

Aus dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
Lehrstuhl für Tierhygiene Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer
Vorgelegt über das Institut für
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Univ.-Prof. Dr. E. Märtlbauer

Zum Nachweis von pathogenen Prionen mittels „Kapillarelektrophorese-laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF)“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Markus Fritz
aus Eichstätt

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
B	Literatur	2
1	Prionproteine	2
1.1	Begriffsbestimmung	2
1.2	Zelluläres Prionprotein (PrP ^C)	2
1.2.1	Struktur und Aufbau	2
1.2.2	Vorkommen und Funktion von PrP ^C	4
1.3	Pathologisches Prionprotein	6
1.3.1	Struktur von PrP ^{Sc}	6
1.3.2	Vorkommen von PrP ^{Sc}	7
1.3.3	Eigenschaft von PrP ^{Sc}	7
1.3.4	Prionenstämme	8
1.4	Konformationsänderung von PrP ^C in PrP ^{Sc}	9
2	Nachweismethoden für TSE	10
2.1	Nachweis von PrP ^{Sc}	10
2.1.1	Offiziell anerkannte Nachweisverfahren	10
2.1.2	Alternative Nachweisverfahren für PrP ^{Sc}	13
2.2	Indirekter Nachweis von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie	14
2.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	14
2.2.2	Tierversuch	15
2.2.3	Nachweis von Surrogatmarkern	15
2.2.3.1	Proteine	16

2.2.3.2	Fouriertransformation-Infrarot-Spektroskopie.....	17
2.2.4	Nachweis charakteristisch extrazellulärer Nukleinsäuren im Blut.....	19
C	Material und Methoden	23
1	Material.....	23
1.1	Hirngewebe und Liquor	23
1.2	Bovines rekombinantes PrP ^c	23
1.3	Antikörper	23
1.4	Gebrauchsmaterial	24
2	Methoden.....	25
2.1	Herstellung von Hirnhomogenat	25
2.2	Herstellung von PrP ^{sc} -haltigem Liquor.....	25
2.3	Prüfung konventioneller Nachweisverfahren für PrP ^c bzw. PrP ^{sc}	26
2.3.1	ELISA in Mikrotiterplatten	26
2.3.2	Dot-EIA.....	29
2.3.3	Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot	31
2.3.3.1	Herstellung eines SDS-PAGE-Gels zur elektrophoretischen Auftrennung von PrP ^c -haltigem Material	31
2.3.3.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von PrP ^c -haltigem Material.....	33
2.3.3.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von PrP ^{sc} -haltigem Material	34
2.3.3.4	Blotvorgang von PrP ^c bzw. PrP ^{sc}	35
2.3.3.5	Nachweis von PrP ^c	36
2.3.3.6	Nachweis von PrP ^{sc}	36
3	Anreicherungsverfahren für PrP ^{sc}	36
3.1	Zentrifugationsverfahren.....	37

3.1.1	BSE-Reinigungskit (Bio-Rad [®] , Methode I).....	37
3.1.2	Fällung mit Phosphorwolframsäure (Methode II).....	38
3.1.3	Ultrazentrifugation nach SCHMERR ET AL. (2000, Methode III).....	41
3.2	Extraktionsverfahren mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP, Methode IV)...	42
3.2.1	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Hirngewebe.....	42
3.2.2	Extraktion von PrP ^{Sc} aus artifiziell kontaminiertem Liquor	44
3.3	Chromatographische Aufreinigungsverfahren	45
3.3.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Methode V)	45
3.3.2	Festphasenextraktion mit SPE-Kartuschen (Methode VI)	47
3.3.2.1	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Hirngewebe.....	47
3.3.2.2	Extraktion von PrP ^{Sc} aus artifiziell kontaminiertem Liquor	49
3.3.3	Kombinationsverfahren.....	49
3.4	Affinität- bzw. Immunomagnetische Separation	50
3.4.1	Versuche mit Plasminogen-beschichteten Beads	51
3.4.2	Versuche mit Antikörper-beschichteten Beads.....	54
3.4.2.1	Herstellung einer PrP ^{Sc} -haltigen Stammlösung	56
3.4.2.2	Versuche zur Anreicherung von PrP ^{c/sc} aus der Matrix PBS	56
3.4.2.3	Versuche zur Anreicherung von PrP ^{c/sc} aus der Matrix Liquor.....	57
4	Nachweis von PrP ^c bzw. PrP ^{Sc} mittels Kompetitiver Immunoassay mit Kapillarelektrophorese-Laser-induzierter Fluoreszenz (CE-LIF)	59
4.1	Untersuchung der Bindungsfähigkeit monoklonaler Antikörper mit Fluoreszenzmarkierten synthetischen Peptiden	59
4.2	Kapillarelektrophoretische Darstellung der Bindung von mAB F89 mit FITC-P3.....	62
4.2.1	Ermittlung der Nachweisgrenze für PrP ^c	64

4.2.2	Nachweisbarkeit von PrP ^{Sc} in Hirnhomogenat.....	65
D	Ergebnisse.....	67
1	Bewertung konventioneller Nachweisverfahren für PrP ^C	67
1.1	ELISA	67
1.2	Dot-EIA.....	69
1.3	Westernblot	70
2	Physikalisch-chemische Anreicherungsverfahren für PrP ^{Sc}	71
2.1	Anreicherung von PrP ^{Sc} mittels Zentrifugation.....	71
2.2	Extraktion mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Methode IV)	73
2.2.1	Hirngewebe	73
2.2.2	Liquor.....	73
2.3	Chromatographische Aufreinigungsverfahren	74
2.3.1	Präparative HPLC.....	74
2.3.2	SPE-Kartuschenaufreinigung	75
2.3.2.1	Hirngewebe	75
2.3.2.2	Liquor.....	76
2.4	Aufreinigung von PrP ^{Sc} mit Kombinationsverfahren.....	77
2.4.1	Hirngewebe	77
2.4.2	Liquor.....	79
2.5	Affinität- bzw. Immunomagnetische Separation	80
2.5.1	Bindungsversuche mit Plasminogen-beschichteten Beads	80
2.5.2	Bindungsversuche mit Antikörper-beschichteten Beads	81
2.5.2.1	Versuche zur Anreicherung von PrP ^C und PrP ^{Sc} aus der Matrix PBS	81
2.5.2.2	Versuche zur Anreicherung von PrP ^C bzw. PrP ^{Sc} aus Liquor.....	82

3	Nachweis von PrP ^c bzw. PrP ^{sc} mittels CE-LIF	84
3.1	Prüfung der Affinität zwischen PrP-spezifischen Antikörpern und FITC markierten Peptiden	84
3.2	Nachweis von PrP ^c	87
3.3	Nachweis von PrP ^{sc}	89
3.3.1	Hirngewebe	89
3.3.2	Liquor.....	93
E	Diskussion	95
1	CE-LIF	95
2	Vergleich unterschiedlicher Nachweisverfahren am Beispiel PrP ^c	98
3	Nachweis von PrP ^{sc} mittels CE-LIF	100
3.1	Nachweis von PrP ^{sc} aus Hirngewebe	100
3.2	Nachweis von PrP ^{sc} aus Liquor	103
4	Affinität- und Immunomagnetische Separation von PrP ^c und PrP ^{sc}	103
5	Schlussfolgerungen	104
F	Zusammenfassung	105
G	Summary	106
H	Literaturverzeichnis	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des PrP ^C (HUANG ET AL., 1996).....	3
Abbildung 2: Aminosäuresequenz des bovinen Vollängen-PrP ^C (HEATON ET AL. 2003); eingerahmte Bereiche werden posttranslational abgespalten.....	3
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des C und N-terminalen Endes des Prion Proteins (in Anlehnung an Millhauser, 2004).....	4
Abbildung 4: Struktur des PrP ^{Sc} (HUANG ET AL., 1996)	6
Abbildung 5: Entstehungsmodelle von PrP ^{Sc} aus PrP ^C . a) autokatalytisches Umfaltungsmodell; b) Nukleationsmodell (Abbildung aus KRETZSCHMAR 2001)	9
Abbildung 6: Prinzip der Immundetektion von PrP ^{Sc} durch IHC (modifiziert nach BFAV 2002)	13
Abbildung 7: Zweifarben-Fluoreszenz-Intensitäts-Histogramm	14
Abbildung 8: Spektren einer FT-IR-Spektroskopie zur Identifikation von BSE (LASCH ET AL., 2003).	19
Abbildung 9: Prinzip einer PMCA (Saborio et al., 2001)	21
Abbildung 10: Nachweis einer PrP ^{Sc} -Amplifikation im Westernblot: a) Kontrolle, b) nach Amplifikation (aus SABORIO ET AL., 2001)	22
Abbildung 11: Aufreinigung von PrP ^{Sc} aus Hirnhomogenat in Anlehnung an WADSWORTH ET AL. (2001) (Methode II a und II b)	40
Abbildung 12: Arbeitsschritte zur Anreicherung von PrP ^{Sc} mittels Ultrazentrifugation nach SCHMERR ET AL. (2000, Methode III).....	42
Abbildung 13: Arbeitsschritte zur Extraktion von PrP ^{Sc} aus Hirngewebe mittels 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (HFIP) nach SCHMERR ET AL. (2000) (Methode IV).....	44
Abbildung 14: Versuchsdesign zur Extraktion von PrP ^{Sc} aus kontaminiertem Liquor mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Methode IV).....	45
Abbildung 15: Arbeitsschritte zur Aufreinigung von PrP ^{Sc} mittels SPE-Kartuschen (in Anlehnung an CERVENAKOVA ET AL. 2003, Methode VI).....	48
Abbildung 16: Aufreinigungsverfahren von PrP ^{Sc} -kontaminierter Cerebrospinalflüssigkeit mit SPE-Kartuschen (Methode VI).....	49
Abbildung 17: Prinzip der IMS. Links: Probe; Mitte: Zugabe von Dynabeads [®] , Bindung an den Liganden; rechts: Magnetische Separation	51
Abbildung 18: Versuchsdesign zur Anreicherung von PrP ^{Sc} aus Hirnhomogenat mittels Plasminogen beschichteter Dynabeads [®]	54
Abbildung 19: Kapillarelektrophoresekammer mit Detektor (links) und Argon Ion Laser (rechts)	62
Abbildung 20: Schematische Messapparatur für die Kapillarelektrophorese (aus www.tu- bs.de/ce-jpg.de).....	63
Abbildung 21: Kombinationsverfahren aus Methode IV und VI zur Aufreinigung von PrP ^{Sc} - kontaminierter Cerebrospinalflüssigkeit	66

Abbildung 22: Dot-EIA von PrP ^c (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen	69
Abbildung 23: Dot-EIA von PrP ^{sc} (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen	69
Abbildung 24: Nachweisbarkeit abgestufter PrP ^c -Mengen in PBS; Nachweisverfahren Westernblot. Lane 1) 20 ng PrP ^c ; Lane 2) 10 ng PrP ^c ; Lane 3) 5 ng PrP ^c ; Lane 4) 2.5 ng PrP ^c ; Lane 5) 1.25 ng PrP ^c	70
Abbildung 25: Titration von PrP ^{sc} -haltigem Hirnhomogenat; Nachweisverfahren Westernblot. Lane 1: Größenmarker, Lane 2: Kontrolle 20 ng PrP ^c , Lane 3: Kontrolle 10 ng PrP ^c , Lane 4: Aufgereinigtes Hirnhomogenat unverdünnt, Lane 5-11: Aufgereinigtes Hirnhomogenat 1:2 bis 1:128 verdünnt	71
Abbildung 26: Vergleich von Aufreinigungsverfahren für PrP ^{sc} mittels Zentrifugation; Methode I: Extraktkonzentration äquivalent 33 mg Hirn/ 100 µl; Methoden IIa und IIb: Extraktkonzentration: 100 mg Hirn/ 100 µl; Nachweisverfahren: ELISA	72
Abbildung 27: Dot-EIA ausgewählter Hirnhomogenat-Fractionen gewonnen nach Methode III: Proben 1 – 3: Pellets bzw. Überstände nach Ultrazentrifugation; Position 4: PrP ^{sc} -haltiges Endextrakt nach letzter Ultrazentrifugation	72
Abbildung 28: Vergleich der Extrahierbarkeit von PrP ^{sc} aus Hirnhomogenat. Methode I (BioRad-Verfahren): Extraktkonzentration äquivalent 33 mg Hirn/ 100 µl; Methode IV (1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol): Extraktkonzentration äquivalent 100 mg Hirn/ 100 µl; Nachweisverfahren: ELISA	73
Abbildung 29: Vergleich der OD-Werte von artifiziell mit PrP ^{sc} -kontaminiertem nativem Liquor und Liquorextrakt (Nachweisverfahren: ELISA)	74
Abbildung 30: Fraktionierung eines PrP ^{sc} -haltigen Hirnextraktes nach HPLC (PrP ^{sc} - Nachweis: ELISA)	75
Abbildung 31: Nachweis von PrP ^{sc} in HPLC-Fractionen eines Hirnextraktes; K: Positiv- Kontrolle: PrP ^c = 200ng/µl; Positionen 1-8: Eluate nach 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 und 32 min.75	
Abbildung 32: Dot-EIA von PrP ^{sc} (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen nach Durchführung des SPE-Aufreinigungsverfahrens;	76
Abbildung 33: Vergleich der OD-Werte von mit PrP ^{sc} artifiziell kontaminiertem Liquor vor und nach einer Aufreinigung mit SPE-Kartuschen	77
Abbildung 34: OD-Werte von PrP ^{sc} -haltigem Hirnhomogenat im ELISA nach Anwendung unterschiedlicher Extraktionsverfahren	78
Abbildung 35: Dot-EIA zum Nachweis von PrP ^{sc} nach Durchführung des Kombinationsverfahrens 2: Position 1) wässrige Phase , Position 2) HFIP-Phase.....	78
Abbildung 36: Nachweis von PrP ^{sc} nach Aufreinigung von Hirnhomogenat im Extrakt nach Durchführung des Kombinationsverfahrens 3: Position 1) ACN-haltiges Eluat A, Position 2) wässriges Eluat B).....	79
Abbildung 37: Nachweisbarkeit von PrP ^{sc} in artifiziell kontaminiertem Liquor vor und nach Durchführung des Kombinationsverfahrens aus Methode IV und V; (Nachweisverfahren: ELISA).....	79
Abbildung 38: Nachweis von PrP ^{sc} nach Affinitätsmagnetischer Separation (Adsorbens: Plasminogen)	80
Abbildung 39: Nachweis abgestufter Konzentrationen von PrP ^c in PBS vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	81

Abbildung 40: Nachweis von PrP ^{Sc} aus PBS-Hirn-Homogenat vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	82
Abbildung 41: Nachweis von rekombinanten PrP ^C in Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	83
Abbildung 42: Nachweis von PrP ^{Sc} in Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA.	83
Abbildung 43: Intensität der Fluoreszenz nach Inkubation mAB F89 beschichteter Kavitäten mit abgestuften Mengen FITC-P3	85
Abbildung 44: Überprüfung einer Bindung von mit mAB F89 vorinkubierten Kavitäten an Mikrotiterplatten mit abgestuften Mengen FITC-markierten Ziege-Anti-Maus Antikörpern im Doppelansatz	85
Abbildung 45: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC P3 54 pg/nl; B: 10 pg/nl mAB F89; C: 1.25 pg/nl mAB F89.....	86
Abbildung 46: Einfluss der Konzentration von mAB F89 auf die Fluorezenzintensität von mAB F89-FITC-P3 und FITC-P3 bei konstanter FITC-P3 Konzentration (54 ng/ml); jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von drei Messungen ($y_{F89-FITC-P3} = 0.0126x^2 + 0,1841x +$ 0.3179 ($r^2=0,9807$); $y_{FITC-P3} = 0.0104x^2 - 0.1556x + 0.6351$ ($r^2 = 0.9507$)).....	87
Abbildung 47: CE-LIF-Elektropherogramme: A: 0 pg PrP ^C ; B: 10 pg PrP ^C ; 2.5 pg PrP ^C	88
Abbildung 48: CE-LIF-Elektropherogramme: A: Extrakt äquivalent 0 mg Hirn/μl; B: Extrakt äquivalent 5 mg Hirn/μl;C: Extrakt äquivalent 0.31 mg Hirn/μl.....	91
Abbildung 49: CE-LIF-Elektropherogramme von Hirnpräparationen (Kombinationsverfahren 3): A) Kontrolle, B) PrP ^{Sc} -haltiger Extrakt (äquivalent 20 μg Hirn/nl	93
Abbildung 50: CE-LIF-Elektropherogramm von Liquor eines BSE-positiven Tieres: A: Leerwert; B: Liquorextrakt	94
Abbildung 51: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC-P1; B: FITC-P1 und mAB 6H4 (B)	96
Abbildung 52: Messung von FITC-P3 (c = 54 pg/μl) und mAB F89 (c = 1.25 ng/μl)	96
Abbildung 53: CE-LIF-Elektropherogramm: Messung von FITC-P3 (c = 54 pg/μl) und mAB 89 (c = 1.25 ng/μl) nach einer Inkubation von 24 h	97
Abbildung 54: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC-P3 (54 pg/μl) ; B: Probe nach 3- stündiger Inkubation	97
Abbildung 55: Nachweisbarkeit abgestufter PrP ^C Mengen in verschiedenen Matrices; Nachweisverfahren: ELISA	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Wirkungen von PrP ^c	5
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Gebrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Inhalt des Platelia [®] BSE Nachweiskits	27
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial zur Durchführung einer Aufreinigung mit dem BSE Reinigungskit nach Bio-Rad [®]	37
Tabelle 5: Inhalt des BSE Reinigungskits (Bio-Rad Produktbeschreibung)	37
Tabelle 6: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP ^c aus PBS vor und nach IMS; Nachweis- verfahren ELISA	57
Tabelle 7: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP ^{sc} aus PBS vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	57
Tabelle 8: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP ^c aus vorverdaulichem Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	58
Tabelle 9: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP ^{sc} aus vorverdaulichem Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA	58
Tabelle 10: Sequenzen der geprüften Peptide	59
Tabelle 11: Versuchsdesign zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von FITC-P1 und FITC- P2 mit mAB 6H4	61
Tabelle 12: Versuchsdesign zur Prüfung der Bindungsfähigkeit von mAB F89 mit FITC-P3	62
Tabelle 13: Programmierung der CE-LIF	63
Tabelle 14: Versuchsdesign zur Bestimmung der Nachweisgrenze von PrP ^c mittels CE-LIF	65
Tabelle 15: Versuchsdesign zur Bestimmung von PrP ^{sc} mittels CE-LIF	66
Tabelle 16: Nachweis definierter PrP ^c -Mengen im Bio-Rad ELISA	67
Tabelle 17: Nachweis abgestufter PrP ^{sc} -Mengen im Bio-Rad ELISA	68
Tabelle 18: Einfluss der Konzentration von PrP ^c auf die Intensität der Fluoreszenzsignale von mAB F89-FITC-P3-Komplex und FITC-P3 (Anzahl der Messungen pro Konzentration: 3) ...	89
Tabelle 19: Überblick über die Nachweisbarkeit von PrP ^{sc} aus Probenextrakten nach Durchführung der Einzelaufreinigungsmethoden	90
Tabelle 20: Einfluss definierter PrP ^{sc} -Mengen auf die Intensität der Fluoreszenzsignale des mAB F89/FITC-P3-Komplexes und FITC-P3 in der CE-LIF (Anzahl der Messungen pro Konzentration: 3)	92
Tabelle 21: Vergleich der Leistungsfähigkeit von ELISA, Dot-EIA, Westernblot und CE-LIF bezüglich des Nachweises von PrP ^c	99

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AMS	Affinitätsmagnetische Separation
bp	Basenpaare
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
BSA	Bovines Serum Albumin
CDI	Conformation dependent Immunoassay
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt-Jakob-Disease)
CWD	Chronic Wasting Disease
c	Konzentration in ng pro Kavität
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HFIP	1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-isopropanol
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
CE-LIF	Kapillarelektrophorese Laser-induzierte Fluoreszenz
IMP-ELISA	Immunomagnetic Particle ELISA
kD	Kilo-Dalton
mA	Milliampere
mAB 6H4	Monoklonaler Antikörper 6H4
mAB F89	Monoklonaler Antikörper F89
min	Minute(n)
MPC	Magnetischer Partikel Konzentrator
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
ng /K	Nanogramm pro Kavität
OD	Optical Density
OR	Oktarepeat-Region
PBS	Phosphat Buffered Saline

Fortsetzung des Abkürzungsverzeichnisses:

pg	Pikogramm
PK	Proteinase K
<i>PRNP</i> -Gen	Prion-Protein-Gen
PrP	Prionprotein
PrP ^c	Physiologisches Prionprotein
PrP ^{sc}	Pathologisches Prionprotein
rpm	rounds per minute
s	Sekunde(n)
SAF	Scrapie associated fibrils
sCJD	Sporadische CJD
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
TFA	Trifluoressigsäure
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vCJD	Neue Variante der CJD
w/v	weight/volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

A Einleitung

Die bovine spongiforme Enzephalopathie, kurz BSE, gehört zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), degenerativen Veränderungen der Nervenzellen des Gehirns, die mit Plaques- und Vakuolenbildung einhergehen und letztlich immer zum Tod führen (HÖRNLIMANN 2001). Diese Form der Erkrankung ist im Tierreich auch bei Katzen, Nerzen, Rotwild, Schafen und Hirschen bekannt und steht im Verdacht, beim Menschen durch Verzehr von Fleisch oder Risikomaterial erkrankter Rinder die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) auszulösen, die erstmals 1996 in England beschrieben wurde (BRUCE ET AL. 1997, WILL ET AL. 1996). Zu den bisher beim Menschen bekannten spongiformen Enzephalopathien zählen die Kuru, das Gerstmann-Sträußler-Scheinker Syndrom (GSS), die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) und mit einem Anteil von ca. 75 % der Fälle die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), die spontan mit einer Prävalenz von 1:1 Mio. vor allem bei älteren Patienten auftritt (PRUSINER 1995).

TSE-Erkrankungen werden nach dem heutigen Kenntnisstand höchstwahrscheinlich von pathologisch verändertem Prionprotein (PrP^{Sc}) ausgelöst (LEGNAME ET AL. 2004). Oberstes Ziel des Verbraucherschutzes ist es daher, einem Eintrag von PrP^{Sc} in die Nahrungskette vorzubeugen. Dazu werden EU-weit alle Rinder ab einem Alter von 30 Monaten mit einem Schnelltest auf BSE getestet, in Deutschland bereits ab einem Alter von 24 Monaten, wobei die Erkrankung gegenwärtig nur *post mortem* durch den Nachweis von PrP^{Sc} in Hirngewebe festgestellt werden kann. In Frankreich, Italien und Japan sind jedoch erstmalig Fälle von BSE bei unter 24 Monate alten Tieren aufgetreten, bei denen ein Stamm von PrP^{Sc} isoliert wurde, der bei den bisherigen BSE-Fällen noch nicht nachgewiesen worden ist (BIACABE ET AL. 2004, CASALONE ET AL. 2004, YAMAKAWA ET AL. 2003). Es erhärten sich auch Hinweise darauf, dass sich Prionen im Muskel anreichern können (ANDREOLETTI ET AL. 2004, THOMZIG ET AL. 2004a). Außerdem gilt eine Übertragbarkeit von CJD von Mensch zu Mensch durch Bluttransfusionen als immer wahrscheinlicher (KNIGHT 2004, LLEWELYN ET AL. 2004). Daher ist die Entwicklung eines *ante mortem* - Tests für den Nachweis von BSE oder CJD nach wie vor im Focus der Wissenschaft, um größt mögliche Lebensmittelsicherheit oder die Sicherheit von Blutkonserven gewährleisten zu können. In den für einen solchen Test in Frage kommenden Körperflüssigkeiten wie Blut, Liquor oder Urin ist die Konzentration an eventuell vorhandenem Prionprotein jedoch so gering, dass ein Nachweis in diesen Medien die Entwicklung besonders sensitiver Methoden und Anreicherungsverfahren verlangt.

In dieser Arbeit wurde versucht, eine als sehr sensitiv geltende Methode der „Kapillarelektrophorese-laserinduzierten Fluoreszenz“ als mögliches Verfahren zum Nachweis von PrP^{Sc} zu etablieren und deren Möglichkeit für einen Einsatz als *ante mortem* - Test für bovinen Liquor zu überprüfen.

B Literatur

1 Prionproteine

1.1 Begriffsbestimmung

Der Begriff „Prion“ (PrP) wurde 1982 von PRUSINER geprägt. Er verstand darunter sogenannte „Proteinaceous infectious particle“ („eiweißartige infektiöse Partikel“), die als Ursache Transmissible Spongiformer Enzephalopathien angesehen werden (PRUSINER, 1982; BOLTON ET AL., 1982, PRUSINER ET AL., 1982). Die Abkürzung für Proteinaceous infectious particle „Proin“ wurde zugunsten des leichter sprechbaren „Prion“ abgeändert (PRUSINER, 2001). Der Begriff „Prion“ erfuhr eine erweiterte Bedeutung als festgestellt wurde, dass neben einer pathologischen Form des Moleküls auch eine physiologische Form existiert. (PRUSINER 1998). Die physiologische Form wird als PrP^c (c = zellular) bezeichnet, die pathologische Form als PrP^{sc}, wobei „sc“ von Scrapie, einer transmissiblen Enzephalopathie der Schafe ableitet. (MEYER ET AL., 1986). Darüber hinaus findet man für die pathologische Form in der Literatur auch noch die Bezeichnungen PrP^{res} bzw. PrP²⁷⁻³⁰. Dies beruht auf dem Sachverhalt, dass PrP^{sc} relativ resistent gegenüber einem Verdau mit Proteinase K ist und nach der Darstellung im Western Blot Banden der Massen 27 – 30 kDa nachweisbar sind (BOLTON ET AL., 1985).

1.2 Zelluläres Prionprotein (PrP^c)

1.2.1 Struktur und Aufbau

Das bovine PrP^c besteht aus 218 Aminosäuren und ist durch eine Tertiärstruktur charakterisiert, die von drei α -Helices und zwei β -Faltblatt-Einheiten dominiert wird (Abbildung 1). Das Molekulargewicht variiert zwischen 30-33 kD; dies ist abhängig vom Glykosilierungsgrad des Proteins (nicht, einfach oder zweifach glykolisiert).

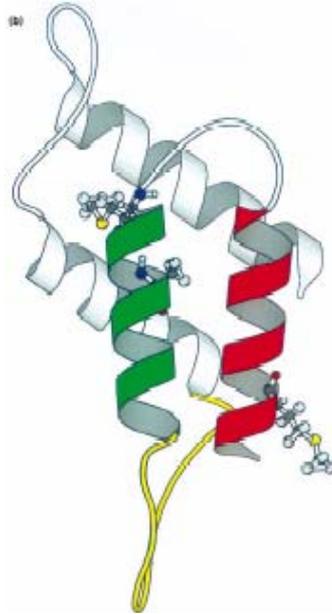


Abbildung 1: Struktur des PrP^C (HUANG ET AL., 1996)

PrP^C besteht ursprünglich aus 264 Aminosäuren (HEATON ET AL., 2003). Die N-terminalen Aminosäuren 1-24 dienen als Signalpeptid und werden posttranslational abgespalten (RIESNER, 2001); C-terminal wird ein weiteres Peptid von 22 Aminosäuren von primären Translationsprodukt abgetrennt (STAHL ET AL., 1990), so dass das sogenannte „Volllängen-PrP^C“ entsteht (Abbildung 2, C- bzw. N-terminal abgespaltene Bruchstücke sind jeweils eingerahmt). An dieser Stelle ist anzumerken, dass in der Literatur oft Bezeichnungen des am längsten aufgeklärten murinen PrP^C (PrP²³⁻²³¹) synonym für bovines PrP^C verwendet wird, das eigentlich als PrP²⁵⁻²⁴² zu benennen ist.

```

1  mvkshigswi lvlfvamwsd vglmkkrrpkp gggwntggsr ypgqgxpqgn ryppqgggww
61  gqphgggwgq phggwgqph gggwgqphgg gwqphgggg wgggthgqw nkpskpktnm
121 khvaaaaag avvgglggy m lgsamsrpli hfgsdyedry yrenmhrypn qvyyrpdqy
181 snqnnfvhdc vnitvkehtv ttttkgenft etdikmmerv veqmcitqyq resqayyqrg
241  asvilfsspp villisflif livg

```

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des bovines Volllängen-PrP^C (HEATON ET AL. 2003); eingerahmte Bereiche werden posttranslational abgespalten

Funktionell unterscheidet man drei wesentliche Regionen, den ER-SS-Bereich, den Oktarepeat-Bereich und die Transmembrandomäne (vergl. Abbildung 3). Die ER-SS-Region stellt ein Signalpeptid dar, das für den Transport des Moleküls zum Endoplasmatischen Retikulum notwendig ist. Daran anschließend findet man eine spezieabhängig variierende „Oktarepeat-Einheit“ HGGGW, der für die Funktion des Moleküls (Regulation des neuronalen Kupferhaushaltes) eine entscheidende Rolle zugesprochen wird (MILLHAUSER ET AL. 2004). Die aus drei Helices aufgebaute Transmembrandomäne lässt sich im C-terminalen Teil nachweisen, wobei die Helix α -1 durch zwei antiparallele β -Faltblatt-Einheiten

eingeschlossen werden. Eine Stabilisierung des Moleküls erfolgt durch eine Disulfidbrücke (RIEK ET AL., 1997; DONNE ET AL., 1997). Über einen Phosphatidylinositolglykolipid-Anker (GPI-Anker) ist das PrP^c-Molekül C-terminal mit der Zellmembran fixiert (STAHL ET AL., 1990; STIMSON ET AL., 1999).

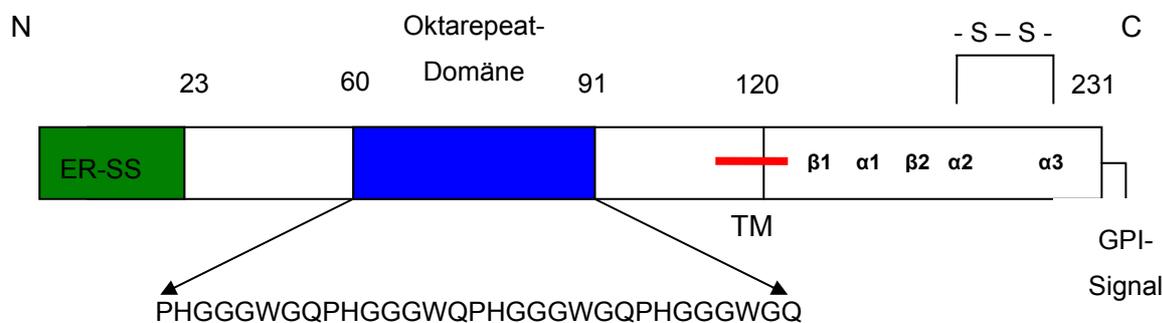


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des C und N-terminalen Endes des Prion Proteins (in Anlehnung an Millhauser, 2004)

N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; ER-SS-Bereich (grün): Signalsequenz für den Transport zum Endoplasmatische Retikulum; Oktarepeat-Domäne (blau); TM (roter Strich): Transmembran-domäne; α 1-3: α -Helices; β 1-2: β -Faltblätter; S-S: Disulfidbrücke; GPI-Signal: Glykosyl-phosphatidylinositol-Anker-Signal

Bovines PrP^c wird durch ein Gen (*prnp*) codiert, das auf dem Chromosom 13 liegt. Dieses Gen breitet sich über 20 kbp aus und besteht aus 3 Exons mit einer Länge von 4244 bp. (RYAN ET AL., 1993). Die ersten beiden Exons sind durch ein 10 kbp langes Intron von Exon 3 entfernt. Der ORF (open reading frame) befindet sich in Exon 3; Exon 1 und 2 sind im Verhältnis zu Exon 3 deutlich kleiner. (HOURIUCHI ET AL., 1995). Intron 2 ist 2 Mal so lang, wie der Rest des ganzen Gens. Diesem nachgelagert liegt ein Gen, das als „Doppel“ (COMINCINI ET AL., 2001) bezeichnet wird und 178 Aminosäuren umfasst (TRANULIS ET AL., 2001).

1.2.2 Vorkommen und Funktion von PrP^c

Prionproteine wurden bei Säugetieren, Vögeln und Amphibien nachgewiesen (HARRIS ET AL., 1993; WINDL ET AL., 1995; STRUMBO ET AL., 2001; COTTO ET AL., 2005). Dabei ist jedoch festzuhalten, dass bezüglich der Anzahl und Sequenz der Aminosäuren tierspeziesspezifische Unterschiede bestehen (WOPFNER ET AL. 1999). Die höchste Konzentration von PrP^c ist im Gehirn zu finden und dort vor allem in den Neuronen (BORCHELT ET AL., 1994). Die Vermutung, dass PrP^c nur im ZNS exprimiert werden würde, ist mittlerweile widerlegt; es liegen Berichte vor, dass dieses Protein in unterschiedlichen Zellarten nachzuweisen ist. So fanden DODELET UND CASHMAN (1998) PrP^c auf der Oberfläche von menschlichen Leukozyten. In geringen Mengen konnte PrP^c beim Schaf

auch u.a. in Leber, Milz, Niere, Herz, Skellet- und Herzmuskulatur, sowie im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (HORIUCHI ET AL. 1995).

Die physiologische Funktion von PrP^c ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Feststeht, dass PrP^c-defiziente Mäuse durchaus lebensfähig sind (WEISSMANN UND FLECHSIG, 2003). Allerdings wurden bei diesen „knock-out“-Mäusen Veränderungen im circadianen Aktivitäts- und Schlafrythmus beobachtet (TOBLER ET AL., 1996, TOBLER ET AL., 1997). Bereits 1994 zeigten COLLINGE ET AL. an PrP^{0/0}-Mäusen Veränderungen in der sogenannten Langzeitpotenzierung bei der Übertragung von Aktionspotentialen im Gehirn.

Eine der wichtigsten Funktionen von PrP^c scheint die Regulation des Kupferhaushaltes in Neuronen zu sein. Wie schon erwähnt kommt dabei der Oktarepeat-Region in der Nähe des N-terminalen Endes eine wichtige Rolle zu. Abhängig von der Anzahl der Regionen werden dort Cu(II)-Ionen gebunden, wobei zwei Oktarepeat-Peptide ein einzelnes Cu(II)-Ion binden kann, ein vier Oktarepeat-Peptid vermag jedoch vier Cu(II)-Ionen zu binden (VILES ET AL., 1999.). Die Bindung von Cu(II)-Ionen an die Oktapeptidregion verstärkt die Endocytose von PrP^c, wodurch es zu einer Einschleusung von Cu(II)-Ionen in die Zelle kommt (PAULY ET AL., 1998).

Neben Cu(II)-Ionen scheinen auch noch andere Moleküle an PrP^c zu binden. Eine Übersicht hierzu mit daraus resultierenden vermuteten Wirkungen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Wirkungen von PrP^c

Bindungspartner zur PrP^c	Vermutete Wirkung	Literatur
Laminin (LN)	Vermittlung der Neuritenbildung durch LN-PrP ^c Interaktion	GRANER ET AL., 2000
37-kDa/67-kDa Laminin-Rezeptor (LR)	Beteiligung an der Einschleußung von PrP ^c in die Zelle	GAUCZYNSKI ET AL., 2001
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Beteiligung an der Umformung von PrP ^c in PrP ^{sc}	OESCH ET AL., 1990
Hitzeschockprotein 60 kDa (Hsp60)	Beteiligung an der Umformung von PrP ^c in PrP ^{sc}	EDENHOFER ET AL., 1996
Bcl-2	Unterdrückung des Zelltods	KURSCHNER ET AL., 1995

Fortsetzung von Tabelle 1:

Dystroglycan-Komplex (DGC)	Aktivierung und Steuerung neuronaler Signalübertragung durch PrP ^c -DGC Interaktion	KESHET ET AL., 2000 KESHET ET AL., 1999
----------------------------	--	--

Erst kürzlich gelang es SAKUDO et al. (2005), neuroprotektive Wirkungen von PrP^c aufzuzeigen. Sie berichteten, dass PrP^c die Zellapoptose durch Regulation der Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität hemmt; auch hier kommt der Oktarepeat-Region und dem N-terminalen Ende des Prion Proteins eine wichtige Rolle zu. Bereits 2001 zeigten BROWN ET AL. (1997), dass durch die Bindung von Kupferionen in der Oktarepeat-Region des Prion Proteins ein Einfluß auf die SOD-Aktivität des PrP^c genommen wird. Nicht ganz geklärt ist, inwieweit die antiapoptotische Wirkung direkt durch PrP^c oder indirekt durch Aktivierung der SOD-Aktivität stattfindet.

1.3 Pathologisches Prionprotein**1.3.1 Struktur von PrP^{sc}**

PrP^{sc} und PrP^c weisen bei ein und demselben Individuum die gleiche Anzahl und Sequenz von Aminosäuren auf (STAHL ET AL., 1994). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Proteinen liegt in ihrer räumlichen Faltung. Anstelle der schraubenartig gewundenen α -Helices bei PrP^c werden bei PrP^{sc} überwiegend β -Faltblattstrukturbereiche vorgefunden (Abb. 3); zwei antiparallel aneinander gelagerte Stränge bilden dabei eine sogenannte β -Faltblattstruktur aus (PAN ET AL., 1993).

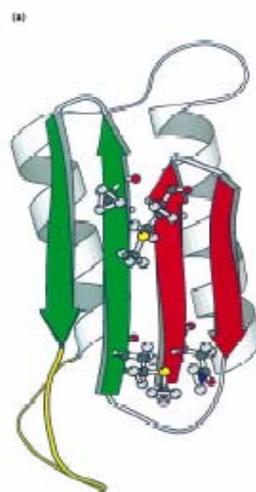


Abbildung 4: Struktur des PrP^{sc} (HUANG ET AL., 1996)

1.3.2 Vorkommen von PrP^{sc}

PrP^{sc} wurde zunächst im zentralen Nervensystem nachgewiesen. Dabei wurde auch beobachtet, dass PrP^{sc} nicht homogen über Hirn und Rückenmark verteilt ist, sondern überwiegend in der grauen Substanz des Stammhirns zu finden ist (TRAUTWEIN-HEWICKER ET AL., 2001). Darüber hinaus wurde bei Infektionsversuchen mit Rindern eine Akkumulation von PrP^{sc} in den Peyer-Plaques des distalen Ileums festgestellt (TERRY ET AL., 2003). Dieses Resultat weist eine hohe Parallelität zu den von BONS ET AL. (1997) beschriebenen Befunden auf, wonach PrP^{sc} in den Peyer-Plaques von oral infizierten Affen gefunden worden ist. Auch andere Matrices wurden auf PrP^{sc} untersucht. Während bei Schaf und Elch PrP^{sc} auch im Blut nachgewiesen werden konnte (SCHMERR ET AL. (1999), gelang dies nicht bei mit CJD infizierten bzw. an CJD erkrankten Schimpansen (CERVENAKOVA ET AL. 2003).

Was das Vorkommen PrP^{sc} in anderen Geweben betrifft, so stellten HEIKENWALDER ET AL. (2005) in Versuchen mit Mäusen fest, dass PrP^{sc} in Niere Pankreas und Leber akkumulieren, wenn diese eine chronisch lymphozytäre Entzündung aufweisen.

1.3.3 Eigenschaft von PrP^{sc}

Im Gegensatz zu PrP^c zeichnet sich PrP^{sc} durch eine partielle Resistenz gegenüber Proteinase K aus (MEYER ET AL., 1986). Während PrP^c bereits nach wenigen Minuten zu Oligopeptiden gespalten wird (MCKINLEY ET AL., 1983), erfolgt bei PrP^{sc} nur eine Abspaltung von ca. 68 Aminosäuren am N-terminalen Ende (RIESNER ET AL., 2001), wobei sich das Molekulargewicht auf 27-30 kD reduziert. Aufgrund dieser Eigenschaft werden für PrP^{sc} auch die Bezeichnungen PrP^{res} und PrP²⁷⁻³⁰ verwendet. Dieser PK-resistente Teil wurde im Mausmodell auch als „resistant core“ von PrP^{sc} 92-231 beschrieben. Das thermostabile Subtilisinenzym Properase scheint PrP^{sc} noch stärker verdauen zu können, da mit Hilfe des Antikörpers 6H4 keine Fragmente des Proteins nachweisbar waren. Allerdings wird durch eine derartige Behandlung die Infektiosität des Moleküls nur insofern verändert, als dass dadurch die Inkubationszeit im Mäuseversuch verlängert wird (MCLEOD ET AL., 2004).

Auch gegenüber den anerkannten Inaktivierungsverfahren für konventionelle Infektionserreger erwies sich PrP^{sc} als außergewöhnlich stabil (ALPER ET AL., 1967; PRUSINER ET AL., 1980; MCKINLEY ET AL., 1983). Wird infektiöses Material für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert, so reduziert sich die Infektiosität des Materials kaum (ALPER ET AL., 1967). Auch eine Bestrahlung mit UV-Licht führt nicht zu einer Inaktivierung. Erfolgreich ist dagegen eine Behandlung von PrP^{sc}-haltigem Material mit Protein-denaturierenden Agenzien (ALPER ET AL., 1967; PRUSINER ET AL., 1980; PRUSINER ET AL., 1981; PRUSINER, 1982). So empfiehlt der Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) (2003) PrP^{sc}-haltige Flüssigkeiten durch

Zugabe eines gleichen Volumens einer 2 M NaOH-Lösung zu inaktivieren; alternativ kann auch eine 5 %-ige Natriumhypochloritlösung verwendet werden. Die Dauer der Inaktivierung ist dabei abhängig von der Abfallbeschaffenheit und der Erregerlast und kann von 1 h bis zu 24 h schwanken.

Im Vergleich zu PrP^c ist PrP^{sc} nahezu unlöslich in Wasser. Nur wenige Lösungsmittel konnten bisher gefunden werden, die sich für Untersuchungen an PrP^{sc} eignen. Hierzu zählen insbesondere Guanidinium Hypochlorid (0.5 M), N-Lauroyl-Sarcosin (1-4% w/v) oder Natrium-Dodecylsulfat (0.5 bis 10 % w/v) (KOCISKO ET AL., 1994; SCHMERR ET AL., 1999; SAFAR ET AL., 1998).

Wie bereits dargelegt, unterscheiden sich PrP^c und PrP^{sc} bei einem Individuum weder in der Anzahl noch in der Sequenz der Aminosäuren. Dies mag mit ein Grund sein, dass PrP^{sc} keinerlei Reaktion des Immunsystems hervorruft. Nach RIESNER (2001) umfasst das Fehlen der Abwehrreaktion ein Ausbleiben spezifischer Immunreaktion (z.B. Fehlen spezifischer Antikörper), Entzündungserscheinungen und Interferonproduktion; des Weiteren fehlen cytotoxische Effekte auf in vitro infizierte Zellen und keine qualitative oder quantitative Änderung der T- und B- Lymphozyten.

1.3.4 Prionenstämme

Der Sachverhalt, dass unterschiedliche PrP^{sc}-Präparationen zu verschiedenen phänotypischen Reaktionen führten, war Anlass den Begriff „Prionenstämme“ einzuführen. Hauptkriterien zur Stammdifferenzierung sind hierbei klinische Symptomatik, Inkubationszeit, Übertragbarkeit, histopathologische Läsionsprofile, Inaktivierungsverhalten, PK-Resistenz und PrP^{sc}-Glykosilierung (SAFAR ET AL., 1998; GROSCHUP ET AL., 2000). Eine wichtige Rolle bei der Identifizierung des jeweiligen Stammes spielt dabei, in welchem Tier die Passage des Erregers stattgefunden hat. Während bereits verschiedene PrP^{sc}-Stämme bei der Scrapie-Krankheit des Schafes und bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen isoliert wurden, ging man bis vor kurzem davon aus, dass BSE nur durch einen einzigen Stamm verursacht werden würde (GROSCHUP UND KUCZIUS, 2000). Die Resultate epidemiologischer Erhebungen sowie von Infektionsversuchen und biochemischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass dieser Stamm verantwortlich für Infektionen des Menschen mit dem BSE-Erreger ist, und eine Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit hervorruft (COLLINGE ET AL. 1996; WILL ET AL. 1996; BRUCE ET AL. 1997). Neuere biochemische und pathologische Untersuchungen zeigen jedoch, dass anscheinend zumindest ein zweiter Stamm existiert, der eine gewisse Ähnlichkeit mit einem bestimmten Subtyp der sporadischen Form der CJD aufweist (CASALONE ET AL., 2004). In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse von LLOYD ET

AL. (2004), die bei Versuchen mit Inzuchtmäusen 2 unterschiedliche PrP^{Sc}-Stämme identifizieren konnten.

1.4 Konformationsänderung von PrP^c in PrP^{Sc}

Die Frage nach der Entstehung von PrP^{Sc} ist auch bis heute noch nicht vollständig geklärt. Weitestgehend unstrittig ist die Notwendigkeit von PrP^{Sc} als Initiator der Bildung neuer PrP^{Sc}-Moleküle. Dies geht auch aus den Untersuchungen von SABORIO ET AL. (2001) hervor. Diskutiert werden zwei Modelle, das autokatalytische Umfaltungsmodell und das Nukleationsmodell.

Das autokatalytische Umfaltungsmodell („*refolding model*“, PRUSINER 1991) geht von einer Interaktion zwischen einem Molekül PrP^{Sc} mit einem Molekül PrP^c aus. PrP^c entfaltet sich zu einem gewissen Grad und nimmt unter Einfluss von PrP^{Sc} dessen Struktur ein. Vermutlich spielen Chaperone bei der Überwindung der hohen Energiebarriere im Umfaltungsprozess eine wichtige Rolle (SHORTER ET AL., 2004). Beim erstmals von TELLING ET AL. (1995) beschriebenen Protein X handelt es sich um einen solchen „molekularen Helfer“. Von DELEAULT ET AL. (2003) wurden spezifische RNA-Moleküle entdeckt, die an der Transformation von PrP^c zu PrP^{Sc} beteiligt sein könnten. Somit kann eine vollkommene Nukleinsäure-Unabhängigkeit zumindest in der Entstehungsphase einer Prionerkrankung nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies ermöglicht wiederum alternative Ansätze zum Nachweis der Erkrankung.

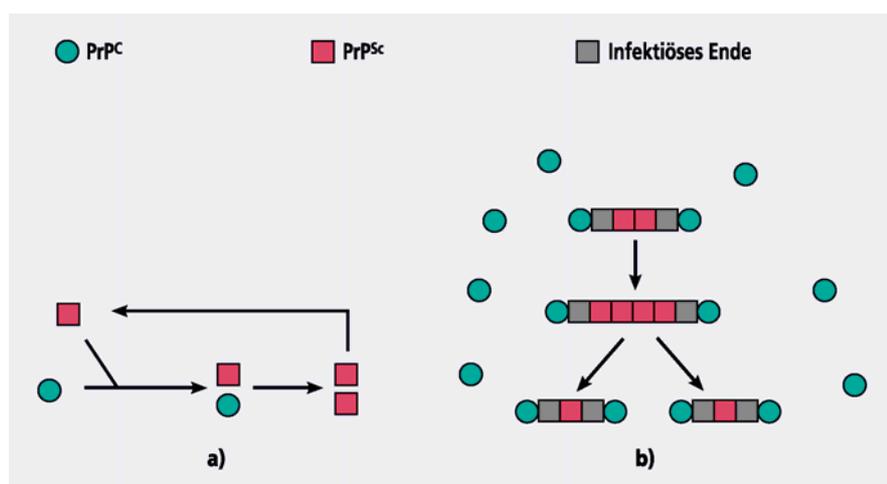


Abbildung 5: Entstehungsmodelle von PrP^{Sc} aus PrP^c. a) autokatalytisches Umfaltungsmodell; b) Nukleationsmodell (Abbildung aus KRETZSCHMAR 2001)

Das Nukleationsmodell geht von einer PrP^{Sc}-Aggregatbildung zu Amyloid-Ketten aus, die an ihren Enden PrP^c binden und es in PrP^{Sc} umwandeln (Abbildung 5). Größere Aggregate

zerfallen dann in kleinere Untereinheiten, wobei es zu einem exponentiellen Anstieg der PrP^c-Konformationsänderung kommt (JARRETT und LANSBURY, 1993).

2 Nachweismethoden für TSE

2.1 Nachweis von PrP^{sc}

Zum Nachweis von PrP^{sc} werden in erster Linie immunologische Verfahren eingesetzt. Darüber hinaus wird zur Diagnose von TSE neben der Histologie und dem Tierversuch auch noch der Nachweis von Surrogatmarkern herangezogen.

2.1.1 Offiziell anerkannte Nachweisverfahren

Nach Erlass der EG-Verordnung 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter Transmissibler spongiformer Enzephalopathien ist die BSE-Untersuchungspflicht seit dem 1. Juli 2001 unmittelbar Teil des EG-Rechts. Dementsprechend sind

- alle über 24 Monate alten not- und krankgeschlachteten Rinder
- alle über 30 Monate alten für den menschlichen Verzehr geschlachteten Rinder
- über 24 Monate alte verendete Rinder

nach einem bestimmten Stichprobenschlüssel mit einem BSE-Test zu untersuchen. In Deutschland gilt mit dem vorgeschriebenen Untersuchungsalter aller gesundgeschlachteter Rinder von über 24 Monaten ein noch strengeres Gesetz (Verordnung zur fleischhygienerechtlichen Untersuchung von geschlachteten Rindern auf BSE (BSEUntersV, 1.12.2000)), wobei derzeit über eine Angleichung an die EU-Verordnung diskutiert wird (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Stellungnahme vom 22. Dezember 2003).

Für den Nachweis von PrP^{sc} aus Hirnmaterial sind von der EU bisher folgende 12 Nachweisverfahren anerkannt (VERORDNUNG EG 999/2001, Nr. 260/2005 vom 16. Februar 2005):

- Immunoblotting-Test auf Grundlage eines Westernblot-Verfahrens zum Nachweis des proteaseresistenten Prionoproteins (Prionics[®] Check Western-Test): Verwendung eines PrP-spezifischen Antikörpers und eines Alkalin-Phosphatase markierten Sekundärantikörpers, Nachweis durch Chemilumineszenz. Neben den PrP^{sc}-spezifischen Banden dienen das durch den Verdau reduzierte Molekulargewicht wie auch das glykosylierungsbedingte 3-Banden-Muster als zusätzliche Indikatoren für ein positives Testergebnis.

- Chemilumineszenz-ELISA-Test mit Extraktionsverfahren und ELISA-Technik unter Verwendung eines verstärkenden chemilumineszenten Reagenz (Enfer-Test): Das in der aufbereiteten und PK-verdauten Probe enthaltene PrP^{Sc} wird direkt auf die ELISA-Platte adsorbiert, ohne einen Capture-Antikörper einzusetzen. Polyklonale Antikörper und enzymmarkierte Sekundäntikörper werden zur Detektion mittels Chemilumineszenz eingesetzt.
- Zwei Immunoassays zum Nachweis von PrP^{Sc} im Sandwich-ELISA, durchgeführt im Anschluss an Denaturierung und Konzentration (Bio-Rad Platelia[®] BSE-Test, detaillierte Beschreibung im Methodenteil dieser Arbeit unter (C3.1.1) und Roboscreen[®] Beta Prion BSE EIA Test Kit).
- Immunoassay zum Nachweis von PrP^{Sc} im ELISA (Prionics[®] Check LIA-Test): Nachweis von PrP^{Sc} nach Probenaufbereitung und Verdau im Sandwich-Immunoassay mit monoklonalen Antikörpern und Chemilumineszenz.
- Automatisierter konformationsabhängiger Immunoassay mit Abgleich der Reaktivität eines Detektion-Antikörpers gegenüber PrP^C und PrP^{Sc} (InPro CDI-5[™]-Test): Dieser Test basiert auf dem Nachweis der abnormen Faltung von PrP^{Sc}. Durch Denaturierung wird bei PrP^{Sc} ein Epitop freigelegt, das in einem Sandwich-ELISA nachgewiesen wird. Zur Detektion wird die charakteristische Emission von Europium-markierten Detektorantikörpern gemessen.
- Chemilumineszenz-ELISA-Test mit Extraktionsverfahren und ELISA-Technik unter Verwendung eines verstärkt chemilumineszierenden Reagenz (Enfer TSE Kit version 2.0).
- Selektive Bindung von PrP^{Sc} an einen festphasengebundenen spezifischen Liganden, der als Seprion bezeichnet wird. Der Nachweis erfolgt dann mit einem HRP markierten Sekundäntikörper; da nur PrP^{Sc} und nicht PrP^C gebunden wird, entfällt ein Verdau mit Proteinase K (IDEXX HerdCheck BSE Antigen Test Kit).
- Chemilumineszenz-ELISA-Test zur qualitativen Bestimmung von PrP^{Sc} (CediTect BSE-Test, Fa. Cedi Diagnostics, Netherlands).
- Chemilumineszenz-Immunoassay auf Mikrotiterplatte zum Nachweis von PrP^{Sc} in Rindergewebe (Insitut Pourquier Speed´it BSE).
- Seitenstrom-Immunoassay mit 2 verschiedenen monoklonalen Antikörpern zum Nachweis proteinase-K-resistenter PrP-Fraktionen im Streifenformat (Prionics Check

PrioSTRIP, Fa. Prionics, Switzerland): homogenisierte Hirnproben werden mit einem optimierten Reagenzgemisch aus Verdauungsenzymen und Puffer inkubiert, wobei normales Prionprotein abgebaut wird; in der Lösung bleibt nur noch BSE-spezifisches Prionprotein bestehen. Diese vorinkubierte Probe wird anschließend auf eine Testplatte aufgetragen und mit Antikörper-beschichteten Latexperlen vermischt. In das Probengemisch werden Teststreifen getaucht und in den Wells belassen. Antikörper-Prionprotein-Komplexe steigen an den Streifen hoch und werden an der Testlinie gebunden. Freie Antikörper werden an der Kontrolllinie gebunden.

- Immunoassay zum Nachweis von PrP^{sc} im Capture-ELISA: PrP^{sc} wird aus homogenisiertem Probenmaterial nach Verdau mit Proteinase K gefällt und wieder in Lösung gebracht. PrP^{sc} wird durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden. Diese Bindung wird wiederum durch einen HRP-konjugierten Anti-PrP Antikörper sichtbar gemacht (Roche Applied Science PrionScreen).

Zur endgültigen Abklärung eines BSE-Verdachts wird am Nationalen Referenzzentrum für BSE und Scrapie an der BFAV eine immunhistochemische Untersuchung (IHC) durchgeführt. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper können auch geringe Mengen an abgelagertem PrP^{sc} im Hirngewebe spezifisch nachgewiesen werden. Nach einer speziell auf diese Anwendung abgestimmten Herstellung und Behandlung der Schnittpräparate (Inkubation in 98 % Ameisensäure, Paraffineinbettung, Schneiden, Behandlung mit Proteinase K, Inkubation im Dampfautoklav) erfolgt die Inkubation mit einem spezifischen Anti-PrP Antikörper. Diese Reaktion wird durch einen mit Biotin markierten Sekundärantikörper und mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Komplexes sichtbar gemacht (BUNDESFORSCHUNGSANSTALT FÜR VIRUSERKRANKUNGEN) 2002, vgl. Abbildung 6).

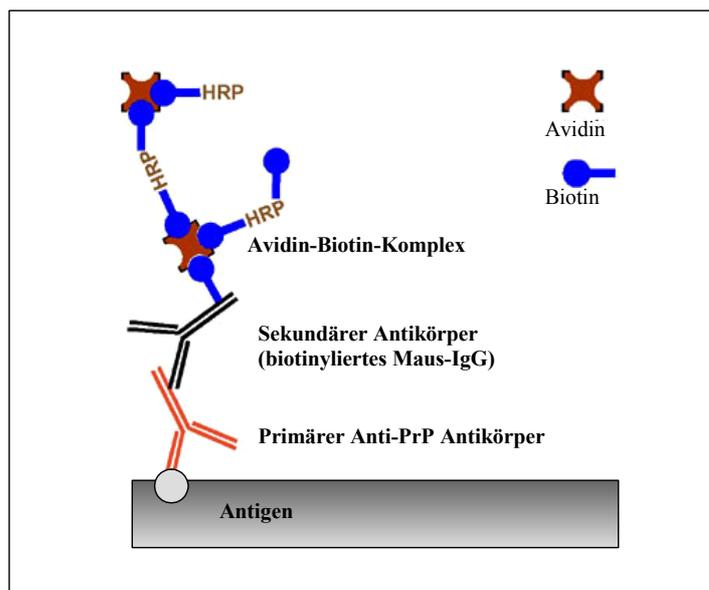


Abbildung 6: Prinzip der Immundetektion von PrP^{Sc} durch IHC (modifiziert nach BFAV 2002)

Entsprechend der Verordnung EG 999/2001 gilt ein Tier als BSE-positiv, wenn das Ergebnis des Schnelltests positiv oder nicht schlüssig ist und das Ergebnis einer histologischen Untersuchung positiv ausfällt. Außerdem kann ein BSE-Verdacht durch ein spezielles Western-Immunoblot-Verfahren nach Vorgaben der O.I.E. oder durch den Nachweis von SAF im Elektronenmikroskop bestätigt werden.

2.1.2 Alternative Nachweisverfahren für PrP^{Sc}

Neben den offiziell anerkannten Nachweisverfahren für PrP^{Sc} werden in der Literatur noch weitere Methoden beschrieben. Hierzu zählen die Kapillarelektrophorese in Kombination mit Laser-induzierter Fluoreszenz und die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie.

Kapillarelektrophorese Laser-induzierte Fluoreszenz (CE-LIF)

Der CE-LIF-Nachweis von PrP^{Sc} wird erstmals von SCHMERR ET AL. (1994) beschrieben und stellt eine Kombination aus einem elektrophoretischen und einem fluoreszenzimmunologischen Verfahren dar. Dazu wird zunächst ein FITC-markiertes Peptid synthetisiert, das den Aminosäuren 218-232 des ovinen Prionproteins entspricht. Spezifische Antikörper gegen dieses Peptid werden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Die kapillarelektrophoretische Untersuchung von Peptid-FITC führte im Elektropherogramm zu einem einzigen Peak. Die Injektion eines Antikörper-Peptid-Gemisches in entsprechender Konzentration liefert zwei Peaks: einen für Peptid-FITC sowie einen weiteren für den Antikörper-Peptid-FITC-Komplex. Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte indirekt: ist in einer Probe

PrP^{Sc} enthalten, so reagiert dieses mit dem Antikörper. Dadurch nimmt die Intensität des Antikörper-Peptid-FITC-Signales ab und das Signal für Peptid-FITC nimmt entsprechend zu.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist ein Verfahren zum Nachweis von PrP^{Sc}-Molekülen in Körperflüssigkeiten (BIESCHKE ET AL., 2000; GIESE ET AL., 2000). Dabei werden zwei spezifische Antikörper eingesetzt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (rot, grün) markiert sind. Die Antikörper können mit PrP^C und PrP^{Sc} reagieren. Die Detektion erfolgt durch einen gebündelten Laserstrahl. Da PrP^C im Vergleich zu PrP^{Sc} keine Aggregate bildet, liefert es nur Signale von sehr geringer Intensität. Aggregiertes PrP^{Sc} kann mehrere Antikörper binden; deshalb treten intensive, koinzidente Signale beider Farbstoffe auf. Durch diese Koinzidenzdetektion lassen sich PrP^{Sc}-spezifische Signale von freien Sonden oder unspezifischen Aggregaten unterscheiden (EIGEN, 2001). In Abbildung 7 sind Ergebnisse einer solchen Fluoreszenzmessung veranschaulicht.

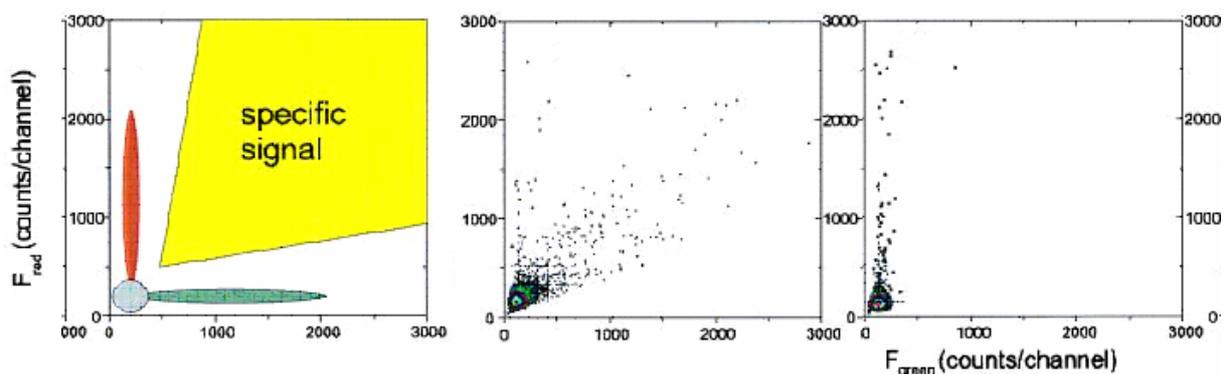


Abbildung 7: Zweifarben-Fluoreszenz-Intensitäts-Histogramm

Zweifarbigen-Fluoreszenz-Intensitäts-Histogramme (nach BIESCHKE ET AL., 2000). X-Achse: Grüne Fluoreszenz, Y-Achse: Rote Fluoreszenz. A: Schematische Darstellung eines Fluoreszenz-Intensitäts-Histogramms: Grauer Bereich: Fluoreszenzsignale von geringer Intensität, roter/grüner Bereich: einfarbig fluoreszierender Bereich unspezifischer Aggregate, gelber Bereich: intensive Lichtblitze beider Fluoreszenzfarbstoffe. B: Liquor kontaminiert mit *prion-rod*s aus Scrapie-infiziertem Hamsterhirn, 1:1000 verdünnt; C: Nicht kontaminierter Liquor

2.2 Indirekter Nachweis von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie

2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Verfahren zum Nachweis der spongiformen Veränderungen in Testgewebe aus dem Hirnstamm. Aus den in Paraffin eingebetteten Hirnpräparaten werden ca. 5-10 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt

und mikroskopisch untersucht. Allerdings zeigte sich, dass die Vakuolisierung des Hirngewebes experimentell infizierter Tiere erst mehrere Wochen bis Monate nach einer Nachweisbarkeit durch die im Folgenden beschriebene Immunhistochemie und erst kurz vor Auftreten der ersten klinischen Symptome erkennbar ist (BRUCE ET AL., 1989). Eine histopathologische Untersuchung kann einen BSE-Verdacht zwar bestätigen, ist aber zum Widerlegen eines Verdachts nicht geeignet, da eine BSE-Erkrankung aufgrund eines negativen Befundes nicht definitiv ausgeschlossen werden kann (GROSCHUP ET AL., 2002).

2.2.2 Tierversuch

Der Tierversuch ist der einzige Weg, eine Infektiosität von Probenmaterial zu bestätigen bzw. auszuschließen. Besondere Bedeutung hat er bei Versuchen zur Inaktivierung von PrP^{sc}. Bestimmte Behandlungsmaßnahmen können zwar dazu führen, dass PrP^{sc} mit immunologischen Verfahren nicht mehr nachweisbar ist, die Infektiosität aber dennoch, wenn auch reduziert, vorhanden bleibt (TAYLOR, D. M., 2000).

Zur Überprüfung der Infektiosität werden in der Regel transgene Mäuse (z.B. Tgbov-XV-Mäuse) verwendet, die bereits nach 250 anstatt 330 Tagen erkranken und eine bis zu 1000-fach höhere Empfänglichkeit gegenüber einer BSE-Infektion auf als normale Mäuse aufweisen (GROSCHUP ET AL., 2002). Die Injektion des Probenmaterials erfolgt dabei intracerebral oder intraperitoneal. Trotz der Verwendung transgener Mäuse bleiben Tierversuche zweitaufwendig (KÜBLER 2003).

2.2.3 Nachweis von Surrogatmarkern

Weitere Ansätze zum Nachweis von TSE beruhen auf dem Sachverhalt, dass im Krankheitsverlauf auch Veränderungen auf m-RNA- und Proteinebene im Blut und/oder Liquor zu erkennen sind. Diese, meist in ihrer Konzentration veränderten Moleküle, werden als Surrogatmarker bezeichnet. Im Rahmen einer Früherkennung der CJD werden Surrogatmarker teilweise angewendet und stellen somit auch eine Möglichkeit für eine BSE-Diagnostik dar. Allerdings ist zu bedenken, dass Proteine beim Absterben neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen generell vermehrt auftreten und damit keine TSE-spezifischen Markersubstanzen darstellen (ZERR ET AL., 2002). Dies mag ein Grund sein, warum die O.I.E. einer Verwendung dieser Proteine aufgrund der bisherigen Erkenntnisse eine eher geringe Bedeutung für eine BSE-Diagnose beimisst (O.I.E., 2004).

2.2.3.1 Proteine

14-3-3 Proteine

Bereits 1986 beschrieben HARRINGTON ET AL. Liquorproteine mit Molekulargewichten von 26 und 29 kD, die ausschließlich bei CJD-Patienten auftraten. Dieses Resultat wurde später bestätigt und die Proteine aufgrund ihres elektrophoretischen und immunologischen Verhaltens der 14-3-3 Gruppe zugeordnet (HSICH ET AL., 1996). Diese Proteine werden vor allem in Neuronen und Gliazellen des ZNS exprimiert (SATO ET AL., 1999). Der 14-3-3-Gruppe gehören mittlerweile sieben Proteine mit einem Molekulargewicht von 26 bis 30 kD an, die vermutlich eine regulatorische Funktion in der Signaltransduktion oder bei Phosphorylierungsschritten haben (AITKEN ET AL., 1992). BAXTER ET AL. (2002) konnten zeigen, dass bestimmte Proteine der 14-3-3 Gruppe in Abhängigkeit der Erkrankung in unterschiedlichen Mengen auftreten, was zu einer genaueren Diagnose mittels ELISA beitragen kann. GREEN ET AL. (2001) stellten jedoch fest, dass bei vCJD nur ca. 50 % der Fälle erhöhte Konzentrationen der 14-3-3 Proteingruppe aufwiesen.

Neuronspezifische Enolase

Die neuronspezifische Enolase (NSE, auch γ -Enolase) und das S-100-Protein wurden erstmals 1983 von MOKUNO *et al.* bei neurologischen Erkrankungen im Liquor nachgewiesen. Die NSE hat ein Molekulargewicht von 78 kD und wird hauptsächlich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen synthetisiert. ZERR ET AL. (1995; 2002) erkannten, dass die NSE-Konzentration im Serum und Liquor bei CJD-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten im Verlauf einer Erkrankung ansteigt.

S-100 Protein

Das S-100 Protein ist ein Kalzium-bindendes Eiweiß mit einer Masse von 10 kD, das im Gehirn vor allem in den Gliazellen vorkommt (ISOBE ET AL. 1984). OTTO ET AL. (1998) verglichen das Vorkommen des S-100 Proteins im Serum CJD-kranker Patienten und gesunder Individuen. Dabei stellten sie fest, dass die Konzentration bei CJD-kranken Personen signifikant höher war als bei Gesunden.

Fatty acid binding protein (FABP)

Alternativ dazu erforschen GUILLAUME ET AL. (2003) das FABP als Markersubstanz. Dabei handelt es sich um eine Gruppe 14 kD großer Proteine, die eine Rolle im Fettsäuretransport und -metabolismus spielen. Von den vier bekannten Arten ist vor allem das H-FABP (*heart*) von Interesse, das auch als früh auftretende Plasma-Markersubstanz für Herzinfarkt gilt.

GUILLAUME ET AL. (2003) untersuchten Liquor und Plasma von CJD- und Kontrollpatienten. Die H-FABP Konzentration war bei den CJD-Patienten signifikant in beiden Körperflüssigkeiten erhöht. Ein Test auf H-FABP könnte demnach den Autoren zufolge eine Möglichkeit darstellen, die Sicherheit von Bluttransfusionen zu verbessern und das Risiko iatrogener Übertragung von Prionenkrankheiten zu verringern.

Prionin

Das amerikanische Unternehmen Altegen Inc. hat einen Bluttest auf einen Antikörper gegen das sog. Prionin entwickelt. Als Prionin wird ein Protein bezeichnet, das bei der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} entstehen soll. Die Antikörper gegen Prionin sollen bereits wenige Tage nach einer Infektion durch einen ELISA nachweisbar sein (Quelle: <http://www.altegen.com>).

Weitere Proteine

Zur Gruppe der zur Diskussion stehenden Surrogatmarker gehören auch das tau-Protein, das als Marker für Morbus Alzheimer bekannt ist, die hirnspezifische Isoform der Kreatinkinase, das G₀-Protein und Ubiquitin. Auch diese Verbindungen konnten in unphysiologisch hohen Konzentrationen im Liquor von CJD-Patienten nachgewiesen werden (JIMI ET AL., 1992, MANAKA ET AL., 1992, OTTO ET AL., 1997).

Des Weiteren konnte im Liquor erkrankter Tiere das Apolipoprotein E (Apo E) gefunden werden. Da dieses Protein während der Inkubationszeit nicht auftrat, scheint es für eine Früherkennung ungeeignet zu sein (JONES ET AL., 1996). VÖLKE ET AL. (2001) prüften, ob Veränderungen des Plasmaspiegels von C-reaktivem Protein (CRP) und Interleukin-6, die allgemeine Markersubstanzen für Zellschädigungen darstellen, mit einer CJD-Erkrankung korrelieren. Da auch diese Substanzen lediglich Identifikationsraten von ca. 75 % aufwiesen, können sie nicht für eine sichere Diagnose herangezogen werden. Kürzlich wurde über Cystatin C, ein Protein mit 13,4 kD, als möglichen *ante mortem* - Indikator berichtet. Im Liquor von 8 CJD-Patienten wurden signifikant erhöhte Werte gemessen (SANCHEZ ET AL., 2004).

2.2.3.2 Fouriertransformation-Infrarot-Spektroskopie

Die Fouriertransformation-Infrarot-Spektroskopie ist eine Möglichkeit, organische Matrix zu analysieren. Das erhaltene Spektrum ist charakteristisch für die Molekülzusammensetzung und die Molekülbewegungen der Probe. Damit besteht die Möglichkeit, Blut, Blutserum, Blutplasma oder Liquor von TSE-kranken bzw. TSE-gesunden Tieren zu untersuchen und gegebenenfalls Unterschiede im Spektrum festzustellen. Es wird also nicht PrP^{Sc}

nachgewiesen, als vielmehr eine Veränderung im gesamten Spektrum des Blutes bzw. Liquor, die vor allem Protein-bedingt sind (LASCH ET AL., 2003). Allerdings konnten mithilfe der FT-IR unterschiedliche TSE-Erregerstämme differenziert werden (THOMZIG ET AL., 2004 B).

Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass durch Infrarotstrahlung Atome, chemische Bindungen und Gruppen in Molekülen unterschiedlich angeregt werden und diese die Energie dabei unterschiedlich absorbieren. Die Spektralanalyse von Blutseren von mehreren Hundert gesunden Tieren lieferten Spektren, die statistisch verarbeitet werden. Zum Vergleich dazu werden Messungen mit Blutseren TSE-positiver Individuen durchgeführt und die Resultate wiederum einer sog. multivariaten Analyse unterzogen. Je mehr Spektren in dieser Teaching-Phase ermittelt werden, desto genauere Algorithmen für die Klassifikation „BSE-positiv“ bzw. „BSE-negativ“ können errechnet und desto höher ist die Sensitivität und die Spezifität des Tests (LASCH ET AL., 2003).

Eine Anwendung der FT-IR zur Identifikation molekularer Veränderungen wurde bei Scrapie-infizierten Hamstern im Gehirn (KNEIPP ET AL. 2000 UND 2002) und im Serum (SCHMITT ET AL., 2002) durchgeführt. LASCH ET AL. (2003) setzten das Verfahren zum Nachweis von BSE-infizierten Rindern ein. Dabei wurden Serumproben von über 800 Rindern analysiert, darunter BSE-positive, gesunde oder andere, bakteriell oder viral infizierte Tiere, um entsprechend klassifizierbare Spektren zu erhalten. Dabei konnte eine Sensitivität und Spezifität von 96 % bzw. 92 % erreicht werden.

Abbildung 8 zeigt ein typisches Infrarot-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von $500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Über 3100 cm^{-1} absorbiert größtenteils Wasser (Peak ganz links). Für die Vergleiche der Spektren gibt es drei Haupt-Absorptionsregionen: Zwischen 3050 und 2800 cm^{-1} absorbieren vor allem Lipide, zwischen 1800 und 1500 cm^{-1} Carbonyl-ester und Amide. Die dritte Region liegt zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} , die als die sog. Fingerprint-Region bezeichnet wird und den Absorptionsbereich von DNA/RNA und Kohlenhydraten darstellt (KNEIPP ET AL., 2000). Die größten signifikanten Unterschiede zwischen den Spektren BSE-positiver und -negativer Seren liegen in der ersten Region (LASCH ET AL., 2003).

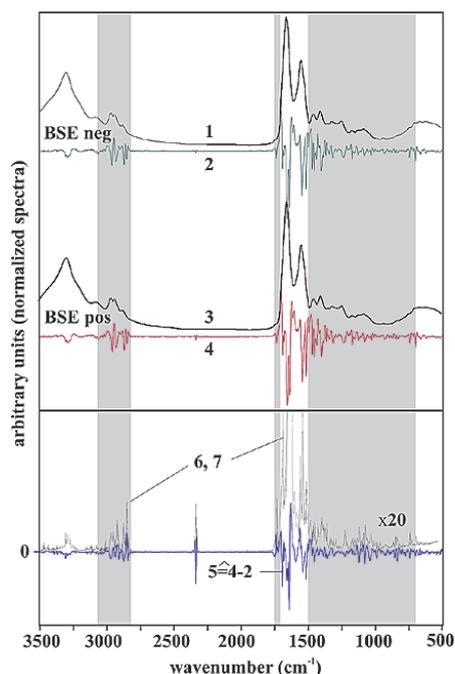


Abbildung 8: Spektren einer FT-IR-Spektroskopie zur Identifikation von BSE (LASCH ET AL., 2003).

1) Spektrum des Serums eines BSE-negativen Tieres; 2) 2. Ableitung von 1); 3) Spektrum des Serums eines BSE-positiven Tieres; 4) 2. Ableitung von 3); 5) Differenz zwischen 2) und 4) in 20-facher Vergrößerung; 6/7) Spektren der Standardabweichung der Klassen „BSE-positiv“ und „BSE-negativ“

2.2.4 Nachweis charakteristisch extrazellulärer Nukleinsäuren im Blut

Erythroid Differentiation-Related Factor (EDRF)

MIELE ET AL. (2001) beschrieben erstmals Unterschiede in der Genexpression TSE-erkrankter gegenüber gesunden Tieren. Sie untersuchten dabei das lymphoretikuläre System und hier vor allem die Milz als Ort der Prionreplikation nach Aufnahme in den Organismus. Beim Vergleich von ca. 10000 Transkriptomen aus der Milz gesunder und Scrapie-infizierter Mäuse konnte ein Transkriptom festgestellt werden, das bei infizierten Tieren deutlich weniger transskribiert wurde als bei gesunden. Dieser Abschnitt codiert für ein 102 Aminosäuren langes Protein, dessen Funktion weitestgehend unbekannt ist. Da dieses Protein bei der Maus in der Milz, im Blut und vor allem im Knochenmark vorkommt, wurde es als *erythroid differentiation-related factor* (EDRF) bezeichnet. Beim Menschen wird EDRF nur im Blut und im Knochenmark exprimiert. Nicht nur bei experimentell infizierten Mäusen sondern auch bei TSE-erkrankten Rindern und Schafen zeigte sich eine verminderte EDRF-Genexpression in Knochenmark und Blut.

Proteolipid-Ribonukleinsäurekomplexe

Der Nachweis charakteristischer extrazellulärer RNA-Segmente stellt die Basis eines BSE-Tests nach BRENIG ET AL. (2002) dar. Die RNA-Segmente liegen im Serum jedoch nicht frei vor, sondern als Proteolipidkomplexe in Form von Mikrovesikeln. Zwar treten RNA-haltige Mikrovesikel sowohl bei gesunden als auch bei kranken Tieren auf, aber die mit ihnen assoziierten RNA-Proteolipid-Komplexe unterscheiden sich. Grundlegend für diese Untersuchungen ist, dass bei vielen chronischen Erkrankungen des Menschen (z.B. Tumore, Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten) erhöhte Mengen an Nukleinsäuren im Serum beobachtet wurden (LO 2001, SHAPIRO ET AL., 1983). Die Bildung der Nukleinsäuren ist dabei krankheitsspezifisch. Der Grund für das Auftreten oder die Bildung derartiger Moleküle ist noch unzureichend geklärt, man geht aber davon aus, dass das Genom so auf toxische Vorgänge und negative Umwelteinflüsse reagiert (BRENIG ET AL., 2003). Ein Nachweis der entsprechenden extrazellulären RNA kann daher als Diagnoseverfahren eingesetzt werden. Dazu wurde das Serum/Plasma aus EDTA-Vollblutproben BSE-erkrankter Rinder analysiert (BRENIG ET AL., 2003).

3. Anreicherungsverfahren für PrP^{sc}

Zum sensitiven Nachweis von PrP^{sc} sind Anreicherungsverfahren erforderlich. Prinzipiell stehen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Eine basiert auf der Bindung von PrP^{sc} an festphasengebundene Liganden (z.B. Antikörper, Plasminogen, Seprion), die Zweite auf einer in-vitro Amplifikation von PrP^{sc}.

Protein misfolding cyclic amplification (PMCA)

Die als „protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA) bezeichnete Methode wurde von SABORIO ET AL. (2001) entwickelt. Sie beruht darauf; dass PrP^{sc} in einer Art Kettenreaktion die Umfaltung von PrP^c in PrP^{sc} induziert. Diese Kettenreaktion gliedert sich in mehrere Zyklen, wobei sich ein Zyklus aus einer Inkubation von PrP^c mit PrP^{sc} mit anschließender Ultraschallbehandlung zusammensetzt. Durch die Inkubation erfolgt eine Aggregatbildung, die zur Umfaltung von PrP^c in PrP^{sc} führen soll. Um ein Erliegen der Reaktion zu verhindern, müssen entstandene Aggregate durch eine Ultraschallbehandlung in kleinere Einheiten aufgespalten werden. Nach erneuter Zugabe von PrP^c kann ein neuer Zyklus beginnen.

Für eine Überprüfung dieser Hypothese wurde bis unter die Nachweisgrenze verdünntes, PrP^{sc}-positives Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Hamster mit Hirnhomogenaten gesunder Tiere vermischt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert; daran anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung für 5 s. Dieser Zyklus wurde 15 Mal wiederholt. Parallel dazu wurden Kontrollgruppen ohne Ultraschallbehandlung mitgeführt. Dabei zeigte sich, dass je mehr

Zyklen mit Ultraschall durchgeführt wurden, desto größer war die Menge an nachweisbarem PrP^{Sc}. Bei der Kontrollgruppe ohne Ultraschallbehandlung fiel die Konzentration an nachweisbarem PrP^{Sc} bereits nach 7 Zyklen unter die Nachweisbarkeitsgrenze ab. Abbildung 10 zeigt einen Westernblot PK-verdauter Proben in steigenden Verdünnungen ohne Amplifikation (a) und mit Amplifikation nach 10 Zyklen (b). Inwieweit dieses Verfahren zur Diagnostik in der Frühphase einer Erkrankung herangezogen werden kann, bleibt jedoch abzuwarten.

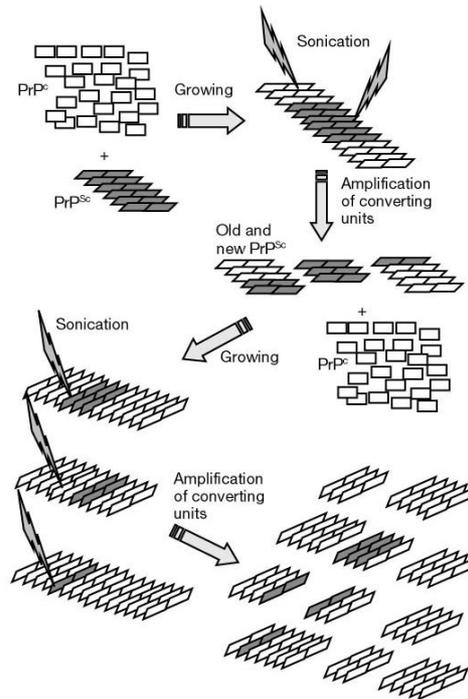


Abbildung 9: Prinzip einer PMCA (SABORIO ET AL., 2001)

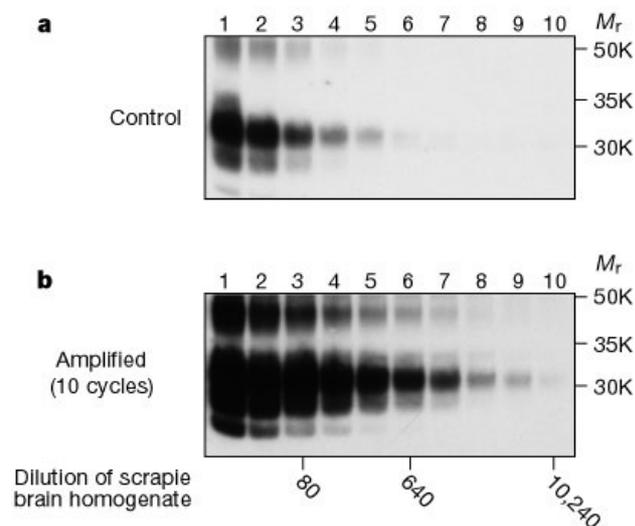


Abbildung 10: Nachweis einer PrP^{sc}-Amplifikation im Westernblot: a) Kontrolle, b) nach Amplifikation (aus SABORIO ET AL., 2001)

Auch andere Arbeitsgruppen wendeten die PMCA zur Amplifikation von PrP^{sc} mit Erfolg an (DELEAULT ET AL., 2003, BARRETTE ET AL., 2003). Wie groß dabei die Bedeutung der Ultraschallbehandlung ist, zeigten die Ergebnisse von PIENING ET AL. (2005). Bei ihren Versuchen wurde bei einem Versuchsansatz gezielt auf eine Ultraschallbehandlung verzichtet; bereits nach wenigen Passagen konnte kein PrP^{sc} mehr nachgewiesen werden.

Plasminogen

FISCHER ET AL. (2000) UND MAISSEN ET AL. (2001) haben berichtet, dass humanes Plasminogen PrP^{sc} spezifisch binden soll. Da PrP^c nicht gebunden werden kann, scheint die Bindung konformationsabhängig zu sein. Plasminogen wurde dabei an Dynabeads[®] adsorbiert und war dann in der Lage, PrP^{sc} aus Hirnhomogenaten sowohl von infizierten Mäusen, Schafen, Rindern als auch Menschen zu adsorbieren. Das extrahierte Prionprotein konnte im Westernblot nachgewiesen werden.

C Material und Methoden

1 Material

1.1 Hirngewebe und Liquor

Für die Untersuchungen wurde BSE-positives Hirnmaterial von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (BFAV), Insel Riems, zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden Gehirn und Liquor infizierter Rinder von Prof. W. Schmahl, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München bereitgestellt; Liquor nicht infizierter Rinder wurde mir von Prof. Dr. W. Klee, Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München überlassen.

1.2 Bovines rekombinantes PrP^c

Bovines rekombinantes PrP^c wurde von Prionics, Schweiz (Kat.-Nr. 03-010) bzw. Jena Bioscience (Kat.-Nr. PR-370) bezogen. 100 µg Lyophilisat wurde in 500 µl Aqua bidest. gelöst und in Aliquoten à 10 µl bei -20 °C tiefgefroren.

1.3 Antikörper

Zwei verschiedene monoklonale anti-PrP Antikörper wurden für die Untersuchungen verwendet. Dabei handelte es sich um den monoklonalen Anti-PrP Antikörper 6H4 (Fa. Prionics, Produkt-Nr. 01-010), sowie um den monoklonalen Anti-PrP Antikörper F89/160.1.5 (Fa. Abcam, Kat.-Nr. ab2777). Die Antikörperlösungen (c = 1 mg/ml) wurden nach Herstellerangaben bei 4°C gelagert.

HRP-markierter Sekundäntikörper (0.8 mg/ml), der gegen Immunglobuline 6H4 und F89 gerichtet ist, wurde von Dako Cytomation (Kat.-Nr. P O477) bezogen und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

FITC-markierter Sekundäntikörper (5,4 mg/ml), der gegen das Immunoglobulin F89 gerichtet ist, stammte ebenfalls von Dako Cytomation (Kat.-Nr. F 0205); eine Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4 °C.

1.4 Gebrauchsmaterial

Das für die Durchführung aller Versuche benötigte Gebrauchsmaterial ist in Tabelle 2 dargestellt. Spezielle Geräte, die zur Durchführung bestimmter Versuche notwendig waren, sind in den entsprechenden Kapiteln aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller, Produktspezifikation
Analysenwaage	Sartorius, Modell 3716
Brutschrank	Memmert, Modell 040
Durchlaufkühler	Haake, Typ FP
Heizblock	Grant Instruments, Typ OBT 4
Laborschüttler	Janke & Kunkel KS 250
Laborwippe	BioSan Mini Rocker RS 1
Magnetrührer	Janke & Kunkel, IKA Combimag Ret
Mikrotiterplattenwaschgerät	Anthos Labtech Instruments, Modell Anthos fluido 24 550
PP-Röhrchen	15 ml (Fa. Greiner, Kat.-Nr. 188 271), 50 ml (Fa. Greiner, Kat.-Nr. 227 261)
Photometer ¹	SLT Labinstruments, Modell Medgenix 400 AT
Photometer ²	Dynex, MRX Revelation
pH-Meter	WTW, pH 535 MultiCal
Pipettensatz	Eppendorf (2-20 µl, 10-100 µl, 100 µl- 1 ml, 1-5 ml)
Ribolyser	Hybaid, Art.-Nr. 358-9158
Save-Lock Tubes	Kat.-Nr. 0030120.094, Fa. Eppendorf
Spritzen	2 ml (Fa. VWR, Kat.-Nr. 612-0108 Q); 10 ml (Fa. Terumo, Kat.-Nr. 3SS-10L)
Thermomixer	Eppendorf, Typ 535502652
Vortex-Mischgerät	Scientific Industries, Modell G-560E

Fortsetzung von Tabelle 2:

Zentrifuge	Biofuge Primo R, Kat.-Nr. 7500 5440, Fa. Kendro Laboratory Products / Heraeus
Vakuumpkonzentrator:	
Chemie Membran Pumpe MZ 2 C	Vakuubrand, 3125847
Eppendorf Konzentrator 5301	Eppendorf, Bestellnr 5301 000.016
Messgerät CVC 2	Vakuubrand, 3125847
Rotor F 45-70-11 für 70 Safe Lock Tubes	Eppendorf, Best.-Nr. 5490034.007

^{1/2} Geräte für Verwendung mit BSE-positivem¹ und BSE-negativem² Material

2 Methoden

2.1 Herstellung von Hirnhomogenat

PrP^{sc}-haltiges Hirnhomogenat wird in „Ribolyser-Tubes“ (Bestandteil des BSE-Reinigungskits) hergestellt. Diese enthalten bereits einen sogenannten „Lösungspuffer“ unbekannter Zusammensetzung. Da für unterschiedliche Aufreinigungsverfahren methodenabhängig verschiedene Lösungsmittel zur Anwendung kommen, muss der enthaltene „Lösungspuffer“ entfernt und nach 3-maliger Spülung mit 1.2 ml des gewünschten Lösungsmittel durch dieses ersetzt werden. Die Zusammensetzung der Lösungsmittel ist bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Anschließend wird mit einer BSE-Probenentnahmespritze (Bio-Rad®, Kat.-Nr. 355-1121) ~400 mg Hirngewebe zugegeben und 2 Mal für 45 s bei Stärke 6 mit einem BSE-Ribolyser Fast Prep (Kat.-Nr.: 358-9158; Fa. Hybaid) homogenisiert. Einen Überblick über alle verwendeten Suspensionsmittel gibt Tabelle 3.

2.2 Herstellung von PrP^{sc}-haltigem Liquor

Da Liquor PrP^c enthält, wurde dieser vor der Durchführung von Kontaminationsversuchen mit Proteinase K (Kat.-Nr.: P 2308, Fa. Sigma) verdaut JACKMAN ET AL. (2003). Dazu wurde jeweils 1 ml Liquor mit 50 µg Proteinase K versetzt und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Kochen der Proben für 10 min bei 100 °C (Heizblock Typ OBT 4, Grant Instruments) inaktiviert.

Das zur artifiziellen Kontamination notwendige PrP^{Sc}-haltige Material wurde in Anlehnung an die von Bio-Rad beschriebene Methode gewonnen (Methode I, C 3.1.1). Das dabei erhaltene Pellet wurde in 50 µl Reagenz C1 gelöst; das Endvolumen dieser Stammlösung wurde mit Aqua dest auf 300 µl eingestellt, was einer Hirnmenge äquivalent 100 mg entspricht. Diese Stammlösung diente zur artifiziellen Kontamination von vorbehandeltem Liquor. 250 µl vorverdauter Liquor wurden mit dem gleichen Volumen der Stammlösung gemischt, wovon 250 µl in die Versuche eingesetzt wurden.

2.3 Prüfung konventioneller Nachweisverfahren für PrP^C bzw. PrP^{Sc}

Zum Nachweis von PrP^C bzw. PrP^{Sc} wurde ein Verfahren mit der Kapillarelektrophorese in Kombination mit Laser-induzierter Fluoreszenz (C 3) entwickelt. Als Referenzmethode diente der in der EU offiziell anerkannte BSE-Test der Firma Bio-Rad[®] (C 2.3.1). Darüber hinaus wurde zur Überprüfung einzelner Anwendungsschritte ein Dot-EIA (C 2.3.2) als „Schnelltest“ eingesetzt. Die Nachweisgrenze für PrP^C wurde in einer Verdünnungsreihe mit allen drei genannten Methoden durchgeführt. Da in der BSE-Diagnostik auch der Westernblot eingesetzt wird (C 2.3.3), wurde dieser in die Untersuchung miteinbezogen.

2.3.1 ELISA in Mikrotiterplatten

Als Referenzverfahren zum Nachweis von PrP^{Sc} wurde der Platelia[®] BSE Nachweis kit (Kat.-Nr. 355-1103, Fa. Bio-Rad) eingesetzt, der aus den in Tabelle 3 aufgelisteten Komponenten besteht.

Tabelle 3: Inhalt des Platelia® BSE Nachweiskits

Bezeichnung	Art der Reagenzien	Menge
R1	Mikrotiterplatte: 12 Streifen mit je 8 Wells, mit monoklonalem Anti-PrP Antikörper beschichtet	1 Platte
R2	Waschlösung: 10-fach konzentrierter Puffer Tris-NaCl, pH 7.4 Konservierungsmittel: Natriummerthiolat (0.01 %)	1 Flasche (100 ml)
R3	Negativkontrolle: PBS-Puffer, pH 7.4, mit BSA versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0.1 %)	1 Flasche (2 ml)
R4	Positivkontrolle: rekombinantes Prionprotein, lyophilisiert	1 Flasche (für 2 ml)
R6	Probenverdünnungsmittel: PBS-Puffer, pH 7.4, mit BSA und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0.1 %)	1 Flasche (25 ml)
R7	Konjugat: 10-fach konzentrierter monoklonaler Anti-PrP Antikörper, peroxidase markiert, in Tris-NaCl-Puffer, pH 7.4 gelöst, mit BSA und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0.1 %)	1 Flasche (1,5 ml)
R8	Peroxidasesubstratpuffer: Zitronensäurelösung und Natriumacetat, pH 7.4 mit 0.015 % H ₂ O ₂ und 4 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Flasche (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidinlösung (TMB)	1 Flasche (5 ml)
R10	Stopplösung: Schwefelsäurelösung 1 N	1 Flasche (28 ml)
	Klebefolien	4

Für einen Nachweis von PrP^{Sc} muss Hirnmaterial bzw. Cerebrospinalflüssigkeit vorher entsprechend aufgereinigt werden (vgl. C 3.1.1 bzw. C 2.2). Für Versuche mit rekombinantem PrP^C entfallen die Aufreinigung und der Proteinase K-Verdau. Der Nachweis wird wie folgt durchgeführt:

- Die Reagenzien und die ELISA-Platte werden bei +2 bis +8 °C aufbewahrt; 1 h vor Gebrauch aus dem Kühlschrank entnehmen
- Benötigte Anzahl an ELISA-Streifen aus der Schutzpackung entnehmen und in den Halterahmen setzen; Packung mit den restlichen Streifen wieder gut verschließen und kühl lagern
- Herstellen der Positivkontrolle R4: Fläschchen leicht gegen die Tischfläche klopfen, um eventuell am Gummistopfen anheftendes Reagenz zu lösen; Flasche öffnen und mit 2 ml Reagenz R6 auffüllen, wieder verschließen und 1 min stehen lassen; von Zeit zu Zeit leicht homogenisieren, um die Lösung zu erleichtern
- In Kavität 1A und 1B je 100 µl Negativ- und Positivkontrolle (Reagenz R3 und R4) pipettieren. Nicht verwendete Positivkontrolle à 150 µl aliquotieren und bei -20 °C tiefgefrieren
- In restliche Kavitäten je 100 µl mit R6 (oder anderen entsprechend angegebenen Lösungsmedien) verdünnte Probe pipettieren, mit Klebefolie bedecken und 75 min bei 37 +/- 1 °C inkubieren
- Herstellen der Waschlösung: Reagenz R2 1:10 mit Aqua dest. verdünnen (z.B. 100 ml Reagenz R2 in 900 ml Aqua dest. für einen Streifen)
- Herstellen der Konjugatlösung: Reagenz R7 in der frisch angesetzten Waschlösung auf 1:10 verdünnen und vorsichtig homogenisieren
- Klebefolie entfernen, 3 Waschzyklen im Mikrotiterplattenwaschgerät mit Waschlösung durchführen; Entfernen der restlichen Flüssigkeit durch Umdrehen auf ein saugfähiges Papier und innerhalb 1 min 100 µl der Konjugatlösung in jedes Well geben
- Mit Klebefolie abdecken und 60 min bei +2 bis +8 °C inkubieren
- Klebefolie entfernen, 5 Waschzyklen vornehmen und währenddessen die enzymatische Entwicklungslösung herstellen: Das Reagenz R9 im Reagenz R8 1:11 verdünnen. Platte auf saugfähigem Papier trocknen und je Well 100 µl frisch hergestellte Entwicklungslösung zugeben
- Platte 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (z. B. in einer Schublade) ohne Klebefolie inkubieren
- In jede Kavität 100 µl Stopplösung (Reagenz R10) pipettieren
- Extinktion sofort bei 450/620 nm im Photometer messen

Um die Sensitivität des Platelia[®] BSE-ELISA mit der CE-LIF-Methode vergleichen zu können, wurden Versuche mit rekombinantem PrP^c durchgeführt. Hierzu wurden 10 ng PrP^c in 100 µl Aqua dest. bzw. vorbehandeltem Liquor (C 2.2) gelöst und eine Verdünnungsreihe angelegt (Faktor 1:2); der Liquor wurde vor Zugabe von PrP^c mit PK verdaut .

Analog zur Versuchsanordnung mit PrP^c wurde ein ELISA zur Bestimmung geeigneter Konzentrationen von PrP^{sc} durchgeführt. Dazu wurde ein Pool aus positivem Hirnmaterial gebildet. In einem Doppelansatz wurde Poolmaterial entsprechend der Anweisung nach Methode I (C 3.1.1) homogenisiert und aufgereinigt. Ein Pellet wurde in 300 µl Aqua dest. gelöst und eine lineare Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:1024 erstellt, wobei das Endvolumen 300 µl betrug. Beide Verdünnungsreihen wurden im ELISA in Mikrotiterplatten (C 2.3.1) gemessen.

2.3.2 Dot-EIA

Zur Überprüfung einzelner Arbeitsschritte wurde zum Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{sc} ein Dot-EIA angewendet. Dazu waren folgende Lösungs,- und Waschpuffer, sowie die Färbereagenzien notwendig.

TBS-Lösung:

- 2.92 g NaCl (Kat.-Nr. 1.06404, Fa. Merck[®])
- 2 ml Tris-HCl (1M), pH 7.5
- Aqua dest. ad 1000ml

TBS-T-Waschpuffer

- 50 µl Tween 20 (Kat.-Nr. 8.22184, Fa. Merck[®])
- auf 100µl TBS-Lösung

Absättigungslösung

- 5 g Magermilchpulver (Kat.-Nr. 1.15363, Fa. Merck[®])
- 50 µl Tween 20 (Kat.-Nr. 8.22184, Fa. Merck[®])
- in 100 ml TBS lösen

TMB-Stammlösung:

- 0.375 g Tetramethylbenzidin (Kat.-Nr. 108622, Fa. Merck[®])
- 5 ml DMSO (Kat.-Nr. 102952, Fa. Merck[®])
- Methanol (Kat.-Nr. 8402, Fa. JT Baker[®]) ad 25 ml

TMB-Substratpuffer

- 46.02 g $\text{KH}_2\text{-Citrat}$ (Kat.-Nr. 60215, Fa. Fluka[®])
- 0.1 g Sorbinsäure (Kat.-Nr. S-1751, Fa. Sigma[®])
- mit Aqua dest. ad 1000ml

TMB-Färbelösung

- 30 ml TMB-Substrat-Puffer
- 500 μl TMB-Stammlösung
- 100 μl H_2O_2 (1%) (Kat.-Nr. 1.07209, Fa. Merck[®])
- 0.3 g Dextransulfat (Kat.-Nr. D-8906, Fa. Sigma[®])

Der Dot-EIA wurde wie folgt durchgeführt: 1 μl Probenmaterial wurde pro Probenfeld aufgetragen. Nach Antrocknen der Probe wurde die Nitrocellulosemembran in eine Petrischale (Prod.-Nr. 633180, Fa. Greiner[®]) verbracht und mit 20 ml Absättigungslösung für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen der Membran in TBS-T Puffer erfolgte eine 2-stündige Inkubation in 20 ml Antikörperlösung (mAB F89 0.4 $\mu\text{g/ml}$). Danach wurden ungebundene Antikörper durch 3-maliges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Probe in 20 ml einer Lösung des Sekundäantikörpers (Anti-Maus IgG-HRP, Kat.-Nr. P0447, Fa. Dako Cytomations[®]; 2.5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 4-maliger Waschung mit TBS-T Puffer wurden 30 ml TMB-Färbelösung zugegeben und für weitere 30 min in der Lösung belassen. Danach wurde die Membran aus der Lösung genommen und an der Luft getrocknet.

Alle Inkubationsschritte wurden auf einer Laborwippe (Mini Rocker RS 1, Fa. BioSan[®]) bei Raumtemperatur durchgeführt und die verwendeten Flüssigkeiten anschließend entsorgt. Ein Waschzyklus mit TBS-T Puffer erfolgte jeweils mit 20 ml für 5 min. Die Größe der verwendeten Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Schleicher & Schuell[®]) war abhängig von der Anzahl der zu messenden Proben. Pro Probe wurde ein Nachweisfeld von ca. 1 cm^2 gewählt.

Die Nachweisgrenze von rekombinantem PrP^c wurde mittels einer linearen Verdünnungsreihe (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ – 0.625 $\text{ng}/\mu\text{l}$) in Aqua dest. ermittelt.

Zur Prüfung der Nachweisbarkeit von PrP^{sc} wurde Poolmaterial entsprechend der Anweisung nach Methode I homogenisiert und aufgereinigt (vergl. C 3.1.1). Ein Pellet (äquivalent 100 mg Hirngewebe) wurde in 300 μl Aqua dest. gelöst und ebenfalls linear verdünnt (Faktor 1:2). Der Test wurde wie unter C 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

2.3.3 Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von BSE-positivem Material wurden Fertiggele (C 2.3.3.3) verwendet, wohingegen für die Untersuchung von PrP^c-haltigem Material die SDS-PAGE-Gele (C 2.3.3.1) selbst gegossen wurden. Demzufolge kamen auch unterschiedliche Elektrophorese- und Blotvorrichtungen zur Anwendung, auf die in den einzelnen Kapiteln im Detail eingegangen wird.

2.3.3.1 Herstellung eines SDS-PAGE-Gels zur elektrophoretischen Auftrennung von PrP^c-haltigem Material

Vorarbeiten:

Ein SDS-PAGE-Gel setzt sich aus zwei separaten Gelen zusammen, die übereinander geschichtet werden. Die untere Schicht besteht aus einem sogenannten Separationsgel, gefolgt von einer schmalen Schicht eines sogenannten Sammelgels. Die zur Herstellung notwendigen Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Solution A (1 M Tris-Lösung pH 8.5)

- 24.2 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- lösen in 160 ml Aqua bidest
- einstellen auf pH 8.5 mit konz. HCl
- Aqua bidest. ad 200 ml

Solution B (Acrylamidlösung)

- 140 ml 40 % Acrylamidlösung (Kat.-Nr. 100633, Fa. Merck®)
- mit 60 ml Aqua dest. Mischen
- 1.5 g Diallyltartardiamid (DATD, Kat.-Nr. D-2391, Fa. Sigma®) zugeben

SDS-Lösung:

- 10 g SDS (Kat.-Nr. 811030, Fa. ICN®)
- 50 ml Aqua dest.

1 M Tris-HCL-Lösung, pH 7.0

- 24.2 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- in 160 ml Aqua bidest. lösen
- mit konz. HCl auf pH 7.0 einstellen
- mit Aqua bidest. ad 200 ml

Solution C:

- 48 ml 1 M Tris-Lösung pH 7.0
- 2 ml 20 % SDS-Lösung zugeben

Ammoniumpersulfatlösung:

- 0.07g Ammoniumpersulfat
- in 5 ml Aqua dest. lösen

Durchführung:

Die Rezeptur für das Separations- und Sammelgel ist ausreichend für jeweils zwei Gele mit je 1 mm Stärke.

Das Separationsgel setzt sich dabei wie folgt zusammen:

- 12 ml Solution A (1 M Tris-Lösung pH 8,5)
- 17.12 ml Solution B (Acrylamidlösung)
- 2.08 ml Aqua bidest.
- 0.16 ml SDS-Lösung 20 %
- Lösung mischen ohne Blasenbildung
- 0.8 ml Ammoniumpersulfatlösung
- 10 µl TEMED (Kat.-Nr. 1610801, Fa. Bio-Rad®)

Das Sammelgel wird wie folgt gemischt:

- 6.5 ml Aqua bidest.
- 3.2 ml Solution B (Acrylamidlösung)
- 1.5 ml Solution C
- Lösung mischen ohne Blasenbildung
- 0.6 ml Ammoniumpersulfatlösung
- 6 µl TEMED (Kat.-Nr. 1610801, Fa. Bio-Rad®)

Ein Gel wird in einer Gelgießkammer hergestellt, das aus dem Gießsystem Bio-Rad Protean II xi (Kat.-Nr. 1651803, Fa. Bio-Rad®) besteht und sich aus zwei Glasplatten, Gelspacern und

Gelkämme zusammensetzt. Zum Gießen des Gels müssen die sorgfältig gereinigten Glasplatten mit 1 mm-Spacer zusammengesetzt und fest in die Gelgießapparatur (Hofer Scientific Instruments SE 600) eingespannt werden; dann wird wie folgt weiterverfahren:

- frisches Separationsgel vorsichtig vom Rand her mit einer 5 ml Pipette einfüllen bis ca. 1 cm unter den Rand des Kamms
- mit Aqua dest. überschichten und ca. 2 h oder über Nacht auspolymerisieren lassen
- Aqua dest. abkippen, Sammelgel bis kurz unter den Rand der Glasplatte einfüllen und Gelkamm einsetzen

Um eine Blasenbildung bei der Auspolymerisierung des Zweikomponentengels zu verhindern, wird es mit Gellaufpuffer überschichtet und für 2 h stehen gelassen; darüber hinaus wird damit die Trennkammer aufgefüllt. Der Gel-Laufpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Gel-Laufpuffer 5 x:

- 15 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- 72 g Glycin (Kat.-Nr. 808822, Fa. ICN®)
- 5 g SDS (Kat.-Nr. 811030, Fa. ICN®)
- 1000 ml Aqua bidest.

2.3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von PrP^C-haltigem Material

Vorbereitung:

Vor einer gelelektrophoretischen Auftrennung muss das Probenmaterial im sogenannten Probenpuffer gekocht werden, der sich wie folgt zusammensetzt:

Probenpuffer 2 x:

- 0.775 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- 20 ml Glycerin (Kat.-Nr. 104092, Fa. Merck®)
- Lösen in 17.5 ml Aqua bidest.
- Einstellen auf pH 6.75 mit konz. HCl
- Zugabe von 2 g SDS (Kat.-Nr. 811030, Fa. ICN®)
- Zugabe von 5 ml Mercaptoethanol (Kat.-Nr. M-6250, Fa. Sigma®)
- Zugabe von 0.001 g Bromphenolblau (Kat.-Nr. 17132901, Fa. Pharmacia®)
- Aqua bidest. ad 50 ml

Durchführung:

- Gellamm vorsichtig entfernen und Slots 2-3 x mit Gellaufpuffer (Zusammensetzung siehe C 2.3.3.1) ausspülen und damit auffüllen
- Proben 1:2 mit Probenpuffer verdünnen, nach IMS extrahierte Beads direkt in 25 µl Probenpuffer aufnehmen und 5 min bei 95 °C kochen
- Je nach Größe der Slots 20 µl Probe auftragen
- Gele in Elektrophoresekammer einbauen und diese mit Laufpuffer auffüllen
- Lauf starten mit max. 30 mA pro Gel; Laufdauer nach Beginn der Trennung im Separationsgel berechnen und Stromstärke dementsprechend regulieren
- Strom abschalten und Glasplatten aus Elektrophoresekammer entnehmen

Für die Durchführung des Blotvorgangs wurden die Reagenzien und Lösungen aus dem Dot-EIA analog Kapitel C 2.3.2 verwendet.

2.3.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von PrP^{Sc}-haltigem Material

Für Versuche mit BSE-positivem Material im S3**-Labor wurden Fertiggele (Tris-HCl 12 % Acrylamidgel) der Fa. Bio-Rad[®] (Prod.-Nr. 161-1174) verwendet. Diese wurden wie folgt vorbereitet:

- Fertiggel aus dem Kühlschrank nehmen, Verpackung vorsichtig aufschneiden und Platte in Gellaufpuffer einlegen
- Klebefolie entlang der schwarzen Markierung einschneiden und abziehen; Platte in die Trennkammer einspannen
- Gellaufpuffer (Zusammensetzung siehe C 2.3.3.1) in die äußere Gel-Elektrophoresekammer Mini Protean 3 Cell (Fa. Bio-Rad[®]) ca. 3 cm hoch einfüllen, die innere Gel-Elektrophoresekammer bis oben hin befüllen
- Proben 1:2 mit Probenpuffer verdünnen, nach IMS extrahierte Beads direkt in 25 µl Probenpuffer aufnehmen und bei 95 °C 5 min lang inkubieren
- Je Slot 20 µl Probe auftragen
- Gellauf ca. 80-100 min bei 100 V mit dem Netzgerät Gel-Elektrophorese Power Supply (Power Pac 200, Fa. Bio-Rad)
- Netzgerät abstellen und Platte aus der Kammer entnehmen; Klebefolie vorsichtig entfernen und Glas- und Plastikplatte vorsichtig voneinander lösen

2.3.3.4 Blotvorgang von PrP^c bzw. PrP^{sc}

Ein für den Blotvorgang notwendiger Transferpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Transferpuffer:

- 3.2 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- 14.4 g Glycin (Kat.-Nr. 808822, Fa. ICN®)
- 200 ml Methanol (Kat.-Nr. 106009, Fa. Merck®)
- 800 ml Aqua bidest.

Für den Blotvorgang selbst wurde für PrP^c eine Blotkammer der Fa. SKB Bromma® (Typ 2117 Multiphor II) verwendet. Der Vorgang des Blottens wurde wie folgt durchgeführt:

- 6 Blotpapiere (Kat.-Nr. 5883112, Fa. VWR®) in Gelgröße zuschneiden und in Transfer-Puffer einlegen; 3 Blotpapiere auf den Boden der Blotapparatur legen und Luftblasen entfernen durch Abrollen mit einer Pasteurpipette
- Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Fa. Schleicher & Schuell®) in Gelgröße zuschneiden, kurz in Transfer-Puffer einlegen und auf die Blotpapiere legen
- Gel vorsichtig auf die Membran legen, Luftblasen entfernen
- Die übrigen 3 Blotpapiere auf das Gel legen und nochmals mit Transfer-Puffer benetzen
- Zusammenbau der Blotkammer und Berechnen der Stromstärke für den Blot: Gelgröße in cm² x 0.8 mA/cm²; max. Spannung 50 V
- Einstellen des Netzgeräts; Blotdauer ca. 2 h
- Netzgerät Power Supply (Power Pac 200, Fa. Bio-Rad®) abschalten, Membran entnehmen und für 1 h in Glasschale oder -becken in Absättigungslösung unter leichtem Kippen inkubieren (Laborwippe)
- Membran 1 x waschen mit TBS-T auf Laborwippe für 5 min
- Inkubation 2 h mit Primärantikörper Anti-PrP F89 (1:2500 in TBS, Kat.-Nr. AB 2777, Fa. Acris Antibodies®)
- Membran 3 x waschen mit TBS-T auf Laborwippe für 5 min

- Inkubation 2 h mit Sekundärantikörper Anti-Maus IgG-HRP (1:2500 in TBS, Kat.-Nr. P0447, Fa. Dako Cytomations®)
- Membran 4 x waschen mit TBS-T auf Laborwippe für 5 min
- Je nach Färbemethode wird wie folgt vorgegangen:
 - TMB-Färbung: Inkubation mit TMB-Färbelösung (siehe Kapitel C 2.3.2, Dot-EIA) bis Banden sichtbar werden (ca. 30 min)
 - Chemilumineszenz: Überschichten der Membran mit ECL-Färbelösung (Kat.-Nr. RPN2106, Fa. Amersham Biotech®) und 1 min einwirken lassen; Messen in Kodak Image Station 2000R (Fa. Kodak®).

2.3.3.5 Nachweis von PrP^c

Um die Nachweisbarkeit von PrP^c mit dieser Methode zu veranschaulichen, wurden eine Gelelektrophorese und ein Westernblot durchgeführt. Eine lineare Verdünnungsreihe von PrP^c in PBS wurde angelegt, so dass in je 10 µl Probenvolumen 20 bis 1,25 ng PrP^c enthalten waren. Anschließend wurden die Proben 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95 ° C gekocht (siehe C 2.3.3.3). Jeweils 20 µl wurden wie beschrieben auf das Gel aufgetragen.

2.3.3.6 Nachweis von PrP^{sc}

Die Nachweisbarkeit von PrP^{sc} im Westernblot wurde ebenso untersucht. Dazu wurde positives Hirnmaterial, wie in Kapitel C 3.1.1 (BSE-Reinigungskit, Fa. Bio-Rad®) beschrieben homogenisiert und aufgereinigt. Das daraus entstandene Pellet wurde in 50 µl Reagenz C1 (Stammlösung) gelöst, wovon aber nur 25 µl für die Herstellung einer linearen Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:128) mit PBS (Endvolumen 25 µl) eingesetzt wurden. Jede Verdünnungsstufe und die übrigen 25 µl der Stammlösung wurden dann jeweils nochmal 1:2 mit 25 µl Probenpuffer versetzt (Endvolumen 50 µl). Anschließend wurde weiter verfahren, wie in Kapitel C 2.3.3.3 beschrieben.

3 Anreicherungsverfahren für PrP^{sc}

Für die Gewinnung von PrP^{sc} aus Hirnhomogenat sind in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben worden. Diese galt es zu überprüfen. Neben dem BSE-Reinigungskit der Fa. Bio-Rad® (Methode I) wurden noch 5 weitere Verfahren (Methode II bis VI) getestet. Als Standardmethode für den Nachweis von PrP^{sc} diente der BSE-Detection Kit (Bio-Rad®, C

2.3.1); alternativ wurde auf den Dot-EIA zurückgegriffen. Darüber hinaus wurde versucht, alle aufkonzentrierten Proben in der CE-LIF zu messen.

3.1 Zentrifugationsverfahren

3.1.1 BSE-Reinigungskit (Bio-Rad[®], Methode I)

Zur Durchführung der Aufreinigung von Probenmaterial wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Verbrauchsmaterialien benötigt. Die Zusammensetzung des Reinigungskits ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial zur Durchführung einer Aufreinigung mit dem BSE Reinigungskit nach Bio-Rad[®]

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle, Produktspezifikation
BSE Reinigungskit	Bio-Rad, Kat.-Nr. 355-1102
Kalibrationsnadel	Bio-Rad, Kat.-Nr. 355-1124
Kalibrationsspritze	Bio-Rad, Kat.-Nr. 355-1123
Probenentnahmespritze	Bio-Rad, Kat.-Nr. 355-1121
Proteinase K	Bio-Rad, Kat.-Nr. 355-1100
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Kat.-Nr. 0030120.094

Tabelle 5: Inhalt des BSE Reinigungskits (Bio-Rad Produktbeschreibung)

Bezeichnung	Art der Reagenzien	Menge
Probenröhrchen (Ribolysertubes)	Probenröhrchen mit Keramikugeln in Pufferlösung Konservierungsmittel: Proclin 300 (0,1 %)	100 Röhrchen
Reagenz A	Denaturierungspuffer	2 Flaschen (25 ml)
Reagenz B	Fällungspuffer Farbstoff: Bromphenolblau	1 Flasche (50 ml)
Reagenz C1	Solubilisierungspuffer	1 Flasche (6 ml)

Die Aufreinigung wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Detail wird wie folgt vorgegangen:

- 500 µl Homogenat (C 2.1) mit der Kalibrationsspritze entnehmen und in ein 2 ml Safe-Lock Tube überführen.
- Vorbereiten der Proteinase K-Lösung: 4 µl Proteinase K in 1 ml Reagenz A (Verdünnungspuffer) pipettieren und durch mehrfaches Umschütteln gut mischen.
- 500 µl der Proteinase K-Lösung zu den Proben geben, mischen und die Proben 15 min bei 37 °C inkubieren.
- Die Röhrchen aus dem Heizblock nehmen und jeweils 500 µl Reagenz B zugeben; gut mischen und dann 5 min bei 20000 x g zentrifugieren.
- Den Überstand abgießen und die Röhrchen durch Umdrehen auf saugfähiges Papier trocknen.
- Das Pellet in 50 µl Reagenz C1 lösen und 5 min bei 100 °C inkubieren
- Die Röhrchen aus dem Heizblock nehmen und mit einem Vortex-Mischgerät mixen, bis das Pellet ganz gelöst ist.

Der Nachweis von PrP^{sc} kann mittels ELISA (C 2.3.1) erfolgen; hierzu wird zum Probenmaterial 250 µl Reagenz R6 aus dem Platelia[®] BSE Nachweiskit hinzugefügt, wovon 100 µl für die Messung eingesetzt wird.

3.1.2 Fällung mit Phosphorwolframsäure (Methode II)

Die Gewinnung von PrP^{sc} nach Fällung mit Phosphorwolframsäure basiert auf der Methode von WADSWORTH ET AL. (2001). Zur Gewinnung des Präzipitates wird eine konventionelle Zentrifuge (Biofuge Primo R, Kat.-Nr. 7500 5440, Kendro Laboratory Products / Heraeus) bzw. ein Ultrazentrifuge (Kat.-Nr. 355-645, Fa. Beckman) eingesetzt. Zur Durchführung der Methode wurden folgende Lösungen benötigt.

Lösung I zur Herstellung von Hirnhomogenat

- 1 Tablette PBS (Kat.-Nr. L-182-50, Biochrom[®])
- *in 1000 ml Aqua dest.*,
- auf pH 7.4 einstellen
- davon 10 ml nehmen
- 1 g N-lauroyl-Sarcosine (Art.-Nr. 51H0454, Fa. Sigma[®]) zugeben

Lösung II

- 4g N-Lauroyl-Sarkosine (Art.-Nr. 51H0454, Fa. Sigma®)
- *in 100 ml Aqua dest. lösen*
- 50 U/ml Benzonase (Kat.-Nr. 101694, Fa. Merck®) zugeben

Lösung III

- 100 µg Proteinase K
- in 1 ml PBS lösen

Lösung IV

- 0.3 g Natriumwolframat (Kat.-Nr. 106672, Fa. Merck®)
- *In 100 ml Aqua dest. lösen*

Lösung V

- 0.01 g N-lauryol-Sarkosin (Art.-Nr. 51H0454, Fa. Sigma®)
- In 10 ml PBS lösen
- auf pH 7.4 einstellen

Der Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte zur Gewinnung von PrP^{Sc} ist in Abbildung 11 dargestellt.

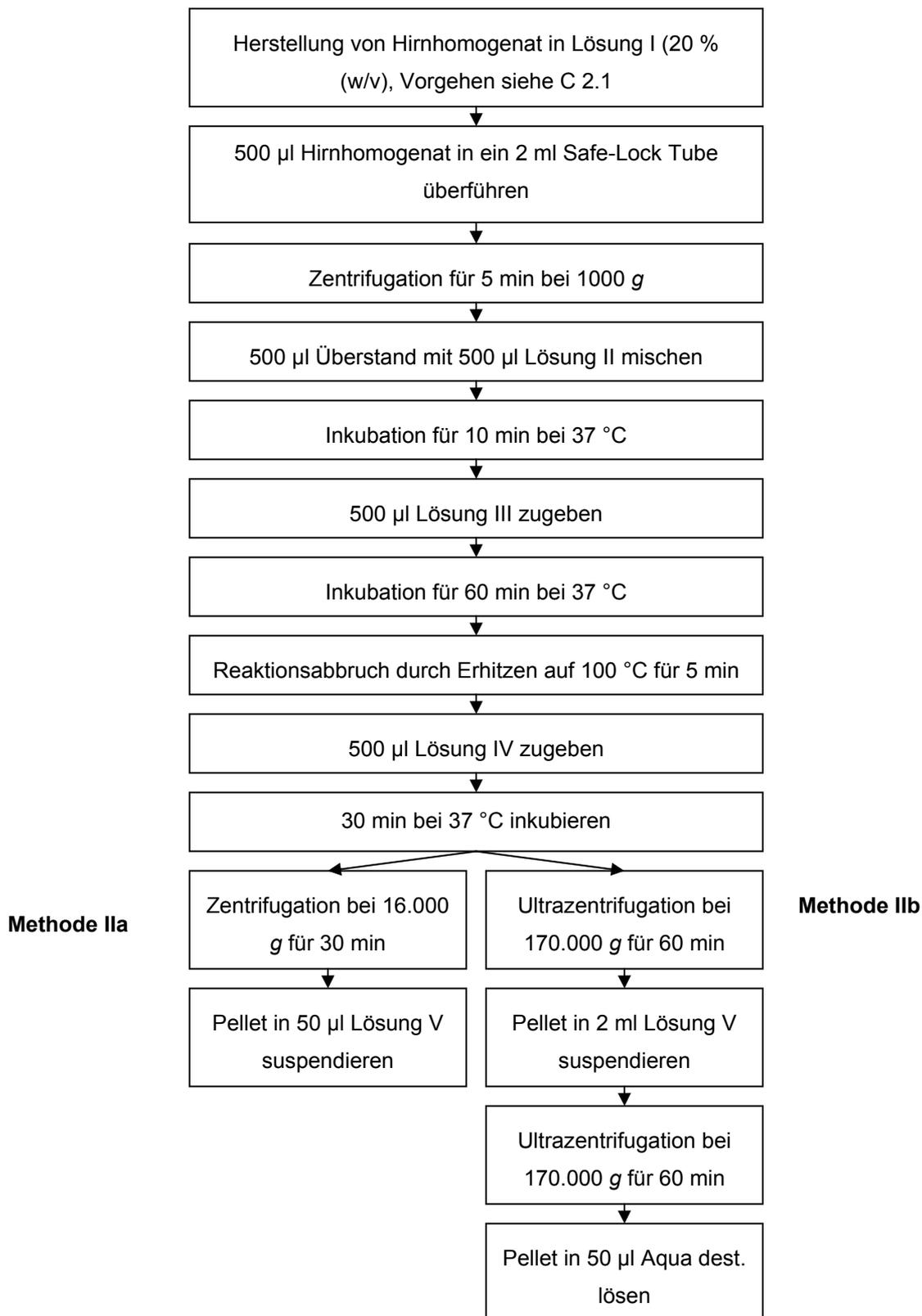


Abbildung 11: Aufreinigung von PrP^{sc} aus Hirnhomogenat in Anlehnung an WADSWORTH ET AL. (2001) (Methode II a und II b)

Für den Nachweis von PrP^{sc} wurde das gesamte Probenvolumen in den Platelia[®] BSE Nachweiskit der Fa. Bio-Rad[®] (C 2.3.1) eingesetzt.

3.1.3 Ultrazentrifugation nach SCHMERR ET AL. (2000, Methode III)

Bei dieser Methode wird in Saccharose-Lösung suspendiertes Hirnhomogenat fraktioniert zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in Tris-Lösung mit Proteinase K verdaut und PrP^{Sc} durch einen weiteren Ultrazentrifugationsschritt angereichert. Zur Durchführung dieser Methode sind folgende Lösungen erforderlich:

Lösung I zur Herstellung von Hirnhomogenat

- 1.09 g Saccharose (Art.-Nr. 107651, Fa. Merck®)
- in 100 ml Aqua dest. lösen

Lösung II

- 0.121 g Tris (Kat.-Nr. 1.08382, Fa. Merck®)
- in 100 ml Aqua dest. lösen

10 mg Proteinase K (Kat.-Nr. P 2308, Fa. Sigma®) hinzufügen

Die Zentrifugation wurde mit einer Tischzentrifuge (Biofuge Primo R, Kat.-Nr. 75000 5440, Kendro Laboratory Products / Heraeus®) und einer Ultrazentrifuge (Kat.-Nr. 355-645, Fa. Beckman®) durchgeführt. Die Vorgehensweise ist im Detail in Abbildung 12 dargestellt. Das gewonnene Pellet wurde dem jeweiligen Nachweisverfahren entsprechend in 10 µl Aqua dest. für CE-LIF(C 3) und Dot-EIA (C 2.3.2) gelöst.

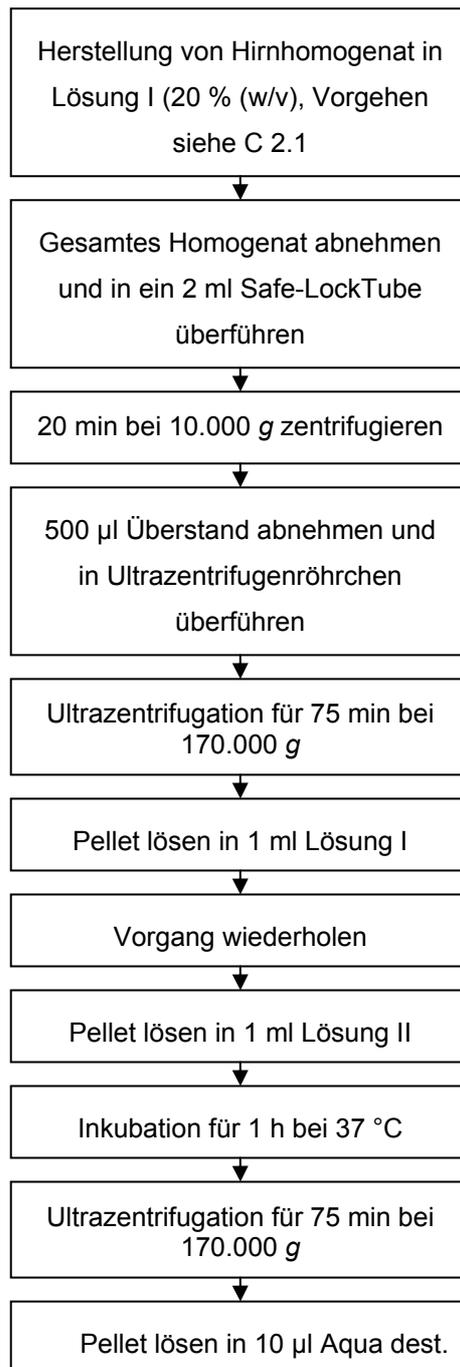


Abbildung 12: Arbeitsschritte zur Anreicherung von PrP^{sc} mittels Ultrazentrifugation nach SCHMERR ET AL. (2000, Methode III)

3.2 Extraktionsverfahren mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP, Methode IV)

3.2.1 Extraktion von PrP^{sc} aus Hirngewebe

Dieses Verfahren, das ebenfalls von SCHMERR ET AL. (2000) beschrieben wurde, beruht auf der Löslichkeit von PrP^{sc} in 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (HFIP). Zur Durchführung sind folgende Materialien notwendig:

- 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Kat.-Nr. H 8505, Fa. Sigma®)
- Proteinase K (25 µg/µl in Aqua dest., Kat.-Nr. P 2308, Fa. Sigma®)

Lösung I (zur Herstellung des Hirnhomogenats):

- 1 g N-lauroyl-Sarkosin (Art.-Nr. 51H0454, Fa. Sigma®)
- 10 ml Aqua dest. lösen

Lösung II:

- 7.1 g Na₂SO₄ (Kat.-Nr. 106647, Fa. Merck®)
- in 100 ml Aqua dest. lösen

Die einzelnen Arbeitsschritte gibt Abbildung 13 wieder. Der gewonnene Rückstand wurde dann für den ELISA (C 2.3.1) in 50 µl Aqua dest. bzw. in 10 µl Aqua dest. für die CE-LIF gelöst.

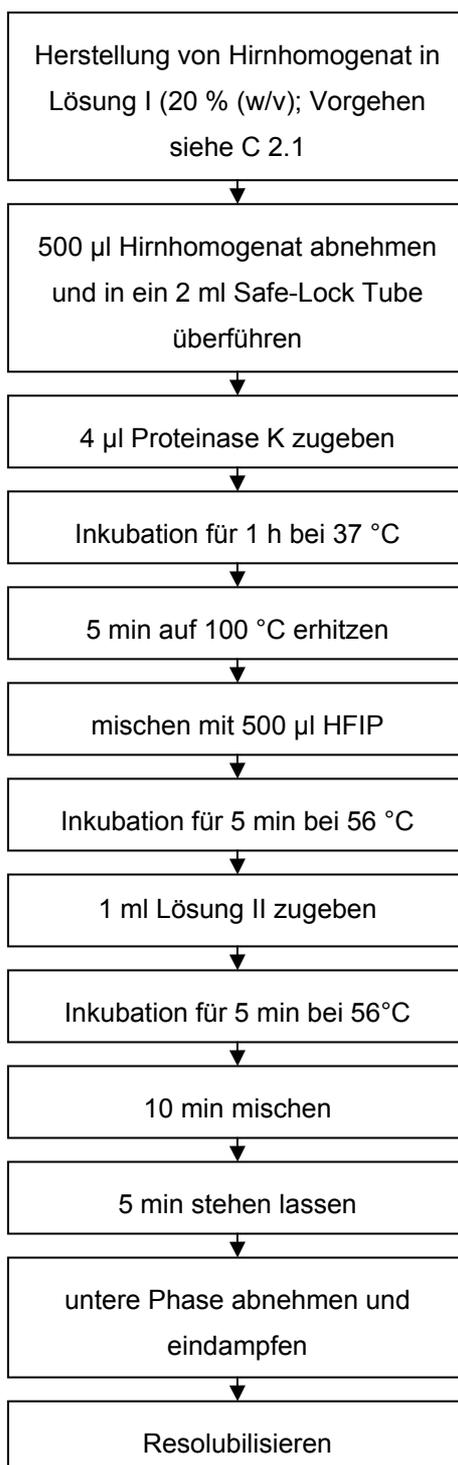


Abbildung 13: Arbeitsschritte zur Extraktion von PrP^{sc} aus Hirngewebe mittels 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (HFIP) nach SCHMERR ET AL. (2000) (Methode IV)

3.2.2 Extraktion von PrP^{sc} aus artifiziell kontaminiertem Liquor

Dieses Verfahren basiert auf der bereits in Kapitel C 3.2.1 beschriebenen Methode; dort sind auch alle hierzu erforderlichen Materialien zu finden. Das Vorgehen wurde leicht modifiziert und wie in Abbildung 14 durchgeführt. Liquor wurde nach der unter C 2.2 beschriebenen

Methode vorbehandelt. Eine PrP^{Sc}-haltige Stammlösung wurde nach C 2.2.1 hergestellt. Mit dieser Stammlösung wurde eine lineare Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 mit Liquor (Endvolumen 250 µl) hergestellt. Die eingesetzten äquivalenten Hirnmengen lagen im Bereich von 333 µg/µl bis 5.2 µg/µl.

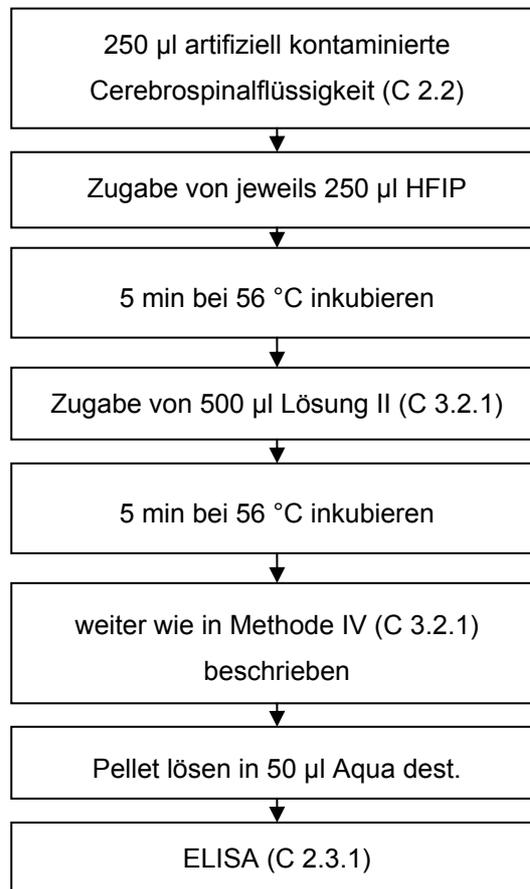


Abbildung 14: Versuchsdesign zur Extraktion von PrP^{Sc} aus kontaminiertem Liquor mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Methode IV)

3.3 Chromatographische Aufreinigungsverfahren

Obwohl es sich im Grunde genommen bei den chromatographischen Aufreinigungsverfahren um kombinierte Verfahren handelt, sollen sie dennoch bei den Einzelverfahren dargestellt werden.

3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Methode V)

Die Durchführung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgte in Anlehnung an die Methode von SCHMERR ET AL. (2000). Hierzu wurde zunächst ein PrP^{Sc}-haltiges Präzipitat aus Hirngewebe gewonnen (Methode I, C 3.1.1), das dann mittels HPLC aufgetrennt worden ist.

Material

- Säule: Polyhydroxyethyl A (200 x 4.6 mm; 5 µm; 300 Å, Fa. PolyLC, Inc., Columbia USA, Best.-Nr. 204HY0503)
- HPLC-System Gold 126 (Kat.-Nr. 24853, Fa. Beckman Coulter®)
- UV-Detektor 168 (Kat.-Nr. 950184, Fa. Beckman Coulter®)
- Luer-Syringe (100 µl, Kat.-Nr. 80601, Fa. Hamilton®)

Lösung I

- Stammlösung
- 1.21 g Tris (Kat.-Nr. 1.08382.100, Fa. Merck®)
- *in 100 ml Aqua dest. lösen*
- auf pH 8.00 einstellen
- 0.08 g EDTA (Kat.-Nr. E 4884, Fa. Sigma®)
- 5 g SDS (Kat.-Nr. L-3771-100G, Fa. Sigma®) zugeben
- 9 ml Stammlösung mit 1 ml HFIP (Kat.-Nr. H 8508, Fa. Sigma®) mischen

Eluent A

- 99.48 ml ACN (Kat.-Nr. 8257, Fa. JT Baker®)
- 0.52 ml HFIP (Kat.-Nr. 8508, Fa. Sigma®) mischen
- davon 99.9 ml mit 0.1 ml TFA (Best.-Nr. 8082600100, Fa. VWR®) versetzen

Eluent B

- 99.48 ml Aqua dest. mit 0.52 ml HFIP mischen
- davon 99.9 ml mit 0.1 ml TFA mischen

Methode:

Das mittels Methode gewonnene Pellet wurde in 100 µl Lösung I gelöst, 10 min bei 100 °C erhitzt und dann mittels Luer-Spritze in die HPLC-Anlage injiziert. Die Trennung erfolgte unter folgenden Bedingungen.

- Injektionsvolumen: 100 µl
- Gradientenprogramm:
 - Eluent A (100 %), Eluent B (0 %): 8 min

- Eluent B (100 % → 0 %), Eluent B (0 % → 100 %): 15 min
- Eluent A (0 %), Eluent B (100 %): 10 min

Über den gesamten Zeitraum hinweg wurden Fraktionen á 4 min aufgefangen, die im Vakuumkonzentrator bei 60 °C eingeengt wurden. Der Nachweis von PrP^{sc} erfolgte mittels Dot-EIA (C 2.3.2) und CE-LIF (C 3). Hierzu wurden die Fraktionen in 10 µl Aqua dest. gelöst.

3.3.2 Festphasenextraktion mit SPE-Kartuschen (Methode VI)

3.3.2.1 Extraktion von PrP^{sc} aus Hirngewebe

Diese Methode basiert auf dem Verfahren von CERVENAKOVA ET AL. (2003). Dabei wird zunächst ein PrP^{sc}-haltiges Präzipitat aus Hirngewebe gewonnen (Methode I, C 2.3.1), das anschließend an einer SPE-Kartusche fraktioniert wird. Hierzu sind folgende Materialien erforderlich:

- SPE-Kartuschen (Polyhydroxyethyl Asparamide Cartridges, Bestell-Nr. SPEHY 1203, Fa. Chromatographie Technologies[®])
- PP-Röhrchen (Kat.-Nr.: 188271, Fa. Greiner)
- 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (HFIP, Kat.-Nr. H 8505, Fa. Sigma[®])

Lösung I

- 2.4 g Tris (Kat.-Nr. 1.08382.100, Fa. Merck[®])
- 0.08 g EDTA (Kat.-Nr. E 4884, Fa. Sigma[®])
- 2 g SDS (Kat.-Nr. L-3771-100G, Fa. Sigma) zugeben
- *in 100 ml Aqua dest. lösen*
- auf pH 8.00 einstellen

Lösung II

- 95 ml ACN (Kat.-Nr. 8257, Fa. JT Baker[®])
- mit 5 ml Aqua dest. mischen
- 0.520 ml HFIP (Kat.-Nr.: H 8508, Fa. Sigma[®])
- 0.1 ml TFA (Best.-Nr. 8082600100, Fa. VWR[®])

Lösung III

- 99 ml Aqua dest. mit 1 ml ACN mischen
- 0.520 ml HFIP zugeben
- 0.1 ml TFA zugeben

Vor Gebrauch muss die SPE-Kartusche durch Spülen mit 5 ml Lösung II aktiviert werden. Probenmaterial bzw. Lösungen werden in Spritzen aufgenommen und manuell auf die SPE-Kartuschen aufgebracht (Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen/s). Die Eluate werden in PP-Röhrchen gesammelt und in einem Vakuumkonzentrator (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) eingedampft. Das detaillierte Vorgehen ist Abbildung 15 zu entnehmen.

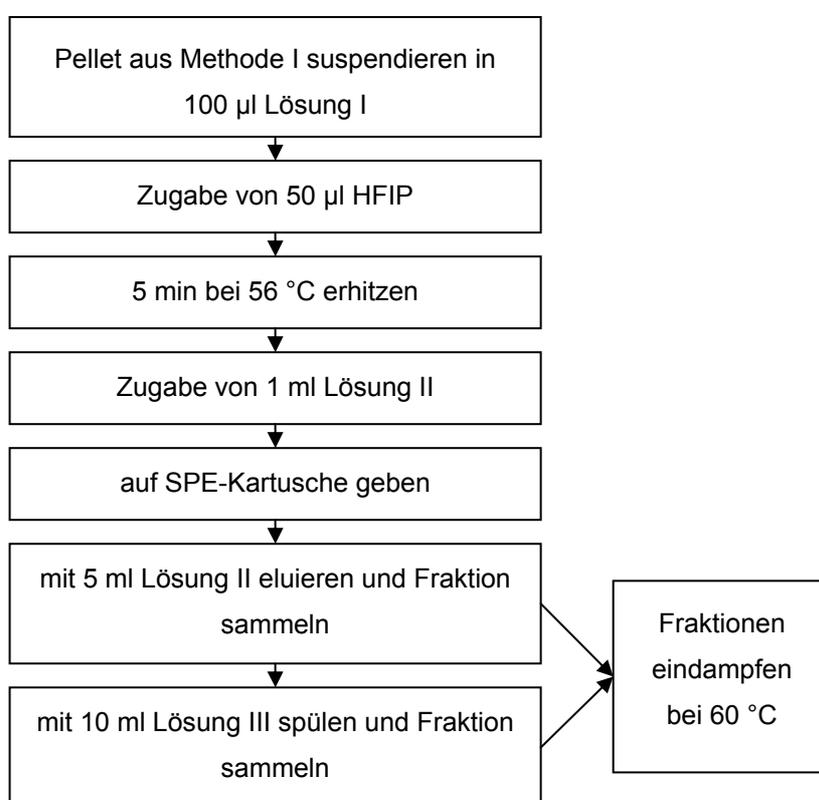


Abbildung 15: Arbeitsschritte zur Aufreinigung von PrP^{sc} mittels SPE-Kartuschen (in Anlehnung an CERVENAKOVA ET AL. 2003, Methode VI)

Die Rückstände werden mittels Dot-EIA (C 2.3.2) und/oder CE-LIF (C 3) untersucht und hierfür in 10 µl Aqua dest. gelöst.

3.3.2.2 Extraktion von PrP^{sc} aus artifiziell kontaminiertem Liquor

Auch dieses Verfahren basiert auf der in Kapitel C 3.3.2.1 beschriebenen Methode. Die zur Durchführung benötigten Materialien sind dort beschrieben. Das Verfahren wurde an die Matrix Liquor angepasst und ist im Detail in Abbildung 16 dargestellt. Liquor wurde nach dem unter C 2.2 und C 2.2.1 beschriebenen Verfahren vorbehandelt und artifiziell kontaminiert.

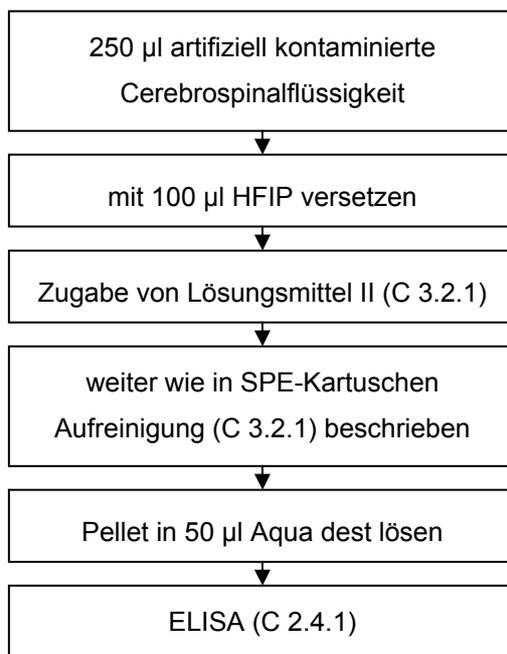


Abbildung 16: Aufreinigungsverfahren von PrP^{sc}-kontaminierter Cerebrospinalflüssigkeit mit SPE-Kartuschen (Methode VI)

3.3.3 Kombinationsverfahren

Da sich bei der Prüfung der Einzelmethode herausstellte, dass der Reinheitsgrad der Präparation nur bedingt für die CE-LIF tauglich ist, wurde versucht, durch Kombination einzelner Verfahren bessere Resultate zu erzielen. Dabei wurde auf die Methoden I, III, IV und VI zurückgegriffen.

Im Einzelnen wurden folgende Kombinationen geprüft:

- Kombinationsverfahren 1
 - Methode I (C 3.1.1, Aufreinigungs-kit nach Bio-Rad®)
 - Pellet lösen in 500 µl PBS
 - Zugabe von 500 µl HFIP

- weiter wie in Methode IV (C 3.2.1, HFIP-Methode) beschrieben
 - Nachweis im ELISA (C 2.3.1)
- Kombinationsverfahren 2
- Methode III (C 3.1.3, Ultrazentrifugation nach Schmerr)
 - Pellet lösen in 500 µl PBS
 - Zugabe von 500 µl HFIP
 - Weiter wie in Methode IV (C 3.2.1, HFIP-Methode) beschrieben
 - Pellet in 10 µl Aqua dest. lösen
 - Nachweis im Dot-EIA (C 2.3.2) und in der CE-LIF (C 3)
- Kombinationsverfahren 3
- Methode III (C 3.1.3, Ultrazentrifugation nach Schmerr)
 - Methode VI (C 3.3.2.1, SPE-Kartuschenaufreinigung)
 - Eluate sammeln und im Vakuumkonzentrator eindampfen
 - Pellet lösen in 10 µl Aqua dest.
 - Nachweis im Dot-EIA (C 2.3.2) bzw. in der CE-LIF (C 3)

3.4 Affinität- bzw. Immunomagnetische Separation

Die Affinitäts- bzw. Immunomagnetische Separation sind Verfahren zur selektiven Anreicherung von Proteinen, Peptiden, Zellen oder Bakterien. Dabei werden paramagnetische Partikel (Dynabeads[®]) mit spezifischen Liganden (Bindungsproteine oder Antikörper) beschichtet. Nach Inkubation der Beads mit der flüssigen Probe werden diese mit Hilfe eines Dauermagneten an die Wand des Reagenzglases gezogen (vergleiche Abbildung 17). Der Überstand wird entfernt und die extrahierten Substanzen können von den Beads eluiert werden. Möglich ist auch, einen Immunoassay direkt auf den Beads durchzuführen.

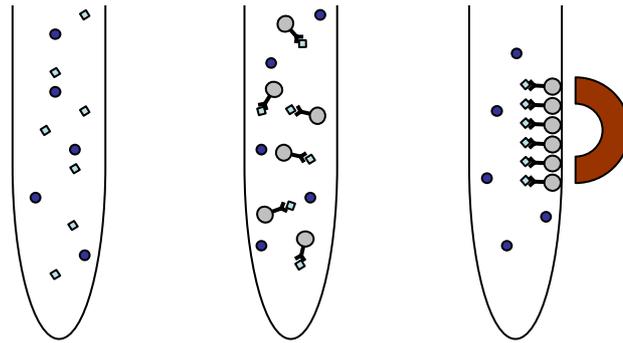


Abbildung 17: Prinzip der IMS. Links: Probe; Mitte: Zugabe von Dynabeads[®], Bindung an den Liganden; rechts: Magnetische Separation

3.4.1 Versuche mit Plasminogen-beschichteten Beads

Diese Untersuchungen basieren auf den Resultaten von FISCHER ET AL. (2000), wonach PrP^{Sc} an humanes Plasminogen binden soll.

Material

- tosylaktivierte Dynabeads[®] (Durchmesser 2.8 nm, 2×10^9 Beads/ml, Prod.-Nr. 142.03, Fa. Dynal Biotech[®])
- Magnetischer Partikelkonzentrator (MPC^R-L/MPC, Kat.-Nr. 120.21, Dynal Biotech[®])
- Plasminogen (Kat.-Nr. 528180, Fa. Calbiochem[®])
- Safe-Lock Tubes (Kat.-Nr. 0030120.094, Fa. Eppendorf[®])
- PrP^{Sc}-haltiges Hirnhomogenat

Lösung I zur Herstellung von Hirnhomogenat

- 0.5 ml Igepal (Kat.-Nr. I 3021, Fa. Sigma[®])
- 0.5 g Natrium-desoxycholat (Kat.-Nr. D-6750, Fa. Sigma[®])
- *in 100 ml PBS lösen*

Puffer A

- 6,183 g H₃BO₃ (Kat.-Nr. 203667, Fa. Calbiochem[®])
- *in 800 ml Aqua dest. lösen*
- *einstellen auf pH 9.5*
- *mit Aqua dest auf 1000ml*

Puffer B

- 0.1 g Bovines Serumalbumin (BSA, Kat.-Nr. 112018, Fa. Merck®)
- *in 100 ml PBS suspendieren*

Puffer C

- 2.42 g Tris (Kat.-Nr. 108382, Fa. Merck®)
- *in 100 ml Aqua dest. lösen*
- auf pH 8.5 einstellen
- 0.5 g BSA zugeben

Puffer D

- 0.1 ml Tween 20
- *in 9.9 ml PBS lösen*

Zur Beschichtung der Beads mit Plasminogen wurde wie folgt vorgegangen:

- Bead-Suspension aufschütteln und 1 ml in Reagenzglas überführen
- Beads mit MPC von der Flüssigkeit abtrennen, Überstand verwerfen
- 1 ml PBS zugeben und resuspendieren
- Beads mit MPC von PBS abtrennen, Überstand verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- 100 µg Plasminogen in 1 ml Puffer A lösen und zu vorbehandelte Beads geben
- 24 h bei 37°C unter ständigem Mischen inkubieren
- Beads mit MPC vom Puffer A abtrennen, Überstand verwerfen
- Beads mit 1 ml Puffer B suspendieren und 5 min bei RT schwenken
- Beads mit MPC vom Puffer B abtrennen, Überstand verwerfen
- Vorgang wiederholen
- Beads in 1 ml Puffer C suspendieren und für 4 h bei 37 °C inkubieren
- mit MPC Beads von Puffer C abtrennen, Überstand verwerfen

- Beads in Puffer B suspendieren und 5 min bei RT inkubieren
- Beads mit MPC vom Puffer B trennen; Überstand verwerfen
- Beads in Puffer D suspendieren und für 10 min bei RT inkubieren
- Beads mit MPC vom Puffer D trennen, Überstand verwerfen
- Beads in Puffer B suspendieren und für 5 min bei RT inkubieren
- Beschichtete Beads bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahren

PrP^{sc}-haltiges Probenmaterial wurde mit Plasminogen beschichteten Beads inkubiert. Nach magnetischer Separation wurden sowohl Überstände als auch die Beads auf das Vorhandensein von PrP^{sc} untersucht. PrP^{sc}-haltiges Ausgangsmaterial diente als Kontrolle. Im Einzelnen wurde wie in Abbildung 18 beschrieben vorgegangen.

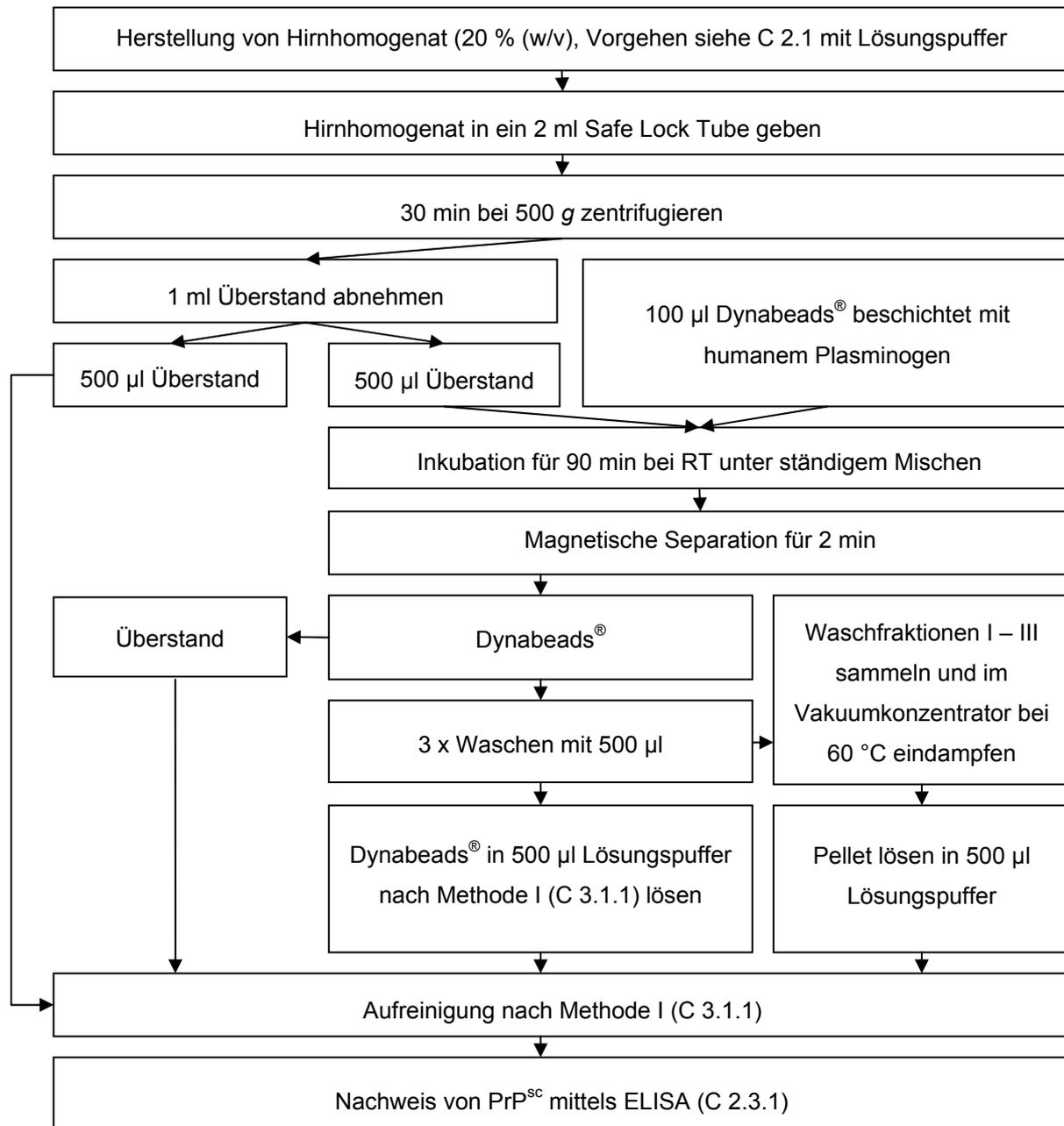


Abbildung 18: Versuchsdesign zur Anreicherung von PrP^{sc} aus Hirnhomogenat mittels Plasminogen beschichteter Dynabeads®

3.4.2 Versuche mit Antikörper-beschichteten Beads

Zur Durchführung dieser Versuche war es notwendig, paramagnetische Beads mit gegen PrP^{sc}-gerichteten Antikörpern zu beschichten. Dazu wurden tosylaktivierte Dynabeads® (Prod.-Nr. 142.03, Dynal Biotech) in einer Konzentration von 2×10^9 Beads pro 1 ml verwendet. Je 5 µl Beads (10^7 Teilchen) wurden mit 3 µl monoklonalem Antikörper F89 (mAB F89, Prod.-Nr. AB2777, Fa. Acris Antibodies) [1 mg/ml] inkubiert. Folgende Puffer wurden für eine Beschichtung verwendet:

Puffer A

- 2.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 14.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- in 1000 ml Aqua dest. lösen

Puffer B

- 6.183 g H_3BO_3 (Kat.-Nr. 203667, Fa. Calbiochem®)
- in 800 ml Aqua dest. lösen
- auf pH 9.5 mit 0.5 M NaOH einstellen
- auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen

Puffer C

- 0.88 g NaCl
- 0.1 g BSA (Kat.-Nr. 112018, Fa. Merck®)
- in 100 ml 1:10 (mit Aqua dest.) verdünntem Puffer A lösen

Puffer D

- 2.42 g Tris
- in 80 ml Aqua dest. lösen
- auf pH 8.5 mit 1M HCl einstellen
- Aqua dest. ad 100 ml

Bei der Beschichtung wurde wie folgt vorgegangen:

- Dynabeads® durch Schütteln gut mischen
- Gewünschte Menge Beads entnehmen und in ein 2 ml Safe-Lock Tube (Kat.-Nr. 0030120.094, Fa. Eppendorf®) überführen
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Beads waschen (2 min schütteln in Puffer B)
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Beads wieder aufnehmen in Puffer B in Höhe des ursprünglich abgenommenen Volumens
- Beads gut schütteln und je 10^7 Beads 3 μl Antikörper zugeben; 1 min durch Pipettieren mischen

- Beads bei 37 °C im Brutschrank unter ständigem Schütteln für 24 h inkubieren
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Beads 2 x waschen (5 min in Puffer C bei 4 °C)
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Zum Absättigen der freien Bindungsstellen Beads bei 37 °C im Brutschrank für 4 h unter ständigem Schütteln in Puffer D inkubieren
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Beads 1 x waschen (5 min in Puffer C bei 4 °C)
- Beads mit MPC vom Puffer trennen, Überstand verwerfen
- Wiederaufnehmen der gekoppelten Beads in Puffer C in Höhe des ursprünglich abgenommenen Volumens, so dass die Konzentration der Beads wieder 2×10^9 /ml entspricht

Die Beads werden bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.4.2.1 Herstellung einer PrP^{Sc}-haltigen Stammlösung

Das zur artifiziellen Kontamination notwendige PrP^{Sc}-haltige Material wurde mit der von Bio-Rad beschriebenen Methode gewonnen (Methode I, C 3.1.1). Grundsätzlich wurde das dabei entstandene Pellet in 50 µl Reagenz C1 gelöst und – in Abhängigkeit der zu untersuchenden Matrix – entweder mit 250 µl PBS oder Liquor auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Auf die Art der verwendeten Matrix wird in den jeweiligen Kapiteln hingewiesen.

3.4.2.2 Versuche zur Anreicherung von PrP^{C/Sc} aus der Matrix PBS

Versuche mit PrP^C

Um eine Bindung von PrP^C in der Matrix PBS an die mit mAB F89 gecoateten Beads nachzuweisen, wurden die Überstände der Proben vor und nach IMS im ELISA (C 2.3.1) gemessen. Dazu wurden für PrP^C 20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,63 ng eingesetzt. Das genaue Versuchsdesign ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP^c aus PBS vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

Probe	1		2		3		4		5		6	
PrP ^c (ng/100 µl PBS)	20		10		5		2.5		1.25		0.63	
4 x 10 ⁶ (2 µl) Dynabeads [®] mit Anti-PrP F89	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Inkubationszeit	30 min											

Versuche mit PrP^{sc}

Die Herstellung der PrP^{sc}-haltigen Lösung erfolgte mit PBS mit dem unter C 3.4.2.1 beschriebenen Verfahren. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS (Faktor 1:2, Endvolumen 100 µl) hergestellt, wovon nur die Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:64 in den Versuch eingesetzt wurden. Nach Zugabe von 2 µl (4 x 10⁶) gecoateter Dynabeads[®] in jede Verdünnungsstufe erfolgte eine Inkubation für 60 min unter leichtem Schütteln. Die Darstellung in Tabelle 7 soll den Versuch noch mal verdeutlichen.

Tabelle 7: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP^{sc} aus PBS vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

Probe	1		2		3		4	
PrP ^{sc} - Verdünnungsstufe	1:8		1:16		1:32		1:64	
PrP ^{sc} [mg Hirnäquivalent]	4.2		2.1		1.05		0.52	
4 x 10 ⁶ (2 µl) Dynabeads [®] mit Anti-PrP F89	+	-	+	-	+	-	+	-
Inkubationszeit	60 min							

3.4.2.3 Versuche zur Anreicherung von PrP^{c/sc} aus der Matrix Liquor

Versuche mit PrP^c

Analog zu den Versuchen unter 3.4.2.1 wurde versucht PrP^c in der Matrix Liquor mittels IMS anzureichern und indirekt in der ELISA (C 2.3.1) zu bestimmen. Um eine effektivere

Separation zu erreichen, wurde die Inkubationszeit für den Liquor auf 60 min heraufgesetzt. Der Versuchsaufbau ist detailliert in Tabelle 8 dargestellt:

Tabelle 8: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP^c aus vorverdaulichem Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

Probe	1		2		3		4		5		6	
PrP ^c (ng/100 µl Liquor)	40 ng		20 ng		10 ng		5 ng		2,5 ng		1,25 ng	
4 x 10 ⁶ (2 µl) Dynabeads [®] mit Anti-PrP F89	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Inkubationszeit	60 min											

Versuche mit PrP^{sc}

Für die Herstellung einer PrP^{sc}-haltigen Lösung wurde, wie unter C 3.4.2.1 beschrieben, vorgegangen. Das in 50 µl C1 gelöste Pellet wurde dann mit 250 µl vorbehandeltem Liquor (C 2.2) auf 300 µl aufgefüllt. Mit dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 mit Liquor hergestellt, wovon aber nur die Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:64 in den Versuch eingesetzt wurden. Da eine Abnahme der PrP^{sc}-Konzentration in der Matrix Liquor vor und nach IMS bestimmt werden sollte, wurden die Versuche im Doppelansatz durchgeführt. Eine genaue Beschreibung des Versuchs ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Versuchsdesign zum Nachweis von PrP^{sc} aus vorverdaulichem Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

Probe	1		2		3		4	
PrP ^{sc} -Verdünnungsstufe	1:8		1:16		1:32		1:64	
PrP ^{sc} [mg Hirnäquivalent]	4.2		2.1		1.05		0.52	
4 x 10 ⁶ (2 µl) Dynabeads [®] mit Anti-PrP F89	+	-	+	-	+	-	+	-
Inkubationszeit	60 min							

4 Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{sc} mittels Kompetitiver Immunoassay mit Kapillarelektrophorese-Laser-induzierter Fluoreszenz (CE-LIF)

Der Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{sc} mittels Kapillarelektrophorese Laser-induzierter Fluoreszenz (CE-LIF) wurde in Anlehnung an das Verfahren von SCHMERR ET AL. (1998) entwickelt. Kernstück dieser Methode ist die Bindung eines Fluoreszenz-markierten Peptides (FITC-P), das einem Epitop von PrP^c bzw. PrP^{sc} entspricht, mit einem Antikörper. Das Verhältnis von FITC-P zum Antikörper wird so gewählt, dass in der Kapillarelektrophorese zwei „peaks“ (FITC-P/Antikörperkomplex und FITC-P) gleicher Intensität entstehen. Ist im Untersuchungsmaterial PrP^c bzw. PrP^{sc} vorhanden, so wird weniger FITC-P an dem Antikörper gebunden. Im Elektropherogramm wird deshalb der FITC-P-Peak größer.

Zur Realisierung dieser Methode musste zunächst ein Peptid synthetisiert werden, das durch einen PrP^c bzw. PrP^{sc} spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden wird. Im Anschluss daran wurde die CE-LIF etabliert.

4.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit monoklonaler Antikörper mit Fluoreszenz-markierten synthetischen Peptiden

In die Untersuchung wurden drei Peptide einbezogen, die von der Firma Biosynthan GmbH, Berlin, synthetisiert worden sind. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte N-terminal durch Konjugation von γ -Aminobuttersäure bzw. β -Alanin mit Fluoreszein-isothiocyanat. Die Sequenzen der drei Peptide sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Sequenzen der geprüften Peptide

Bezeichnung	Produktspezifikation, Bezugsquelle
FITC-P1	FITC- γ -Abu-DYEDREYYRE-Amid (Proben-Nr.: 3175, Fa. Biosynthan GmbH, Berlin)
FITC-P2	FITC- β -Ala-HFGSDYEDREYYRE-Amid (Proben-Nr.: 3482, Fa. Biosynthan GmbH, Berlin)
FITC-P3	FITC- γ -Abu-SRPLIHFGSDYEDR-Säure (Proben-Nr.: 3694, Fa. Biosynthan GmbH, Berlin)

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit monoklonaler Antikörper mit den Fluoreszenz-markierten synthetischen Peptiden wurde ein spezieller Fluoreszenz-Immunoassay entwickelt. Da die Aminosäuresequenz von FITC-P1 und FITC-P2 Epitopen entsprechen, an denen der monoklonale Antikörper 6H4 anlagert, wurde die Bindungsfähigkeit beider Peptide gegenüber diesem Antikörper geprüft. FITC-P3 entspricht der Region, an der der

monoklonale Antikörper F89 bindet; deshalb wurde dieses Peptid gegenüber dem komplementären Antikörper geprüft.

Die Tests wurden auf Mikrotiterplatten (Best.-Nr. 831835, Fa. Sarstedt) durchgeführt. Dabei kamen folgende Materialien zur Anwendung :

Absättigungslösung

- 5 % Magermilchpulver (Kat.-Nr. 1.15363, Fa. Merck)
- 0.05 % Tween[®] 20 (Kat.-Nr. 8.22184, Merck)
- 100 ml TBS

Bindungspuffer

- 1.59 g Na₂CO₃ (Kat.-Nr. 106329, Fa. Merck)
- 2.93 g NaHCO₃ (Kat.-Nr. 106329, Fa. Merck)
- *mit Aqua dest. ad 1000 ml*

Waschpuffer (10-fach konzentriert)

- 1.38 g NaH₂PO₄ x H₂O (Kat.-Nr. 6392, Fa. Merck)
- 12.46 g Na₂HPO₄ x 2H₂O (Kat.-Nr. 106329, Fa. Merck)
- 8.5 g NaCl (Kat.-Nr. 1.06404, Fa. Merck)
- 5 ml Tween (Kat.-Nr. 8.22184, Merck)
- *mit Aqua dest. ad 1000 ml*

Zur Durchführung der Versuche wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit dem ausgewählten Antikörper beschichtet, die freien Bindungsstellen mit Absättigungslösung geblockt und anschließend wurde das entsprechende FITC-makrierte Peptid zugegeben. Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde mit einem Plattenfluoreszenzphotometer (Fa. Tecan, Spectra Fluor Plus) durchgeführt.

Das genaue Versuchsdesign zur Testung von mAB 6H4 mit FITC-P1 und FITC-P2 ist in Tabelle 11 dargestellt; die Versuchsbedingungen zur Prüfung von mAB F89 mit FITC-P3 sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 11: Versuchsdesign zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von FITC-P1 und FITC-P2 mit mAB 6H4

	Proben			
	1	2	3	4
mAB 6H4 150 µl	1:1000 (150ng/Kavität)	1:10.000 (15ng/Kavität)	1:50.000 (3ng/Kavität)	1:100.000 (1.5ng/Kavität)
Inkubationszeit,- temperatur	16 h, 4 °C			
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer je Kavität			
Absättigungslösung	300 µl je Kavität			
Inkubation	37 °C, 60 min			
Waschen	3 x waschen mit 300 µl Waschpuffer je Kavität			
FITC P1/2	200 µl FITC-P1 (1.23 ng/µl) oder 200µl FITC-P2 (4,8 ng/µl)			
Waschen	3 x waschen mit 300 µl Waschpuffer je Kavität			
Messung Photometer	485/630 nm (Excitation/Emission)			

Tabelle 12: Versuchsdesign zur Prüfung der Bindungsfähigkeit von mAB F89 mit FITC-P3

	Probe		
	1	2	3
mAB F89 (150 µl)	1:5000 (30 ng/Kavität)		
Inkubationszeit, -temperatur	16 h, 4 °C		
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer je Kavität		
Absättigungslösung	300 µl je Kavität		
Inkubation	37 °C, 60 min		
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer je Kavität		
FITC-P3	200 µl (5 ng/µl)	200 µl (0.5 ng/µl)	200 µl (0.05 ng/µl)
Inkubationszeit, -temperatur	37 °C, 60 min		
Waschen	3 x 300 µl Waschpuffer je Kavität		
Messung Photometer	485/630 nm		

4.2 Kapillarelektrophoretische Darstellung der Bindung von mAB F89 mit FITC-P3

Für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen stand eine Messapparatur der Firma Beckman zur Verfügung. Diese besteht aus einer Kapillarelektrophoresekammer PACE-MDQ (Best.-Nr. 149872, Fa. Beckman) mit einer integrierten Spannungsquelle und einem Fluoreszenzdetektor. Daran ist ein ein Argon Ion Laser (Mod 240 V; Best.-Nr. 727622, Fa. Beckman Coulter) angeschlossen (Abbildung 19).

**Abbildung 19: Kapillarelektrophoresekammer mit Detektor (links) und Argon Ion Laser (rechts)**

In der Kapillarelektrophoresekammer (Schematischer Aufbau siehe Abbildung 20) befindet sich eine 20 cm lange Quarzkapillare (Best.-Nr. 338475, Beckman Coulter), die an beiden Enden in ein Gefäß mit Laufpuffer eintaucht. Die zur elektrophoretischen Auftrennung notwendige Spannung wird durch zwei parallel zu den Kapillaren verlaufenden Elektroden übertragen.

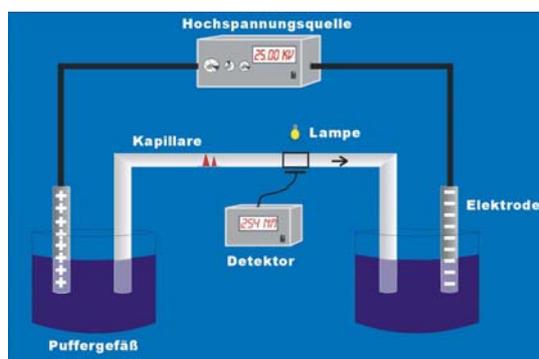


Abbildung 20: Schematische Messapparatur für die Kapillarelektrophorese (aus www.tu-bs.de/ce-jpg.de)

Vor der elektrophoretischen Auftrennung und Messung einer Probe muss die Quarzkapillare in einer bestimmten Reihenfolge mit Regenerator und Laufpuffer gespült werden; die Zusammensetzung ist im Anschluss an Tabelle 13 aufgeführt. Dazu wurde ein Programm entwickelt, das Tabelle 13 entnommen werden kann. Darin sind auch alle für eine Messung notwendigen Einstellungen (Drucke, Spülzeiten, Spannung und Wellenlängeneinstellungen) zur Durchführung einer Messung aufgeführt.

Tabelle 13: Programmierung der CE-LIF

	Einstellung	Zeit	Puffer
Rinse-pressure I	20 psi	2 min	NaOH
Rinse pressure II	20 psi	1 min	Laufpuffer
Inject pressure I	2 psi	15 s	Probe
Inject pressure II	2 psi	5 s	Laufpuffer
Separate voltage	26 KV	5 min	Laufpuffer
Excitation	488 nm		
Emission	512 nm		

Laufpuffer:

- 4.48 g Tricine (Best.-Nr. T-5816; Fa. Sigma)
- mit 100 ml Aqua dest. auffüllen,
- mit NaOH auf pH 8.0 einstellen
- 0.1g BSA (Kat.-Nr. 1.12018. Fa. Merck)
- 0.1 g N-octyl-β-D-Glycosid (Best.-Nr. 0-9882, Fa. Sigma)

Regenerator:

- 2 g NaOH (Kat.-Nr. 106498, Fa. Merck)
- in 100 ml Aqua dest. Lösen

Für eine Messung einer Probe ist ein Mindestvolumen von 20 µl notwendig.

Wie bereits erläutert, ist zum Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{Sc} erforderlich, dass FITC-P3 und der FITC-P3-F89-Komplex in etwa gleicher Intensität kapillarelektrophoretisch nachweisbar sind. Zu diesem Zwecke wurden jeweils 10 µl einer FITC-P3 Lösung (54 pg/µl; Lösungsmittel: Laufpuffer) mit 10 µl unterschiedlich konzentrierter mAB F89-Lösung (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ng/µl; Lösungsmittel: Laufpuffer) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1 nl wurde in die Kapillarelektrophorese injiziert und unter den in Tabelle 13 genannten Bedingungen getrennt.

4.2.1 Ermittlung der Nachweisgrenze für PrP^c

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze von rekombinanten PrP^c mittels CE-LIF wurde das in Tabelle 14 dargestellte Versuchsdesign gewählt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zunächst PrP^c mit mAB F89 für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Anschluß daran wurde FITC-P3 hinzugefügt und nach weiteren 15 min kapillarelektrophoretisch getrennt (Bedingungen siehe Tabelle 13).

Tabelle 14: Versuchsdesign zur Bestimmung der Nachweisgrenze von PrP^c mittels CE-LIF

		Probe									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PrP^c	(ng/μl)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.02
	(μl)	5									
mAB F89	(ng/μl)	1.25									
	(μl)	10									
FITC- P3	(ng/μl)	0.054									
	(μl)	10									

4.2.2 Nachweisbarkeit von PrP^{sc} in Hirnhomogenat

Zum Nachweis von PrP^{sc} wurde zunächst hochaufgereinigtes PrP^{sc} aus einem definierten Hirngewebepool mittels Methode I (C 3.1.1) und SPE-Kartuschenaufreinigung hergestellt (Details hierzu C 3.3.2.1). Das gewonnene Pellet wurde in 20 μl Aqua dest. gelöst. Das Versuchsdesign zur Messung ist in Tabelle 15 wiedergegeben. Von den Proben wurde jeweils 1 nl in die Kapillarelektrophorese injiziert und wie unter Tabelle 13 beschrieben analysiert.

Tabelle 15: Versuchsdesign zur Bestimmung von PrP^{Sc} mittels CE-LIF

		Probe									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PrP^{Sc}	Verdünnung	1:1*	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
	(mg ^{**} /µl)	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.157	0.08	0.4	0.02	0.01
	(µl)	5									
mAB F89	(ng/µl)	1.25									
	(µl)	10									
FITC- P3	(ng/µl)	0.054									
	(µl)	10									

* unverdünnt, ** Hirn-äquivalent

Artifizuell kontaminierter Liquor wurde mit dem in C 2.2 und C 2.2.1 beschriebenen Verfahren hergestellt. Um eine höhere Reinheit der Liquorpräparationen zu erhalten, wurde eine Kombination des HFIP- und des SPE-Verfahrens durchgeführt. Die dazu benötigten Materialien sind in den Kapiteln C 3.2.1 und C 3.3.2 aufgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 21 wiedergegeben.

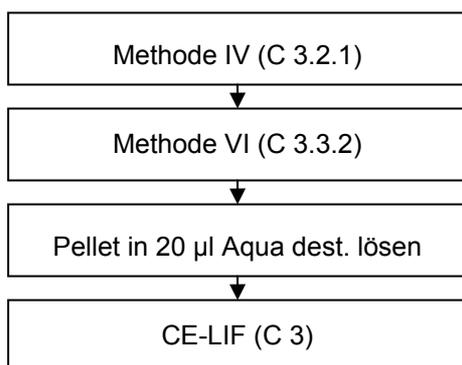


Abbildung 21: Kombinationsverfahren aus Methode IV und VI zur Aufreinigung von PrP^{Sc}-kontaminierter Cerebrospinalflüssigkeit

D Ergebnisse

1 Bewertung konventioneller Nachweisverfahren für PrP^c

Der Nachweis von PrP^{sc} in organischer Matrix mittels CE-LIF erfordert eine Aufreinigung des Probenmaterials. Damit die Effektivität der geprüften Verfahren bzw. einzelner Verfahrensschritte besser eingeschätzt werden konnte, wurde zunächst zum Nachweis von PrP^{sc} ein ELISA (Bio Rad[®]), ein Dot-EIA sowie ein Westernblot eingesetzt. Da bei diesen Untersuchungen aufgrund begrenzter Probenmenge zum Teil auf unterschiedliche PrP^{sc}-haltige Hirnhomogenate zurückgegriffen werden musste, wurde die Sensitivität der einzelnen Verfahren mittels rekombinantem PrP^c geprüft. Parallel dazu erfolgte die Untersuchung PrP^{sc}-haltiger Proben.

1.1 ELISA

Die Ergebnisse bezüglich des Nachweises definierter PrP^c-Mengen mittels ELISA-Technik sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Auswertung dieser Daten nach statistischen Kriterien ergab, dass sich die durchschnittlichen OD-Werte von PrP^c-Konzentrationen ≥ 0.04 ng /100 μ l signifikant von dem Durchschnittswert der Kontrolle unterschieden. Nimmt man allerdings die von Bio-Rad zur Berechnung des „cut offs“ vorgegebenen Kriterien (cut off = Durchschnitt aus 4 Negativkontrollen + 0.210), so liegt die Nachweisgrenze zwischen 0.16 und 0.31 ng/100 μ l.

Tabelle 16: Nachweis definierter PrP^c-Mengen im Bio-Rad ELISA

PrP ^c (ng/100 μ l)	Extinktion (OD)			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	\bar{x} ($\pm s$)
0	0.023	0.026	0.019	0.023 (± 0.004)
0.005	0.015	0.005	0.015	0.011 (± 0.005)
0.01	0.022	0.007	0.029	0.019 (± 0.011)
0.02	0.026	0.023	0.04	0.029 (± 0.009)
0.04	0.051	0.031	0.055	0.045 (± 0.013)
0.08	0.081	0.077	0.115	0.091 (± 0.02)

Fortsetzung Tabelle 16:

0.16	0.138	0.157	0.246	0.18 (\pm 0.058)
0.31	0.315	0.28	0.543	0.38 (\pm 0.14)
0.63	0.563	0.676	0.972	0.737 (\pm 0.21)
1.25	1.382	1.542	1.632	1.52 (\pm 0.13)
2.5	1.89	1.942	1.944	1.93 (\pm 0.03)
5	2.002	1.993	1.971	1.98 (\pm 0.016)
10	1.974	1.979	1.976	1.98 (\pm 0.003)
20	1.956	1.947	1.96	1.95 (\pm 0.006)

Die Untersuchung abgestufter PrP^{Sc}-haltiger Hirnhomogenat-Verdünnungen im ELISA lieferte ein vergleichbares Resultat, wie Tabelle 17 zeigt.

Tabelle 17: Nachweis abgestufter PrP^{Sc}-Mengen im Bio-Rad ELISA

PrP^{Sc} (mg Hirnäquivalent/100μl)	Verdünnungsstufe	Extinktion (OD)
0.008	1:4096	0.034
0.016	1:2048	0.041
0.03	1:1024	0.074
0.07	1:512	0.144
0.13	1:256	0.274
0.26	1:128	0.571
0.52	1:64	0.898

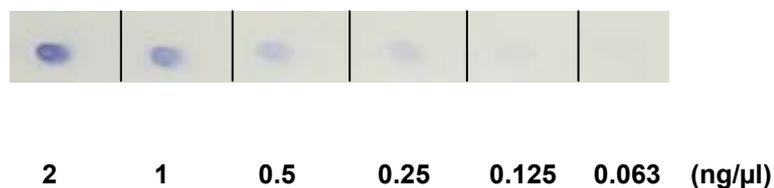
Fortsetzung von Tabelle 17:

1.05	1:32	1.323
2.1	1:16	1.780
4.2	1:8	1.787
8.3	1:4	1.777
16.7	1:2	1.527
33.3	1:1*	1.738

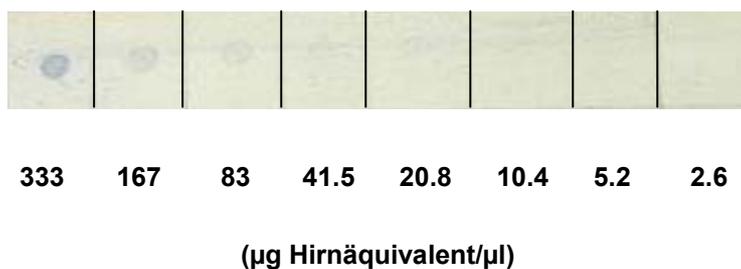
* unverdünnt

1.2 Dot-EIA

Die Untersuchung definierter, in Aqua dest. gelöster PrP^C-Mengen ergab, dass die minimal nachweisbare Menge bei 0.25 ng/Dot lag (vergl. Abbildung 22).

Abbildung 22: Dot-EIA von PrP^C (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen

Parallel durchgeführte Untersuchungen mit bekannt PrP^{Sc}-haltigem Hirnmaterial ergaben ebenfalls positive Befunde. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, konnte eine PrP^{Sc}-Menge, die 83 μg des verwendeten Hirngewebes entsprach, noch erkannt werden.

Abbildung 23: Dot-EIA von PrP^{Sc} (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen

1.3 Westernblot

PrP^c

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis nach Durchführung eines Westernblot mit abgestuften PrP^c-Mengen. Dazu wurden 20, 10, 5, 2.5 und 1.25 ng PrP^c eingesetzt. Dabei wird deutlich, dass die Nachweisgrenze zwischen 2.5 ng (lane 4) und 1.25 ng (lane 5) liegt.

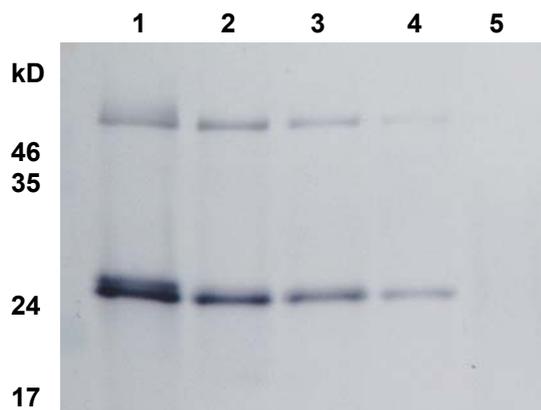


Abbildung 24: Nachweisbarkeit abgestufter PrP^c-Mengen in PBS; Nachweisverfahren Westernblot. Lane 1) 20 ng PrP^c; Lane 2) 10 ng PrP^c; Lane 3) 5 ng PrP^c; Lane 4) 2.5 ng PrP^c; Lane 5) 1.25 ng PrP^c

PrP^{sc}

Das Untersuchungsergebnis abgestufter PrP^{sc}-Mengen verdeutlicht Abbildung 25. In Lane 1 wurde ein Größenmarker aufgetrennt und geblottet. Dabei ist der Bereich zwischen 24 und 35 kD von Interesse und muss im Vergleich zu den Banden der anderen aufgetrennten Proben gesehen werden. In lane 2 und 3 wurden 20 bzw. 10 ng PrP^c aufgetrennt, wobei jeweils eine Bande im Bereich von ca. 30 kD zu erkennen ist. Lane 4 bis 11 zeigen PrP^{sc} in abgestuften Mengen mit 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 und 0.3125 mg Hirnäquivalent. Die PrP^{sc}-haltigen Hirnproben wiesen das typische Drei-Banden Glykosylierungsmuster für PrP^{sc} auf. Der zweifach glykosylierte Anteil hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kD, während der einfach glykosylierte Banden bei ca. 24 kD zeigt. Nicht glykosyliertes PrP^{sc} hat mit unter 20 kD das geringste Molekulargewicht. Die Nachweisgrenze liegt für dieses PrP^{sc}-haltige Material im Bereich zwischen 0.625 und 1.25 mg Hirnäquivalent.

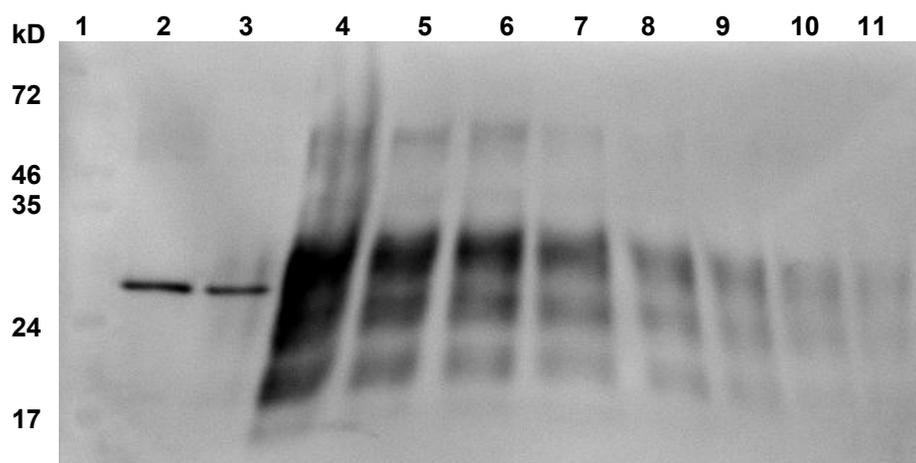


Abbildung 25: Titration von PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat; Nachweisverfahren Westernblot. Lane 1: Größenmarker, Lane 2: Kontrolle 20 ng PrP^C, Lane 3: Kontrolle 10 ng PrP^C, Lane 4: Aufgereinigtes Hirnhomogenat unverdünnt, Lane 5-11: Aufgereinigtes Hirnhomogenat 1:2 bis 1:128 verdünnt

Die mit PrP^{Sc} erzielten Ergebnisse zeigen, dass das ELISA-Verfahren in quantitativer Hinsicht dem Dot-EIA bzw. den Westernblot überlegen ist. Allerdings liefert letzterer zusätzliche Informationen (Molekulargewicht, Grad der Glykosylierung), was die Aussagekraft dieses Nachweisverfahrens erhöht.

2 Physikalisch-chemische Anreicherungsverfahren für PrP^{Sc}

Da, wie bereits erwähnt, die CE-LIF sehr störanfällig gegenüber Matrixeffekten ist, muss das Probenmaterial einer speziellen Aufbereitung zugeführt werden. Neben der Elimination von interferierenden Begleitsubstanzen hat diese das Ziel, PrP^{Sc} in ein möglichst kleines Testvolumen zu konzentrieren, da nur 1 nl in der Elektrophorese untersucht wird. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Versuche zur Abtrennung von Matrixbestandteilen und zur Aufkonzentrierung von PrP^{Sc} durchgeführt. Zur qualitativen und quantitativen Einschätzung der Resultate wurden der ELISA (Bio-Rad) und der Dot-EIA herangezogen.

2.1 Anreicherung von PrP^{Sc} mittels Zentrifugation

Die mit den Methoden I sowie IIa und IIb nach WADSWORTH ET AL. (2001) erzielten Resultate sind in Abbildung 26 dargestellt. Die mit Methode I geprüfte Extraktkonzentration entsprach 33 mg Hirnprobe pro 100 µl; zur Untersuchung der Methoden IIa und IIb wurden Extraktkonzentrationen äquivalent 100 mg Hirngewebe pro 100 µl eingesetzt. Obwohl das Gewebsmengenäquivalent bei der Prüfung der Methoden IIa und IIb um den Faktor 3 höher war als bei Methode I, waren die entsprechenden Extinktionen deutlich (um bis zu 80 %) niedriger. Dies weist darauf hin, dass es bei dem aufwendigen Präparationsverfahren zu

nicht unerheblichen Verlusten an PrP^{Sc} kommt. Da der Extrakt optisch als „rein“ betrachtet wurde, wurde er einer Messung in der CE-LIF zugeführt. Die Ergebnisse diesbezüglich sind im Kapitel D 3.2.1 nachzulesen.

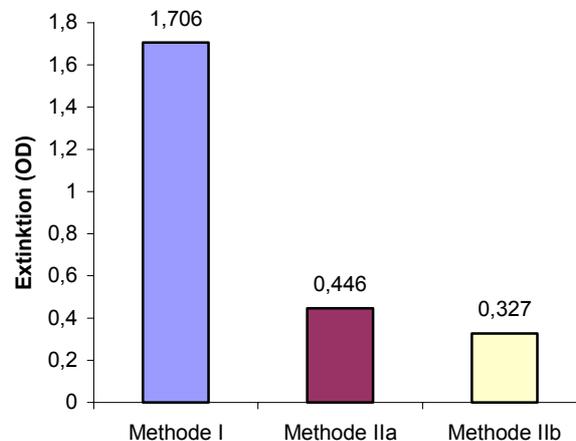


Abbildung 26: Vergleich von Aufreinigungsverfahren für PrP^{Sc} mittels Zentrifugation; Methode I: Extraktkonzentration äquivalent 33 mg Hirn/ 100 µl; Methoden IIa und IIb: Extraktkonzentration: 100 mg Hirn/ 100 µl; Nachweisverfahren: ELISA

Die Überprüfung des Anreicherungsverfahrens nach SCHMERR ET AL. (2000) (Methode III) erfolgte mittels Dot-EIA. Dabei wurden ausgewählte Überstände einzelner Zentrifugationsschritte und Pellets in die Untersuchung miteinbezogen. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, ist nur an Position 4 eine Blaufärbung festzustellen; in diesem Testfeld wurde der „End-Extrakt“ geprüft, in dem die Anreicherung von PrP^{Sc} erwartet wurde. Auf den anderen Testfeldern verlief der Dot-EIA negativ. Dies bedeutet, dass sich in den „Abfall-Fractionen“ keine nachweisbaren PrP^{Sc}-Konzentrationen befanden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde Fraktion 4 für die CE-LIF selektiert.

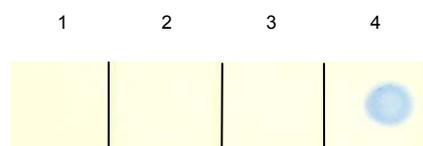


Abbildung 27: Dot-EIA ausgewählter Hirnhomogenat-Fractionen gewonnen nach Methode III: Proben 1 – 3: Pellets bzw. Überstände nach Ultrazentrifugation; Position 4: PrP^{Sc}-haltiges Endextrakt nach letzter Ultrazentrifugation

2.2 Extraktion mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Methode IV)

2.2.1 Hirngewebe

Zur Prüfung der Effektivität der Extraktion von PrP^{Sc} aus Hirngewebe mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol wurde dieses Verfahren ebenfalls mit der Methode I verglichen. Die nach Anwendung von Methode I im ELISA eingesetzte Extraktkonzentration war äquivalent 33 mg / 100 µl; der entsprechende Wert betrug für Methode IV 200 mg / 100 µl. Abbildung 28 ist zu entnehmen, dass der mit Methode I gewonnene Extrakt zu einer deutlich höheren Extinktion führt als der nach Methode IV. Dabei ist noch zu berücksichtigen, dass beim letztgenannten Verfahren die dreifache Menge an Hirngewebe eingesetzt wurde.

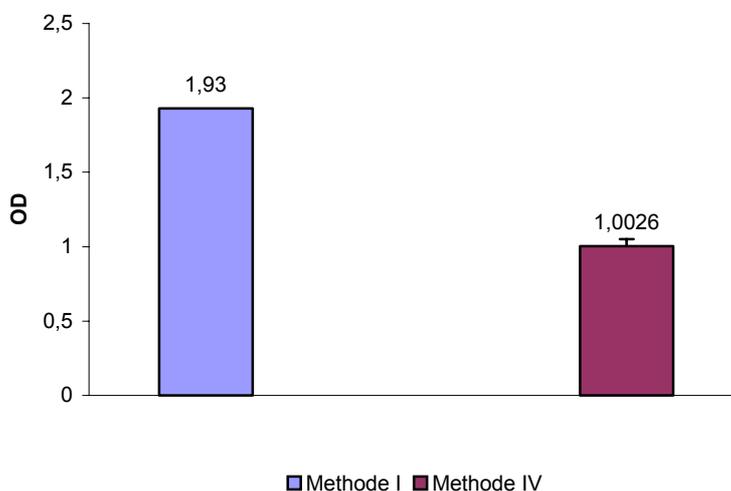


Abbildung 28: Vergleich der Extrahierbarkeit von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat. Methode I (BioRad-Verfahren): Extraktkonzentration äquivalent 33 mg Hirn/ 100 µl; Methode IV (1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol): Extraktkonzentration äquivalent 100 mg Hirn/ 100 µl; Nachweisverfahren: ELISA

2.2.2 Liquor

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurde vorverdauter Liquor artifizuell mit PrP^{Sc}-haltigem Hirngewebe (166 µg/µl) kontaminiert. Dieses Material wurde entweder direkt im ELISA untersucht, oder ein Aliquot zuvor mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol extrahiert. Die dabei erzielten OD-Werte sind in Abbildung 29 wiedergegeben. Daraus ist ersichtlich, dass die Wiederfindung durch den Extraktionsprozess nur um ca. 12 % reduziert worden ist.

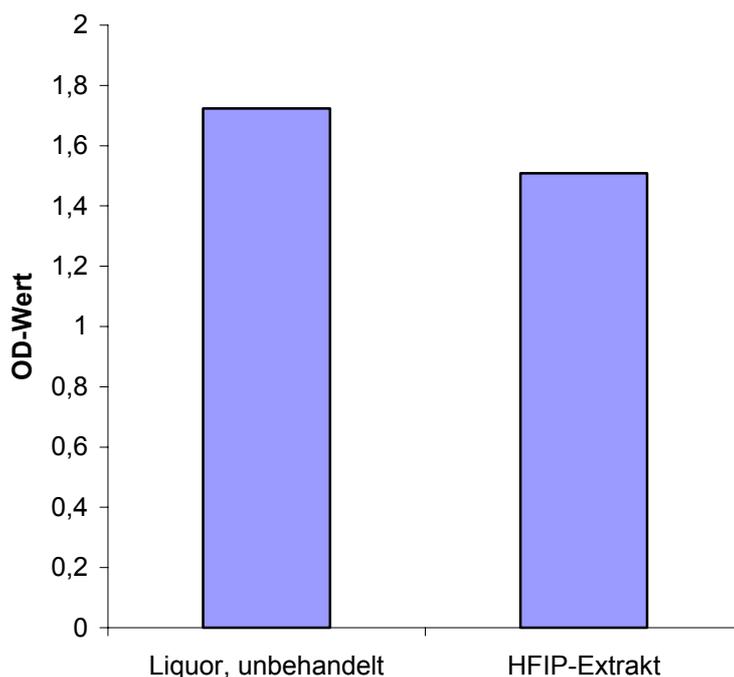


Abbildung 29: Vergleich der OD-Werte von artifiziell mit PrP^{Sc}-kontaminiertem nativem Liquor und Liquorextrakt (Nachweisverfahren: ELISA)

2.3 Chromatographische Aufreinigungsverfahren

2.3.1 Präparative HPLC

Als weiteres Verfahren zur Aufreinigung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat wurde eine präparative HPLC-Methode geprüft. Dabei wurde ein nach Methode I hergestellter Extrakt (äquivalent 100 mg Hirngewebe) an einer Polyhydroxyethyl A Säule getrennt. Über einen Zeitraum von 32 min wurden 8 Fraktionen zu je 4 min gewonnen, die im ELISA auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} geprüft wurden. Die ersten Untersuchungen verliefen zunächst recht Erfolg versprechend: in der 7. Fraktion (Elutionszeit 24-28 min) war ein deutlicher Anstieg der Extinktion im ELISA festzustellen (vergleiche Abbildung 30).

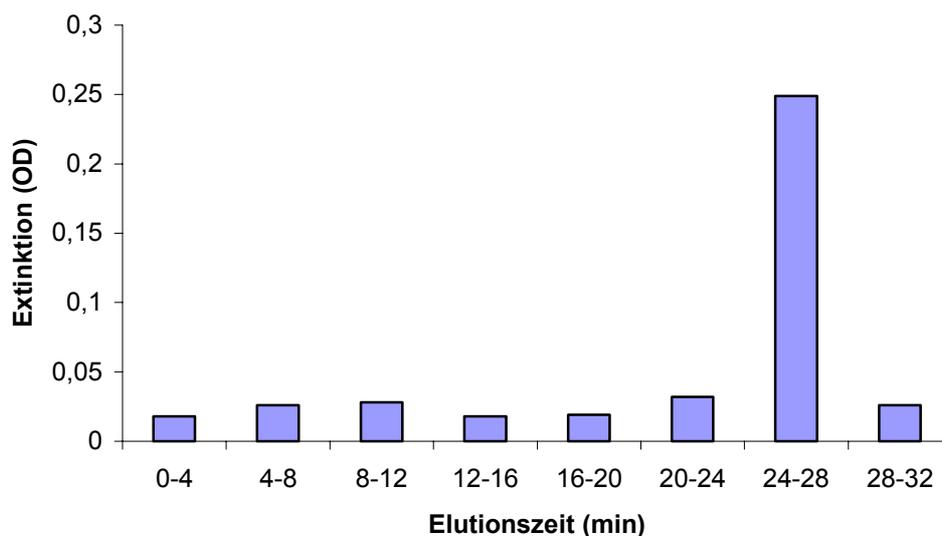


Abbildung 30: Fraktionierung eines PrP^{sc}-haltigen Hirnextraktes nach HPLC (PrP^{sc}-Nachweis: ELISA)

Allerdings konnten diese Resultate bei weiteren Versuchen nicht mehr reproduziert werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass mit zunehmender Säulenverwendung PrP^{sc} immer unregelmäßiger und vor allem über mehrere Fraktionen hinweg eluiert wurde. Der in Abbildung 31 wiedergegebene Dot-EIA illustriert diesen Sachverhalt. Bei diesem Versuch war PrP^{sc} in den Fraktionen 1, 2, 5, 6 und 7 nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde HPLC als Anreicherungsverfahren nicht mehr weiter verfolgt.

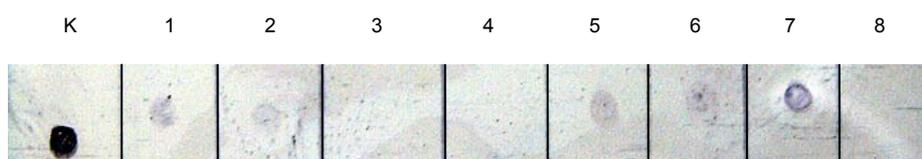


Abbildung 31: Nachweis von PrP^{sc} in HPLC-Fractionen eines Hirnextraktes; K: Positiv-Kontrolle: PrP^c = 200ng/μl; Positionen 1-8: Eluate nach 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 und 32 min

2.3.2 SPE-Kartuschenaufreinigung

2.3.2.1 Hirngewebe

Da sich die präparative Aufreinigung von PrP^{sc}-haltigem Hirnhomogenat mit HPLC als ein wenig praktikables Verfahren erwiesen hat, wurde alternativ die Anwendbarkeit von Einmalkartuschen für die Reindarstellung von PrP^{sc} überprüft. Die dabei eingesetzte

Hirnmenge betrug 100 mg; nach der Durchführung der Reinigungsschritte wurde der Extrakt in 20 μl Aqua dest. gelöst. Die Untersuchung von Verdünnungsstufen (1:2) mittels DOT-Blot zeigte, dass PrP^{Sc}-Konzentrationen äquivalent einer Hirngewebsmenge von 0.625 mg/ μl noch nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 32). Da die Extrakte sich optisch als "rein" erwiesen, wurden sie für CE-LIF-Untersuchungen ausgewählt. Diese Ergebnisse sind in Kapitel 3.2.3 zu finden.

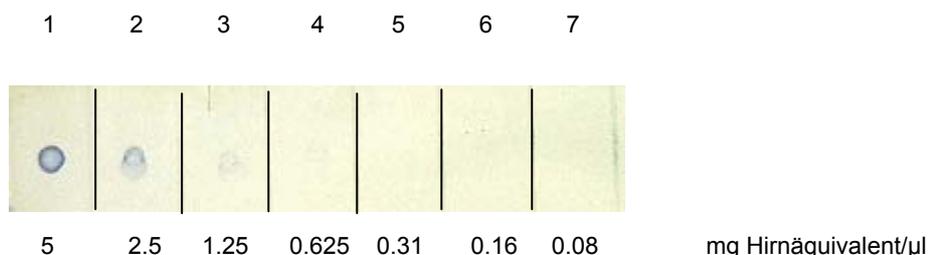
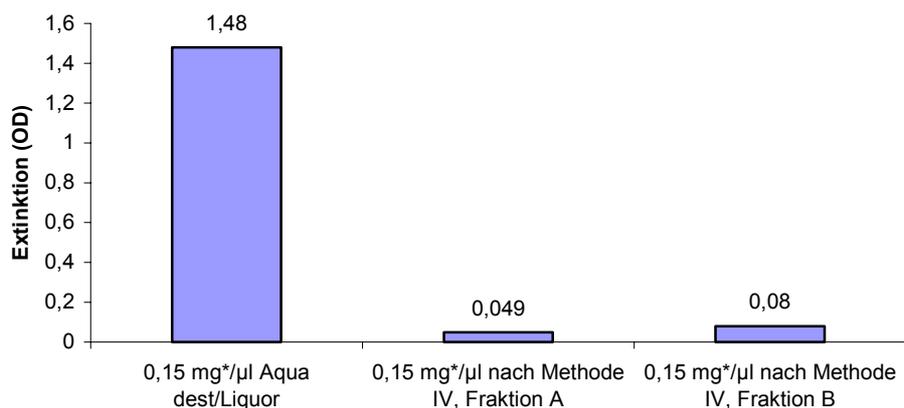


Abbildung 32: Dot-EIA von PrP^{Sc} (gelöst in Aqua dest.) in abgestuften Konzentrationen nach Durchführung des SPE-Aufreinigungsverfahrens;

2.3.2.2 Liquor

In gleicher Weise wurde die Anwendbarkeit von Einmalkartuschen zur Aufreinigung von artifiziell kontaminiertem Liquor geprüft (Abbildung 33). Der zur Kontamination benötigte PrP^{Sc}-haltige Extrakt wurde durch Präparation von Hirngewebe mit Methode I gewonnen. Dieser wurde in Aqua dest. gelöst und mit vorverdautem Liquor 1:1 verdünnt, so dass die Konzentration äquivalent einer Hirnmenge von 0.15 mg/ μl entsprach. Nach dem Auftragen der Liquor-Hirnsuspension auf die SPE-Kartusche (Methode VI) wurde mit einem ACN-haltigen Eluenten A und einem wässrigen Eluenten B eine weitere Aufreinigung durchgeführt. Die gesammelten Eluate wurden nach dem Eindampfen und Lösen in Aqua dest. auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} im ELISA untersucht. Wie Abbildung 33 zeigt, war weder im Eluat A noch im Eluat B ein Nachweis möglich. Auch eine Erhöhung der Eluentmenge bzw. eine Änderung der Elutionsgeschwindigkeit erbrachten ebenfalls das gleiche Ergebnis. Dies bedeutet, dass bei der Aufreinigung von PrP^{Sc}-haltigem Material mittels SPE-Kartuschen doch mit nicht unerheblichen Verlusten gerechnet werden muss; ebenso ist durch das Einwirken der unterschiedlichen Lösungsmittel eine Änderung der PrP^{Sc}-Struktur denkbar, die dazu führt, dass die im ELISA nach Bio-Rad eingesetzten Antikörper nicht mehr zu binden vermögen.



* mg Hirnäquivalent

Abbildung 33: Vergleich der OD-Werte von mit PrP^{Sc} artifiziell kontaminiertem Liquor vor und nach einer Aufreinigung mit SPE-Kartuschen

2.4 Aufreinigung von PrP^{Sc} mit Kombinationsverfahren

2.4.1 Hirngewebe

Für eine Untersuchung der Probenkonzentration auf PrP^{Sc} aus den Kombinationsverfahren 1 bis 3 wurden sowohl ELISA als auch der Dot-EIA eingesetzt.

Im Kombinationsverfahren 1 wurden nacheinander die Methoden I (Bio Rad-Verfahren) und IV (Extraktion mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol) eingesetzt. Als Kontrolle diente ein nur mittels Methode I behandeltes Hirngewebe. Bei der Beurteilung des Ergebnisses muss berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Hirnmengen nicht gleich waren. Aus diesem Grund ist der tatsächliche Verlust an PrP^{Sc} nach zusätzlicher Extraktion mit Hexafluoroisopropanol um den Faktor 3 höher einzustufen, als das Diagramm (Abbildung 34) zu vermitteln vermag.

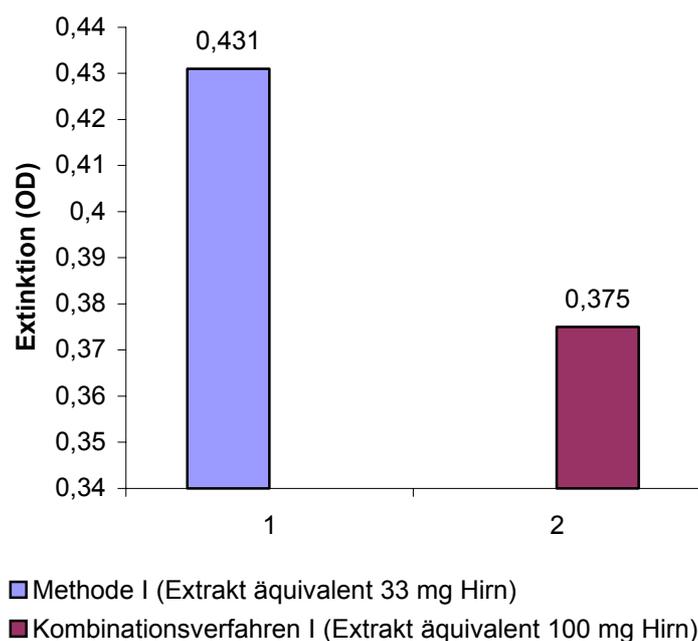


Abbildung 34: OD-Werte von PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat im ELISA nach Anwendung unterschiedlicher Extraktionsverfahren

Im Kombinationsverfahren 2 wurde die Ultrazentrifugation nach Methode III mit der Extraktion nach Methode IV gekoppelt. Die eingesetzte äquivalente Hirnmenge betrug dabei 0.2 mg/µl. Nach Durchführung der Extraktion wurden die beiden Phasen eingedampft und in 10 µl Aqua dest. gelöst. Dabei konnte PrP^{Sc} nur in der HFIP-Phase festgestellt werden (Abbildung 35). Dieses Ergebnis zeigt, dass PrP^{Sc} aus wässrigen Phasen mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol extrahiert werden kann.



Abbildung 35: Dot-EIA zum Nachweis von PrP^{Sc} nach Durchführung des Kombinationsverfahrens 2: Position 1) wässrige Phase , Position 2) HFIP-Phase

Für einen Nachweis von PrP^{Sc} nach einer Aufreinigung von Hirnhomogenat mit dem Kombinationsverfahren 3, wurde ebenfalls der Dot-EIA gewählt. Die für die Ultrazentrifugation nach Methode III eingesetzte äquivalente Hirnmenge betrug 0.2 mg/µl. Das Pellet wurde dann einer weiteren Aufreinigung mittels SPE-Kartusche unterzogen. Die dabei gewonnenen Eluate wurden eingedampft und nach Lösen in Aqua dest. im Dot-EIA auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} untersucht. Wie Abbildung 36 zeigt, war ein PrP^{Sc}-Nachweis

nur im ACN-haltigen Eluat B möglich; dagegen war keine Blaufärbung im wässrigen Eluat A zu beobachten.

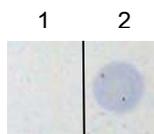
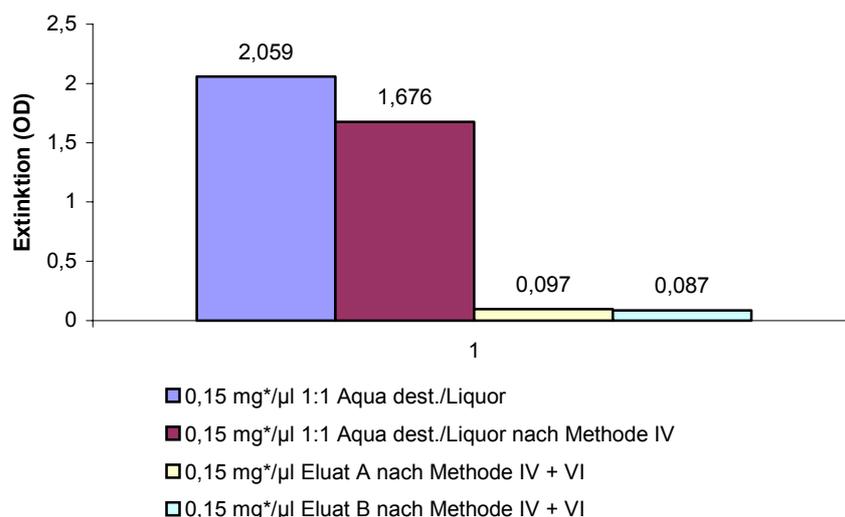


Abbildung 36: Nachweis von PrP^{sc} nach Aufreinigung von Hirnhomogenat im Extrakt nach Durchführung des Kombinationsverfahrens 3: Position 1) ACN-haltiges Eluat A, Position 2) wässriges Eluat B)

2.4.2 Liquor

Zur Aufreinigung von PrP^{sc} aus artifiziell kontaminiertem Liquor wurden die Methoden IV (Extraktion mit 1,1,1,3,3,3 -Hexafluoroisopropanol) und Methode VI (SPE-Kartuschen) gewählt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 37 ersichtlich. Daraus geht hervor, dass beide Aufreinigungsschritte zu einem Verlust von PrP^{sc} führen. Die Graphik könnte den Eindruck vermitteln, dass der Verlust bei Anwendung von SPE-Kartuschen deutlich größer sei als der bei HFIP-Extraktion; allerdings ist zu berücksichtigen, dass sich der OD-Wert der unbehandelten Proben Plateau-Bereich der sigmoidartigen Standardkurve befindet, so dass eine quantitative Aussage nicht möglich ist.



* mg Hirnäquivalent

Abbildung 37: Nachweisbarkeit von PrP^{sc} in artifiziell kontaminiertem Liquor vor und nach Durchführung des Kombinationsverfahrens aus Methode IV und V; (Nachweisverfahren: ELISA)

2.5 Affinität- bzw. Immunomagnetische Separation

Da die Aufreinigung von PrP^{Sc} mit konventionellen chemisch-physikalischen Verfahren zu nicht unerheblichen Verlusten des Analyten führte, wurde zusätzlich geprüft, inwieweit eine Affinität- bzw. Immunomagnetische Separation zu einer besseren Abtrennung von PrP^{Sc} führt. Als PrP^{Sc}-selektive Liganden sollten dabei Plasminogen und PrP-spezifische Antikörper zum Einsatz kommen.

2.5.1 Bindungsversuche mit Plasminogen-beschichteten Beads

Die Resultate der Versuche zur Bindung von PrP^{Sc} an Plasminogen-beschichtete Beads sind in Abbildung 38 dargestellt. Daraus geht hervor, dass der PrP^{Sc}-Gehalt der Ausgangsprobe einem OD von 1.978 im ELISA entsprach. Nach Behandlung dieser Probe mit Plasminogen-beschichteten Beads war nur noch ein OD von 1.019 messbar. Dies bedeutet, dass zumindest ein Teil von PrP^{Sc} mit den Plasminogen-beschichteten Beads aus dem Probenmaterial entfernt worden ist. Das Untersuchungsergebnis der Waschfraktion der Beads zeigt jedoch, dass PrP^{Sc}, wenn überhaupt, nur sehr „schwach“ an Plasminogen gebunden wird, denn der OD-Wert von 0,896 entspricht nahezu vollständig der Reduktion des Ausgangswertes nach Inkubation mit den Beads. Das Untersuchungsergebnis der Beads (kein PrP^{Sc} nachweisbar) unterstreicht die Richtigkeit dieses Resultates.

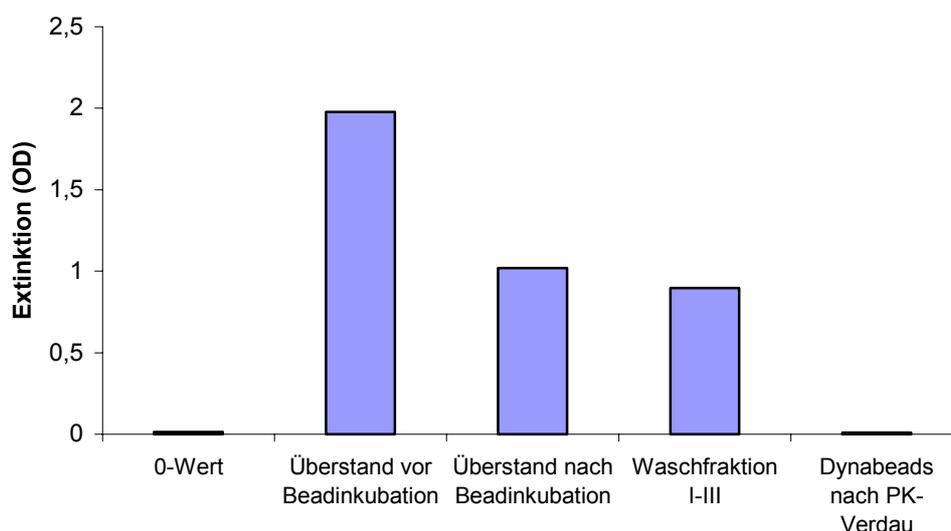


Abbildung 38: Nachweis von PrP^{Sc} nach Affinitätsmagnetischer Separation (Adsorbens: Plasminogen)

2.5.2 Bindungsversuche mit Antikörper-beschichteten Beads

2.5.2.1 Versuche zur Anreicherung von PrP^c und PrP^{sc} aus der Matrix PBS

PrP^c

Die Resultate der Versuche zur Bindung abgestufter Konzentrationen von PrP^c aus PBS mittel Antikörper-beschichteter Beads sind in Abbildung 39 wiedergegeben. Daraus ist ersichtlich, dass die Konzentrationen von PrP^c in den Proben nach Behandlung mit Antikörper-beschichteten Beads auf Bereiche abgesunken sind, die nahe der Nachweisgrenze liegen.

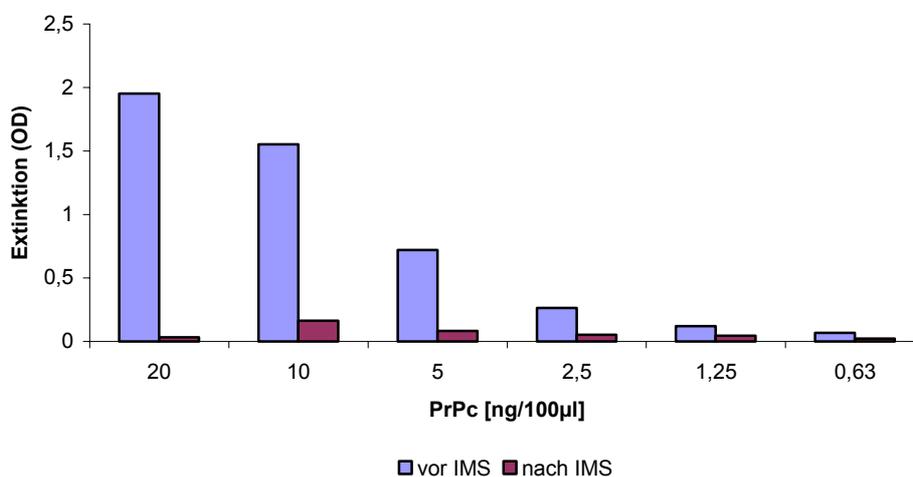


Abbildung 39: Nachweis abgestufter Konzentrationen von PrP^c in PBS vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

PrP^{sc}

Die Messung von PrP^{sc}-haltigen Proben vor und nach IMS im ELISA lieferte die in Abbildung 40 gezeigten Ergebnisse. Eine Bindung an die Dynabeads[®] fand offensichtlich statt, allerdings war der PrP^{sc}-Gehalt der Proben nach Inkubation mit Antikörper-beschichteten Beads immer noch sehr hoch. Das deutet darauf hin, dass die Bindung von PrP^{sc} entweder durch den gewählten Antikörper (F 89) nicht optimal stattfand oder dass die IMS von PrP^{sc} aus Hirnhomogenat-Verdünnungen matrixbedingt erschwert ist.

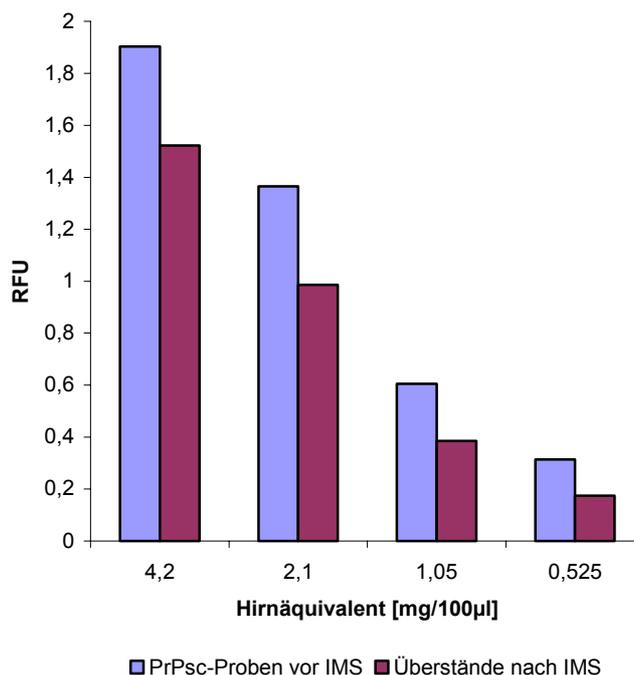


Abbildung 40: Nachweis von PrP^{sc} aus PBS-Hirn-Homogenat vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

2.5.2.2 Versuche zur Anreicherung von PrP^c bzw. PrP^{sc} aus Liquor

PrP^c

Auch bei diesen Untersuchungen sollte durch den Vergleich der Messergebnisse von Proben vor und nach der Durchführung der IMS ein indirekter Nachweis für eine Separation von PrP^c aus Liquor erbracht werden. Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, ist PrP^c nach der IMS zwar noch im Liquor nachweisbar, aber es ist eine deutliche Abnahme der Extinktion im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar. Der optische Eindruck, dass bei einer Konzentration von 10 ng PrP^c pro 100µl eine stärkere Bindung stattgefunden hätte als bei 40 bzw. 20 ng/100µl ist allein darauf zurückzuführen, dass diese Gehalte oberhalb des im ELISA quantifizierbaren Bereiches liegen.

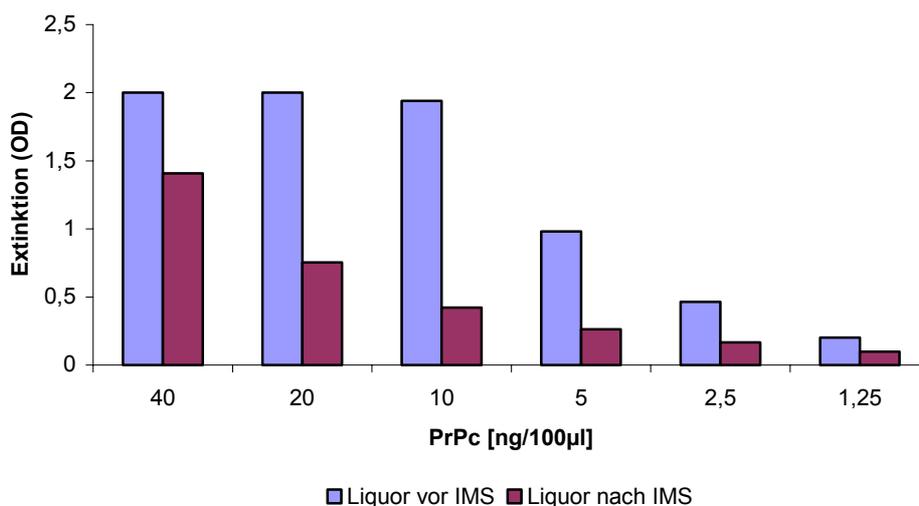


Abbildung 41: Nachweis von rekombinanten PrP^c in Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

PrP^{sc}

Die Resultate der Bindungsversuche von PrP^{sc} aus Liquor sind in Abbildung 42 dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass eine Bindung von PrP^{sc} an Antikörper-beschichtete Beads nur eingeschränkt feststellbar war; dies betrifft in erster Linie die Proben mit den höheren Konzentrationen an PrP^{sc} und damit auch an Hirngewebe. Nur in den niedriger konzentrierten Proben (0.525 mg Hirnäquivalent/100µl) nahm das Signal nach IMS deutlich ab. Dieses Verhalten dürfte vor allem auf Matrix-bedingte Störungen der IMS-zurückzuführen sein.

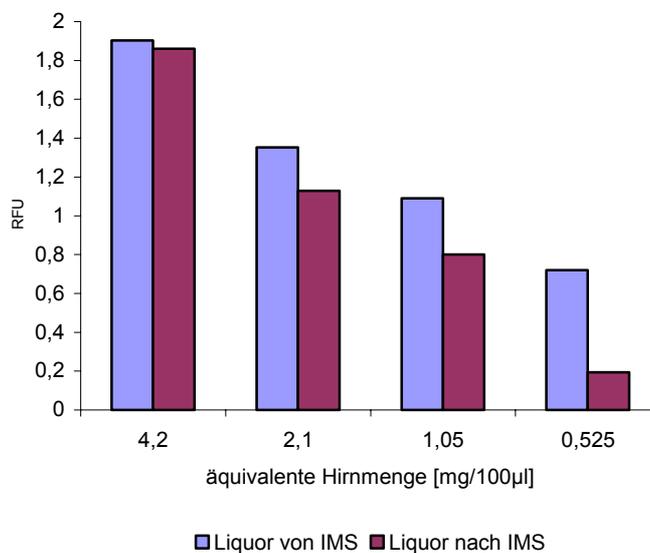


Abbildung 42: Nachweis von PrP^{sc} in Liquor vor und nach IMS; Nachweisverfahren ELISA

3 Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{sc} mittels CE-LIF

Wie in Kapitel C 3 bereits beschrieben, beruht der Nachweis von PrP^c bzw. PrP^{sc} mittels CE-LIF auf der Konkurrenz eines FITC-markierten Peptides mit PrP^c bzw. PrP^{sc} um die Bindung mit einem Antikörper. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von FITC-markiertem Peptid. Zur Durchführung dieses Tests ist ein FITC-markiertes Peptid notwendig, das mit einem Antikörper agiert. Auf der Suche nach dem geeigneten Peptid wurde zunächst ein Fluoreszenz-Immunoassay eingesetzt und dann das Prinzip auf die Kapillarelektrophorese übertragen. In einer weiteren Verdünnungsreihe wurde das richtige Verhältnis von FITC-markierten Peptiden und Antikörpern bestimmt und dann als Testsystem zur Messung von PrP^c bzw. PrP^{sc} eingesetzt.

3.1 Prüfung der Affinität zwischen PrP-spezifischen Antikörpern und FITC markierten Peptiden

Die Resultate der fluoreszenzimmunologischen Untersuchungen von FITC-P1 und FITC-P2 gegenüber mAB 6H4 wiesen darauf hin, dass keine Bindung zwischen den Antikörpern und dem FITC-markierten Peptid stattfand. Nach Inkubation der mit mAB 6H4 beschichteten Platte mit den Peptiden konnte kein Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der entsprechenden Kontrolle gemessen werden.

Demgegenüber führte die Prüfung des mAB F89 und FITC-P3 zu einem konzentrationsabhängigen Fluoreszenzsignal, das etwa doppelt so intensiv war als das der entsprechenden Kontrollen (Abbildung 43). Die Bindung von mAB F89 an die Kavität wurde zusätzlich durch eine Inkubation mit einem FITC-markierten Ziege-Anti-Maus-IgG Antikörper nachgewiesen (Abbildung 44). Auch bei diesem Versuch führte die Beschichtung mit mAB F89 zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Bindung von mAB F89 an die Oberfläche der Mikrotiterplatten sowie eine Bindung zwischen mAB F89 und FITC-P3 stattgefunden hat.

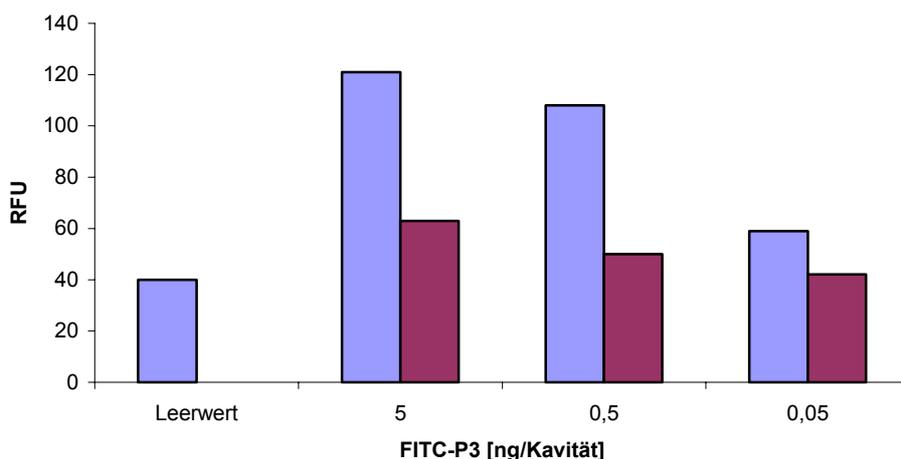


Abbildung 43: Intensität der Fluoreszenz nach Inkubation mAB F89 beschichteter Kavitäten mit abgestuften Mengen FITC-P3

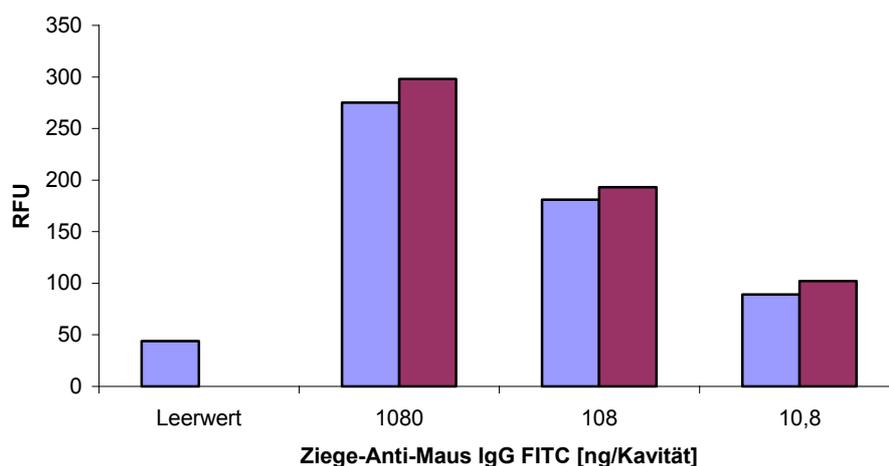


Abbildung 44: Überprüfung einer Bindung von mit mAB F89 vorinkubierten Kavitäten an Mikrotiterplatten mit abgestuften Mengen FITC-markierten Ziege-Anti-Maus Antikörpern im Doppelansatz

Den Resultaten des Fluoreszenz-Immunoassays zu Folge, liegt eine Affinität zwischen mAB F89 und FITC-P3 vor. Daher wurde versucht, diese Antikörper-Peptid Kombination für den Nachweis von PrP^C bzw. PrP^{sc} mittels CE-LIF einzusetzen.

Die Injektion von FITC-P3 (c = 54 pg/μl) in die Kapillarelektrophorese erbrachte einen Peak mit einer Retentionszeit von 1.53 min mit einem Peakmaximum bei RFU von 0.92 (Abbildung 45 A). Das Elektropherogramm einer Mischung aus FITC-P3 (c = 54 pg/μl) und mAB F89 (c = 10 pg/μl) zeigte einen geänderten Kurvenverlauf, bei dem ein Peak mit einer Retentionszeit von 0.77 min mit einem Peakmaximum von 0.92 RFU gemessen wurde

(Abbildung 45 B). Eine Reduktion der Konzentration an mAB F89 auf 1.25 pg führte bei konstanter FITC-P3-Menge zu zwei Peaks, deren Verhältnis ausgeglichen war (Abbildung 45 C).

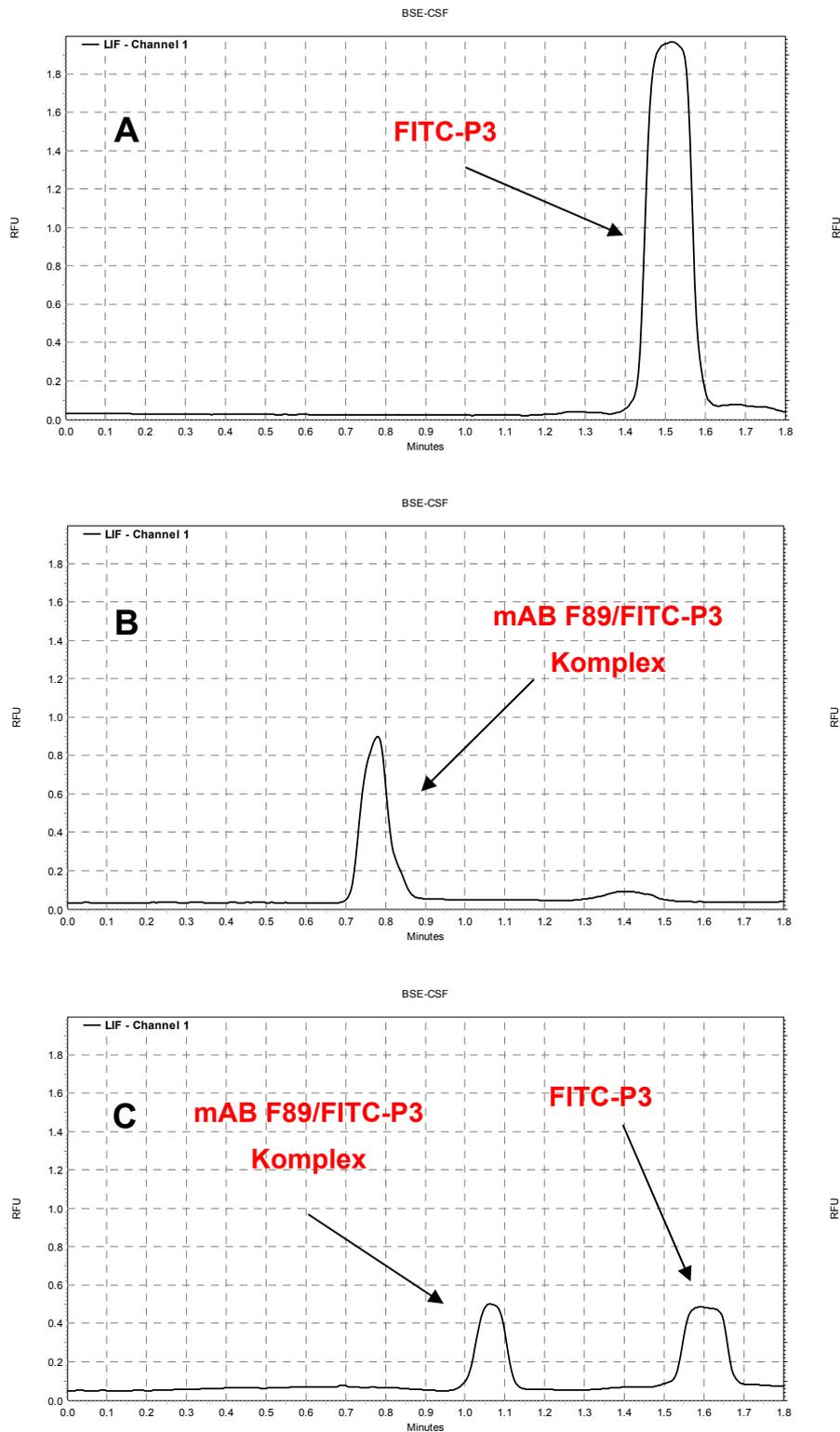


Abbildung 45: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC P3 54 pg/ml; B: 10 pg/ml mAB F89; C: 1.25 pg/ml mAB F89

Mit Hilfe einer Messreihe, deren Resultat in Abbildung 46 dargestellt ist, wurde das Verhalten der Fluoreszenzintensitäten des mAB F89/FITC-P3-Komplexes und von FITC-P3 in Anhängigkeit von der Konzentration von mAB F89 näher analysiert. Daraus geht hervor, dass die Intensität des mAB F89/FITC-P3 Peaks bei konstanter FITC-P3-Konzentration proportional der eingesetzten mAB F89-Konzentration ist. Umgekehrt proportional verhält sich dagegen die Intensität des Fluoreszenzsignals von FITC-P3. Die Intensität des Signals nimmt mit zunehmender Konzentration an mAB F89 ab.

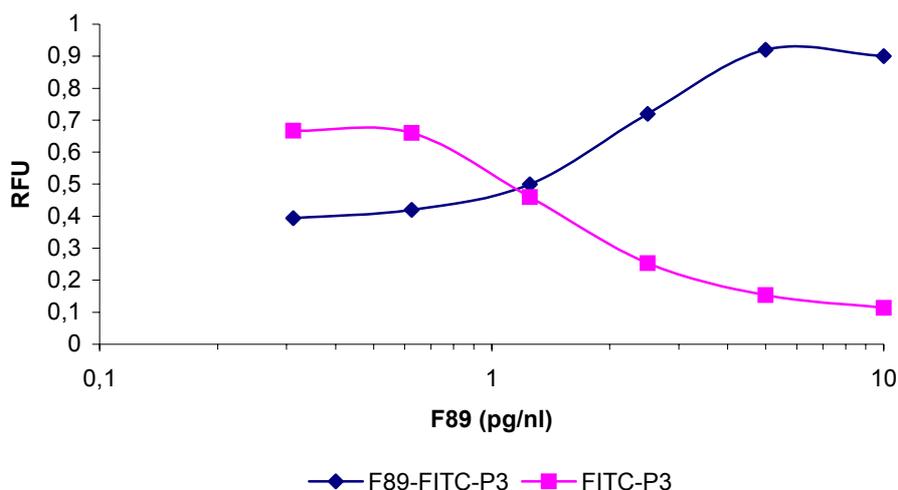


Abbildung 46: Einfluss der Konzentration von mAB F89 auf die Fluoreszenzintensität von mAB F89-FITC-P3 und FITC-P3 bei konstanter FITC-P3 Konzentration (54 ng/ml); jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von drei Messungen ($y_{\text{F89-FITC-P3}} = 0.0126x^2 + 0,1841x + 0.3179$ ($r^2=0,9807$); $y_{\text{FITC-P3}} = 0.0104x^2 - 0.1556x + 0.6351$ ($r^2 = 0.9507$))

Da zur Messung von PrP^c bzw PrP^{Sc} die Fluoreszenzintensitäten des mAB F89-FITC-P3-Komplexes und von FITC-P3 gleich sein sollen, wurde für die weiteren Versuche eine mAB F89-Konzentration von 1.25 ng/ml gewählt.

3.2 Nachweis von PrP^c

Für den Nachweis von PrP^c wurde zunächst eine Leerprobe analysiert. Dazu wurde zu der „Messlösung“ (FITC-P3: 54 µg/µl, mAB F89: 1.25 ng/µl) die gleiche Menge an Aqua dest. gegeben und kapillarelektrophoretisch getrennt. Erwartungsgemäß waren zwei etwa gleich hohe Peaks im Elektropherogramm feststellbar, deren Fluoreszenzintensitäten um ca. die Hälfte geringer war als unter D 3.1.2 beschrieben (Abbildung 45 C). Dies ist auf die Zugabe einer äquivalenten Menge an Aqua dest. zurückzuführen.

Ersetzt man das der „Messlösung“ zugefügte Aqua dest durch eine PrP^c-haltige wässrige Lösung (20 pg/ml; äquivalent einer Messung von 10 pg), so sind im Elektropherogramm

deutliche Veränderungen festzustellen: Anstelle von zwei Peaks ist nur noch einer nachweisbar, dessen Signalsintensität jedoch deutlich zugenommen hat. Auf Grund der Retentionszeit ist davon auszugehen, dass es sich dabei um FITC-P3 handelt, das bei der Konkurrenz von PrP^C um die Bindungsstelle am mAB F89 freigesetzt worden ist. Die leichte Verschiebung der Retentionszeit von dürfte durch den Einfluss von PrP^C zu erklären sein (Abbildung 47 B). Das Elektropherogramm einer Messung von 2.5 pg PrP^C gibt Abbildung 47 C wieder. Sowohl die Fluoreszenz des mAB F89-FITC-P3-Komplexes als auch die von FITC-P3 sind nachweisbar, allerdings hat sich das Verhältnis der Peaks zueinander geändert (vergleiche Abbildung 47 A versus C)

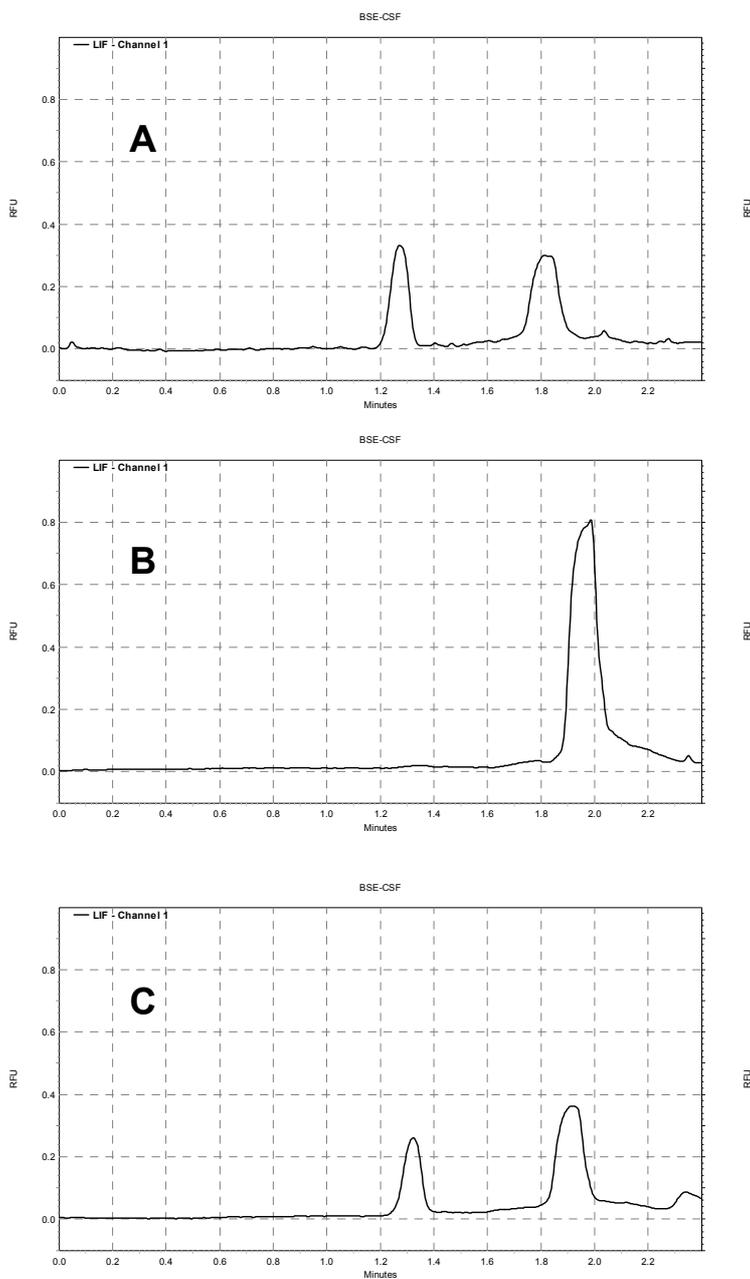


Abbildung 47: CE-LIF-Elektropherogramme: A: 0 pg PrP^C; B: 10 pg PrP^C; 2.5 pg PrP^C

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze des Messsystems wurden abgestufte PrP^c-Konzentrationen geprüft. Erwartungsgemäß nahm die Fluoreszenzintensität des mAB F89-FITC-P3-Komplexes ab und die von FITC-P3 zu (Tabelle 18). Der Vergleich der Mittelwerte des Quotienten zwischen der Fluoreszenzintensität des mAB F89-FITC-P3-Komplexes und der von FITC-P3 ergab, dass sich dieser bei einer Konzentration 2,5 pg PrP^c/nl signifikant von dem des „Leerwertes“ unterschied.

Tabelle 18: Einfluss der Konzentration von PrP^c auf die Intensität der Fluoreszenzsignale von mAB F89-FITC-P3-Komplex und FITC-P3 (Anzahl der Messungen pro Konzentration: 3)

PrP ^c (pg/nl)	mAB F89-FITC-P3 [RFU]	FITC-P3 [RFU]	mAB F89-FITC-P3:FITC-P3 (S)
0	0.32 (± 0)	0.29 (± 0.01)	1.08 (± 0.005) ^{a*}
0.3125	0.3 (± 0,01)	0.27 (± 0.01)	1.12 (± 0.04) ^a
0.625	0.3 (± 0,02)	0.27 (± 0.01)	1.11 (±0.04) ^a
1.25	0.29 (± 0,01)	0.28 (± 0.02)	1.07 (± 0.04) ^a
2.5	0.26 (± 0.01)	0.35 (± 0.01)	0.77 (± 0.05) ^b
5	0.12 (± 0)	0.39 (± 0.01)	0.31 (± 0.01) ^c
10	0.016 (± 0,02)	0.74 (± 0.07)	0.02 (± 0.06) ^d

*Mittelwerte mit unterschiedlichem Superskript unterscheiden sich statistisch signifikant von einander (p <0.05)

3.3 Nachweis von PrP^{sc}

3.3.1 Hirngewebe

- Einzelaufreinigungsverfahren

Die mit den Aufreinigungsverfahren I bis VI erzeugten Probenkonzentrate wurden neben dem ELISA und dem Dot-EIA auch in der CE-LIF auf PrP^{sc} hin untersucht.

Tabelle 19 zeigt im Überblick, bei welchen Verfahren sich der Reinheitsgrad der Probenextrakte dabei als „ausreichend“ bzw. „ungenügend“ für eine Messung in der CE-LIF herausstellte. Es wurde deutlich, dass ein Nachweis von PrP^{sc} mittels CE-LIF nur nach einer besonderen Aufbereitung des Probenmaterials möglich war, da die Probenkonzentrate aus

den Methoden I bis IV Verunreinigungen aufwiesen, die bereits bei der Injektion einer Probe zu einer Verstopfung der Kapillare führte. Ein PrP^{Sc}-Nachweis mit der CE-LIF war dadurch nicht möglich und wird deshalb auch nicht im Detail besprochen. Nur die chromatographischen Aufreinigungsverfahren der Methoden V und VI lieferten genügend saubere Probenextrakte. Wie in den vorhergehenden Untersuchungen jedoch gezeigt werden konnte, war eine gezielte Eingrenzung der Retentionszeit mit Methode V unmöglich. Daher soll nur Methode VI im Einzelnen besprochen werden

Tabelle 19: Überblick über die Nachweisbarkeit von PrP^{Sc} aus Probenextrakten nach Durchführung der Einzelaufreinigungsmethoden

Aufreinigungsmethode	Reinheitsgrad	PrP ^{Sc} Nachweis mittels CE-LIF
Bio-Rad® (Methode I)	ungenügend	-
Fällung mit Phosphorwolframsäure (Methode IIa und IIb)		-/-
Ultrazentrifugation nach Schmerr (Methode III)		-
Extraktion mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol (Methode IV)		-
HPLC (Methode V)	ausreichend	+
SPE-Kartuschenaufreinigung (Methode VI)		+

Zum Prüfen der Nachweisbarkeitsgrenze von PrP^{Sc} mittels CE-LIF wurde zunächst eine hochangereicherte PrP^{Sc}-Präparation unter Verwendung der Methode I und zusätzlicher Aufreinigung mit SPE-Kartuschen hergestellt. Auch bei dieser Versuchsreihe war zunächst eine Justierung des Messsystems erforderlich. Hierzu wurde eine 1:1 mit Aqua dest. verdünnte „Messlösung“ elektrophoretisch getrennt. Das Elektropherogramm wies zwei etwa gleich hohe Peaks mit Retentionszeiten von 1.3 min (mAB F89/FITC-P3-Komplex) und 1.9 min (FITC-P3) auf (vergleiche Abbildung 48 A). Nach dem Ersatz von Aqua dest. durch eine äquivalente Menge an PrP^{Sc}-haltiger Präparation (äquivalent 5 mg Hirn/ μ l) war nur noch ein Peak mit einer Retentionszeit von 2.0 min zu messen.

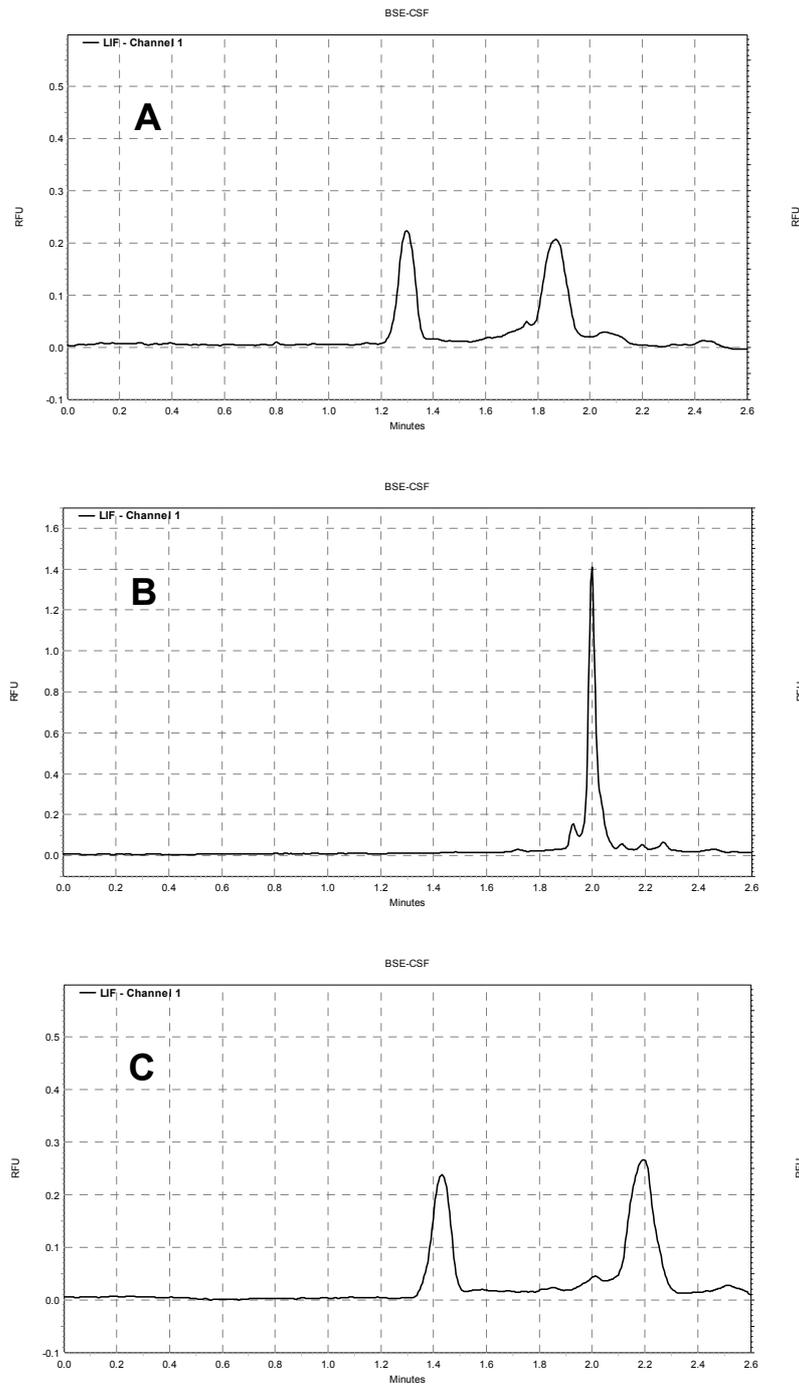


Abbildung 48: CE-LIF-Elektropherogramme: A: Extrakt äquivalent 0 mg Hirn/ μ l; B: Extrakt äquivalent 5 mg Hirn/ μ l; C: Extrakt äquivalent 0.31 mg Hirn/ μ l

Die Resultate einer Messreihe mit abgestuften Mengen an PrP^{Sc} (ausgedrückt in mg Hirnäquivalent) sind in Tabelle 20 dargestellt. Daraus geht hervor, dass mit zunehmender Menge an PrP^{Sc} die Intensität des mAB F89/FITC-P3 Peaks abnimmt und die des FITC-P3 Peaks zunimmt. Es fällt allerdings auf, dass die Intensität des letztgenannten Peaks überproportional zunimmt.

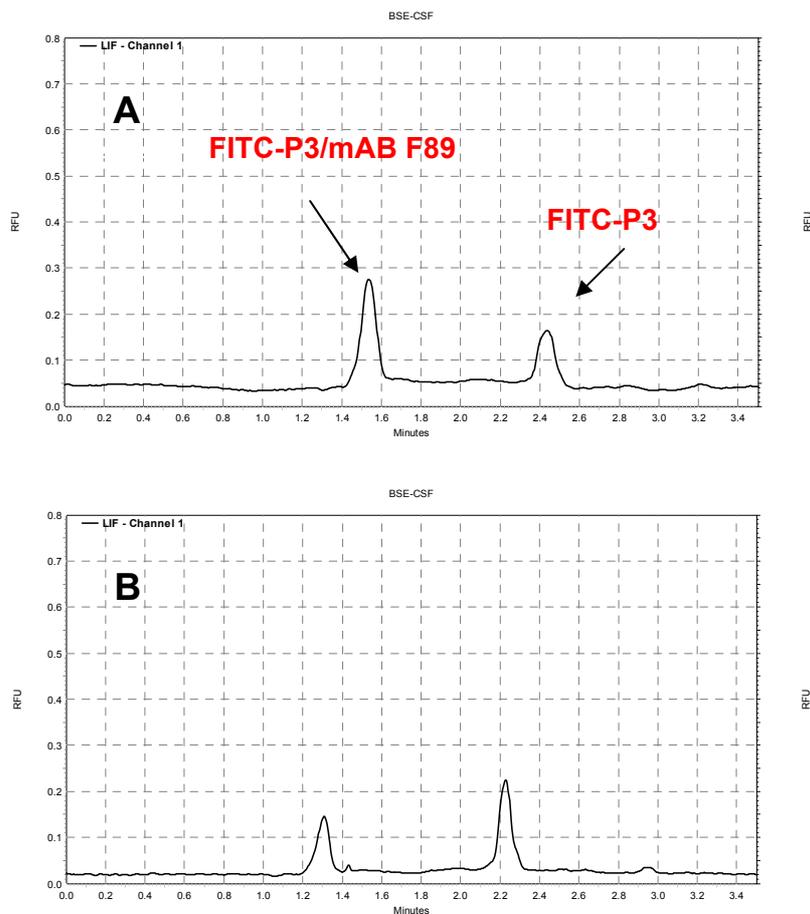
Tabelle 20: Einfluss definierter PrP^{Sc}-Mengen auf die Intensität der Fluoreszenzsignale des mAB F89/FITC-P3-Komplexes und FITC-P3 in der CE-LIF (Anzahl der Messungen pro Konzentration: 3)

Hirnextrakt- äquivalent (mg/μl)	mAB F89/FITC-P3 [RFU]	FITC-P3 [RFU]	mAB F89-FITC- P3/FITC-P3
0	0.22 (± 0,005)	0.2 (± 0.01)	1.11 (± 0.03) ^{a*}
0.08	0.25 (± 0,01)	0.22 (± 0.005)	1.16 (0.02) ^a
0.16	0.25 (± 0,01)	0.23 (± 0.02)	1.06 (± 0.13) ^a
0.31	0.25 (± 0,01)	0.26 (± 0.02)	0.95 (± 0.12) ^a
0.63	0.25 (± 0.01)	0.29 (± 0.006)	0.85 (± 0.04) ^b
1.25	0.26 (± 0.01)	0.43 (± 0.01)	0.61 (± 0.04) ^c
2.5	0.1 (± 0)	0.83 (± 0.01)	0.12 (± 0) ^d
5	0.01 (± 0)	1.49 (± 0.06)	0.0067 (± 0.0001) ^e

* Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05)

- Kombinationsverfahren

Auch die Extrakte, die mit den Kombinationsverfahren 1 und 2 gewonnen worden waren, erbrachten nicht die für die CE-LIF erforderliche Reinheit, so dass eine Durchführung der Messung aufgrund technischer Probleme (Verstopfung der Kapillare) scheiterte. Allein mit dem Kombinationsverfahren 3 (Ultrazentrifugation, SPE-Kartusche) wurden messtaugliche Extrakte hergestellt. Das Resultat ist in Abbildung 49 dargestellt. Nach Zugabe des PrP^{Sc}-haltigen Extraktes ist eine Zunahme des FITC-P3-Peaks feststellbar.



**Abbildung 49: CE-LIF-Elektropherogramme von Hirnpräparationen (Kombinationsverfahren 3):
 A) Kontrolle, B) PrP^{Sc}-haltiger Extrakt (äquivalent 20 µg Hirn/nl)**

3.3.2 Liquor

Die CE-LIF-Untersuchung von artifiziell mit PrP^{Sc} kontaminiertem Liquor, der mittels Methode IV und VI aufbereitet wurde, erbrachte keine positiven Resultate.

Demgegenüber war das Ergebnis der Untersuchung des Liquors eines bekannt BSE-positiven Rindes nicht eindeutig. Einerseits wurde durch Zugabe des Extraktes zur „Messlösung“ die Intensität des mAB F89/FITC-P3-Komplexes deutlich reduziert, was für einen positiven Nachweis spricht. Andererseits nahm jedoch die Intensität des FITC-P3 Peaks nicht in dem erwarteten Umfang zu, so dass das Resultat als fraglich eingestuft werden muss (vgl. Abb. 50).

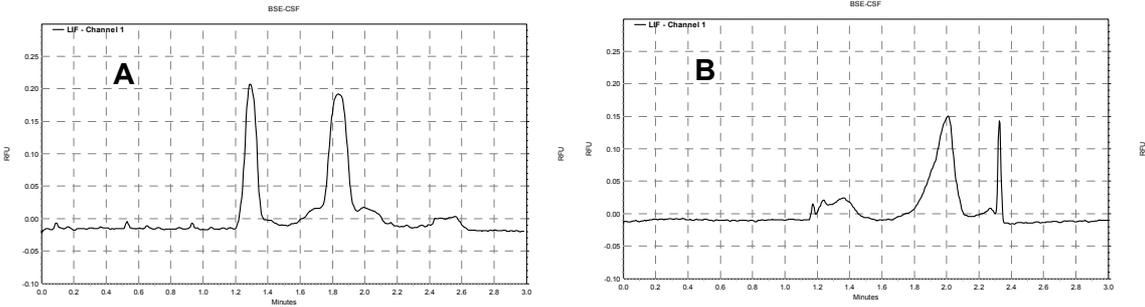


Abbildung 50: CE-LIF-Elektropherogramm von Liquor eines BSE-positiven Tieres: A: Leerwert; B: Liquorextrakt

E Diskussion

Die Diagnose der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) ist bisher nur in der Spätphase einer Erkrankung post-mortem im Gehirn möglich. Eine frühe Diagnosestellung, möglichst vor Ausbruch der Krankheit unter Zuhilfenahme von nicht-neuronalen Geweben ist ein Ziel der Prionforschung. Daher gewinnt der Nachweis der pathologischen Form des Prionproteins in leicht zugänglichen Geweben wie zum Beispiel in Liquor, Blut oder Harn an Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, zu prüfen, inwieweit CE-LIF zum Nachweis von PrP^{Sc} geeignet ist und welchen Präparationsprozessen das Probenmaterial hierzu unterzogen werden muss. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird zunächst die CE-LIF-Methode genauer beleuchtet und im Anschluss daran ihre Anwendung auf unterschiedliche Hirn- bzw. Liquorpräparationen.

1 CE-LIF

Die Grundlagen für den Nachweis von PrP^{Sc} mittels CE-LIF wurden von SCHMERR ET AL. bereits 1994 gelegt. In den folgenden Jahren konnte die Empfindlichkeit der Messmethode weiterentwickelt werden, so dass ein Nachweis im Blut von Schafen möglich wurde (SCHMERR ET AL., 1999, JACKMAN ET AL., 2003). Verschiedene Arbeiten zeigten jedoch, dass dieses Verfahren nicht ohne weiteres auf die gleiche Matrix anderer Spezies übertragen werden kann. Während einerseits über den Nachweis von PrP^{Sc} im Liquor von CJD-Patienten berichtet wird (ZERR ET AL., 2003), konnte andererseits die pathologische Form des Prionproteins im Blut von CJD-infizierten Schimpansen und Menschen nicht gefunden werden (CERVENAKOVA ET AL., 2003)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung eines Antikörpers mit einem Fluoreszenz-markierten Peptid (FITC-P) und dessen Verdrängung dieser Bindung bei Vorhandensein des pathogenen bzw. physiologischen Prionproteins. Dazu wurden spezielle Aminosäuresequenzen der Prionproteine ausgewählt, Peptide synthetisiert und mit Fluorescein gekoppelt. Polyklonale Antikörper wurden durch Immunsierung von Kaninchen gewonnen und aufgereinigt. (CERVENAKOVA ET AL., 2003, JACKMAN ET AL., 2003)

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen auf fertige monoklonale Antikörper zurückgegriffen und deren Bindungsstellen analysiert. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Peptide unterschiedlicher Länge synthetisiert und mit Fluoreszeinisothiocyanat markiert. Für

den Nachweis einer Bindung wurde zunächst auf einen Fluoreszenzimmunoassay zurückgegriffen, bevor weitere Messungen in der CE-LIF erfolgten.

Dabei konnte keine Bindung zwischen dem monoklonalen Antikörper 6H4 und den beiden unterschiedlich langen Peptiden FITC-P1 bzw. FITC-P2 nachgewiesen werden. Die Elektropherogramme der CE-LIF zeigen exemplarisch die Messergebnisse vor und nach Zugabe der einzelnen Reaktionspartner (Abbildung 51). Unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner war die Intensität des gemessenen Signals jeweils nur etwa halb so intensiv als das der entsprechenden Kontrolle. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es zu keiner Bindung zwischen dem gewählten Antikörper und den unterschiedlich langen Aminosäuren gekommen sein kann. Vielmehr hat hier nur eine Verdünnung stattgefunden.

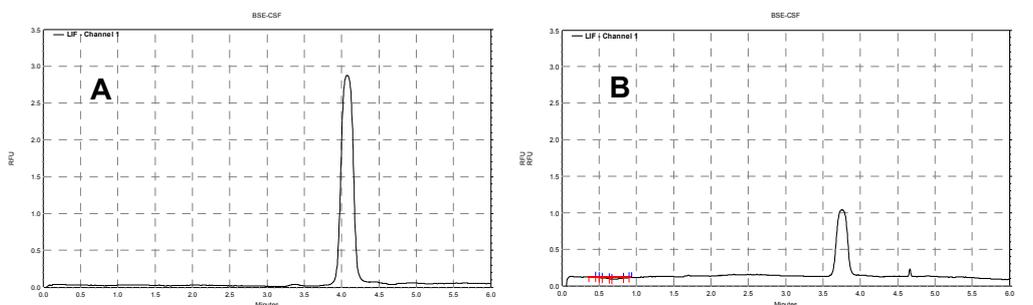


Abbildung 51: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC-P1; B: FITC-P1 und mAB 6H4 (B)

Dagegen konnte bei Verwendung des mAB F89 und FITC-P3 sowohl im Immunoassay wie auch in der CE-LIF eine Bindung nachgewiesen werden. (Abbildung 52). Die Intensität der Signale des FITC-P3/mAB-F89-Komplexes und von FITC-P3 waren in etwa gleich, wenn 1.25 ng/ μ l mAB-F89 und 54 pg/ μ l FITC-P3 eingesetzt wurden. Auf molarer Basis bedeutet dies, dass das Verhältnis mAB-F89 : FITC-P3 1:2.7 war.

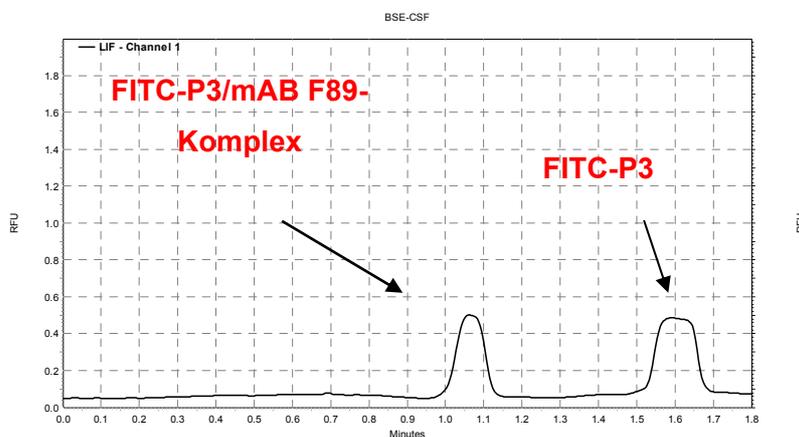


Abbildung 52: Messung von FITC-P3 (c = 54 pg/ μ l) und mAB F89 (c = 1.25 ng/ μ l)

Bei wiederholten Messungen derselben Probe wurde deutlich, dass die Stabilität des Messsystems auf eine bis maximal drei Stunden begrenzt war, da die Entstehung eines dritten Peaks („Artefakt“) beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 53). Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Autoren beobachtet und als Unreinheit der Probe, Zerfall von FITC-Peptiden oder Verbindung von FITC-Peptiden untereinander interpretiert (SCHMERR ET AL., 1996; YANG ET AL., 2005).

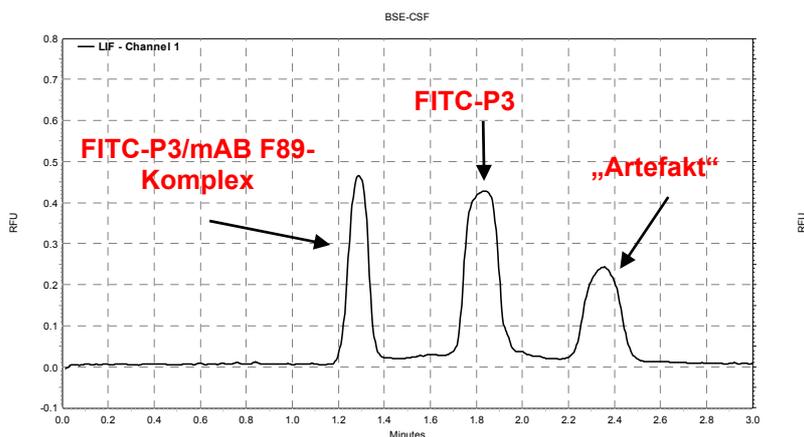


Abbildung 53: CE-LIF-Elektropherogramm: Messung von FITC-P3 ($c = 54 \text{ pg}/\mu\text{l}$) und mAB 89 ($c = 1.25 \text{ ng}/\mu\text{l}$) nach einer Inkubation von 24 h

Untersuchungen diesbezüglich zeigten, dass es sich dabei vermutlich um von FITC-P 3 gelöstes Fluoreszeinisothiocyanat handeln könnte, da dieses „Artefakt“ auch nach 3-stündiger Inkubation von FITC-P3 zu beobachten war (vgl. Abbildung 54)

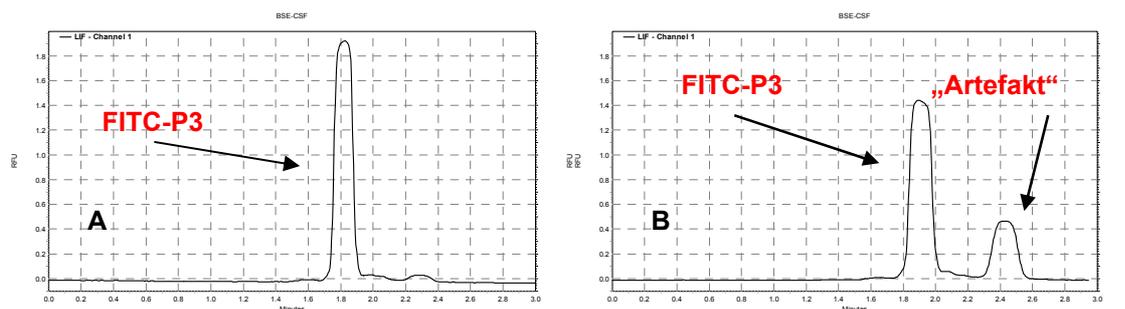


Abbildung 54: CE-LIF-Elektropherogramme: A: FITC-P3 ($54 \text{ pg}/\mu\text{l}$) ; B: Probe nach 3-stündiger Inkubation

Weiter konnte beobachtet werden, dass ein beschleunigter Zerfall von FITC-P3 vorallem bei höheren Raumtemperaturen und / oder mit zunehmendem Alter der eingesetzten Kapillare auftrat. Um keine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuell entstehende Zerfallsprodukte zu erhalten, wurde daher versucht, alle Probenansätze nach einer Inkubationszeit von 15 min dreimal hintereinander zu messen.

2 Vergleich unterschiedlicher Nachweisverfahren am Beispiel PrP^c

Für rekombinantes PrP^c wurde in der CE-LIF eine Nachweisgrenze von ~ 1pg/nl bestimmt. Die entsprechenden Werte lagen für den ELISA bei 0.16-0.32 ng/100 µl, für den Dot-EIA bei 0.25 ng/Dot und für den Westernblot 2.5 – 1.25 ng/20 µl.

Bei den ELISA-Versuchen fiel auf, dass das Lösungsmittel offensichtlich einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von PrP^c hat (vgl. Abbildung 55). BSA-haltiger Puffer führte bei gleichen Konzentrationen zu deutlich intensiveren Signalen als PBS, Liquor oder Aqua dest. Eine Beeinflussung des Messergebnisses durch BSA konnte ausgeschlossen werden. Allerdings ist die Affinität von Prionen an Kunststoffoberflächen bekannt (WEISSMANN ET AL., 2002). Es ist durchaus vorstellbar, dass BSA die Bindungsstellen an Reagenzröhrchen absättigt und so zu höheren Extinktionen im ELISA führt.

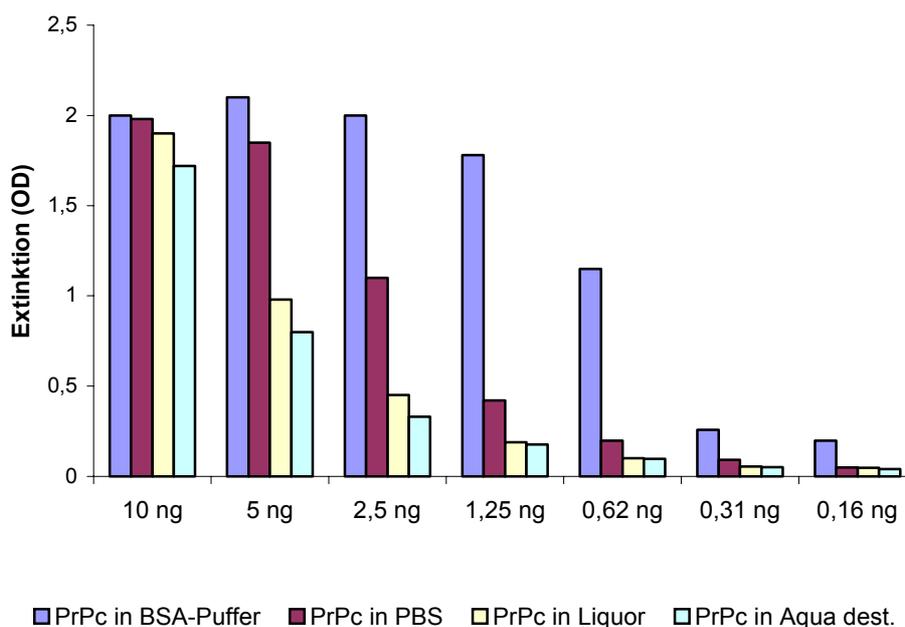


Abbildung 55: Nachweisbarkeit abgestufter PrP^c Mengen in verschiedenen Matrices; Nachweisverfahren: ELISA

Ein Vergleich der Leistungsfähigkeit der oben dargelegten Methoden muss sehr differenziert erfolgen, da die in den Versuchen ermittelten Nachweisgrenzen unterschiedlich dimensioniert sind. Aus diesem Grunde werden sie in Tabelle 21 in einheitliche Konzentrationen bzw. Menge pro Test umgerechnet und bezüglich CE-LIF mit Resultaten aus der Literatur noch zusätzlich verglichen.

Tabelle 21: Vergleich der Leistungsfähigkeit von ELISA, Dot-EIA, Westernblot und CE-LIF bezüglich des Nachweises von PrP^c

Testsystem	Nachweisgrenze	Konzentration (pg/μl)	Minimale Menge/Test (pg)
ELISA	0.16-0.32 ng/100 μl	1.6 -3.2	80-160
Dot-EIA	0.25 ng/dot	250	250
Westernblot	2.5-1.25 ng/20 μl	125 – 63	2500 – 1250
CE-LIF	1.25-0.625 pg/nl	1250-625	1.25 – 0.625
CE-LIF¹	2 nM	60 – 66	0.06 – 0.066
CE-LIF²	80 ng/mL	80	1 pg

¹CERVENAKOVA ET AL., 2003; ²YANG ET AL., 2005

Nimmt man die PrP^c-Konzentration der Probe als Bewertungskriterium, so ist der ELISA deutlich den anderen Nachweisverfahren überlegen. Für einen positiven Befund mittels Dot-EIA, Westernblot oder CE-LIF werden je nach Testsystem 10 bis 400-fach höhere Konzentrationen benötigt als im ELISA. Stellt man jedoch die pro Test erforderliche minimale PrP^c-Menge in den Vordergrund, so ist die CE-LIF den anderen Testsystemen überlegen. Da aber nur in wenigen Fällen die Probenmenge ein den Test limitierender Faktor sein dürfte, wird dieser Vorteil nur selten zum Tragen kommen. Die CE-LIF stellt nur dann ein wesentlich sensitiveres Verfahren dar, wenn eine Anreicherung von Prionen in einem möglichst kleinen Volumen gelingt.

Vergleicht man die im vorgestellten Test benötigte minimale PrP^c-Menge mit der von anderen Autoren beschriebenen, so ist festzustellen, dass zumindest zu der Arbeit von YANG ET AL (2005) keine wesentliche Differenz besteht. Dennoch fällt auf, dass die in der Probe benötigte Konzentration um etwa den Faktor 10 höher ist, als sie bei diesen Autoren beschrieben wird. Die Ursache hierfür liegt in unterschiedlichen Injektionsvolumina: Während YANG ET AL (2005) 12 nl injizieren, war dies bei den eigenen Arbeiten nur 1 nl. Eine Vergrößerung des Injektionsvolumens und der Einsatz einer dickeren Kapillare (50 μm) dürften vergleichbare Ergebnisse zur Folge haben. Die höhere Empfindlichkeit des von CERVENAKOVA ET AL. (2003) beschriebenen Testsystems mag möglicherweise auf den

speziell gegenüber den Fluoreszenz-markierten Peptiden hergestellten polyklonalen Antikörpern beruhen.

3 Nachweis von PrP^{Sc} mittels CE-LIF

Wie bereits erwähnt, hat die CE-LIF nur dann entscheidende Vorteile gegenüber anderen Nachweisverfahren, wenn eine Anreicherung von PrP^{Sc} in möglichst kleinen Volumina gelingt und dabei möglichst viele Störfaktoren eliminiert werden. Aus diesem Grunde wurden unterschiedliche Methoden zur Präparation von PrP^{Sc} auf ihre Leistungsfähigkeit hin überprüft.

3.1 Nachweis von PrP^{Sc} aus Hirngewebe

- Fällungs- und Zentrifugationsverfahren (Methode I, II und III)

Da den Methoden I, II und III eine Fällung und/oder eine (Ultra-)Zentrifugation zu Grunde liegen, sollen diese Verfahren gemeinsam diskutiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat mit der Methode I (Aufreinigungskit Fa. Bio Rad[®]) gewonnen. Das dabei gewonnene Extrakt erwies sich als ungenügend sauber, um für einen Nachweis in der CE-LIF eingesetzt zu werden; eine Messung des in Aqua dest. gelösten Pellets führte stets zur Verstopfung der Kapillare. Somit konnte diese Methode nur als erster Schritt bei Kombinationsverfahren genutzt werden.

Ebenso war die Methode IIa (nach WADSWORTH ET AL., 2001) nicht geeignet, einen brauchbaren Extrakt zu liefern. Obwohl mit diesem aufwändigen Verfahren (Fällungsreaktion mit Phosphorwolframsäure, Zentrifugation) ein optisch sauberes Produkt erzeugt wurde, war auch hier eine Messung in der CE-LIF nicht möglich. Zwar wurde versucht, den Reinheitsgrad durch einen weiteren Ultrazentrifugationsschritt zu erhöhen, aber dennoch konnte das Elektropherogramm aufgrund von Interferenzen nicht ausgewertet werden. Die Überprüfung des PrP^{Sc}-Gehaltes von Ausgangsmaterial und Extrakten ergab Reduktionen der Extinktionen um bis zu 80 %. Warum es zu einem so ausgeprägten Verlust an PrP^{Sc} gekommen war, konnte nicht ermittelt werden. Ein Grund könnte sein, dass der Einsatz unterschiedlichster Reagenzien und Temperaturen zu einer Änderung in der räumlichen Struktur des Prionproteins führt, wodurch die Bindung an den Antikörper beeinträchtigt wird. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es allein bei der Durchführung der einzelnen Aufreinigungsschritte zu nicht unerheblichen Verlusten kommt.

Auch die Anwendung der Methode III (Schmerr ET AL., 2000) führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Extraktionsergebnisse. Zwar war im Dot-EIA nur im „Endextrakt“ PrP^{Sc} nachweisbar, aber bei Einsatz in der CE-LIF führte dieser zu den bereits dargestellten technischen Problemen (Verstopfung bzw. Durchbrennen der Kapillare). Dies war der Grund warum auch dieses Verfahren nicht weiter verfolgt wurde.

Insgesamt hat sich ergeben, dass die untersuchten Fällungs- und Zentrifugationsverfahren allein nicht geeignet sind, um genügend sauberes Probenmaterial für eine Messung in der CE-LIF zu liefern. Darüber hinaus wurde ebenfalls deutlich, dass es durch die einzelnen Aufreinigungsschritte zu massiven Verlusten an PrP^{Sc} gekommen ist.

- Extraktion mit HFIP (Methode IV)

Über die Gewinnung von PrP^{Sc} aus ovinem Hirnhomogenat mittels Extraktion mit 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol wurde bei SCHMERR ET AL. (2000) zum ersten Mal berichtet. In anderen Versuchen wurde dieses Verfahren zur Extraktion von PrP^{Sc} aus Schafblut verwendet (YANG ET AL., 2005). Es wurde daher versucht, dieses Verfahren für eine Aufreinigung von bovinem Hirn zu nutzen. Die vergleichende Prüfung des Ausgangsmaterials und der Extrakte im ELISA ergab deutliche Reduktionen der Extinktionen, was wiederum auf Verluste während des Präparationsvorganges hinweist. Die versuchte kapillarelektrophoretische Trennung war von den bereits mehrfach dargestellten technischen Problemen begleitet, so dass auch dieses Verfahren als alleinige Aufreinigungsmethode nicht in Frage kommt.

- Chromatographische Verfahren (Methoden V und VI)

Alle bisher durchgeführten Aufreinigerungsverfahren zeigten einen für die Messung in der CE-LIF zu geringen Aufreinigungsgrad, die in den allermeisten Fällen eine Verstopfung der Kapillare zur Folge hatte und dies letztendlich zu technischen Problemen führte. Abhilfe sollte die chromatographische Trennung unter Verwendung von HPLC-Säulen (SCHMERR ET AL., 1998, 2000) bringen. Dazu wurde Hirnhomogenat nach Methode I vorgereinigt und anschließend einer HPLC-Aufreinigung (Methode V) zugeführt. PrP^{Sc} konnte bei erstmaliger Anwendung nach einer Retentionszeit von $t = 21$ min eluiert und im ELISA bestimmt werden. Jedoch zeigte sich bereits bei einer Wiederholung dieses Versuchs unter gleichen Bedingungen, dass eine Eingrenzung der Retentionszeit nicht mehr möglich war. Daher liegt die Vermutung nahe, dass PrP^{Sc} auf der Säule ausfällt und trotz intensiver Reinigung durch Spülung nach und nach eluiert wird. Die gleiche Beobachtung wurde bei Verwendung einer neuen Säule gemacht. Obwohl eine Messung der Eluate zu keiner Störung der CE-LIF führte, mußte aufgrund der fehlenden Eingrenzbarkeit auf die weitere Verwendung von

HPLC-Säulen verzichtet werden. In späteren Versuchen zur Aufreinigung von PrP^{sc} aus Blut wurde auf die Verwendung von SPE-Einmalkartuschen zurückgegriffen (CERVENAKOVA ET AL., 2003; YANG ET AL., 2005). Es zeigte sich dabei, dass Methode I in Verbindung mit der SPE-Kartuschenaufreinigung (Methode VI) die geeignetste Methode zur Gewinnung von PrP^{sc} ist. Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte auch dann nicht erzielt werden, wenn anstelle von Methode I Methode III einer SPE-Kartuschenaufreinigung vorgeschaltet wurde. Ähnliche Beobachtungen machten JACKMAN ET SCHMERR (2003). Ihrer Meinung nach ist die Ursache für eine reduzierte Ausbeute an PrP^{sc} in einer geringen Löslichkeit von Prionprotein in Acetonitril wie auch in der fehlenden Konstanz in der Zusammensetzung der Kartuschen zu suchen. Bessere Ergebnisse konnten auch durch eine Erhöhung des eingesetzten Elutionsvolumens oder durch eine Änderung der Elutionsdauer nicht erzielt werden.

- Kombinationsmethoden

Obwohl bei SCHMERR ET AL. (1996, 1997, 1998) das Einzelverfahren der Ultrazentrifugation als geeignetes Verfahren zur Aufreinigung von ovinem Hirnhomogenat für einen Nachweis in der CE-LIF als geeignet beschrieben wurde, konnte dies in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Es wurde daher dazu übergegangen, getestete und als „gut“ befundene Methoden miteinander zu kombinieren und diese auf ihre Anwendbarkeit zu untersuchen.

Das Kombinationsverfahren 1 (Methode I und Methode IV) führte zu keiner Verbesserung der Extraktreinheit; die Trennversuche endeten meist mit einer Verstopfung der Kapillare.

Bei einer Kombination von Methode III mit Methode IV (Kombinationsverfahren 2) wurde ein optisch deutlich saubereres Extrakt erzeugt. Die Messung des Probenextrakts in der CE-LIF führte dabei zwar zu keinerlei technischen Problemen, jedoch waren die Signale aufgrund von Interferenzen nicht eindeutig zu zuordnen.

SCHMERR ET AL. (2000) beschrieben in ihrer Patentschrift das kombinierte Verfahren aus Ultrazentrifugation mit anschließender HPLC Aufreinigung. Da die eigenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass eine Eingrenzung der Retentionszeit nach erstmaligen Gebrauch der Säule nicht mehr reproduzierbar war, wurde dazu übergegangen SPE-Einmalkartuschen zu verwenden (Kombinationsverfahren 3). Dazu wurde die Zusammensetzung der Elutionsmittel in Anlehnung nach CERVENAKOVA ET AL. (2003) gewählt. Wie sich zeigte, war Kombinationsverfahren 3 durchaus geeignet, um PrP^{sc} in möglichst reiner Form herzustellen. Ein Nachteil liegt jedoch auch hier im großen Verlust an PrP^{sc} bei der Durchführung dieses kombinierten Verfahrens, da die Messung in der CE-LIF nur ein gering positives Signal ergab.

3.2 Nachweis von PrP^{sc} aus Liquor

Die Versuche mit artifiziiell kontaminiertem Liquor verliefen negativ. Die Gründe hierfür dürften vor allem in den Verlusten bei der Probenaufreinigung zu suchen sein. Möglicherweise war auch die zugegebene Menge an PrP^{sc} zu gering.

Die Untersuchung des Liquors von einem BSE-positiven Rind führte zu einem nicht eindeutigen Ergebnis. Zwar war nach Zugabe der Liquorpräparation zur Messlösung die Intensität des mAB F89/FITC-P3-Komplexes reduziert, was für einen positiven Befund sprechen würde, aber die Intensität des „FITC-P3-Peaks“ nahm nicht in erwarteter Weise zu. Aus diesem Grunde muss dieser Befund sehr zurückhaltend interpretiert werden und bedarf weiterer Überprüfungen. Leider stand dazu kein Untersuchungsmaterial mehr zur Verfügung.

4 Affinität- und Immunomagnetische Separation von PrP^c und PrP^{sc}

In der Literatur wurde über eine selektive Bindungsfähigkeit zwischen humanem bzw. murinem Plasminogen an PrP^{sc} berichtet (FISCHER ET AL., 2000). In unseren Versuchen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.

Dagegen verliefen die Untersuchungen mit an magnetische Teilchen adsorbierten Antikörpern durchaus vielversprechend in Abhängigkeit von der gewählten Matrix. In Separationsversuchen mit PrP^c in PBS konnte eine Reduktion der Extinktion von bis zu 95% gegenüber der Kontrolle in der ELISA festgestellt werden. Wurde jedoch in vorbehandeltem Liquor eine Extraktion durchgeführt, so konnte aus Proben höherer Konzentration nur ca. 60 %, aus niedriger konzentrierten Proben ca. 75 % des zugegebenen PrP^c wieder extrahiert werden.

Dagegen sind die Extraktionsversuche mit PrP^{sc} unabhängig von der gewählten Matrix kritisch zu betrachten, wie die Ergebnisse zeigten. So ist durchaus anzunehmen, dass eine verminderte Separation bzw. Extraktion von PrP^{sc} vor allem aus der Matrix Liquor auf das Vorhandensein von Zelldetritus oder auch auf andere Verunreinigungen zurückzuführen ist. Ebenso ist eine Reaktion von PrP^{sc} mit Substanzen, die sich noch in der jeweiligen Matrix befinden, denkbar. Eine mögliche Steigerung der Extrahierbarkeit könnte durch die Wahl der verwendeten Antikörper erzielt werden, wie die Untersuchungen von ZOU ET AL. (2004) zeigen.

Neben der reduzierten Separationsfähigkeit, besteht ein weiteres Problem in der mangelnden Elutionsfähigkeit von PrP^{sc} nach einer eventuellen Bindung an magnetischen Teilchen. Eine denkbare Möglichkeit gebundenes PrP^{sc} vom Antikörper frei zu setzen, wäre einen weiteren

Proteinase-K Verdau der IMS folgen zu lassen. Diesbezüglich durchgeführte Untersuchungen verliefen jedoch negativ. Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass ein „Lösen“ von an Antikörper gebundenem PrP^{Sc} in dieser Form nicht erfolgt ist. Geht man von der Matrix Hirn aus, so wurde in den Versuchen bereits mit Proteinase K vorverdautes PrP^{Sc} eingesetzt. Der Einsatz verschiedener Lösungsmittel und ein erneuter Proteinase K Verdau könnten durchaus zu einer Änderung in der Prionproteinstruktur geführt haben (PRUSINER SB, 1981), die somit eine Detektion mit den in den Nachweisverfahren verwendeten Antikörpern unmöglich machen würde.

5 Schlussfolgerungen

Die CE-LIF ist prinzipiell zum Nachweis von PrP^{Sc} geeignet. Allerdings handelt es sich dabei um ein Verfahren, das in der gegenwärtigen Form noch wenig robust ist. Die Störungen sind sowohl gerätetechnischer Art als auch durch die Probenmatrix bedingt. Bezogen auf die gerade noch nachweisbare PrP^C-Menge pro Test ist dieses Verfahren den bislang etablierten Methoden etwas überlegen. Da aber in den seltensten Fällen die Probenmenge der limitierende Faktor sein dürfte, kommt dieser Vorteil kaum zu tragen. Ein wesentliches Problem stellt die Extraktion von PrP^{Sc} aus Geweben und Körperflüssigkeiten dar. Die geprüften Verfahren sind mit hohen Verlusten behaftet, so dass dadurch die Nachweisgrenze stark ansteigt. Will man CE-LIF als Nachweismethode für PrP^{Sc} weiter verfolgen, so sind in erster Linie Verbesserungen im Bereich der Probenaufbereitung erforderlich.

F Zusammenfassung

Zum Nachweis von PrP^c und PrP^{sc} wurde eine Kapillarelektrophorese-Immunofluoreszenz-Methode (CE-LIF) etabliert und mit konventionellen Verfahren (ELISA, Westernblot, Dot-EIA) verglichen. Zur CE-LIF wurde der monoklonale Antikörper F89 und ein Fluoreszenzmarkiertes Peptid (FITC-P3) eingesetzt. Die Nachweisgrenze für rekombinantes bovines PrP^c liegt bei 1 pg/Test.

Zur Anreicherung von PrP^{sc} aus Hirn und Liquor wurden (Ultra-) Zentrifugations-, Extraktions- (HFIP) und Chromatographieverfahren (HPLC, Festphasenextraktion) einzeln oder in Kombinationen geprüft; darüber hinaus wurden Anreicherungsversuche mit Affinität- bzw. Immunomagnetischer Separation vorgenommen.

Die Überprüfung des PrP^{sc}-Gehaltes ausgewählter Extrakte im Vergleich zum Ausgangsmaterial mittels ELISA ergab deutliche Substanzverluste. Eine selektive Bindung von PrP^{sc} an Dynabeads[®] gekoppeltem Plasminogen konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine Anlagerung an Antikörper-beschichteten Beads festgestellt. Allerdings war die Bindungskapazität der Beads bei Versuchen in mit in PBS gelöstem PrP^c oder PrP^{sc} höher als bei vergleichbaren Versuchen mit Liquor.

Bei der kapillarelektrophoretischen Analyse erwiesen sich alle mittels einfacher Probenaufbereitung hergestellten Extrakte als ungeeignet. Sie führten entweder zu technischen Problemen (Verstopfung der Kapillare; Durchbrennen) oder zu Interferenzen im Elektropherogramm, die eine Auswertung nicht ermöglichten. Die Aufbereitung mittels HPLC ergab zwar verwendbare Präparationen, allerdings variierte die Retentionszeit von PrP^{sc} derart stark, dass dieses Verfahren nicht weiter eingesetzt wurde. Bezüglich der Verwertbarkeit von CE-LIF wurden die besten Resultate mit Hilfe einer Aufreinigung nach Bio-Rad[®] mit anschließender Festphasenextraktion erzielt. Während der Nachweis von PrP^{sc} mittels CE-LIF aus Hirngewebe eindeutig gelang, führte die Untersuchung des Liquors eines bekannt BSE-positiven Tieres zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Prinzipiell ist die CE-LIF zum Nachweis von PrP^{sc} geeignet. Allerdings handelt es sich dabei um ein sehr störanfälliges Verfahren. Die Sensitivität kann deutlich erhöht werden, wenn die Konzentration von PrP^{sc} in kleine Volumina noch besser gelingt.

G Summary

For the detection of PrP^c and PrP^{sc} a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method was established and compared with conventional techniques (ELISA, Westernblot, Dot-EIA). For CE-LIF the monoclonal antibody F89 and a fluorescent-labelled peptide (FITC-P3) were used. The limit of detection for recombinant bovine PrP^c was 1 pg/test.

For enrichment of PrP^{sc} from brain and cerebrospinal fluid (ultra-) centrifugation-, extraction- (HFIP) and chromatographic methods (HPLC, SPE-extraction) were evaluated separately or in combination; furthermore affinity,- or immunomagnetic separation were used for enrichment, respectively.

The detection of the PrP^{sc}-content of selected extracts when compared to the source material using ELISA showed clear losses of substance. A selective binding of PrP^{sc} to Plasminogen coupled Dynabeads[®] could not be detected. On the other hand an adsorption onto Dynabeads[®] coupled Plasminogen was determined. The binding capacity of PrP^c or PrP^{sc} to the beads was higher in PBS than in experiments using cerebrospinal fluid.

Extracts purified by single methods were inappropriate for analysis by capillary laser-induced fluorescence, as this caused either technical problems (blockage or damage of the capillary) or interferences in the electropherogram which made an analysis impossible. The purification by HPLC resulted in a useable preparation, but showed widely varying retention times for PrP^{sc} so that this method was not used. The best results were obtained by using a combined method consisting of a purification by Bio-Rad[®] and SPE-cartridges. While the detection of PrP^{sc} in brain was successful with CE-LIF no definitive result could be shown in cerebrospinal fluid of a BSE positive animal.

In principle CE-LIF is a suitable method for detecting PrP^{sc}. However it needs to be improved due to its susceptibility to interferences and technical and methodical problems. The sensitivity can be increased by improving concentration of PrP^{sc} in small volumes.

H Literaturverzeichnis

AITKEN, A., COLLINGE, D. B., VAN HEUSDEN, B. P., ISOBE, T., ROSEBOOM, P. H., ROSENFELD, G., SOLL, J. (1992): 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 17 (12), 498-501

ALTEGEN INC., Delaware, USA, <http://www.altegen.com>

ALPER, T., CRAMP, W. A., HAIG, D. A., CLARKE, M. C., (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? , *Nature*; 214(90):764-6.

ANDREOLETTI, O., SIMON, S., LEPROUS, C., MOREL, N., LABOURED, G., CHAMBER, A., LOGAN, S., CORKIER, F., FERRET, P., FOURS, G., LAUDE, H., EOCENE, F., GRASSY, J., SQUELCHER, F. (2004): PrP^{Sc} accumulation in yachts from sheep incubating natural Scrapie. *Nat Med* 10 (6), 591-593

AUSSCHUSS FÜR BIOLOGISCHE ARBEITSTOFFE (ABAS); Beschluss 603; Ausgabe: März 2003, (BArbBl. Heft 3/2003 S. 55)

BARRETTE, A., TAILGATING, F., FORLORN, G., BATE, C., SALMON, M., COLOMBO, L., DE LUIGI, A., LIMIDO, L., SUARDI, S., ROSSI, G., AUVRE, F., ADJOU, K. T., SALES, N., WILLIAMS, A., LASMEZAS, C., DESLYS, J. P. (2003): Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 77 (15), 8462-8469

BAXTER, H. C., FRASER, J. R., LIU, W. G., FORSTER, J. L., CLOKIE, S., STEINACKER, P., OTTO, M., BAHN, E., WILTFANG, J., AITKEN, A. (2002): Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases. *Biochem Soc Trans* 30 (4), 387-391

BECKMAN COULTER Epics XL Flowzytometer, Geräteanweisung

BIACABE, A. G., LAPLANCHE, J. L., RYDER, S., BARON, T. (2004): Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* 5 (1), 110-115

BIESCHKE, J., GIESE, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W., ZERR, I., POSER, S., EIGEN, M., KRETZSCHMAR, H. A. (2000): Ultrasensitive detection of pathological Prionproteinaggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci* 97(10), 5468-5473

BIO-RAD Produktbeschreibung: BSE Purification-Kit und Platelia[®] TeSeE-Nachweiskit, Version 03.05.2002

BOLTON, D. C., MC KINLEY, M. P., PRUSINER, S. (1982): Identification of a protein that purifies with the scrapie prion, *Science* 218, 1309-1311

BOLTON, D. C., MEYER, R., PRUSINER, S. (1985): Scrapie PrP 27-30 is a Sialoglycoprotein; *Journal of Virology*, 596-606

BONS, N., MESTRE-FRANCES, N., GUIRAUD, I., CHARNAY, Y. (1997): Prion immunoreactivity in brain, tonsil, gastrointestinal epithelial cells, and blood and lymph vessels in lemurian zoo primates with spongiform encephalopathy. *C R Acad Sci III* 320 (12), 971-979

BORCHELT, D. R., KOLIATSOS, V. E., GUARNIERI, M., PARDO, C. A., SISODIA, S. S., PRICE, D. L. (1994); Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems, *J.Biol.Chem.* 269, 14711-14714.

BRENIG, B., SCHÜTZ, E., URNOVITZ, H. (2002): Cellular nucleic acids in serum and plasma as new diagnostic tools. *Berl Münch Tierärztl Wochr* 115 (3-4), 122-124

BRENIG, B., WEMHEUER, W., SCHÜTZ, E., IAKOUBOV, L., URNOVITZ, H., SCHULZ-SCHAEFFER, W. (2003): Surrogate marker test for live cattle. *New Food* 4, 21-23

BROWN, D. R., WONG, B. S., HAFIZ, R., CLIVE, C., HASWELL, S. J., JONES, I. M., (1999): Normal prionprotein has an activity like that of superoxide dismutase, *Biochem. J.* 344 (Pt.1) 1-5

BROWN, D. R., QUIN, K., HERMS, J. W., MADLUNG, A., MANSON, J., STROME, R., FRASER, P. E., KRUCK, T., BOHLEN V., A., SCHULZ-SCHAEFFER, W., GIERSE, A., WSTAWAY, D., KRETZSCHMAR, H., (1997): The cellular Prionprotein binds copper in vivo, *Nature* 390 684-687

BRUCE, M. E., MCBRIDE, P. A., FARQUHAR, C. F. (1989): Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102 (1), 1-6

BRUCE, M. E., WILL, R. G., IRONSIDE, J. W., MCCONNELL, I., DRUMMOND, D., SUTTIE, A., MCCARDLE, L., CHREE, A., HOPE, J., BIRKETT, C., COUSENS, S., FRASER, H., BOSTOCK, C. J. (1997): Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389 (6650), 498-501

BUNDESFORSCHUNGSANSTALT FÜR VIRUSKRANKHEITEN (2002): Protokoll zur immunhistochemischen PrP-Färbung von Paraffinschnitten am Nationalen Referenzzentrum für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien. BFAV, Insel Riems

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR): Anhebung der Altergrenze für BSE-Tests bei Schlachtrindern von 24 auf 30 Monate. Stellungnahme vom 22.12.2003

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. *Proc Natl Acad Sci* 101 (9), 3065-3070

CEDI DIAGNOSTICS B.V., Netherlands; CediTect BSE Test Produktbeschreibung: www.cedi-diagnostics.com

CERVENAKOVA, L., BROWN, P., SOUKHAREV, S., YAKOVLEVA, O., DIRINGER, H., SAENKO, E. L., DROHAN, W. N. (2003): Failure of immunocompetitive capillary electrophoresis assay to detect disease-specific Prionprotein in buffy coat from humans and chimpanzees with Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis* 24 (5), 853-859

CHRONIX BIOMEDICALS (2003): Living test for mad-cow disease. Results presented at Centennial Celebration of German-American Collaborations in Microbiology. Pressebericht vom 15.05.2003

COLLINGE, J., WHITTINGTON, M. A., SIDLE, 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., SIDLE, K.C., MEADS J, IRONSIDE J, HILL AF (1996): Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of „new variant“ CJD, *Nature* 383, 685-690

COMINCINI, S. M., FOTI G., TRAUNULIS, M. A., HILLS D., DI GUARDO, G., VACCARI, G., WILLIAMS, J. L., HARBITZ, I., FERETTI, L. (2001), Genomic organisation, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND). *MAMMALIAN GENOME* 12: 729-733

COTTO, E., ANDRE, M., FORGUE, J., FLEURY, H. J., BABIN, P. J. (2005): Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion protein genes in zebrafish (*Danio rerio*), *FEBS Journal*, 272, 500-513

DELEAULT, N. R., LUCASSEN, R. W., SUPATTAPONE, S. (2003): RNA molecules stimulate Prionproteinconversion. *Nature* 425 (6959), 717-720

DODELET, V. C., CASHMAN, N. R. (1998), Prionprotein expression in human leukocyte differentiation, *Blood* 91, 1556-1561.

DONNE, D. G., VILES, J. H., GROTH, D., MEHLHORN, I., JAMES, T. L., COHEN, F. E., PRUSINER, S. B., WRIGHT, P. E., DYSON, A. J., (1997), Structure of the recombinant full-length hamster prion

protein PrP (29-231): The N terminus is highly flexible, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13452-13457

DYNAL BIOTECH Produktbeschreibung: Tosylaktivierte Dynabeads® M-280, Version 06/03

DYNAL BIOTECH Sicherheitsdatenblatt: Antibody coated Dynabeads®, Version 07/03

EDENHOFER, F., RIEGER, R., FAMULOK, M., WENDLER, W., WEISS, S., WINNACKER, E. L., (1996): Prionprotein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family, *J. Virol.* 70 4724-4728

EIGEN, M.: BSE und das Prionenproblem. *Spektrum der Wissenschaft* 04/2001, 40-49

ENFERSCIENTIFIC GROUP, Ireland; Enfer-Test und Enfer TSE Kit version 2.0
Produktbeschreibung: www.enferscientific.com

FISCHER, M. B., ROECKL, C., PARIZEK, P., SCHWARZ, H. P., AGUZZI, A. (2000): Binding of disease-associated Prionprotein to plasminogen. *Nature* 408 (6811), 479-483

FURUKAWA, H., DOH-URA, K., OKUWAKI, R., SHIRABE, S., YAMAMOTO, K., UDONO, H., ITO, T., KATAMINE, S., NIWA, M. (2004): A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant Prionprotein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins, *J Biol Chem* 279 (22) 23661-23667

GAUCZYNSKI, S., PEYRIN, J. M., HAIK, S., LEUCHT, C., HUNDT, C., RIEGER, R., KRASEMANN, S., DESLYS, J. P., DORMONT, D., LASMEZAS, C. I., WEISS, S., (2001): The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell surface receptor for the cellular prion protein, *EMBO J.* 20 5863-5875

GIESE, A., BIESCHKE, J., EIGEN, M., KRETZSCHMAR, H. A. (2000): Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch Virol Suppl* 16, 161-171

GRANER, E., MERCADANTE, A. F., ZANATA, S. M., FORLENZA, O. V., CABRAL, A. L., VEIGA, S. S., JULIANO, M. A., ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A., IZQUIERDO, I., MARTINS, V. R., BRENTANI, R. R., (2000): Cellular Prionprotein binds laminin and mediates neurite outgrowth, *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 76, 85-92

GREEN, A. J., THOMPSON, E. J., STEWART, G. E., ZEIDLER, M., MCKENZIE, J. M., MACLEOD, M. A., IRONSIDE, J. W., WILL, R. G., KNIGHT, R. S. (2001): Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70 (6), 744-748

GROSCHUP, M. H., KUCZIUS, T., JUNGHANS, F., SWEENEY, T., BODEMER, W., BUSCHMANN, A. (2000): Characterization of BSE and scrapie strains/isolates, *16*, 217-226

GROSCHUP, M. H., STOLZE, A. (2002): BSE- und Scrapie-Diagnostik in Deutschland. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 115, 106-110

GUILLAUME, E., ZIMMERMANN, C., BURKHARD, P. R., HOCHSTRASSER, D. F., SANCHEZ, J. C. (2003), A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease, *Proteomics* 3 (8), 1495-1499

HAIK, S., FAUCHEUX, B. A., SAZDOVITCH, V., PRIVAT, N., KEMENY, J. L., PERRET-LIAUDET, A., HAUW, J. J. (2003): The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Nat Med* 9, 1121–1123

HARRINGTON, M. G., MERRIL, C. R., ASHER, D. M., GAJDUSEK, D. C. (1986): Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 315 (5), 279-283

HARRIS, D.A., LELE, P., SNIDER, W.D. (1993), Localization of the m-RNA for a chicken Prionprotein by in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 4309-4313.

HEATON, M. P., LEYMASTER, K. A., FREKING, B. A., HAWK, D. A., SMITH, T. P., KEELE, J. W., SNELLING, W. M., FOX, J. M., CHITKO-MCKOWN, C. G., LAEGREID, W. W. (2003): Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome* 14 (11), 765-777

HEIKENWALDER, M., ZELLER, N., SEEGER, H., PRINZ, M., KLÖN, P.C., SCHWARZ, P., RUDDLE, N. H., WEISSMANN, C., AGUZZI, A., (2005), CHRONIC LYMPHOCYTIC INFLAMMATION SPECIFIES THE ORGAN TROPISM OF PRIONS, SCIENCE ONLINE (20.JAN. 2005)

HÖRNLIMANN, B. (2001): Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten. aus: Hörnlmann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. (Hrsg.), Walter de Gruyter, Berlin, 1-19

HORIUCHI, M. N., YAMAZAKI, N., IKEDA, T., ISHIGURO, H., SHINAGAWA, M. (1995): A cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep, *J Gen Virol*, 76, 2583-2587

protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335 (13), 924-930

HUANG, Z., PRUSINER, S. B., COHEN, F. E. (1996): Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment, *Fold Des.*, 1 (1), 13-9

IDEXX Laboratories Inc., USA; IDEXX Herd Check BSE Antigen Test Kit
Produktbeschreibung: www.idexx.com

INPRO BIOTECHNOLOGY, San Francisco, Kalifornien (USA): InPro CDI-5™ Test
Produktbeschreibung, <http://www.inpro-biotech.com>

INSITUT POURQUIER, France; Pourquier – LIA BSE Produktbeschreibung

ISOBE, T., TAKAHASHI, K., OKUYAMA, T. (1984): S-100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem* 43 (5), 1494-1496

JACKMAN, R., SCHMERR, M. J. (2003): Analysis of the performance of antibody capture methods using fluorescent peptides with capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 24 (5), 892-896

JARRETT, J.T., LANSBURY, P.J. (1993): Seeding "one dimensional cristallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058

JIMI, T., WAKAYAMA, Y., SHIBUYA, S., NAKATA, H., TOMARU, T., TAKAHASHI, Y., KOSAKA, K., ASANO, T. KATO, K. (1992): High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Chim Acta* 211, 37-46

JONES, V., MARTIN, T. C., KEYES, P., DAWSON, M. (1996): Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 139 (15), 360-363

KESHET, G.I., OVADIA, H., TARABOULOS, A., GABIZON, R., (1999): Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase, *J. Neurochem.*, 72, 225-226

KESHET, G. I., BAR-PELED, O., YAFFE, D., NUDEL, U., GABIZON, R., (2000): The cellular Prionprotein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain, *J. Neurochem.* 75, 1889-1897

KNEIPP, J., LASCH, P., BALDAUF, E., BEEKES, M., NAUMANN, D. (2000): Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1501 (2-3), 189-199

KNEIPP, J., BEEKES, M., LASCH, P., NAUMANN, D. (2002): Molecular changes of preclinical scrapie can be detected by infrared spectroscopy. *J Neurosci* 22 (8), 2989-2997

KNIGHT, R. (2004): Prion diseases. *Vox Sang* 87 (Suppl. 1), 104-106

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., WÜTHRICH, K., OESCH, B. (1997): Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390 (6655), 74-77
- KOCISKO, D. A., COME, J. H., PRIOLA, S. A., CHESEBRO, S. A., RAYMOND, G. J., LANSBURY, P. T., CAUGHEY, B., (1994): Cell-free formation of protease-resistant prion protein, *NATURE*, 370, 471-474
- KRETZSCHMAR, H. A. (2001): BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. *Deutsches Ärzteblatt* 98 (40), A-2576
- KÜBLER, E., OESCH, B., RAEBER, A. J. (2003): Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull* 66, 267-279
- KURSCHNER, C., MORGAN, J. I., (1995): The cellular Prionprotein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system, *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 30, 165-168
- LASCH, P., SCHMITT, J., BEEKES, M., UDELHOVEN, T., EIDEN, M., FABIAN, H., PETRICH, W., NAUMANN, D. (2003): Antemortem Identification of Bovine Spongiform Encephalopathy from Serum Using Infrared Spectroscopy. *Anal Chem* 75 (23), 6673-6678
- LEGNAGE, G., BASKAKOV, I. V., NGUYEN, H. O., RIESNER, D., COHEN, F. E., DEARMOND, S. J., PRUSINER, S. B. (2004): Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673-676
- LLEWELYN, C. A., HEWITT, P. E., KNIGHT, R. S., AMAR, K., COUSENS, S., MACKENZIE, J., WILL, R.G. (2004): Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363, 417-421
- LLOYD, S. E., LINEHAM, J. H. M., DESBRUSLAIS, M., JOINER, S., BUCKELL, J., BRANDNER, S., WADSWORTH, J.D., COLLINGE, J., (2004): Characterisation of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice, *J. Gen. Virol.* (Pt 8), 2471-2478
- LO, Y. M. (2001): Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 945, 1-7
- MAISSEN, M., ROECKL, C., GLATZEL, M., GOLDMANN, W., AGUZZI, A. (2001): Plasminogen binds to disease-associated Prionprotein of multiple species. *Lancet* 357 (9273), 2026-2028
- MANAKA, H., KATO, T., KURITA, K., KATAGIRI, T., SHIKAMA, Y., KUJIRAI, K., KAWANAMI, T., SUZUKI, Y., NIHEI, K., SASAKI, H. (1992): Marked increase in cerebrospinal fluid ubiquitin in Creutzfeldt-Jakob Disease, *Neurosci Lett* 139, 47-49

MC KINLEY, M.P., BOLTON, D. C., PRUSINER, S. B., (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62

MC KINLEY, M. P., BRAUNFELD, M. B., BELLINGER, C. G., PRUSINER, S. B. (1986): Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect Dis* 154(1), 110-120

MC LEOD, A. H., MURDOCH H., DICKINSON J., DENNIS, M. J., HALL, GA, BUSWELL CM, CARR J, TAYLOR, D. M., SUTTON, J. M., RAVEN, N. D., (2004): Proteolytic inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent, *Science* 317, 1165-1170

MEYER, R. K., MCKINLEY, M. P., BOWMAN, K. A., BRAUNFELD, M. B., BARRY, R. A., PRUSINER, S. B. (1986): Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci* 83 (8), 2310-2314

MICROSENS BIOTECHNOLOGY NEWS, <http://www.microsens.co.uk/press3.html>, Pressemitteilung Mai 2004

MIELE, G., MANSON, J., CLINTON, M. A. (2001): A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* 7 (3), 361-364

MILLHAUSER, G. L. (2004): Copper binding in the prion protein. *Acc Chem Res* 37, 79-85

MOKUNO, K., KATO, K., KAWAI, K., MATSUOKA, Y., YANAGI, T., SOBUE, I. (1983): Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci* 60 (3), 443-451

OESCH, B., TELOW, D. B., STAHL, N., SERBAN, D., HOOD, L. E., PRUSINER, S. B., (1990): Identification of cellular proteins binding to scrapie prion protein, *Biochemistry* 29, 5848-5858

O.I.E. (2004): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5. Auflage, O.I.E. Paris

ORMEROD, M.G. (2000): Flow Cytometry, Oxford University Press, Oxford, UK. 3. Auflage

OTTO, M., WILTFANG, J., TUMANI, H., ZERR, I., LANTSCH, M., KORNHUBER, J., WEBER, T., KRETZSCHMAR, H. A., POSER, S. (1997): Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob Disease. *Neurosci Lett* 225, 210-212

OTTO, M., WILTFANG, J., SCHÜTZ, E., ZERR, I., OTTO, A., PFAHLBERG, A., GEFELLER, O., UHR, M., GIESE, A., WEBER, T., KRETZSCHMAR, H. A., POSER, S. (1998): Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S-100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ* 316, 577-582

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. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10962-10966

PAULY, P. C., HARRIS, D. A., (1998): Copper stimulates endocytosis of the Prionprotein in vivo, *J. Biol. Chem.*, 273 33107-33110

PIENING, N., WEBER, P., GIESE, A., KRETZSCHMAR, H. (2005): Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, 339-343

PRIONICS AG, Switzerland: Prionics® Check LIA Test Produktbeschreibung: www.prionics.ch

PRUSINER, S. B., GROTH, D. F., COCHRAN, S. P., MASIARZ, F. R., MCKINLEY, M. P., MATINEZ, H. M., (1980): Molecular properties, partial purification and assay by incubation period measurements of hamster scrapie agent, *Biochemistry* 19, 4883-4891

PRUSINER, S. B., MCKINLEY, M. P., GROTH, D. F., BOWMAN, K. A., MOCK, N. I., COCHRAN, S. P., MASIARZ, F. R. (1981), Scrapie agent contains a hydrophobic protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 78 (11):6675-9.

PRUSINER, S. B. (1991): Molecular biology of prion diseases. *Science* 252,1515-1522

PRUSINER, S. B. (1995): The prion diseases. *Sci Am* 272 (1), 48-57

PRUSINER, S. B. (1998): Prions. *Proc Natl Acad Sci* 95, 13363-13383

PRUSINER, S. B. (2001): Die Geschichte der Erforschung von Prionen; aus: *Prionen und Prionkrankheiten*; Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. (Hrsg.), 36-49

RIEK, R., HORNEMANN, S., WIDER, G., BILLETER, M., GLOCKSHUBER, R., WÜTHRICH, K. (1997): NMR structure of the mouse Prionproteindomain PrP (121-231). *Nature* 382 (6587), 180-182

RIESNER, D. (2001): Die Scrapie-Isoform des Prion-Proteins PrP^{Sc} im Vergleich zur zellulären Isoform PrP^C, aus *Prionen und Prionkrankheiten*, Walter de Gruyter, Berlin, S. 81 – 84

ROCHE® DIAGNOSTICS, Switzerland; Prion Screen Produktbeschreibung: www.roche-diagnostics.com

RYAN, A. M., WOMACK, J. E., (1993): Somatic cell mapping of the bovine Prionproteingene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle and sheep. *Animal Genetics* 24: 23-26

SABORIO, G. P., PERMANNE, B., SOTO, C. (2001): Sensitive detection of pathological Prionprotein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813

SAFAR, J., WILLE, H., ITRI, V., GROTH, D., SERBAN, H., TORCHIA, M., COHEN, F. E., PRUSINER, S. B. (1998): Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nature Med* 4 (10), 1157-1165

SAKUDO, A., LEE, D., NISHIMURA, T., LI, S., TSUJI, S., NAKAMURA, T., MATSUMOTO, Y., SAEKI, K., ITHOARA, S., IJUTA, K., ONODERA, T., (2005): Octapeptide repeat region and T-terminal half of hydrophobic region of Prionprotein(PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326, 600-606

SANCHEZ, J. C., GUILLAUME, E., LESCUYER, P., ALLARD, L., CARRETTE, O., SCHERL, A., BURGESS, J., CORTHALS, G. L., BURKHARD, P. R., HOCHSTRASSER, D. F. (2004): Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 4 (8), 2229-2233

SATOH, J., KUROHARA, K., YUKITAKE, M., KURODA, Y. (1999): The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. *Eur Neurol* 41 (4), 216-225

SCHMERR, M.J., Goodwin K.R., Cutlip, R.C. (1994): Capillary electrophoresis of the scrapie prion protein from sheep brain, *J Chromatography A*, 680(2), 447-453

SCHMERR, M. J., GOODWIN K. R., CUTLIP, R.C., JENNY, A. L. (1996): Improvements in a competition assay to detect scrapie prion protein by capillary *electrophoresis*, *J Chromatography B*, 681, 29-35

SCHMERR, M.J., Jenny, A. L., CUTLIP, R. C. (1997): Use of capillary sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis to detect the prion protein extracted from scrapie-infected sheep, *J Chromatography B*, 697, 223-229

SCHMERR, M. J., JENNY, A. L. (1998): A diagnostic test for scrapie-infected sheep using a capillary electrophoresis immunoassay with fluorescent-labeled peptides, *Electrophoresis* 19, 409-414

SCHMERR, M. J., CUTLIP R. C., JENNY, A. L. (1998): Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein, *J Chromatography A*, 802 (1), 135-141

SCHMERR, M. J., JENNY, A. L., BULGIN, M. S., MILLER, J. M., HAMIR, A. N., CUTLIP, R. C., GOODWIN, K. R. (1999): Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to

detect the abnormal Prionprotein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatography A* 853 (1-2), 207-214

SCHMERR (2000): Method and Kit for extracting Prionprotein United Patent, Patent Number: 6150172

SCHMITT, J., BEEKES, M., BRAUER, A., UDELHOVEN, T., LASCH, P., NAUMANN, D. (2002): Identification of scrapie infection from blood serum by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Chem* 74 (15), 3865-3868

SHAPIRO, B., CHAKRABARTY, M., COHN, E. M., LEON, S. A. (1983): Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51 (11), 2116-2120

SHORTER, J., LINDQUIST, S. (2004): Hsp104 Catalyzes Formation and Elimination of Self-Replicating Sup35 Prion Conformers. *Science* 304 (5678), 1793-1797

STAHL, N., BALDWIN, M. A., BURLINGAME, A. L., PRUSINER, S. B. (1990): Identification of glycoinositol phospholipid-linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29 (38): 8879-8884

STAHL, N., BOULTON, T.G., IP N, DAVIS S., YANCOPOULOS, G.D., (1994): The tails of two proteins: the scarpie Prionprotein and the ciliary neurotrophic factor receptor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 297-301,

STIMSON, E., HOPE, J., CHONG, A., BURLINGAME, L. (1999): Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestion, *Biochemistry*, 38, 4885-4895

STRUMBO, B., RONCHI, S., BOLIS, L. C., SIMONIC, T. (2001), Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein, *FEBS Lett.* 508, 170-174.

TAYLOR, D. M. (2000): Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A review; *The Veterinary Journal*, 159, 10-17

TELLING, G. C., SCOTT, M., MASTRIANNI, J., GABIZON, R., TORCHIA, M., COHEN, F. E., DEARMOND S. J., PRUSINER, S. B. (1995): Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83 (1), 79-90

TERRY, L. A., MARSH, S., RYDER, S. J., HAWKINS, S. A., WELLS, G. A., SPENCER, Y. I. (2003): Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 152 (13), 387-392

THOMZIG, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W., KRATZEL, C., MAI, J., BEEKES, M. (2004 a): Preclinical deposition of pathological PrionproteinPrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* 113 (10), 1465-1472

THOMZIG, A., SPASSOV, S., FRIEDRICH, M., NAUMANN, D., BEEKES, M. (2004 b): Discriminating scrapie and BSE isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem* 279 (32), 33847-33854

TOBLER, I., GAUS, S.E., DEBOER, T., ACHERMANN, P., FISCHER, M., RULICKE, 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* 380 639-642

TOBLER, I., DEBOER, T., FISCHER, M. (1997), Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice, *Journal of Neuroscience*, Vol. 17, Nr. 5, 1869-1879

TRANULIS, M.A., ESPENES, A., COMINCINI, S., SKRETTING, G., HARBITZ, I. (2001)
The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mammalian Genome* 12: 376-379

TRAUTWEIN-HEWICKER, M., HADLOW, W. J., DETWILER, L., WILIAMS, E., S., POHLENZ, J., (2001), Die Pathologie der Prionkrankheiten beim Tier, aus Prionen und Prionkrankheiten von Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H., *De Gruyter*, 27, 225-230

VERORDNUNG EG 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien. (Aktualisierte Fassung als konsolidierter Text des Amtes für amtliche Veröffentlichungen der Europäischen Gemeinschaften vom 16.02.2005)

VERORDNUNG zur fleischhygienerechtlichen Untersuchung von geschlachteten Rindern auf BSE (BSEUNTERSIV), 01.12.2000, i.d.F.v. 18.09.2002

VILES, J. H., COHEN, F. E., PRUSINER, S. B., GOODIN, D.B., WRIGHT, P. E. (1999): Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 2042-2047

VÖLKEL, D., ZIMMERMANN, K., ZERR, I., LINDNER, T., BODEMER, M., POSER, S., SCHWARZ, H. P. (2001): C-reactive protein and IL-6: new marker proteins for the diagnosis of CJD in plasma? *Transfusion* 41 (12), 1509-1514

- WADSWORTH, J. D. J., JOINER, S., FILL, A. F., CAMPBELL, T. A., DESBRUISLAIS, M., LUTHER, P. J., COLLINGE, J., (2001), Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jacob disease using highly sensitive immunoblotting assay, *The Lancet*, Vol. 358, July 21, 171 - 180
- WEISSMANN, C., ENARI, M., KLOHN, P. C., ROSSI, D., FLECHSIG, E. (2002): Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci* 99 Suppl 4, 16378-16383
- WEISSMANN, C., FLECHSIG, E., (2003), PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research, *British Medical Bulletin*, 66, 43-60
- 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 of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925
- WILL, R. G., WARD, H. J. (2004): Clinical features of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 284, 121-132
- WINDL, O., DEMPSTER, M., ESTIBEIRO, P., LATHE, R. (1995). A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene* 159, 181-186.
- WOPFNER, F., WEIDENHÖFER, G., SCHNEIDER, R., BRUNN, A., GILCH, S., SCHWARZ, T. F., WERNER, T., SCHÄTZL, H. M. (1999): Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrP's reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* (289), 1163 - 1178
- YANG, W., YEUNG, E.S., SCHMERR, M.J. (2005): Detection of prion protein using capillary electrophoresis-based competitive immunoassay with laser-induced fluorescence detection and cyclodextrin-aided separation, *Electrophoresis*, 26
- YAMAKAWA, Y., HAGIWARA, K., NOHTOMI, K., NAKAMURA, Y., NISHIJIMA, M., HIGUCHI, Y., SATO, Y., SATA, T. (2003): Atypical proteinase K-resistant Prionprotein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis* 56 (5-6), 221-222
- ZERR, I., BODEMER, M., RACKER, S., GROSCHE, S., POSER, S., KRETZSCHMAR, H. A., WEBER, T. (1995): Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 345 (8965), 1609-1610
- ZERR, I., POSER, S. (2002): Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. *APMIS* 110, 88-98
- ZERR, I., SCHULZ-SCHAEFER, W. (2003): Ein Prion gibt Rätsel auf, *Georgia Augusta* 2, 99-103

ZOU, W. Q., ZHENG, J., GRAY, D. M., GAMBETTI, P., CHEN, S. G. (2004): Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci* 101, 1380-1385

Lebenslauf

Name	Fritz
Vorname	Markus
Geburtsdatum	09.08.1970
Eltern	Renate Fritz-Kollmer, geb. Kollmer, Krankenschwester Dieter Fritz, Lehrer
Schulbildung	September 1977 bis Juli 1982: Grund- und Teilhauptschule Adelschlag September 1982 bis Mai 1991: Gabrieli-Gymnasium Eichstätt
Schulabschluß	Allgemeine Hochschulreife
Militärdienst	Juli 1991 bis Oktober 1992: Grundwehrdienst/Zeitsoldat als Sanitäter im Jagdgeschwader 74 Neuburg/Donau
Berufsausbildung	September 1993 bis Mai 1995: Ausbildung zum Med. Techn. Laboratoriumsassistenten am Klinikum Ingolstadt
Studium	Oktober 1995 bis Mai 2001: Studium der Veterinärmedizin an der Ludwigs-Maximilians Universität München
Abschluß	Staatsexamen
Promotion	August 2001 bis April 2005 am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Freising- Weihenstephan
Berufliche Tätigkeit	1. Mai 2005: Wiedereintritt in die Bundeswehr als Veterinär

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Märtlbauer für die Übernahme dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Professor Bauer möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die mir gewährte Unterstützung sowie die freundliche und sehr geduldige Betreuung ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. K. Meyer danke ich sehr für seine fachliche Betreuung und Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit.

Für die Überlassung von Hirnproben und Liquor infizierter Tiere danke ich Herrn Prof. Schmahl, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie Herrn Professor Klee, II. Medizinische Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Bereitstellung von Liquor nicht infizierter Tiere.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Danken möchte ich dabei Dr. Karin Schweiger, Barbara Dörr, Doris Kirchgatter und Andrea Kolm, die mir bei der Einarbeitung und Durchführung der praktischen Arbeiten zur Hand gegangen sind. Zu großem dank bin ich auch Herrn Dipl. Oec. Christoph Gottschalk für die unendliche Geduld bei der Behebung von Computerproblemen und bei der Durchführung von Versuchen.

Außerdem sei noch all den anderen gedankt, die mich auf dem Weg von Beginn bis zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung, sowie ihr Vertrauen und ihre Liebe diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.