklung einer neuen Analysestrategie mittels Immobilisierung von pathologischen Prionaggregaten und Nachweis mittels 2D-FIDA

Die vergleichsweise hohen Standardabweichungen bei FIDA-Messungen in Aggregatsuspensionen (Kap. 3.6) liegen darin begründet, dass bei Messungen frei in Lösung Aggregate nicht gleichverteilt vorliegen. Um diesem Ergebnis Rechnung zu tragen, wurde eine neue Analysestrategie entwickelt. Diese hat zum Ziel, aufgereinigte Prionaggregate auf der Oberfläche eines Messchips mit Hilfe eines Captures (z.B. spezifischer Antikörper) zu immobilisieren und dann "am Boden" zu detektieren. Da die Immobilisierung eine Bewegung der Aggregate verhindert, kann die Oberfläche durch „Scanning“ (also Bewegung des konfokalen Volumenelements Kap. 2.14.3) nach Aggregaten abgesucht werden. Durch die Fixierung der Aggregate sollten zwei Vorteile genutzt werden. Zum einen sollte die Fixierung zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beitragen und zum anderen sollten die Aggregate aufkonzentriert und somit nur noch in zwei anstatt in drei Raumdimensionen verteilt vorliegen. Des Weiteren könnten Waschschriffe eingeführt und damit das Signal-Rauschverhältnis verbessert werden.

Generelle Voraussetzung für den Einzelpartikelnachweis von immobilisierten Prionpartikeln mittels Messungen im FCS ist eine genaue Fokussierbarkeit des konfokalen Volumenelements auf die Höhe der zu scannende Fläche. Aus diesem Grunde wurde das Inside 2-Strahl-FCS auf die Genauigkeit der Fokussierbarkeit des konfokalen Volumenelements in z-Richtung (Höheneinstellung), welche mit Hilfe einer Motorsteuerung erfolgte, getestet. Es stellte sich heraus, dass eine Höhenfokussierung nur mit einer Genauigkeit von $\pm 10 \mu\text{m}$ möglich war und zudem ein Hysterese-Effekt beim Variieren der Höheneinstellung auftrat (Abb. 3.18).

Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Hecks von Evotec Technologies eine Lösung erarbeitet und das FCS-Gerät um ein Piezo-Element erweitert, welches eine Höheneinstellung unabhängig von der Motorsteuerung mit einer Genauigkeit von 100 nm ermöglicht.

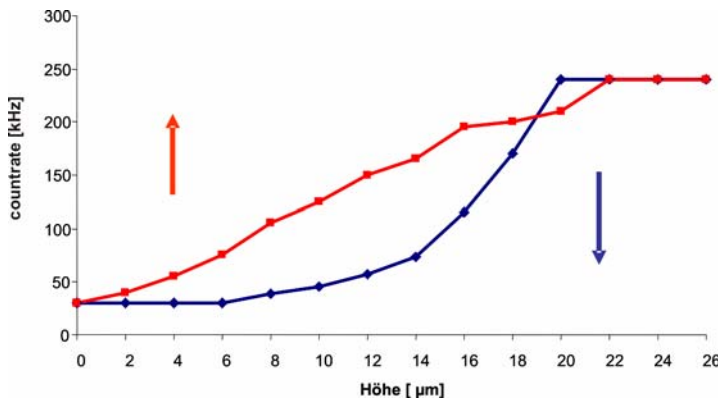


Abb. 3.18 Hystereseeffekt der Höheneinstellung in z-Richtung mittels Motorsteuerung des FCS

3.8 Beschichtung von Glasoberflächen mit Capture-Proteinen

Um die Aggregate spezifisch auf der Glasoberfläche der Messchips zu immobilisieren, muss diese zuvor mit einem Capture (z.B. Antikörper) beschichtet werden. Zur Beschichtung von Glasoberflächen mit Proteinen sind in der Literatur verschiedene Ansätze beschrieben. Zur Evaluierung des Messansatzes wurde ein einfacher Ansatz gewählt: eine adhäsive Bindung des Captures auf eine zuvor mittels poly-D-Lysin aktivierte Oberfläche. Die Effizienz der Aktivierung der Glasoberfläche kann nach Wiegand (2002) durch kurzes Abflämmen der Glasoberfläche gesteigert werden. Zur Beschichtung wurden die 24-Well Assay-Chips (Evotec) mit Glasboden kurz mittels Bunsenbrenner abgeflammt und anschließend 20 µl Poly-D-Lysin (10 µg/µl) in PBS in die Wells der Assay-Chips pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C (optional über Nacht bei 4 °C) inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 µg Capture in PBS (in späteren Versuchen die Antikörper R1 für Scrapie-Proben und Saf32 für BSE-Proben) in die Wells pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden drei Waschschrte mit PBS durchgeführt und freie Bindeplätze durch einstündige Inkubation mit einer 5 %igen-BSA-Lösung geblockt.

Um zu überprüfen, ob auf diese Weise der Glasboden mit Antikörper beschichtet werden konnte, wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper für die Beschichtung eingesetzt. Durch den Einsatz von Chemolumineszenzreagenzien (ECL-PlusTM-Detektions-Reagenz) konnte nur dort, wo die Antikörper-gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysierte, Lumineszenz entstehen, welche nach einer Expositionszeit von 10 Sekunden auf Röntgenfilmen (HyperfilmTM ECL) detektiert werden konnte. Somit konnte überprüft werden, ob die Oberfläche mit Antikörper beschichtet war. Hierbei zeigte sich, dass der Glasboden unter den beschriebenen Bedingungen mit Antikörper beschichtet werden konnte (Abb. 3.19). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es nicht mehr zur unspezifischen Anhaftung von Antikörpern kommen konnte, wenn die Oberfläche zuvor mittels BSA geblockt wurde.

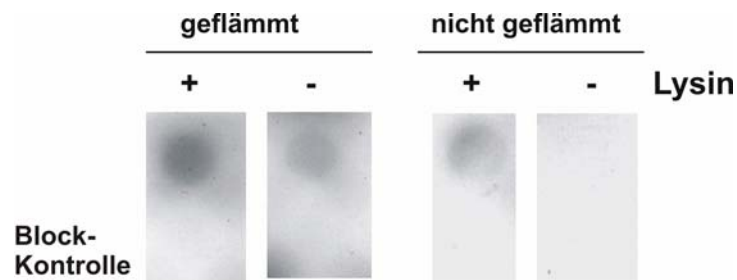


Abb. 3.19 Beschichtung von Glasoberflächen mit Antikörpern

Ein 24-Well Assay-Chip (Evotec) wurden vor der Beschichtung kurz mittels Bunsenbrenner abgeflämmt, ein anderer zum Vergleich nicht. In die Wells der Assay-Chips wurde eine 10 µg/µl Poly-D-Lysin-Lösung pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (+). Zur Kontrolle wurden auch Wells nicht mit Poly-D-Lysin gefüllt (-). Nach drei Waschschritten mit PBS wurde jeweils 1 µg Peroxidasegekoppelter AK in die Wells pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden wieder drei Waschschriffe mit PBS durchgeführt und verbleibende Bindeplätze mit 5%iger BSA-Lösung für eine Stunde geblockt. Um die Beschichtungseffizienz zu überprüfen wurde Chemolumineszenz-Reagenz in die Wells pipettiert und der gesamte Chip für zehn Sekunden auf einen Röntgen-Film gelegt, welcher anschließend entwickelt wurde. Um zu überprüfen, ob es bei den jeweiligen Ansätzen auch zu unspezifischen Bindungen kommen kann, wurde die aktivierte Oberfläche vor der Zugabe des AK mit 5 %-BSA geblockt (Blockkontrolle).

3.9 Immobilisierung von pathologischen PrP-Aggregaten

Nachdem die Beschichtung der Glasböden der Assay-Chips mit Antikörpern etabliert werden konnte, wurden PrP-spezifische Capture eingesetzt, damit die spezifische Immobilisierung der pathologischen PrP-Aggregate erfolgen konnte. Zunächst wurde der Antikörper R1 als Capture für mittels NaPTA-Fällung aufgereinigtes PrP^{Sc} aus Hamsterhirn Scrapie-infizierter Hamster und entsprechender Negativkontrollen aus nicht-infizierten Tieren eingesetzt. Hierzu wurden jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ aufgereinigte und mittels Ultraschall resuspendierte Proben in die mit R1 beschichteten Wells pipettiert und für drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde mehrfach mit TBST gewaschen. Um die immobilisierten Aggregate mittels Fluoreszenz-Messung nachweisen zu können, wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper R1 und D13 eingesetzt, da sich diese Kombination bei Messungen im FCS frei in Lösung bewährt hatten, und für zwei Stunden unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz mit TBST gewaschen.

Um die Höhenbereiche über der Chipoberfläche zu evaluieren, in denen sich die immobilisierten Prion-Partikel befanden, mussten zunächst Höhenscans im FCS in z-Richtung durchgeführt werden. Hierzu wurde zunächst auf die Oberseite des Glasbodens fokussiert und Messungen mit jeweils 5 µm Höhendifferenz durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass nur in einen Höhenbereich von insgesamt 30 µm Fluoreszenz gemessen werden konnte. Dies ließ den Schluss zu, dass eine Immobilisierung stattgefunden hatte. Jedoch konnten auch in den Negativkontrollen gerade in den Bereichen direkt um die Oberfläche des Glasbodens hohe Fluoreszenzintensitäten gemessen werden (Abb. 3.20 A). Diese unspezifische Fluoreszenz ist wahrscheinlich auf unspezifische Anhaftung von fluoreszenz-markiertem Antikörper sowie

der Anhaftung von freiem Fluoreszenzfarbstoff, welcher nach Antikörpermarkierung nicht abgetrennt werden konnte, zurückzuführen. Die Fluoreszenzintensitäten in der negativen Kontrolle konnten durch eine Verringerung der eingesetzten Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Antikörper von 10 µg/ml auf 0,1 µg/ml und Verlängerung der anschließenden Waschschrte mit TBST auf dreimal eine Stunde reduziert werden (Abb. 3.20 B).

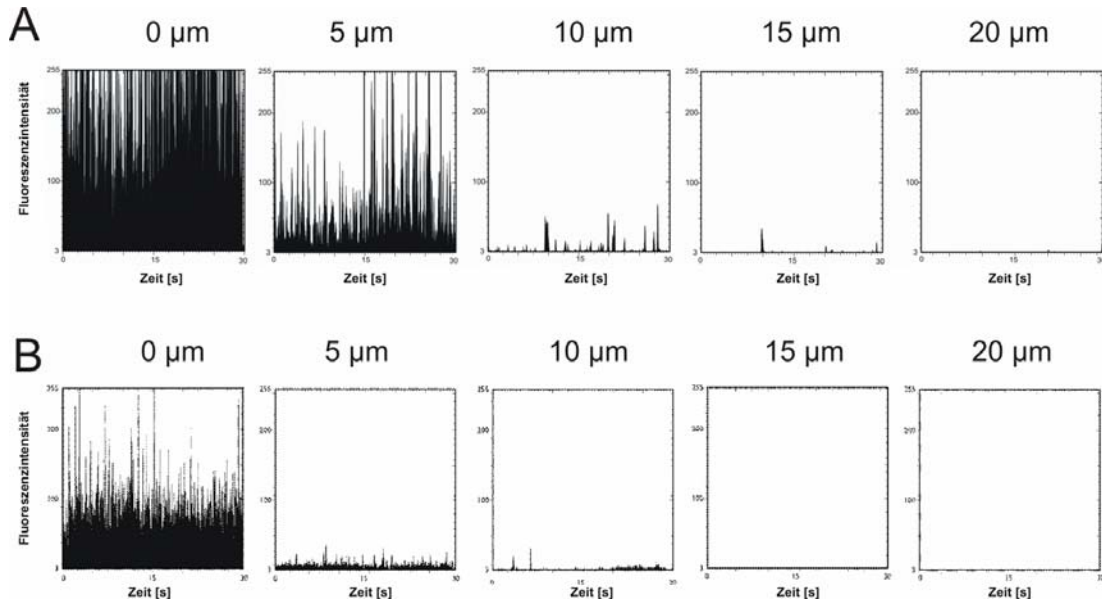


Abb. 3.20 Fluoreszenz-Intensitäts-Messungen beim Höhenscans durch immobilisierte Proben
Der Immobilisierungsansatz (Abb. 3.18) wurde mit negSHa-Proben durchgeführt. Als Detektionssonde wurden der fluoreszenzmarkierten Antikörper D13 in Konzentrationen von 10 µg/ml (**A**) und 0,1 µg/ml (**B**) eingesetzt. Die anschließenden Waschschrte wurden dreimal für zehn Minuten (**A**) bzw. dreimal für eine Stunde (**B**) mit TBST durchgeführt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 0 – 20 µm von der Glasbodenoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

Anschließend wurden vergleichende Fluoreszenzmessungen von Immobilisierungsansätzen mit PrP^{Sc}-Proben und Negativkontrollen durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitätsverläufe lassen deutliche Unterschiede erkennen (Abb. 3.21). Bei Höhen von 5 – 20 µm über der Glasoberfläche, traten bei Scrapie-Proben viele Fluoreszenz-Intensitäts-Peaks auf, die in der Negativkontrolle nicht vorkamen. Diese sind auf die Bindung vieler fluoreszenzmarkierter Antikörper an die pathologischen Prion-Aggregate zurückzuführen. Dies zeigte, dass sowohl die Immobilisierung der PrP^{Sc}-Aggregate über den Capture als auch die Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper R1 und D13 an die Aggregate erfolgreich war.

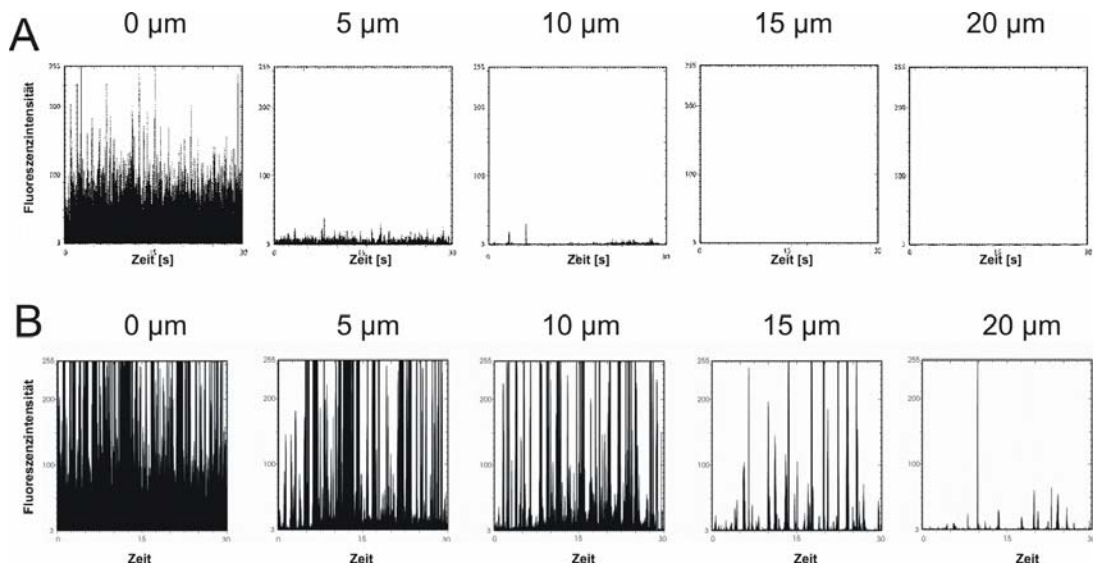


Abb. 3.21 Fluoreszenz-Intensitäts-Messungen beim Höhenscan durch immobilisierte PrP^{Sc}-Probe und Negativkontrolle

Der Immobilisierungsansatz wurde einer negSHa-Probe (A) sowie mit einer PrP^{Sc}-Probe (B) durchgeführt. Als Detektionssonde wurde fluoreszenzmarkierter D13 eingesetzt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 0 – 20 µm von der Glasbodenoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

Die Unterschiede zwischen Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Proben werden durch die Darstellung der 2D-FIDA-Daten noch deutlicher (Abb. 3.22). Die Bindung der beiden fluoreszenzmarkierten Antikörper an immobilisierte PrP-Aggregate führt zum Auftreten einer charakteristischen Diagonale der Fluoreszenzintensitäten im 2D-FIDA-Plot. Hierbei sind auf der x-Achse, die Fluoreszenz-Intensitäten des mit Alexa 488-markierten Antikörpers und auf der y-Achse die Fluoreszenz-Intensitäten des mit Alexa 633-markierten Antikörpers aufgetragen. Die Häufigkeiten des Auftretens der Fluoreszenzintensitäten sind in der z-Achse codiert (Graustufen). Da enorm starke Signale gemessen wurde, konnte diese charakteristische Diagonale erst bei einer Höhe von 15 µm aufgelöst werden.

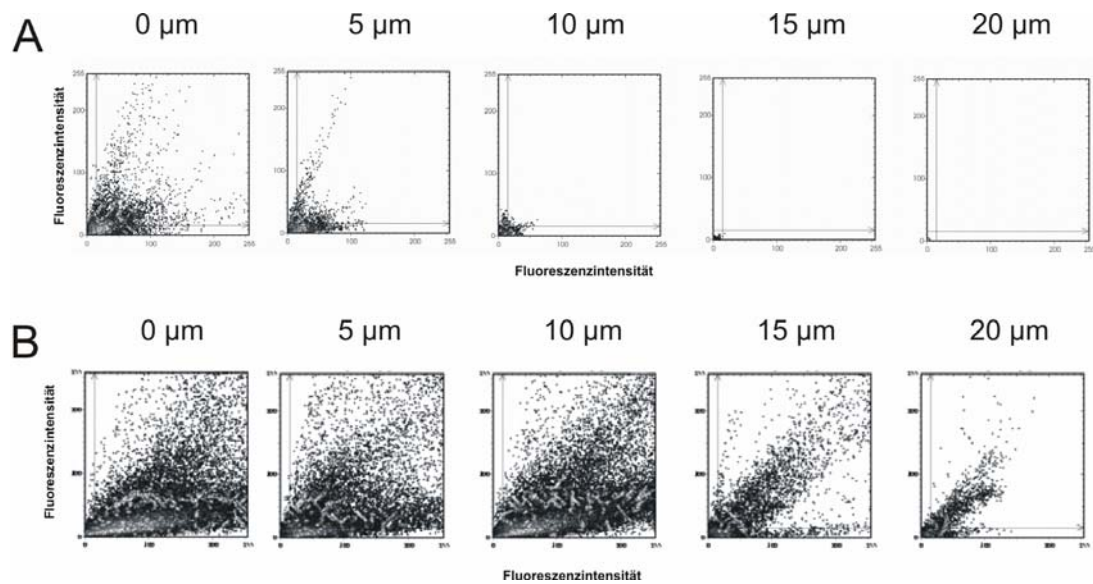


Abb. 3.22 2D-FIDA-Plots der Höhenscans durch immobilisierte PrP^{Sc}-Proben und Negativkontrollen

Der Immobilisierungsansatz wurde mit einer PrP^{Sc}-Probe (**B**) sowie einer Negativkontrolle (**A**) durchgeführt. Als Detektionssonden wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper R1 und D13 eingesetzt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 0 – 20 μm von der Chipoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

Das somit erfolgreich etablierte Protokoll zur Immobilisierung von pathologischen Prionaggregaten und anschließender Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist in Abb. 3.23 zusammengefasst.



Abb. 3.23 Protokoll zur Immobilisierung und Markierung von pathologischen Prionaggregaten

3.10 Optimierung des Messansatzes von immobilisierten Aggregaten mittels 2D-FIDA

Um Aggregate auf einer möglichst großen Fläche erfassen zu können, wurde der Messfokus nicht nur wie durch das FCS standardmäßig vorgegeben, gescannt (Kap. 2.14.3), sondern die zu erfassende Fläche erweitert. Hierzu wurden sieben nebeneinander liegende Flächen in einem Well des Assay-Chips (Abb. 3.24) abgefahren. Ein kompletter Scan der Bodenfläche eines Wells war bislang nicht möglich, da nur Chips mit runden Wells zur Verfügung standen und der Mittelpunkt des Wells manuell eingestellt werden musste, so dass ein „Sicherheitsabstand“ nötig ist, um zu verhindern einen Well während der Messung zu verlassen. Wie in den einzelnen Flächenscans zu sehen, war die Aggregatverteilung über die verschiedenen Flächen erwartungsgemäß nicht gleich. In einigen Flächen waren kaum oder sogar keine Aggregate vorhanden, wohingegen in anderen Flächen viele Aggregate vorlagen. Durch Summierung der Flächen ergibt sich eine repräsentative Beschreibung der Probe.

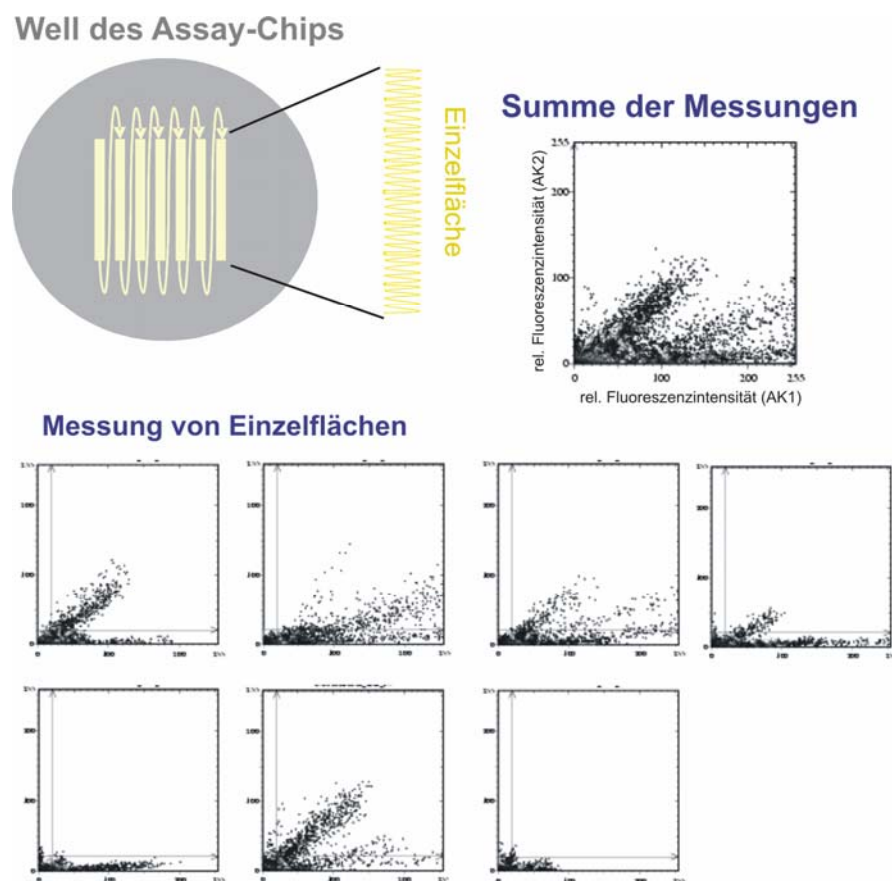


Abb. 3.24 Summierung von sieben gescannten Flächen einer immobilisierten PrP^{Sc}-Probe

Der Immobilisierungsansatz wurde mit einer PrP^{Sc}-Probe mit einem Abstand von 15 µm über dem Glasboden des Chips durchgeführt. Als Detektionssonden wurden fluoreszenzmarkierter AK R1 und AK D13 eingesetzt. Die Fluoreszenzmessungen wurden für 30 Sekunden an sieben nebeneinander liegenden Flächen unter Scanningbewegung durchgeführt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen wurden summiert.

Mittels des etablierten Immobilisierungs- und Messansatzes wurde ein Höhenscan durch eine Scrapie-Probe und eine Negativkontrolle durchgeführt. Die Messungen wurden, wie unter Kap. 3.3 beschrieben, ausgewertet. Hier wurde jedoch ein fester „cut off“ bei 15 relativen Fluoreszenzeinheiten gewählt, da die Fluoreszenz-Intensitäten andersartige Verteilungen aufwiesen, welche die automatische Berechnung des „cut offs“ nicht mehr zuließen. Die Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass die typische Verteilung, welche durch die freien Sonden in Lösung verursacht wurde, nicht mehr vorhanden war.

Die Ergebnisse der 2D-FIDA-Messungen des Höhenscans zeigen, dass eine signifikante Unterscheidung zwischen PrP^{Sc}-Probe und Negativkontrolle mittels Immobilisierungsansatzes möglich war (Abb. 3.24).

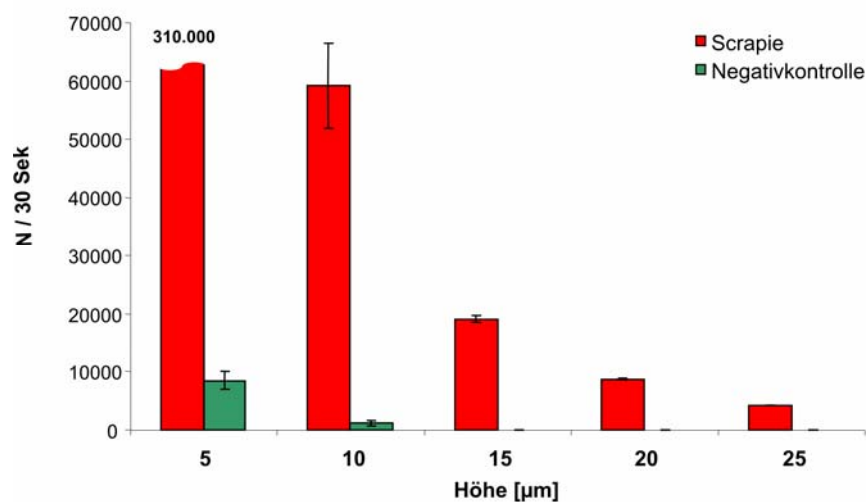


Abb. 3.24 Auswertung von 2D-FIDA-Messungen beim Höhenscan durch eine immobilisierte Scrapie-Probe und Negativkontrolle

Der Immobilisierungsansatz wurde mit einer PrP^{Sc}-Probe (**rot**) sowie einer Negativkontrolle (**grün**) durchgeführt. Als Capture wurde R1 und als Detektionssonden wurden fluoreszenzmarkierter R1 und D13 eingesetzt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 5 – 25 µm von der Glasbodenoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

Die Standardabweichungen der Messungen sind im Vergleich zu Messungen frei in Lösung sehr viel geringer und beschreiben nur noch eine Kombination aus Bleaching-Effekt und Ungenauigkeit der Motorsteuerung des FCS, da eine Diffusion der Aggregate durch die Immobilisierung nicht mehr möglich war. Der Bleaching-Effekt macht sich gerade bei Messungen in den Höhen, wo hohe Fluoreszenzintensitäten auftreten, stark bemerkbar (Abb. 3.25). Nur bei den Höhen, wo hohe Fluoreszenzintensitäten sehr häufig auftreten, sinkt die Anzahl der Fluoreszenzereignisse über einer bestimmten Intensität (cut off) im Zeitverlauf ab, welches wahrscheinlich auf das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe (Bleaching) zurückzuführen ist.

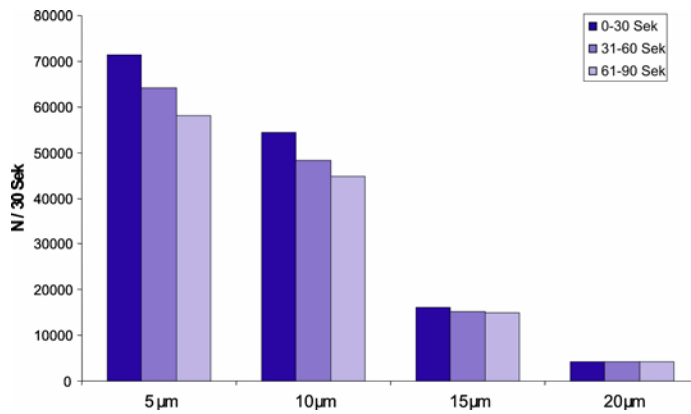


Abb. 3.25 Bleaching durch wiederholtes Messen der gleichen Fläche

Eine immobilisierte und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektierte Probe wurde dreimal hintereinander für jeweils 30 Sekunden gemessen. Die Messungen wurden auf verschiedenen Höhen durchgeführt.

3.11 2D-FIDA-Reihenmessungen von PrP^{Sc} und PrP^{BSE} im Immobilisierungsansatz

Um nun den neuen Messansatz in Bezug auf die diagnostische Anwendbarkeit zu evaluieren, wurden Messreihen mit Proben von vier verschiedenen infizierten und vier nicht-infizierten Tieren als Kontrollen durchgeführt.

Dazu wurden Hirnhomogenatproben Scrapie-infizierter Hamster und Negativkontrollen mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt und $1,25 \times 10^{-3}$ gÄ nach Resuspendierung mittels 3 x 2 Sekunden Ultraschall mit dem Antikörper R1 als Capture auf den Assay-Chips immobilisiert. Zur Detektion wurden 0,1 µg/ml fluoreszenzmarkierter R1 und D13 als Sonden eingesetzt. Nach drei einstündigen Waschschritten mit TBST wurden Fluoreszenzmessungen im FCS unter Scanning von sieben Flächen durchgeführt. Die Messungen wurden auf verschiedenen Höhen über dem Glasboden durchgeführt. Die Ergebnisse (Abb. 3.26) zeigen, dass in den Höhenbereichen von 5 µm bis 25 µm eine signifikante Unterscheidung zwischen mit Scrapie-infizierten und nicht-infizierten Hamstern möglich ist. Die Messhöhe zwischen 10 µm und 20 µm stellte sich dabei als geeignete Messhöhe, da in Höhen oberhalb, die positiven Signale erheblich abfallen und in Höhen unterhalb 10 µm der negative Hintergrund durch unspezifisch anhaftende Antikörper und freiem Farbstoff erhöht ist.

Zusammenfassend ließ sich die Aussage treffen, dass im Hamstermodell Scrapie-infizierte von nicht-infizierten Hamstern signifikant unterschieden werden konnten und im Vergleich zum Messansatz in Suspension nicht nur die Unterschiede zwischen positiven und negativen Proben eindeutiger waren, sondern vor allem die Standardabweichungen enorm reduziert werden konnten.

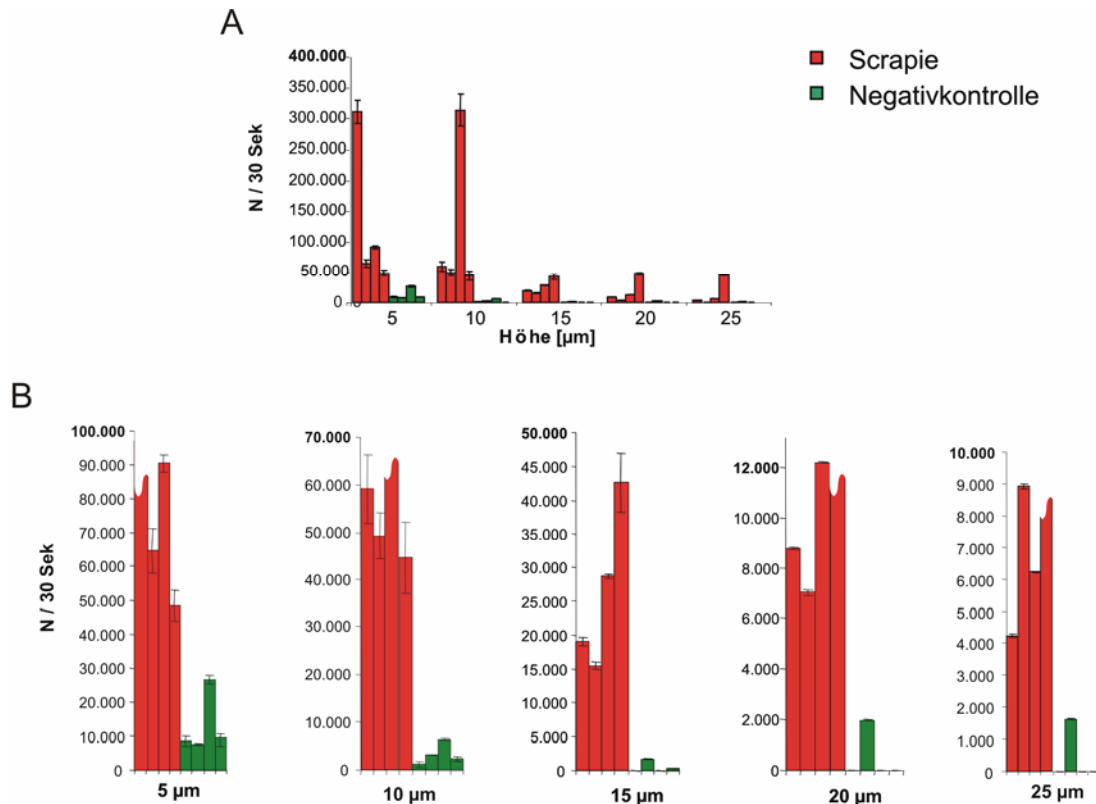


Abb. 3.26 Höhengscan durch eine immobilisierte Scrapie-Probe und Negativkontrolle via 2D-FIDA-Messung

Der Immobilisierungsansatz wurde mit vier PrP^{Sc}-Proben (rot) sowie vier Negativkontrollen (grün) durchgeführt. Als Capture wurde R1 und als Detektionssonden fluoreszenzmarkierter R1 und D13 eingesetzt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 5 – 25 µm von der Glasbodenoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

- A.** Gesamtüberblick über alle Messungen auf den unterschiedlichen Höhen
- B.** Darstellung der Messungen nach Höhen 5 – 25 µm getrennt.

Das System wurde anschließend für BSE-Proben angepasst. Hierzu wurde als Capture der Antikörper 12F10 eingesetzt. Alle anderen Schritte der Immobilisierung erfolgen analog zu denen des Scrapie-Systems. Als Sonden wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper 12F10 und Saf32 eingesetzt. Waschschriffe sowie Messansatz erfolgten analog zum Scrapie-Messansatz.

Die Ergebnisse für vier BSE-infizierte Tiere und vier Negativkontrollen sind in Abb. 3.27 dargestellt. Die Messung zeigt, dass im Höhenbereich von 10 µm – 25 µm in allen Fällen eine signifikante Unterscheidung zwischen BSE-infizierten und nicht-infizierten Tieren möglich war. Der Höhenbereich von 10 µm - 15 µm war der am besten geeignete Messbereich, da ab 20 µm das positive Signal in einigen Proben stark absank.

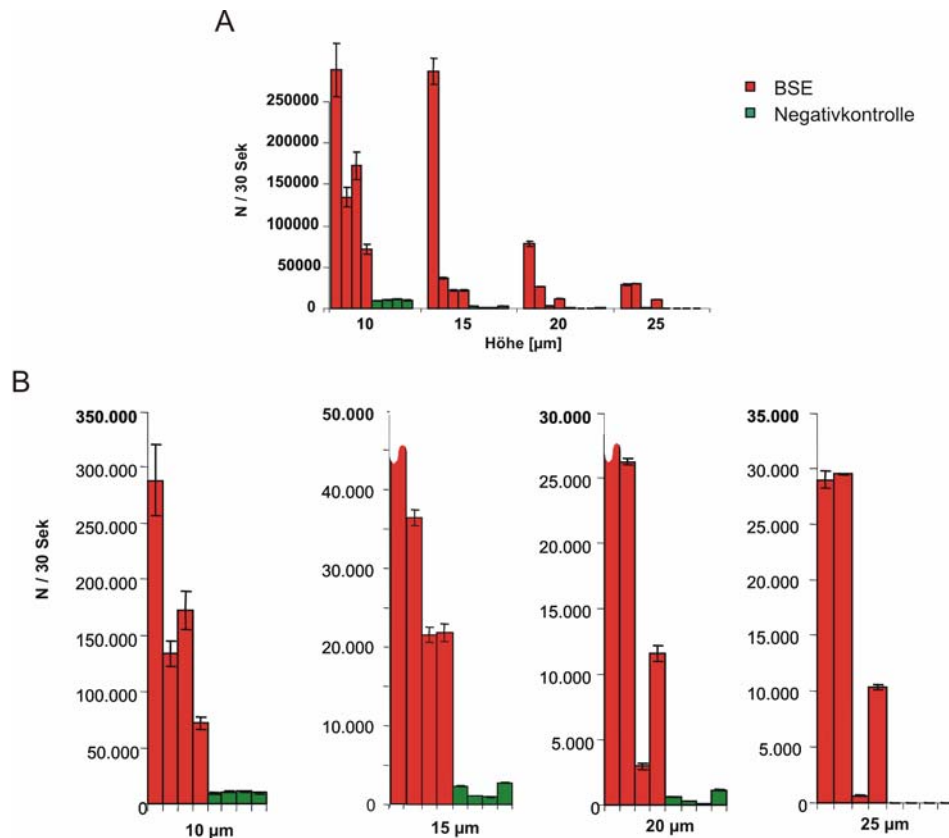


Abb. 3.27 Höhengscan durch eine immobilisierte BSE-Probe und Negativkontrolle via 2D-FIDA-Messung

Der Immobilisierungsansatz wurde mit vier PrP^{BSE}-Proben (rot) sowie vier Negativkontrollen (grün) durchgeführt. Als Capture wurde der Antikörper Saf32 und als Detektionssonden die fluoreszenzmarkierten Antikörper 12F10 und Saf32 eingesetzt. Die Proben wurden in dem Abstandsbereich von 10 – 25 µm von der Glasbodenoberfläche in fünf-Mikrometerschritten für jeweils 30 Sekunden im FCS gemessen.

- A.** Gesamtüberblick über alle Messungen auf den unterschiedlichen Höhen
- B.** Darstellung der Messungen nach Höhen 5 – 25 µm getrennt.

Mit dieser Messreihe konnte gezeigt werden, dass das Messsystem für einen diagnostischen Ansatz zur BSE-Detektion geeignet ist. Somit konnte erstmalig ein Messsystem etabliert werden, welches gänzlich auf Proteolyse verzichtet und mittels Einzelmoleküldetektion den Aggregationszustand und nicht die Proteinase K - Resistenz, als diagnostische Größe ausnutzt.

4 Diskussion

4.1 Notwendigkeit einer neuartigen Diagnostik für Prion-Krankheiten

Obwohl die Prion-Krankheit beim Menschen keine weit verbreitete Krankheit ist, hat das Auftreten der neuen Variante CJD (vCJD) in Verbindung mit BSE (Will *et al.*, 1996; Collinge *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 1999) großes öffentliches Interesse erregt. Inzwischen sind neben vielen europäischen Ländern auch in Kanada und Japan erste Fälle von BSE aufgetreten und verursachten erhebliche Schäden für die fleischverarbeitende Industrie (Schiermeier, 2001; Donnelly *et al.*, 2003; Nolen, 2004).

Ein bisher unterschätzter aber wichtiger Aspekt zur Abschätzung des Gefahrenpotentials bei der Infektion mit Prion-Krankheiten ist der Übertragungsweg zwischen Menschen selber. Im Fall der vCJD ist die Gefahr der Übertragung erhöht, da PrP^{Sc} im peripheren Gewebe in viel höheren Konzentrationen vorliegt als dies bei der sporadischen CJD (sCJD) der Fall ist (Wadsworth *et al.*, 2001). Während bisher keine Übertragung von sCJD durch Bluttransfusionen bekannt war, wurde kürzlich über einen ersten Fall berichtet, bei dem eine Infektion mit vCJD durch eine Bluttransfusion wahrscheinlich ist (Llewelyn *et al.*, 2004). Hierbei entwickelte ein 69 Jahre alter Patient Symptome von vCJD, nachdem er 6,5 Jahre zuvor eine Transfusion erhalten hatte. Die Blutspende stammte von einem Menschen, der 3,5 Jahre nach der Spende vCJD-Symptome aufwies. In diesem Zusammenhang wurde ein zweiter Fall beschrieben, wobei der Erreger wahrscheinlich ebenfalls durch eine Bluttransfusion übertragen wurde (Peden *et al.*, 2004). In diesem besonderen Fall konnte bei einem Patienten, welcher nicht an einer neurodegenerativen Krankheit verstarb, trotzdem PK-resistentes Prion-Protein in Hirnbiopsie-Proben nachgewiesen werden. Dieser Patient hatte fünf Jahre zuvor eine Bluttransfusion erhalten, wobei der Spender 18 Monate nach der Spende erste Symptome von vCJD aufwies. Diese Diagnose konnte durch Hirnbiopsieproben bestätigt werden. Besonders brisant ist, dass der Empfänger der Bluttransfusion heterozygot (Methionin/Valin) im Codon 129 des PrP-Gens war. Alle bis dato bekannten vCJD-Fälle kamen ausschließlich in Patienten vor, welche homozygot Methionin/Methionin waren (Collinge *et al.*, 1996b). Es stellt sich also unweigerlich die Frage, ob über Bluttransfusionen eine Infektion ohne die vormals beschriebene genetische Prädisposition der Homozygotie möglich ist.

Aus diesen Fällen lässt sich schließen, dass der Erreger mehrere Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome in Blut vorhanden ist und auch über mehrere Jahre im Blut überdauern kann, ohne die Infektiosität zu verlieren. Dass Prion-Krankheiten prinzipiell durch Blut übertragbar sind, konnte im Tiermodell bereits an Bluttransfusionsexperimenten mit Schafen bewiesen werden (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002). Auch im Nagetiermodell für vCJD konnte Infektiosität im Blut nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 1999b).

Da zurzeit nicht abschätzbar ist, wie viele von vCJD betroffene Menschen sich in der präklinischen Phase befinden, steigt der Bedarf einer präklinischen Diagnostik, um der Gefahr der iatrogenen Übertragung zu begegnen. Die Tragweite einer iatrogen verursachten Ausbreitung von CJD zeigte sich bereits bei Infektionen über menschliches Gewebe oder über aus menschlichen Geweben gewonnenen Medikamenten. Als Beispiele sind hier Verabreichungen von kontaminierten Wachstumshormonen sowie Transplantationen von Hirnhaut oder Augenhornhaut zu nennen, bei denen einige hundert Menschen infiziert wurden.

Bisher ist eine präsymptomatische Diagnostik für CJD nicht möglich (Brown *et al.*, 2001; Ingrosso *et al.*, 2002, Schiermeier, 2001). Somit ist eine Frühdiagnostik gerade im Hinblick auf die Sicherheit von Blutbanken und anderem humanen Material für den therapeutischen Einsatz von enormer Bedeutung. Eine präklinische Diagnostik ist auch in Bezug auf die effektive Behandlung von großer Bedeutung. Symptome treten meist erst dann auf, wenn schon schwerwiegende irreversible Hirnschäden vorliegen. Im Tiermodell wurden bisher einige therapeutische Ansätze dargestellt, welche den Ausbruch der Krankheit verzögern konnten. Jedoch konnte noch kein Ansatz entwickelt werden, welcher die Krankheit im fortgeschrittenen Stadium heilen kann (Aguzzi *et al.*, 2001; Dormont, 2003; Rossi *et al.*, 2003). Mit einer präklinischen Diagnostik könnten auch Therapiestrategien erfolgsversprechend sein, die im fortgeschrittenen Stadium keine Besserung bewirken. Eine Übersichtsdarstellung von Gebieten, welche von einer Frühdiagnostik profitieren würden, ist in Abb. 4.1 dargestellt.

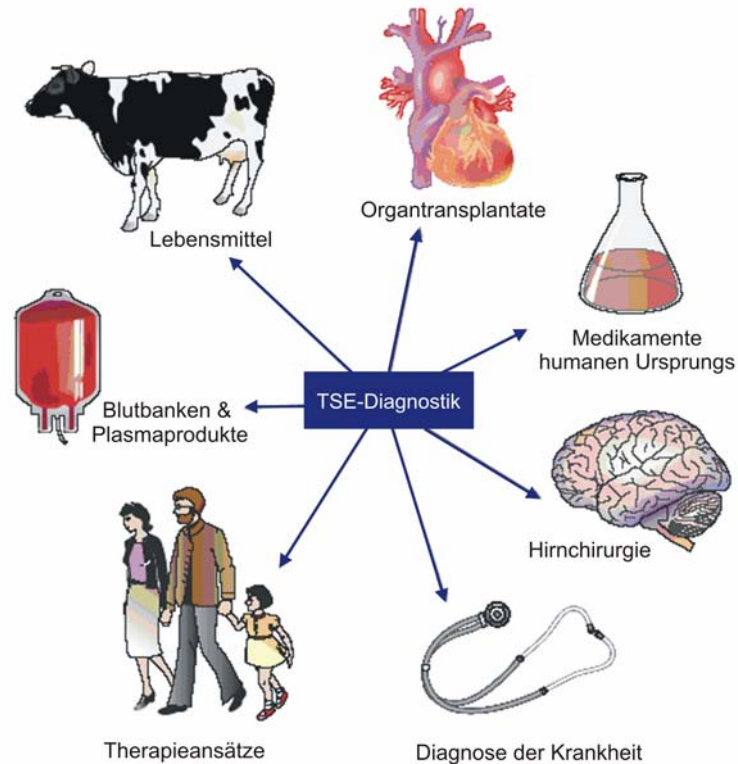


Abb. 4.1 Gebiete, welche von einer Frühdiagnostik profitieren würden

Die Sicherheit von Blut-Banken, Plasmaprodukten und Medikamenten, welche aus menschlichem Gewebe gewonnen werden, könnte erhöht werden. Zusätzlich könnten chirurgische Eingriffe in Nervengewebe, sowie Organtransplantationen sicherer werden. Letztlich könnten Therapieansätze dadurch ermöglicht werden, dass sie früher angewandt werden könnten (verändert nach Soto 2004).

4.2 Notwendigkeit einer Diagnostik ohne Proteolyse als Voraussetzung einer Frühdiagnose

Ein großes Problem stellt die Tatsache dar, dass bisher nicht alle Länder routinemäßige BSE-Schnelltests an Schlachtvieh gesetzlich vorschreiben. Aber auch in Ländern, in denen diese Auflage besteht, kann die Gefahr der Übertragung nicht in Gänze ausgeschlossen werden, da die Sensitivität der zugelassenen Schnelltests keine präklinische Diagnose zulässt (Tab. 4.1). Somit besteht weiterhin die Möglichkeit, dass präklinische Tiere in den vorhandenen Schnelltest als negativ eingestuft werden, in die Lebensmittelkette gelangen und somit ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen.

Tab. 4.1 Nachweisgrenzen der zugelassenen BSE-Schnelltests
Tabelle verändert nach Soto 2005

Testsystem	Nachweisprinzip	Nachweisgrenze
Prionics-Check	SDS-PAGE und Western Blot Immunodetektion von resPrP ^{BSE}	5.0–20 pmol
Enfer Test	Einfacher ELISA Immunodetektion von resPrP ^{BSE}	1.0–10 pmol
CEA/BioRad Test	Sandwich ELISA Immunodetektion von resPrP ^{BSE}	0.5–2.0 pmol
Prionics-Check LIA	Sandwich ELISA Immunodetektion von resPrP ^{BSE}	1.0–5.0 pmol
CDI	Verschieden starke Bindung an natives und denaturiertes resPrP ^{BSE}	0.5–5.0 pmol

Die in Kap. 4.1 beschriebenen Zusammenhänge unterstreichen die Wichtigkeit der Suche nach neuen Ansätzen der Diagnostik von Prion-Krankheiten mit hoher Sensitivität und dem Potential zur Frühdiagnostik.

PrP^{Sc} ist nicht nur die Hauptkomponente von Prionen, sondern auch der bisher einzig unumstrittene Marker für Prion-Krankheiten (Prusiner, 1998, Ingrosso *et al.*, 2002). Um eine empfindliche Diagnostik von Prion-Krankheiten realisieren zu können, muss sichergestellt werden, dass bei der Präparation des zu untersuchenden Materials kein Verlust an pathogenassoziiertem PrP auftritt. In diesem Zusammenhang wird resPrP^{Sc} fälschlicherweise oft mit PrP^{Sc} gleichgesetzt. Es konnte jedoch schon 1998 gezeigt werden, dass große Teile des PrP^{Sc} PK-sensitiv sein können (Abb. 4.2). Sämtliche zurzeit verwendeten BSE-Schnelltests nutzen als Hauptkriterium den Nachweis von Proteinase K (PK) -resistentem PrP^{BSE}.

Die Menge des PK-resistenten PrP^{Sc} schwankt allerdings sehr stark - einerseits wie in dieser Arbeit gezeigt (siehe Kap. 3.1.2) von BSE-Hirn zu BSE-Hirn, andererseits auch innerhalb eines Hirnes von Areal zu Areal, wie am Beispiel der sporadischen CJD von Safar gezeigt werden konnte (Safar *et al.*, 2005). Hierbei stellte sich heraus, dass 90 % des PrP^{CJD} bei sporadischer CJD in der grauen Hirnsubstanz PK-sensitiv war. Zudem ist der Anteil von PK-resistentem PrP^{BSE} weitaus geringer als dies z.B. bei Scrapie-Prionen des Stammes 263 K der Fall ist (siehe Kap. 3.1.1). Gerade die-

ser Scrapie-Stamm wird aber häufig als Modellsystem zur Etablierung und der Bestimmung der Sensitivität neuer TSE-Diagnostikansätze herangezogen.

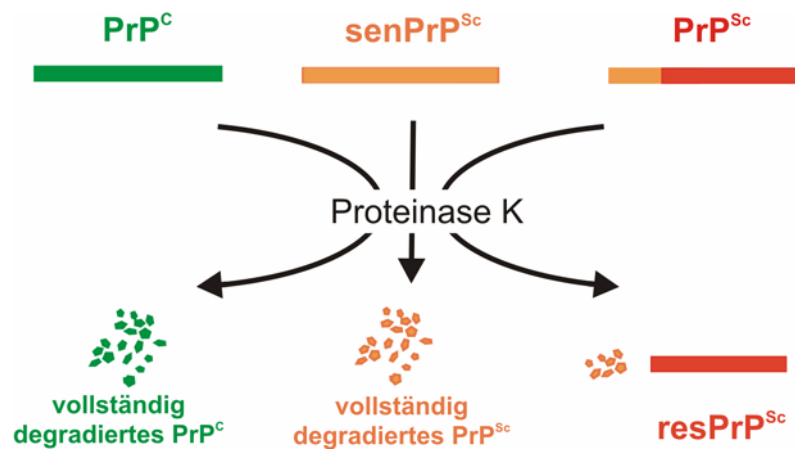


Abb. 4.2 schematische Darstellung der Wirkung einer Proteinase K - Behandlung auf die verschiedenen PrP-Formen

Das bedeutet zwangsläufig, dass die Verwendung eines PK-Verdauungsschrittes bei der Aufreinigung gerade bei BSE-Prionen zu einer nicht unerheblichen Verminderung der Sensitivität führt. Dies wiegt umso schwerer vor dem Hintergrund, dass Legname *et al.* (2004) mittels rekombinant hergestelltem PrP synthetische Prionen *in vitro* herstellen konnten. Dabei wurde *in vitro* Infektiosität generiert und somit die Prion-Hypothese bewiesen. Diese synthetischen Prionen waren jedoch PK-sensitiv, d. h. auch hier war die weit verbreitete angenommene Korrelation von PK-Resistenz und Infektiosität nicht gegeben.

Des Weiteren ist es fraglich, ob der Erreger bereits in frühen Krankheitsstadien PK-Resistenz aufweist. So konnte gezeigt werden, dass gerade mittelgroße bis kleine PrP^{Sc}-Aggregate nicht PK-resistent sind (Tzaban *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen, wurden an terminal erkrankten Hamstern durchgeführt, so dass kein direkter Rückschluss darauf gezogen werden kann, dass PrP^{Sc} im frühen Krankheitsstadium nicht auch PK-sensitiv sein könnte. Jedoch ist es naheliegend anzunehmen, dass die frühen Aggregationsstadien auch früher während der Replikation des Erregers vorliegen, als die hochmolekularen Aggregatsstadien.

Auch konnte kürzlich erstmalig das Vorkommen verschiedener Erregerstämme für BSE nachgewiesen werden (Lloyd *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004). Bis dato galt die Annahme, dass bei BSE nur ein einziger Erregerstamm auftrete. Da für verschiedene Scrapie-Stämme bekannt ist, dass der Anteil an PK-sensitivem PrP^{Sc} mit Werten zwischen 5 % und 95 % enorm variiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies auch bei etwaigen BSE-Stämmen der Fall sein könnte. Da PrP^{BSE} generell als sensitiver gegen Proteolyse gilt, ist eine Diagnostik, welche nicht auf dem Charakteristikum der PK-Resistenz beruht, umso sinnvoller.

In dieser Arbeit wurde daher eine Aufreinigung von nativen, d. h. nicht mit Proteinase K -verdaulichem PrP^{Sc} aus Hirnmaterial am Scrapie-Hamster-Modell etabliert, optimiert und anschließend auf PrP^{BSE} übertragen. Diese Aufreinigung basiert auf einer spezifischen Phosphorwolframat (NaPTA)-Fällung von $\text{PrP}^{\text{Sc/BSE}}$ (Safar *et al.*, 1998, 2002). Mit Hilfe der NaPTA-Fällung werden native Prion-Aggregate spezifisch gefällt, während das zelluläre PrP löslich im Überstand verbleibt. Im Gegensatz zu dem bereits von Safar beschrieben Protokoll konnte hier auch für die Aufreinigung von nativem PrP^{BSE} auf den Einsatz von Proteinase K vollständig verzichtet werden. Zudem wurde durch die Einführung von Waschschritten die Reinheit der Proben erheblich erhöht (Kap. 3.2).

Die hier entwickelte Aufreinigungsmethode von PrP^{BSE} ohne proteolytischen Schritt besitzt somit eine besondere Relevanz in punkto Frühdiagnostik, da eine Aufreinigung pathologischer Prion-Aggregate ohne Proteolyse Voraussetzung für eine höhere Sensitivität von diagnostischen Methoden jeglicher Art ist (Abb. 4.3).

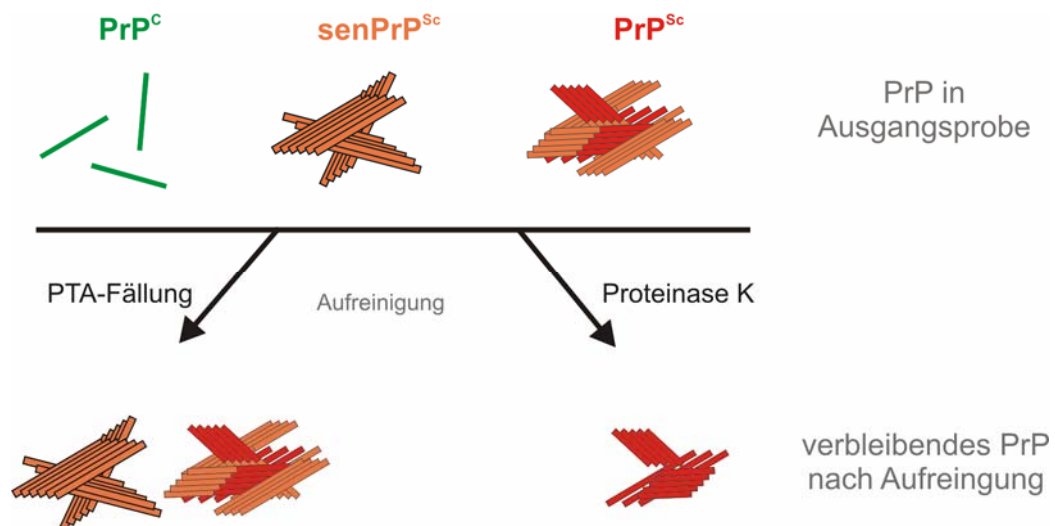


Abb. 4.3 Vergleich der Aufreinigung von PrP^{Sc} mittels NaPTA-Fällung mit der durch Proteinase K – Behandlung

4.3 Der Aggregationszustand als geeigneter Parameter zur Diagnose von Prion-Krankheiten

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 stets in aggregierter Form vorliegt. Alle weiteren Eigenschaften wie PK-Resistenz, oder bestimmte amyloide Eigenschaften, welche häufig für pathogenes PrP herangezogen werden, wurden von Wille und Kollegen (2000) zum einen durch vergleichende Literaturdaten zum anderen durch eigene Experimente teilweise widerlegt bzw. als unzuverlässig herausgestellt. Der Aggregationszustand, wurde zwar oft auch als nicht

mit der Infektiosität korreliert diskutiert, da einige *in vitro* Konversionssysteme rekombinantes PrP zwar zur Aggregation brachten, die Infektiosität aber ausblieb. Jedoch konnte von Legname und Kollegen (2004) gezeigt werden, dass aggregiertes rekPrP sehr wohl Infektiosität aufweisen kann (Kap. 4.2). Daraus ist abzuleiten, dass die Infektiosität mit einem spezifischen Aggregationsprodukt des PrP korreliert. Bisher konnte noch nie gezeigt werden, dass PrP^C *in vivo* in aggregierter Form vorliegt. Die Solubilisierung von Prionen geht jedoch mit dem Verlust der Infektiosität einher (Riesner *et al.*, 1996).

Die Struktur und der Aggregationszustand des PrP sind somit die einzigen pathologischen Charakteristika, welche somit eine sensitive Diagnostik ermöglichen. Ein Ansatz die Struktur als Marker zu nutzen, wurde von Safar und Kollegen (1998) mit der Entwicklung des konformationsabhängigen Immunoassays (CDI) vorgestellt. Hierbei wird das Vorkommen von PrP^{Sc} in der Probe durch das Bindeverhalten eines konformationsspezifischen Antikörpers nachgewiesen. Dieser Antikörper bindet an die PrP^{Sc}-Isoform schlecht bis nahezu gar nicht und an die native PrP^C Isoform bzw. denaturiertes PrP sehr gut. Ist nun die Differenz der Bindeeffizienz zwischen der nativen und der denaturierten Probe hoch, spricht dies für das Vorliegen von PrP^{Sc} in der Probe. Diese Methodik konnte im Hamstermodell mit aufgereinigten Hirnproben eindrucksvoll angewandt werden. Bei der Anwendung im Fall von BSE-Proben, scheint die Methodik jedoch ohne proteolytischen Schritt nicht anwendbar zu sein (Safar *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methodik entwickelt, die die zweite charakteristische Eigenschaft von Prionen genutzt, den Aggregationszustand. Vom diagnostischen Standpunkt aus ist daher ein möglichst empfindlicher Nachweis dieser pathologischen Aggregate sinnvoll.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bietet als Verfahren zur Detektion und Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung die geeignete Voraussetzung zum Nachweis von Aggregaten und damit einer direkten Detektion des Erregers. Dieses Nachweisverfahren wurde in unserer Arbeitsgruppe von Pitschke 1999 entwickelt. Dabei werden Aggregate mit fluoreszierenden Sonden markiert und ausgenutzt, dass diese langsamer durch das Detektionsvolumen des FCS diffundieren und hier durch den hohen Markierungsgrad Fluoreszenzpeaks mit hohen Intensitäten verursachen. Anhand dieser Fluoreszenzpeaks, auch als Fluoreszenzbursts bezeichnet, können die Aggregate eindeutig nachgewiesen werden. Diese Methodik wurde für A β -Aggregate im Liquor von Alzheimerpatienten erfolgreich angewandt. Leider stellte sich heraus, dass diese Methode sehr anfällig für verschiedene AbnahmeprozEDUREN des Liquors war, so dass sie bisher nicht in die routinemäßige Anwendung zur Alzheimer-Diagnostik gehen konnte. Bei Versuchen den diagnostischen Ansatz auf den Nachweis von PrP-Aggregaten im Liquor von CJD-Patienten zu übertragen, konnte nur eine Sensitivität von 20% erreicht werden (Bieschke *et al.*, 2000). Von Schäfer wurde der Nachweis von Aggregaten in Suspension erfolgreich auf aufgereinigtes resPrP^{Sc} aus Hamsterhirn übertragen. Dabei wurde die Methode in sofern erweitert, dass nun das Messvolumen in gewissem Maße durch die Probe bewegt werden

konnte und zudem eine Kreuzkorrelation unter Einsatz von zwei Sonden möglich war (2D-FIDA). Dadurch konnte die Sensitivität des Nachweises erhöht werden, was im Falle des Scrapie-Modells eine signifikante Unterscheidung von an Scrapie erkrankten Tieren und von einer gesunden Kontrollgruppe erst ermöglichte.

Im Gegensatz zum CDI-Test, indem auch PrP^{Sc}-Aggregate eingesetzt werden, werden in dieser Arbeit einzelne Partikel gezählt und nicht ein Messansatz verfolgt, in welchem eine summierte Eigenschaft aller Partikel wie die Gesamtfluoreszenz detektiert wird.

4.4 Nachweis von PrP^{Sc} und PrP^{BSE} ohne Proteolyse mittels 2D-FIDA in Suspension

Ziel dieser Arbeit war es Prion-Aggregate in Lösung nachzuweisen, wobei zuvor auf eine Proteolyse verzichtet werden sollte und nachfolgend das System auf BSE anzuwenden. Nachdem eine PK-freie Aufreinigung erfolgreich etabliert wurde (Kap. 3.2), sollten die Aggregate mittels 2D-FIDA nachgewiesen werden. Hierbei wurden anhand des Hamster-Scrapie Modells geeignete Parameter etabliert. Zunächst wurden verschiedene Resuspendierungsbedingungen für die gefällten PrP-Aggregate mittels Ultraschall untersucht. Man läuft hierbei leicht Gefahr über die gewünschte Resuspension der Aggregate hinaus auch die Prion-Aggregate gänzlich aufzulösen. Dabei stellte sich heraus, dass die PrP^{Sc}-Aggregate im resultierenden Pellet aus der NaPTA-Fällung am besten mit drei Ultraschallpulsen für je zwei Sekunden mittels Ultraschallnadelsonde resuspendierbar waren, ohne dass dabei die Aggregate aufgelöst wurden (Kap. 3.5).

Die für das System notwendigen fluoreszenten Sonden wurden hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität ausgesucht. Der Anspruch an die Sonden war, dass sie die native PrP^{Sc}-Isoform binden konnten. Bisher wurde nur ein Antikörper beschrieben, welcher selektiv die PrP^{Sc}-Isoform erkennt und keine Affinität für PrP^C aufweist (Korth *et al.*, 1997). Da bei der NaPTA-Fällung PrP^C aus der Probe entfernt wurde, konnten in dieser Arbeit auch Sonden eingesetzt werden, welche nicht selektiv für PrP^{Sc} waren. Für das Scrapie-Hamstermodell stellten sich die monoklonalen Anti-PrP-Antikörper R1 und D13 als die beste Kombination für 2D-FIDA-Messungen heraus (Kap. 3.4). Diese Kombination hat den Vorteil, dass die beiden Antikörper an unterschiedlichen Epitopen das PrP binden und so die Spezifität steigern.

Im Hamster-Scrapie-Modell konnten infizierte Hamster von einer Kontrollgruppe gesunder Hamster mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% unterschieden werden (Kap. 3.6.1). Dies gelang durch Kombination der Reinigung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat mittels NaPTA-Fällung, der Resuspendierung mittels dreimal zweisekündiger Ultraschallpulse mittels Ultraschallnase und anschließender 2D-FIDA unter Einsatz der fluoreszenzmarkierten Antikörper D13 und R1. Es konnte hiermit eindeutig gezeigt werden, dass der Nachweis von PrP^{Sc} ohne proteolytische Behandlung mittel 2D-FIDA möglich ist.

Der Ansatz sollte nun auf BSE angewandt werden. Dazu wurde PrP^{BSE} aus *medulla oblongata* Gewebe des Rindes mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt. Dabei stellte sich heraus, dass nur durch die Einführung zusätzlicher Waschschriffe die für FIDA nötige Reinheit erreicht werden konnte. Hier zeigten sich die Antikörper SAF32 und 12F10 als geeignet für die Bindung an native BSE-Aggregate. Somit konnte die Grundvoraussetzung für Analysen mittels 2D-FIDA von BSE-Material geschaffen werden (Kap. 3.4). Leider stellte sich heraus, dass die mittels NaPTA-Fällung aufgereinigten Proben zu inhomogen waren, um mittels 2D-FIDA signifikante Ergebnisse zu liefern. Daher wurde auf BSE-Material zurückgegriffen, das von der Arbeitsgruppe um Roy Jackman (VLA, England) aufgereinigt wurde. Auch bei dieser Aufreinigung wurde auf Proteinase K verzichtet. Diese Aufreinigung basiert auf mehreren Zentrifugationsschritten unter verschiedenen Pufferbedingungen und konnte in unserem Labor nicht durchgeführt werden, da die nötigen Zentrifugen nicht zur Verfügung standen. Diese Pellets mit mäßiger Reinheit (mündliche Mitteilung von Roy Jackman), wurden wiederum mittels Ultraschallbehandlung analog zu den bei Scrapie etablierten Bedingungen resuspendiert und unter Verwendung von Saf32 und 12F10 als Sonden mittels 2D-FIDA untersucht. Mit dieser Kombination konnten BSE-infizierte Tiere signifikant von einer Kontrollgruppe gesunder Rinder unterschieden werden (Kap. 3.6.2). Mit dem so aufgereinigten Material wurde bei Messungen mit dem Zweistrahl-Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer unter Verwendung der 2D-FIDA die prinzipielle Nachweismöglichkeit nativer BSE-Prionen gezeigt. Eine eingehende Betrachtung der Daten deutet allerdings eine Schwäche dieses Messansatzes an. Wurde eine Probe mehrmals direkt nacheinander gemessen, variierten die Einzelergebnisse enorm, was zu hohen Standardabweichungen führte.

Das Problem liegt darin begründet, dass bei Messungen frei in Lösung die resuspendierten Aggregate nicht gleichverteilt vorliegen. Somit kann, trotz des standardisierten Scannens der Probe mittels Beamscanner, der Ungleichverteilung der Aggregate in der Probe nicht beigegeben werden. Von Schäfer 2002 wurden die Scanningbedingungen des Olympus 2-Strahl FCS (Evotec) auf eine maximale mit den Geräteparametern mögliche Volumenerfassung optimiert. Das erfassbare Volumen ist dabei in einer Raumrichtung durch die maximale Länge, in welcher der Probentisch in Abhängigkeit von der Steuersoftware bewegbar ist auf einen Millimeter und in die zweite Raumrichtung durch die maximale Amplitude des Beamscanners auf 100 µm begrenzt. Die dritte Raumrichtung, also die Höhe des Volumenelements, kann nach Auskunft des Geräteherstellers auf durchschnittlich 5 µm genähert werden. Hieraus folgt, dass, selbst wenn ein komplettes Scannen der Fläche ohne Zwischenräume vorausgesetzt wird, unter Ausnutzung der maximalen Geräteparameter lediglich ein Volumen von 5×10^{-4} µl mit einer Messung erfasst werden kann (Abb. 4.4). Für die 2D-FIDA-Analysen wurden jeweils 10 µl an Probenvolumen eingesetzt. Daraus folgt, dass bei einem Mess-Scan nur ein zwanzigtausendstel der Probe erfassbar ist. Wenn man nun noch berücksichtigt, dass die Aggregate in Suspension nicht gleichverteilt vorliegen, ist es unwahrscheinlich, dass ein Mess-Scan ein für die Probe repräsentatives Ergebnis liefern kann. Die Tatsache, dass bei mehrmaligem Scannen

des gleichen Volumenbereichs einer Probe die Ergebnisse variierten, beweist zwar, dass sich die Aggregate in der Probe bewegen, jedoch erscheint hier ein Absinken der Aggregate zum Boden nahe liegend. Dieser Problematik ist mit der bisherigen Methodik, also der Messung markierter Prionen in Suspension, nicht beizukommen.

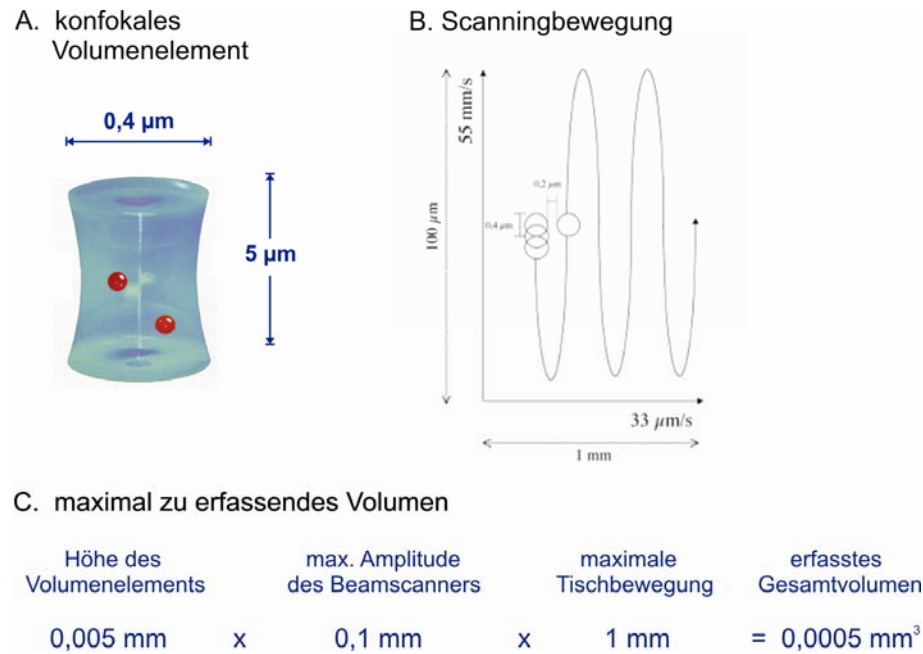


Abb. 4.4 Erfasstes Probenvolumen der Suspension durch Scannen

Bei Verwendung des Olympus 2-Strahl FCS (Evotec, Hamburg) kann das konfokale Volumenelement mit einem Durchmesser von 0,4 µm (A) durch die Probe bewegt werden. Die Geräteeinstellung lässt eine mäanderförmige Bewegung des konfokalen Volumenelements durch Überlagerung zweier Bewegungen zu, welche beide Geräte- oder Software-technisch limitiert sind. In horizontaler Richtung erfolgt die Bewegung über eine maximale Strecke von 1 mm. In vertikaler Richtung erfolgt die Bewegung mit einer Amplitude von 100 µm. Die Messparameter wurden von Schäfer 2002 für diese spezielle Anwendung optimiert (B).

4.5 Entwicklung einer neuen Strategie zum Aggregatnachweis – SPILA (Single Particle Immunosorband Laserscanning Assay)

Um der in Kap. 4.4 beschriebenen Problematik zu begegnen, musste eine neue Analysestrategie entwickelt werden. Diese zielt darauf ab, Partikel hier im Speziellen pathologische Prion-Aggregate auf der Bodenfläche eines Messchips mit Hilfe eines Captures (z.B. spezifischer Antikörper) zu immobilisieren und dann durch Scannen der Bodenfläche die einzelnen Partikel via 2D-FIDA zu detektieren. Diese Analysestrategie wird im Folgenden als SPILA (**S**ingle **P**article **I**mmunosorband **L**aserscanning **A**ssay) bezeichnet. Damit wäre es möglich eine definierte Fläche systematisch nach Partikeln „absuchen“ zu können. Ein Modell dieses Ansatzes ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

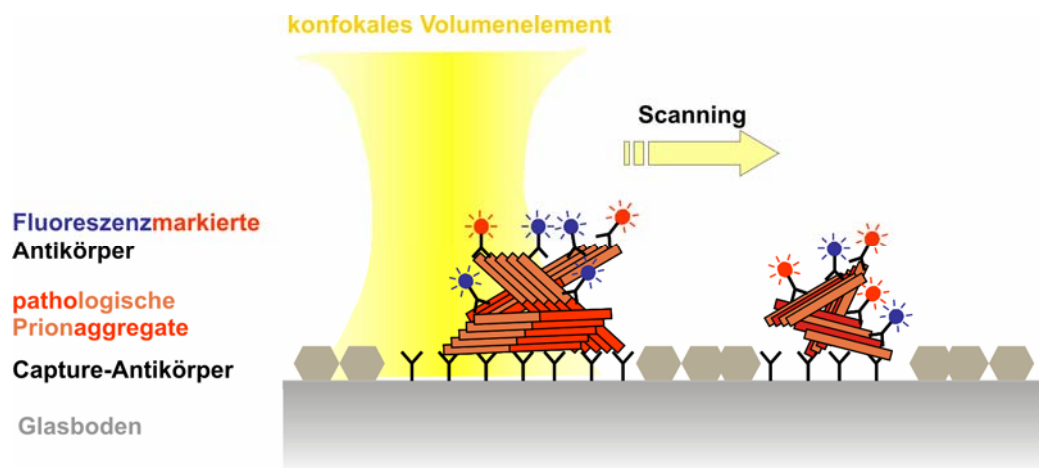


Abb. 4.5 SPILA - Single Particle Immuno-sorband Laserscanning Assay
schematische Darstellung der neuen Analysestrategie

SPILA verspricht somit mehrere deutliche Vorteile gegenüber der bisherigen Analyse mittels 2D-FIDA in Suspension. Zunächst wäre dem "Signalverlust" der durch Absinken der Prion-Aggregate entstehen kann, Rechnung getragen. Darüber hinaus käme es zu einer nicht zu unterschätzenden Aufkonzentrierung von Prionen-Partikeln im Messbereich. Einer der wichtigsten Punkte ist, dass die gesamte Komplexität des Ansatzes um eine Dimension reduziert wird, da die Aggregate nun quasi auf einer zweidimensionalen Fläche und nicht mehr wie zuvor in einem dreidimensionalen Volumen verteilt sind. Während im Dreidimensionalen mehr oder weniger willkürlich ein Teilvolumen analysiert wird, ist durch das Scannen über die gesamte Bodenfläche das Potential gegeben, sämtliche immobilisierte Prion-Partikel zu detektieren. Weiterhin könnte die Spezifität des Prion-Nachweises in diesem Ansatz um einen weiteren Faktor erhöht werden, wenn zur Immobilisierung ein PrP-spezifischer Capture eingesetzt würde. In diesem Fall würde also ein positives Signal nur dann auftreten, wenn die Prion-Aggregate an den spezifischen Capture binden und zusätzlich beide

fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper gleichzeitig gebunden sind. Auch ist bei immobilisierten Proben eine enorme Reduktion der Standardabweichung bei mehrmaligem Messen der gleichen Probe zu erwarten, da keine Diffusion mehr möglich ist. Der Immobilisierungsschritt ermöglicht es, auch unspezifische Hintergrundsignale durch geeignete Waschschriffe zu reduzieren. Wenn die Waschbedingungen so gewählt werden, dass Nicht-PrP-Aggregate, die jedoch unspezifisch an den Antikörper binden entfernt werden können. Dies ist besonders in Bezug auf das Signal-Rauschverhältnis, welches letztlich die Sensitivität limitiert, von besonderer Bedeutung.

4.6 Anwendung von SPILA auf das Scrapie-Hamstermodell und Übertragung auf BSE

Die SPILA-Methode musste nun in Bezug auf ihre Anwendbarkeit als Diagnostik von Scrapie im Hamstermodell und BSE überprüft werden. Dazu wurde die Beschichtung der Glasbodenplatte des Assay-Chips mit Antikörper über eine adhäsive Bindung realisiert. Es stellte sich heraus, dass Adhäsion der Antikörper, welche als Capture dienen sollten, effizienter war, wenn die Glasfläche zuvor mittels Poly-D-Lysin aktiviert wurde (Kap. 3.8). Nach erfolgreicher Beschichtung des Wellbodens mit Antikörper wurden die durch NaPTA-Fällung aufgereinigten und resuspendierten pathologischen Prion-Aggregate immobilisiert. Hierbei wurden die gleichen Resuspendierungsbedingungen herangezogen, welche bereits für die 2D-FIDA in Suspension erfolgreich etabliert wurden (Kap. 3.9). Auch als Sonden wurden diejenigen, verwendet, welche schon in Suspension die besten Ergebnisse geliefert hatten. Bei ersten Kontrollmessungen stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz nur bis zu einem bestimmten Bereich über dem Boden auftrat, was für eine erfolgreiche Immobilisierung sprach. Dabei zeigte sich aber auch, dass die Höhenfokussierung des konfokalen Volumenelements nicht die nötige Genauigkeit lieferte, da sie im Gerät mittels der Motorsteuerung realisiert war. Systematische Untersuchungen der Höhenfokussierung zeigten, dass nur eine Genauigkeit von $\pm 10 \mu\text{m}$ erreichbar war (Kap. 3.7). In Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma (Evotec, Düsseldorf: in Person Frau Dr. Heck) wurde ein Lösungsansatz erarbeitet und umgesetzt. Dabei wurde ein Piezo-Element eingebaut, welches eine Höhenfokussierung unabhängig von der Motorsteuerung mit einer Genauigkeit von 100 nm erlaubte.

Ob eine vollständige Erfassung der Bodenfläche möglich ist, hängt ebenfalls von den Geräteparametern des zur Verfügung stehenden Olympus 2-Strahl FCS ab. Standardmäßig kann der Fokus automatisch von Well zu Well auf einem Assay-Chip bewegt werden. Weiterhin ist ein Scannen der Probe innerhalb der in Kap. 4.4 limitierenden Parameter möglich. Um nun aber trotzdem eine möglichst gute Flächenabdeckung zu erlangen, wurde die Steuersoftware so umgestellt, dass mehrere nebeneinander liegende Flächen in einem Well gemessen werden können (Abb. 4.6).

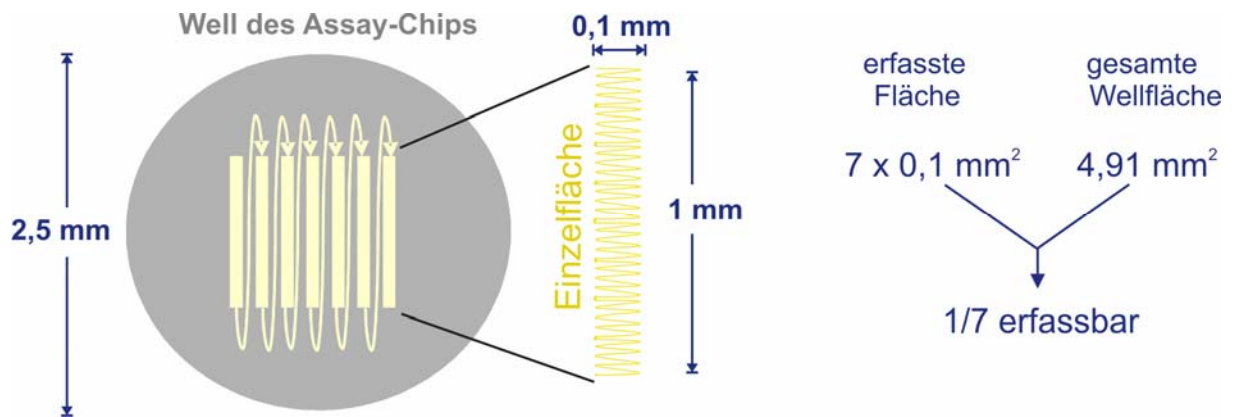


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der Flächenerfassung im Well des Assay-Chips

Um eine möglichst gute Abdeckung der zu erfassenden Scanfläche zu erreichen, wurden mehrere nebeneinander liegende Einzelflächen innerhalb eines Messwells gemessen. Hierdurch ist unter Sicherstellung, dass der Fokus nie die Dimensionen des Wells verlässt, ein Siebtel der Gesamtfläche erfassbar.

Der sich ergebende Nachteil war dabei, dass das optische System nun manuell in die Ausgangsposition für die Messung gebracht werden musste. Bei einem Durchmesser eines Wells von 2,5 mm ist die genaue Positionierung in die Mitte des Wells per Auge somit nicht exakt möglich. Deshalb wurden die einzelnen Messflächen mit dem nötigen Sicherheitsabstand zum Rand der Wells gewählt. Unter diesen Voraussetzungen ist das Erfassen von einem Siebtel der Bodenfläche eines Assay-Wells möglich. Sollte es möglich sein alle in der Probensuspension befindlichen Partikel mittels Capture zu immobilisieren wäre im Vergleich zum Messansatz in Suspension, wo ein Zwanzigtausstel der Probe erfassbar ist (Kap. 4.4) eine über 2500fache Mehrererfassung der Probe möglich. Eine weitere Erhöhung der erfassbaren Fläche wäre durch die Verwendung von Assaychips mit rechteckigen Wells möglich. Für FI-DA-Messungen geeignete Assay-Chips dieser Art, werden in Kürze von der Firma Evotec zu Verfügung gestellt.

Unter diesen Voraussetzungen wurde SPILA zunächst auf das Hamster-Scrapie-Modell angewendet. Dabei stellte sich der Antikörper R1 als geeigneter Capture heraus. Bei Höhenscans durch immobilisierte PrP^{Sc}-Proben konnte bestätigt werden, dass die Immobilisierung erfolgreich war. Zum einen war Fluoreszenz nur in einem Höhenbereich bis 30 µm über dem Boden detektierbar. Zum anderen konnte in den PrP^{Sc}-Proben eine hohe Anzahl an Fluoreszenzpeaks detektiert werden. Jedoch war das Hintergrundsignal in den negativen Proben unerwartet hoch. Es ist wahrscheinlich, dass die Hintergrundsignale auf unspezifisch anhaftende fluoreszenzmarkierte Antikörper zurückzuführen waren, da durch die Verringerung der Detektionssondenkonzentration von 1 µg/ml auf 0,1 µg/ml sowie Erhöhung der Anzahl und Länge der Waschschrte das Hintergrundsignal reduziert werden konnte (Kap. 3.9). Nachdem diese Anpassungen gemacht waren, war eine signifikante Unterscheidung von PrP^{Sc}-Proben und entsprechenden Negativkontrollen möglich. Es stellte sich heraus, dass ein Scannbereich von 5 - 15 µm Höhe über dem Wellboden gut war, da in diesem

Bereich die Intensitätspeaks am besten detektiert werden konnten. In höheren Messbereichen nahm die Fluoreszenzintensität schnell ab, was nicht unerwartet war, da aus elektronenmikroskopischen Bildern abgeleitet werden kann, dass PrP^{Sc}-Aggregate in fibrillärer Form in einem Größenbereich von wenigen µm vorliegen (Safar *et al.*, 1998; Riesner *et al.*, 1996). Mittels Thioflavin-Assay konnte der fibrilläre Charakter der PrP^{Sc}-Proben aus der NaPTA-Fällung bestätigt werden, so dass die Größenabschätzung der Aggregate hier auch in diesem Größenbereich anzunähern ist (Kap. 3.2.1).

Nachdem die Methode auf Prion-Aggregate aus Scrapie-infizierten Hamstern angewendet werden konnte, musste SPILA noch das diagnostische Potential beweisen. Dazu wurden PrP^{Sc}-Proben von mehreren Hamstern und entsprechende Negativkontrollen einer gesunden Kontrollgruppe mittels SPILA untersucht. Dazu standen jedoch nur vier Scrapie-infizierte und vier gesunde Proben zur Verfügung. Die Scrapie-infizierten Tiere ließen sich eindeutig und signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden. Wie erwartet, waren die Ergebnisse im Vergleich zu Messungen in Suspension eindeutiger und die Standardabweichungen nur noch minimal. Es stellte sich heraus, dass bei einer Messhöhe von 5 – 15 µm über dem Boden die beste Unterscheidung der beiden Gruppen möglich war (Kap. 3.11). Damit wurde für die neu entwickelte Mess-Strategie der SPILA-Methode nicht nur die prinzipielle Machbarkeit, sondern auch das Potential für eine diagnostische Anwendung eindeutig nachgewiesen.

Da die Anwendung somit für das Scrapie-Hamster-Modell erfolgreich war, sollte SPILA nun auf die Anwendbarkeit für BSE überprüft werden. Hierbei wurden die in dieser Arbeit bereits etablierten Schritte kombiniert. PrP^{BSE} wurde mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt, wobei wie beschrieben auf eine Proteolyse verzichtet wurde (Kap. 3.2.2). Die gefällten Aggregate wurden via Ultraschall resuspendiert. Als Capture erwies sich der Antikörper Saf32 als geeignet. Der weitere Ansatz wurde analog zu dem bei Scrapie durchgeführt, wobei als Detektionssonden die Antikörper 12F10 und Saf32, wie auch bei den Messansätzen in von PrP^{BSE} in Suspension eingesetzt wurden. In einer ebenfalls vier BSE-infizierte Tiere und vier gesunde Kontrolltiere umfassende Messreihe, konnte eindeutig eine signifikante Unterscheidung von BSE-infizierten und gesunden Tieren gezeigt werden (Kap. 3.11). Damit konnte die Anwendung der SPILA erfolgreich auf BSE übertragen werden. Hiermit steht nun erstmalig eine Methodik zur Verfügung, in der unter vollständigem Verzicht auf einen proteolytischen Schritt natives PrP^{BSE} eindeutig nachweisbar ist und die aufgrund des Einzelpartikelnachweises eine überlegene Sensitivität verspricht.

4.7 Potentialvergleich vom SPILA mit handelsüblichen BSE-Diagnostikverfahren

Die Anwendung der SPILA-Methode auf die Diagnostik von Prion-Krankheiten, insbesondere BSE, bietet das Potential für eine sensitive Früherkennung, da sie alle Kriterien erfüllt, welche hierzu an Sensitivität und Spezifität gestellt werden müssen. Insbesondere die Möglichkeit des Nachweises einzelner Partikel ist hier besonders herauszustellen, da die Methodik dadurch eindeutig gegenüber handelsüblichen Diagnostikmethoden im Vorteil ist. Der Einzelpartikelnachweis hat den Vorteil, dass die Signale, welche durch die einzelnen Partikel erzeugt werden, nicht integraler Bestandteile des Gesamtmesssignals sind, sondern einzeln quantifiziert werden können. Durch den Einzelpartikelnachweis ist es somit möglich auch nur wenige Partikel oder sogar nur einen einzigen Partikel eindeutig nachweisen zu können. Damit ist das Potential auf die theoretisch erreichbare Sensitivitätsgrenze gegeben, welche mit einem Testsystem, das direkt den Erreger nachweist, möglich ist.

Zusammenfassend stellen sich die Vorteile der neuen Methode in punkto Spezifität und Sensitivität wie folgt dar:

Spezifität:

- Nachweis der durch NaPTA gefällten Form des PrP (PrP^{Sc} inkl. senPrP^{Sc})
- Nachweis des Aggregationszustandes, als eindeutig pathogenassoziiertes Charakteristikum
- Gleichzeitige Bindung von drei unabhängigen Sonden (zwei Detektionssonden und ein Capture)
- Ermöglichung eines verbesserten Signal/Hintergrundverhältnisses durch spezifische Waschschrte

Sensitivität:

- Aufkonzentrierung von PrP^{Sc/BSE} durch PTA-Fällung
- Kein Verlust von pathologischem Material durch Verzicht auf PK-Verdauung
- Aufkonzentrierung der Prionpartikel durch Immobilisierung (2D)
- Einzelpartikelnachweis mittels 2D-FIDA, dadurch keine integrale Aufnahme der positiven Signale im Gesamtsignal der Probe
- potentiell: Erfassung aller immobilisierten Prion-Partikel mittels Flächenscans

Ein Vergleich dieser Eigenschaften mit momentan handelsüblichen BSE-Diagnostik-Anwendungen (Kap. 1.11.5) ist in Tab. 4.2 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.2
Vergleich der BSE-Diagnostikverfahren

	Einzelpartikel-nachweis	Anzahl spezifischer Sonden	Nachweis des Aggregationszustandes des nativen Pathogens	Verzicht auf Proteolyse
CDI (Inpro) nach Safar 2002	-	2	+	(-)**
Western Blot (Prionics)	-	1	-	-
ELISA (Prionics & BioRad)	-	2	-	-
SPILA	+	3	+	+

* Im CDI wird die pathogene Konformation des PrP nachgewiesen, die mit dem Aggregationszustand streng korreliert ist

** Prinzipiell wäre keine Proteolyse nötig; aktuelle Protokolle beinhalten allerdings eine milde PK-Behandlung

4.8 Ausblick

Das neu entwickelte Detektionsverfahren (SPILA) bietet das Potential, mit hoher Spezifität und Sensitivität pathologische Prion-Aggregate aus Hirngewebe erkrankter Tiere nachzuweisen.

Ein erster Ansatzpunkt für die Diagnostik von BSE in Bezug auf SPILA wäre eine weitere Erhöhung der Spezifität. Positive Signale können nur erzeugt werden, wenn das Prion-Aggregat an den Capture bindet und gleichzeitig beide Detektionssonden gebunden sind. In dieser Arbeit wurde als Capture und zweite Detektionssonde der gleiche Antikörper eingesetzt, da unserem Labor keine weiteren Antikörper zur Verfügung standen, welche in der Lage waren natives PrP^{BSE} zu binden. Diese Kombination hat zwar den Vorteil, das monomeres PrP nicht detektierbar wäre, weil an das gleiche Epitop des Monomers nicht zwei Sonden gleichzeitig binden können. Da aber das monomere PrP^C bereits durch die Aufreinigung aus dem Probenansatz entfernt wurde, könnte die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern als Capture und zweite Detektionssonde die Spezifität potentiell noch weiter erhöhen.

Weiterhin müsste die Empfindlichkeitssteigerung des neu entwickelten Verfahrens gegenüber marktüblichen Verfahren bestimmt und die Verwendbarkeit zur *post mortem* Frühdiagnose quantitativ bestimmt werden. Dazu könnte zunächst die Bestimmung der Empfindlichkeit an Verdünnungsreihen von Proben aus BSE-positiven *medulla oblongata* – Proben bestimmt und in Vergleich zu momentan am Markt befindlichen Methoden gesetzt werden. Sollte sich das Potential einer hohen Sensitivität bestätigen, könnte die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Gehirnproben von Rindern im präklinischen BSE-Stadium untersucht werden.

Wenn das Testsystem soweit optimiert ist, dass die Hintergrundsignale vollständig unterdrückt werden können, so wäre der Nachweis eines einzigen Partikels in der Probe möglich. Damit wäre theoretisch die maximale Sensitivität erreicht, welche ein Testsystem erreichen kann, das den Erreger direkt nachweist.

Ein Ansatz könnte darin bestehen, die Methode auf andere Gewebe oder Körperflüssigkeiten zu übertragen. Dabei wäre die Analyse von z.B. Cerebrospinalflüssigkeit nahe liegend. Auch eine Fraktionierung von Vollblut BSE-positiver Rinder und Test der einzelnen Fraktionen auf Prionen, wäre bei einer hohen Sensitivität der Methode denkbar. Sollte ein Nachweis von PrP^{BSE} in Blutproben möglich sein, wäre der nächste Schritt die Analyse von Blutproben präklinischer Rinder. Denn das Ziel jeglicher BSE-diagnostischer Ansätze muss es sein einen Lebendtest zu entwickeln. Dazu muss der Test mit leicht abnehmbaren Materialien möglich sein. Daher wäre Blut oder Urin im Sinne der Einfachheit zur Abnahme des Probenmaterials am besten geeignet. Im Urin konnte Infektiosität bisher nicht nachgewiesen werden, daher ist die Aussicht PrP^{BSE} im Blut nachweisen zu können, Erfolg versprechender.

Der komplette diagnostische Ansatz könnte neben der Übertragung auf andere Gewebe oder Körperflüssigkeiten auch auf andere Spezies übertragen werden. Dabei wären Anwendungen zur Diagnose von Scrapie im Schaf und CWD in bestimmten Hirscharten im Sinne des Verbraucherschutzes die wichtigsten Anwendungsbereiche, da hier potentielle Gefahren der Übertragung auf den Menschen vorliegen könnten.

Schließlich erscheint auch die Übertragung der Methodik zur Diagnose von TSE des Menschen sinnvoll, da es bisher diesbezüglich keine verlässliche Diagnostik von TSE gibt. Bisher sind nur Differentialdiagnosen möglich, welche *post mortem* durch Analyse von Hirnbiopsie-Proben bestätigt werden können. Sollte eine Diagnose von präklinischen Tieren möglich sein, so wäre es sinnvoll diesen diagnostischen Ansatz auch für TSE des Menschen zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Prionkrankheiten sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die sowohl infektiös als auch sporadisch oder genetisch bedingt sein können. Die Erreger sind proteinartige ohne Nukleinsäuren, deren Hauptbestandteil das Prion-Protein (PrP) ist. Das PrP kann in der zellulären Isoform (PrP^C) und der pathogen-assoziierten Isoform PrP^{Sc} vorliegen, wobei PrP^{Sc} Hauptbestandteil des Erregers ist. Die drei einzigen Charakteristika, die streng mit dem Pathogen assoziiert sind, sind Infektiosität, der β -Strukturanteil des PrP^{Sc} und der Aggregationszustand des PrP^{Sc}. Die Infektiosität ist aufgrund der langen Zeitdauer von Bioassays als diagnostischer Marker nicht geeignet. Alle bisher zugelassenen BSE-Diagnostik-Methoden beruhen auf dem Nachweis des Proteinase K resistenten Teils des PrP^{Sc} (resPrP^{Sc}) und können BSE erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium nachweisen. Da jedoch z.T. große Anteile des pathologischen PrPs PK sensitiv sind (senPrP^{Sc}), ist die PK-Resistenz als diagnostischer Marker nicht uneingeschränkt geeignet.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Verfahren zu entwickeln, welches sich zur Diagnose von Prion-Krankheiten insbesondere BSE besser eignet und das Potential einer Frühdiagnose oder sogar eines Lebendtest verspricht. Dazu eignet sich der Nachweis des Aggregationszustandes des PrP^{Sc}. Als Nachweismethode für Aggregate in Lösung stand die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zur Verfügung.

Als erster Schritt war die Isolation vom PrP^{Sc} bzw. PrP^{BSE} ohne den Einsatz eines proteolytischen Schrittes nötig. Zur Isolation von PrP^{Sc} aus Hamsterhirngewebe war die Methode der NaPTA-Fällung bekannt (Safar *et al.*, 1998). Sie basiert auf einer selektiven Fällung von PrP^{Sc}-Aggregaten, während monomeres PrP^C im Überstand verbleibt. Anhand dieser Methode wurde ein Aufreinigungsprotokoll für PrP^{Sc} aus Hamsterhirn etabliert, welches durch die Einführung geeigneter Waschschriffe die Isolation von PrP^{Sc} mit einem hohen Reinheitsgrad ermöglichte. Dieses Protokoll wurde anschließend auf die Isolation von PrP^{BSE} aus Rinderhirn übertragen.

Als Sonden zum Nachweis von PrP^{Sc} mittels 2D-FIDA eignete sich die Antikörperkombination D13 und R1, für PrP^{BSE} Saf32 und 12F10. Mit der Verwendung von zwei verschiedenen Antikörpern und einer zwei Wellenlängen-Optik im FCS konnten sowohl mit Scrapie infizierte Hamster als auch mit BSE infizierte Rinder signifikant von gesunden Kontrollgruppen unterschieden werden. Da PrP-Aggregate in Suspension jedoch nicht gleichverteilt vorliegen, ließen sich enorme Standardabweichungen zwischen Messungen der gleichen Probe nicht verhindern. Daher wurde eine neue Analysestrategie entwickelt. Diese zielt darauf ab, aufgereinigte Prionaggregate auf der Oberfläche eines Messchips mit Hilfe eines Captures zu immobilisieren und dann durch Abscannen oberhalb der Bodenfläche mittels zwei Wellenlängen-FCS zu detektieren. Diese Methode, SPILA (single particle immuno-sorbant laser-scanning assay) genannt, konnte erfolgreich zur Diagnose von Scrapie und BSE angewendet werden.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Verfahren entwickelt, welches einen hochspezifischen und hochsensitiven Nachweis von Prionen erlaubt und somit erstmalig alle Eigenschaften, welche das Potential für eine Frühdiagnose voraussetzt, vereinigt.

6 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A. (2003)
Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves
Adv. Immunol. 81, 123–171
- Aguzzi, A., Glatzel, M., Montrasio, F., Prinz, M. & Heppner, F. L. (2001)
Interventional strategies against prion diseases. Nature Rev.
Neurosci. 2, 745–749
- Alper T., Cramp W.A., Haig D.A. & Clarke M.C. (1967)
Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?
Nature 214, 764-766
- 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, 779–88
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., Adessi, C. & Soto, C. (2004)
Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain
barrier
Biochem. Biophys. Res. Commun. 318, 125–130
- Beekes M, Baldauf E, 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, 1925-1934.
- Belt, P.B., Muileman, I.H., Schreuder, B.E., Bos de Ruijter, J., Gielkens, A.L. &
Smits, M.A. (1995)
Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with
natural scrapie.
J. Gen. Virol. 76, 509-17
- Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M, Kretzschmar H.
(2000)
Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color
scanning for intensely fluorescent targets.
PNAS 97, 5468-73
- Bieschke, J. (2000)
Aggregationsanalyse durch Fluoreszenz - Korrelations - Spektroskopie.
Dissertation Universität Carolo-Wilhelmina
- Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer
T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbruggen A, Stack M, Moser M, Oesch B,
Kubler E. (2002)
Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain
homogenate
J. Virol Methods. 101, 79-84

- Blättler, T (1997).
Prp-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain
Nature 389, 69–73.
- Boomen G., Häberlein H. (1999)
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
Deutsche Apotheker Zeitung 18, 54-60
- Bradley, R. and Wilesmith, J. W. (1993).
Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (bse)
Br Med Bull 49, 932–59.
- Brown D.R., Wong B., Hafiz F., Clive C., Haswell S. J & Jones I. M. (1999a)
Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase
Biochem. J. 344, 1-5
- Brown P., Cervenáková L., McShane L.M, Barber P, Rubenstein R, Drohan W.N (1999b)
Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt–Jakob disease in humans.
Transfusion 39, 1169–1178.
- Brown P., Cervenakova, L. & Diringer, H. (2001)
Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt–Jakob disease.
J. Lab. Clin. Med. 137, 5–13
- Brown P., L Cervenakova, LG Goldfarb, WR McCombie, R Rubenstein, RG Will, M Pocchiari, JF Martinez-Lage, C Scalici and C Fasullo (1994)
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine
Neurology 44, 291-293
- Bruce M. E. (2000)
‘New variant’ Creutzfeldt–Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy.
Nature Med. 6, 258–259
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H. Lipp, H.-P., DeArmond, S.J., Prusiner S.B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992)
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein
Nature 356, 577-582
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. (2004)
Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease
PNAS 101, 3065-70
- Chandler, R.L. (1961)
Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material.
Lancet 1, 1378-1379

- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J. & Prusiner, S.B. (1994)
Structural clues to prion replication.
Science 264, 530-531
- Collinge J., Sidl K. C., Heads J., Ironside J., & Hill A. F. (1996 a)
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD
Nature 383, 685-690
- Collinge J., Whittington M. A., Siddle K. C., Smith C. J., Palmer M. S., Clarke A. R. & Jefferys J. G. (1994)
Prion protein is necessary for normal synaptic function
Nature 370, 295-297
- Collinge, J. (1999)
Variant Creutzfeldt–Jakob disease
Lancet 354, 317–323
- Collinge, J., Beck, J., Campbell, T., Estibeiro, K. & Will, R.G. (1996 b)
Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease
Lancet 348, 56
- Demart S, Fournier JG, Creminon C, Frobert Y, Lamoury F, Marce D, Lasmezas C, Dormont D, Grassi J, Deslys JP. (1999)
New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies
Biochem Biophys Res Commun. 265, 652-7
- Dickinson, A.G. (1976)
Scrapie in sheep and goats
Front. Biol. 44, 209–241
- Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C. & Anderson, R. M. (2003)
Extending backcalculation to analyse BSE data
Stat. Methods Med. Res. 12, 177–190
- Dormont, D. (2003)
Approaches to prophylaxis and therapy
Br. Med. Bull. 66, 281–292
- Ehrenberg M, Rigler R (1976)
Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules
Q Rev Biophys. 9, 69-81
- 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, 793–8
- Gajdusek D.C., Zigas V. (1957)
Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population.
N Engl J Med. 257, 974-8

- Gajdusek, D. C. (1977)
Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru
Science 197, 943 - 960
- Goldmann W., Hunter N., Martin T., Dawson M. & Hope J. (1991)
Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within protein-coding exon
J. Gen. Virol. 72, 201-204
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2004)
Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers
PNAS, 101, 8342-7
- Grassi J, Creminon C, Frobert Y, Fretier P, Turbica I, Rezaei H, Hunsmann G, Comoy E, Deslys JP (2000)
Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE
Arch Virol Suppl.(16):197-205
- Hayashi, R. (1992)
Serial computed tomographic and electroencephalographic studies in creutzfeldt-jacob disease.
Acta. Neurol. Scand. 85, 161–165
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1986)
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining.
Electrophor. 6, 103-112
- Hope J, Morton LJ, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH (1986)
The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP).
EMBO J. 10, 2591-2597
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ (2000)
Transmission of BSE by blood transfusion in sheep
Lancet 356, 999
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F (2002)
Transmission of prion diseases by blood transfusion
J Gen Virol 83, 2897-905
- Hörnelimann B., Riesner D., Kretzschmar H. (2001)
Prionen und Prionkrankheiten
DE GRUYTER-Verlag, ISBN 3-11-016361-6
- Hornemann S, Schorn C, Wüthrich K. (2004)
NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains
EMBO Rep. 5, 1159-64

- 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, 924–30
- Ingrosso, L., Vetrugno, V., Cardone, F. & Pocchiari, M. (2002)
Molecular diagnostics of transmissible spongiform encephalopathies
Trends Mol. Med. 8, 273–280
- Jarrett, J.T. & Lansbury, P.T. (1993)
Seeding „one-dimensional crystallization“ of amyloid: A pathogenic mechanism in
alzheimer's disease and scrapie?
Cell 73, 1055-1058
- Kask, P., Palo, K., Ullmann, D. and Gall, K. (1999)
Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular
detection technology.
PNAS 96, 13756–61
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S.B. & Riesner, D. (1992)
Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved
return refocussing gel electrophoresis (RRGE)
J. Gen. Virol. 73, 1025-1029
- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. (1989)
Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection
Virus Res. 12, 213–220.
- Korth, C. Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W,
Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber
R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B. (1997)
Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody.
Nature 390, 74–77
- Krasemann S, Groschup M, Hunsmann G, Bodemer W. (1999)
Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated
immunization of PrP0/0 mice
J Immunol Methods. 199, 109-18
- 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, 1–5
- Lasmézas C. I., Deslys, J. P., Demaimay.R., Adjou K. T., Lamoury F., Dormont D.,
Robain O., Ironside J., & Hauw J.J. (1996)
BSE transmission to macaques
Nature 381, 743 – 744
- Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, Gilligan KJ, Rubenstein
R, Fournel M, Petteway SR Jr. (2000)
Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the
detection of the prion protein
J Virol Methods 84, 77-89

- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. (2004)
Synthetic mammalian prions
Science 305, 673-6
- Leopoldt J. G. (1759)
Einleitung zu der Landwirtschaft Verlag Christian Friederich Günther, Berlin
Gronau
- LeVine, H (2003)
Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with Thioflavin T.
Methods Enzymol. 309, 274-284
- Liu H, Farr-Jones S, Ulyanov NB, Llinas M, Marqusee S, Groth D, Cohen FE, Prusiner SB, James TL. (1999)
Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231)
Biochemistry 38, 5362-77
- Llewelyn, C. A. Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004)
Possible transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by blood transfusion
Lancet 363, 417–421
- Lloyd SE, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Buckell J, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J. (2004)
Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice
J Gen Virol. 85, 2471-8.
- Marsh, R.F. & Kimberlin, R.H. (1975)
Comparision of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis
J. Infect. Dis. 131, 104-110
- McKinley, M.P., Bolton, D.C. & Prusiner, S.B. (1983)
A protease-resistant protein is a structural component of scrapie prion
Cell 35, 57-62.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. and Iqbal, K. (1981)
Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol 54, 63–74
- Miura T., Hori-I A., Mototani H. & Takeuchi H. (1999)
Raman Spectroscopic Study on the Copper(II) Binding Mode of Prion Octapeptide and Its pH Dependence
Biochemistry 38, 11560 - 11569
- Moynagh J, Schimmel H (1999)
Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy
Nature 400, 105
- Nolen, R. S. (2004)
Washington state dairy cow nation's first case of BSE.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 224, 345–346

- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. & Weissmann, C. (1985)
A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein
Cell 40, 735-46
- O'Rourke, K.I., Holyoak, G.R., Clark, W.W., Mickelson, J.R., Wang, S., Melco, R.P., Besser, T.E. & Foote, W.C. (1997).
PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States
J. Gen. Virol. 78, 975-978
- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. & Prusiner, S.B. (1993).
Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
PNAS 90, 10962-10966.
- 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, 115–117
- Pattison, I.H. (1961)
Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome.
J. Comp. Path. 71, 101–108
- Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW (2004)
Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient
Lancet 364, 527-9
- Petersen, N. O. (1986)
Scanning fluorescence correlation spectroscopy. i. theory and simulation of aggregation measurements
Biophys J 49, 809–15
- 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, 832–4
- Priola S. A., Chesebro B (1995)
A single hamster amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells
J. Virol 69, 7754- 7758
- Pruisner S. B., Groth D.F., Cochran S.P., Masiarz F.R., McKinley M.P. & Matinez H. M. (1980)
Molekular properties, partial purification and assay by incubation period measurements of hamster scrapie agent
Biochemistry 19, 4883-4891

- Prusiner SB (1997)
Prion diseases and the BSE crisis
Science 278, 245-51
- Prusiner SB (1998)
Prions
PNAS 95, 13363-83
- Prusiner, S.B. (1982)
Novel proteinaceous infectious partikels cause scrapie.
Science 216, 136-144
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., McKinley, M.P., Chochran, S.P., Bowman, K.A. & Kasper, K.C. (1981)
Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent
PNAS 78, 4606-4610.
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster D., Pan K-M., Groth D., Mirenda C., Torchia M., Yang S. L., Serban D., Carlson G. A., Hoppe P. C., Westaway D. & DeArmond J. (1990)
Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication.
Cell 63, 673-686
- Qian, H. (1990)
On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy
Biophys Chem 38, 49–57
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.B. & Prusiner, S.B. (1996)
Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking scrapie infectivity
J. Virol. 70, 1714-1722
- Roberts. G.W. & Clinton, J. (1992).
In: Prusiner, S. B., Collinge, J., Powell, J. & Anderton, B. (eds.):
Prion diseases of humans and animals. Horwood, London, 215-240
- Rodolfo K, Hassig R, Moya KL, Frobert Y, Grassi J, Di Giamberardino L. (1999)
A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport
Neuroreport. 10, 3639-44
- Roos R, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. (1973)
The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease
Brain. 96, 1-20
- Rossi, G., Salmona, M., Forloni, G., Bugiani, O. & Tagliavini, F. (2003)
Therapeutic approaches to prion diseases.
Clin. Lab. Med. 23, 187–208
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998)
Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations
Nat Med. 4, 1157-65

- Safar JG, Geschwind MD, Deering C, Didorenko S, Sattavat M, Sanchez H, Serban A, Vey M, Baron H, Giles K, Miller BL, Dearmond SJ, Prusiner SB (2005)
Diagnosis of human prion disease
PNAS 102, 3501-6
- Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, Ball H, Legname G, Leclerc E, Solforosi L, Serban H, Groth D, Burton DR, Prusiner SB, Williamson RA (2002)
Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice
Nat Biotechnol. 20, 1147-50
- Safar, J., Roller, P.P., Gaydusek, D.C. & Gibbs, C.J.Jr. (1993)
Conformational transitions, dissociation and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein
J. Biol. Chem. 268, 20276-20284
- Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K, Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T. & Noda T. (1996)
Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene
Nature 380, 528- 531
- Salman MD (2003)
Chronic wasting disease in deer and elk: scientific facts and findings
J Vet Med Sci. 65, 761-8
- Schäfer, O. (2002)
Nachweis von Prionen als Prionprotein-Aggregate im Hirngewebe TSE-erkrankter Tiere mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M (1999)
Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)
Acta Neuropathol. 98, 437-43
- Schiermeier, Q. (2001)
Testing times for BSE
Nature 409, 658–659
- 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, 1878–86
- Scott M., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Wachli M. (1989)
Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques
Cell 59, 847 – 857

- Scott, M. R. Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB (1999)
Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans.
PNAS 96, 15137–15142
- Sigurdson CJ, Miller MW (2003)
Other animal prion diseases
Br Med Bull. 66, 199-212
- 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 Dortrecht, NL
- Soto C. (2004)
Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes
Nat Rev Microbiol. 2, 809-19
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. & Prusiner, S.B. (1993)
Structural Analysis of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing.
Biochemistry 32, 1991-2002
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. & Manson, J.C. (1996)
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein
Nature 380, 639-631
- Turk, E. Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. (1988)
Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins.
Eur. J. Biochem. 176, 21-30
- Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, Shaked G, Gabizon R, Taraboulos A. (2002)
Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes
Biochemistry 41, 12868-75
- Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J (2001)
Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt–Jakob Disease using a highly sensitive immunoblotting assay.
Lancet 358, 171–180
- Weiss S, Proske D, Neumann M, Groschup MH, Kretzschmar HA, Famulok M, Winnacker EL. (1997)
RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP.
J Virol. 71, 8790-7
- Weissmann, C. (1994)
Molecular biology of prion diseases
Trends Cell Biol. 4, 10 – 14

- Wells GA, Wilesmith JW, McGill IS (1991)
Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective
Brain Pathol. 1, 69-78
- Westphal, K.P. (1985)
Computed tomography during creutzfeldt-jacob disease.
Neuroradiology 27(362-364)
- Wiegand T. (2002)
Entwicklung, Charakterisierung und Ableitung neuronaler Netzwerke auf
Multielektrodenarrays
Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 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, 197–201
- Will R. G., Ironside J. W., Zeidler M., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A.,
Poser S., Pocchiari M., Hofman A. & Smith P. G. (1996)
A new variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK
Lancet 347, 921 - 925
- Will R. G., Zeidler M., Stewart G. E., Macleod M. A., Ironside J. W., Cousens S. N.,
Mackenzie J., Estibeiro K., Green A. J. E., Knight R. S. G. (2000)
Diagnosis of new variant Creutzfeldt–Jakob disease
Ann. Neurol. 47, 575–582
- Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2000)
Scrapie infectivity is independent of amyloid staining properties of the N-terminally
truncated prion protein
J Struct Biol. 130, 323-38
- Williams ES, Young S. (1980)
Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy
J. Wildl. Dis. 16, 89-98
- Yoshimoto J., Linuma T., Ishiguro N., Horiuchi M., Imamura M. & Shinagawa M.
(1992)
Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse
L-929 cells
Virus Genes 6, 343 – 356