

4 Material und Methoden

4.1 Material

Spannungsgeräte	Pherostab 200 und 500 Biotec Fischer (Reiskirchen)
Elektrophoresesysteme	Mini Protean TM II Dual Slab Cell, Biorad (München)
Blotapparatur	Fast Blot, Biometra (Göttingen)
Zentrifugen und Rotoren	Tisch-Ultrazentrifuge TL- 100 mit Rotor TLA-45 Beckman Instruments (München) Ultrazentrifuge himac CS 150 GX, Hitachi (Japan)
Ultraschallgeräte	Sonicator Cell Disruptor W 185 F mit Ultraschallnase, Heatsystems Ultrasonic Inc. (Plainview, NY, USA)
Ultraturrax	Ultraturrax, IKA Labortechnik (Staufen)
Sonstige Geräte	Eppendorfschüttler 5432, Eppendorf (Hamburg) Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg) Gelschüttler GFL 3016, Karow (Berlin) Vortex-Schüttler Reax 2000, Heidolph (Schwabach) Taumelschüttler, Heidolph (Schwabach) Entwässerungsautomat TP 1040, Leica (Solms) Paraffinausgießstation, Mikrom (Walldorf) Schlittenmikrotom, Mikrom (Walldorf)

Antikörper und Immunokits:	<p>Alkalische Phosphatase–konjugierte anti–Maus IgG aus der Ziege, Dako (Hamburg)</p> <p>Biotinylierte anti-Maus igG aus dem Kaninchen, Dako (Hamburg)</p> <p>Monoklonaler Antikörper 3F4 (Kascsak et al., 1987)</p> <p>Ziegennormalserum, Dako (Hamburg)</p> <p>Kaninchennormalserum, Dako (Hamburg)</p> <p>Mausnormalserum, Dako (Hamburg)</p>
Enzyme:	<p>Proteinase K aus Titrachium Album, Serva (Heidelberg)</p> <p>Collagenase A aus Clostridium histolyticum, Roche Diagnostics (Mannheim)</p> <p>PnGAse F Kit , Biolabs (New England, USA)</p>
Proteinstandards:	<p>Pharmacia Molecular weight marker, Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)</p>
Chemolumineszenz-Kits	<p>CDP-Star mit Nitroblock II ready-to-use-Lösung, Applied Biosystems (Bedford, USA)</p> <p>CDP-Star Konzentrat, Applied Biosystems (Bedford, USA)</p>
Verbrauchsmaterialien:	<p>Immobilon™ P-transfer-Folie, 0,45 µm, PVDF, Millipore (Bedford, England)</p> <p>Nitrocellulose Folie, 0,45 µm, Biorad (Richmond, USA)</p> <p>Whatman-Blotpapier GB002 Schleicher und Schüll, (Dassel)</p> <p>Zentrifugenröhrchen, Beckmann (München)</p> <p>Röntgenfilme, Kodak (New York, USA)</p> <p>Objektträger Superfrost Menzel (Burgdorf)</p>

4.1.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Scrapie-Forschung hat sich der Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) als besonders geeignetes Versuchstier erwiesen, unter anderem da er bei Verwendung des Scrapie-Stammes 263 K im Gegensatz zu anderen Versuchstieren wie etwa der Maus deutlich kürzere Inkubationszeiten bis zum Ausbruch der Krankheit hat und auch höhere Erregertiter entwickelt (Kimberlin und Walker, 1977).

Die Versuchstiere stammten aus der zentralen Versuchstieranstalt des BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, jetzt BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung) und waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 und 10 Wochen alt. Die Hamster wurden einzeln in nummerierten Käfigen auf autoklavierten Sägespänen gehalten. Die genutzten Ställe des Robert Koch-Instituts, die ausschließlich zur Haltung der Hamster für die Scrapieforschung vorgesehen sind, sind klimatisiert bei 22 °C und haben einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

4.1.2 Infektionstechniken

Die Hamster wurden mit dem Erregerstamm 263 K bzw. dem Stamm ME7-H infiziert. (Kimberlin und Walker, 1977). Für eine Versuchsreihe (Reihe 4) wurde der Stamm BSE-H verwendet (Thomzig et al. 2004a).

4.1.3 Orale Infektion

Die sechs bis acht Wochen alten Hamster wurden mit 100 µl Hirnhomogenat (10 % (w/v) Homogenat in TBS) (10^{-2} Hirnäquivalente) eines terminal kranken Hamsters oral infiziert. Dazu wurde das Hirnhomogenat auf ein Futterpellet gegeben und den Tieren nach mindestens 12 stündigem Futterentzug verfüttert. Nach dem vollständigen Auffressen des Pellets wurden einzelne Tiere, deren Fäzes untersucht werden sollten, in Stoffwechselkäfige der Firma Harvard Apparatus gehalten.

4.1.4 Klinische Beobachtung

Alle Hamster wurden nach der Infektion zweimal wöchentlich von Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe diagnostiziert. Aufgrund des konsistenten Infektionsverlaufs konnte dabei auf eine Diagnose während der ersten 120 Tage nach peroraler Infektion verzichtet

werden. Um einen schnellen Überblick über den Zustand der Tiere zu gewinnen, wurde ihr Verhalten in vier Kategorien eingeteilt und bei jeder Untersuchung protokolliert. Es ergeben sich bei allen Tieren folgende Einteilungen:

Ohne Befund (o.B.)

Die Tiere wirken gesund und verhalten sich genauso wie nicht infizierte Kontrolltiere.

Verdacht (V)

Die Tiere reagieren auf Fingerschnippen und Berührung ängstlich und nervös, während die Bewegungen noch unauffällig sind.

Scrapie-Verdacht (SV)

Charakteristisches Zeichen der Erkrankung ist ein Wackeln des Kopfes der Hamster, welches meist schon im Ruhezustand auftritt, aber in jedem Fall durch Berührung mit einer Pinzette oder durch Fingerschnippen ausgelöst werden kann. Die Tiere bewegen sich unkoordiniert und in Schlangenlinien fort, Futter- und Wasseraufnahme der Tiere ist noch ausreichend.

Scrapie (S)

Die Hamster sind aufgrund einer schweren Ataxie nicht, oder nur noch sehr eingeschränkt in der Lage Futter oder Wasser aufzunehmen. Durch Berührungen werden Krampfanfälle ausgelöst, und die Tiere können sich aus der Rückenlage nur schwer bzw. gar nicht alleine aufrichten.

Um ein Leiden der Tiere zu verhindern, werden die Tiere beim Erreichen dieses Stadiums als terminal kranke Tiere eingestuft und getötet. Benötigte Gewebe werden entnommen.

4.1.5 Tötung und Probenentnahme

Hamster, die das terminale Stadium erreicht haben bzw. bei denen die für den Versuch erforderliche Inkubationsdauer verstrichen war, wurden getötet, indem sie in einen mit CO₂ gesättigten Exikator gesetzt wurden und dort bis zum Eintritt des Todes, nach Atem- und Herzstillstand belassen wurden.

Zur Entnahme von Rektum und Fäzes (falls kein Stoffwechselkäfig zum Halten verwendet wurde) wurde das Peritoneum lateral eröffnet. Der Darm wurde frei präpariert

und ein ca. 1,5 cm langes Stück des Rektums, einschließlich des Schließmuskels entnommen und in einem geeigneten Gefäß bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C eingefroren. Der Kot wurde aus einem ca. 20 cm langen Darmabschnitt oberhalb des Rektum ausgestrichen und ebenfalls in einem geeigneten Gefäß bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

Für jeden Erregerstamm wurde dabei ein eigener Instrumentensatz verwendet.

Für die Entnahme von Proben, die mittels Immunhistochemie oder im PET-Blot untersucht werden sollten, wurden die Tiere nach ihrer Tötung sofort mit Periodate Lysine Paraformaldehyd (PLP) perfundiert (McBride et al., 1998). Nach Waschen in TBS wurden die Proben fünf Stunden in PLP nachfixiert. Anschließend erfolgte eine Gewebeentwässerung mit folgenden Schritten

Ethanol 70 %	12 h
Ethanol 70 %	40 min
Ethanol 80 %	40 min
Ethanol 90 %	40 min
Ethanol absolut	40 min
Ethanol absolut	40 min
Ethanol 50 %/Xylol 50 %	30 min
Ethanol 50 %/Xylol 50 %	30 min
Xylol	30 min
Xylol	30 min
Paraffin	25 min
Paraffin	25 min
Paraffin	25 min

Am folgenden Tag wurden die Organe in einer Histokinette mit 60°C heißem Paraffin übergossen. Nach Erkalten des Paraffins waren die Präparate schnittfähig.

4.1.6 Probengewinnung im Stoffwechselkäfig

Eine bestimmte Anzahl von Versuchstieren wurde einzeln in Stoffwechselkäfigen der Firma Harvard Apparatus, Holliston, USA gehalten, bei denen der Kot und der Urin getrennt gesammelt werden konnten. Der Kot wurde täglich entnommen, in geeignete Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

4.2 Präparative biochemische Methoden: Rektumproben

4.2.1 Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Rektumproben wurden zunächst von Haaren und Bindegewebe befreit und dann in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Dann wurden die Proben dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Proben je 500 µl TBS (mit 25 mg CaCl₂ / 100 ml) gegeben. Nach Zugabe von 12,5 µl einer Collagenase-Stammlösung [100 mg/ml] (Endkonzentration: 2,5 mg/ml) wurden die Proben zur Desintegration des Gewebes 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Collagenase wurden die Proben für 10 Minuten auf 80 °C erhitzt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben dann bei –80 °C gelagert, bzw. für die immunhistochemischen Verfahren in Formalin fixiert.

4.2.2 Biochemische Extraktion des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc} aus Darmproben

Die Proben wurden durch Ultraschallung mit einer Fingersonde homogenisiert und das Volumen mit TBS auf 1 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration des Gewebes betrug dabei 80-100 mg je Milliliter. Die folgenden Zentrifugationen wurden bei 4 °C durchgeführt, soweit nichts anders vermerkt ist. Die Zentrifugationen erfolgten im TLA-45 Rotor von Beckman bzw. einem vergleichbaren Rotor von Hitachi. Je 1 Milliliter des Homogenates wurde 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert [1.500 x g] (Zentrifugation 1 a). Der resultierende Überstand wurde in ein 1,5 ml Polyallomer- Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt, das Pellet wurde mit 0,5 ml TBS versetzt und mit dem Vortex gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation des resuspendierten Pellets im TLA-45 Rotor [3 min bei 5.000 rpm] (Zentrifugation 1b) wurde der Überstand abgenommen und mit dem Überstand der Zentrifugation 1a vereinigt. Das verbleibende Pellet wurde verworfen. Die vereinigten Überstände aus den Zentrifugationen 1a und 1b wurden im TLA-45 Rotor 40 min bei 20.000 rpm zentrifugiert [25.000 x g] (Zentrifugation 2). Der resultierende Überstand wurde abgehoben und verworfen. Das Pellet aus der Zentrifugation 2 wurde in 1 ml 1 % (w/v) Sacrosyl / TBS aufgenommen und mit der Ultraschallfingersonde resuspendiert (Lösung 2). Diese Suspension wurde im TLA-45 Rotor 2,5 h mit 45.000 rpm zentrifugiert [125.000 x g] (Zentrifugation 3). Der resultierende Überstand wurde abgehoben und verworfen. Das Pellet aus Zentrifugation 3 wurde in 1 ml 0,1 % (w/v) Sacrosyl / 10 % (w/v) NaCl / TBS aufgenommen und mit der Ultraschallfingersonde homogenisiert. Nach

Zugabe von 2,5 µg Proteinase K (d.h. Zugabe von 2,5 µl einer Stammlösung mit 1 mg Proteinase K / ml) wurden die Proben 15 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz im TLA-45 Rotor 2,5 h mit 45.000 rpm zentrifugiert [125.000 x g] (Zentrifugation 4). Der resultierende Überstand wurde vom Pellet abgehoben und verworfen. Das Pellet wurde in 20 µl Probenpuffer (2xLPP) aufgenommen, 5 min gekocht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3 Präparative biochemische Methoden: Fäzesproben

4.3.1 Vorbereitung der Proben

Fäzes von Tieren aus der kinetischen Studie wurden in TBS aufgenommen und mit dem Ultraturrax suspendiert. Die Endkonzentration des Fäzeshomogenates betrug dabei 10 % (w/v). Als Trägermaterial wurde ferner 10 %iges (w/v) Hirnhomogenat von gesunden Hamstern zugesetzt, welches in einer Endkonzentration von 1,25 % (v/v) vorlag, also einer Endkonzentration von 0,125 % (w/v) Hirnmaterial. Es wurden je 4 ml dieser angesetzten Menge, aufgeteilt auf 3 Reaktionsgefäße, aufgearbeitet, wobei die Pellets am Ende vereinigt wurden.

4.3.2 Standardproben

Um zu zeigen, dass eventuell vorhandenes infektiöses Prion-Protein mit dieser Methode tatsächlich in Fäzes nachgewiesen werden kann, liefen bei jedem Versuch Standards mit, die eine definierte Menge an zugesetztem Hirnmaterial enthielten.

Für die Negativkontrolle wurde Hirngewebe aus gesunden Hamstern (N-Hirnhomogenat) verwendet, während für die Positivkontrollen Hirnhomogenat von terminal an Scrapie erkrankten Hamstern (S-Hirnhomogenat) in definierter Menge zugesetzt wurde. Als Maßstab für die Menge an infektiösem Material wurde dabei die Einheit Hirnäquivalente (HÄ) verwendet. In Vorversuchen wurde herausgefunden, dass die Nachweisgrenze für PrP^{Sc}/PrP27-30 im Western Blot für aufgearbeitete Fäzesproben bei ca. 5×10^{-6} zugesetzten Scrapie-Hirnäquivalenten pro aufgetragene Gelspur lag. Als Standards für die Aufarbeitung von Fäzesproben wurde Kot von gesunden Kontrolltieren in 10 %iger Endkonzentration (w/v) in TBS aufgenommen und mit entsprechenden Mengen N- und/oder S-Hirnhomogenat dotiert. Den Ansätzen für die Negativkontrollen wurde 10 %iges N-Hirnhomogenat zugegeben, 2,5 % (v/v) in jedem Ansatz [Endkonzentration

Hirnmateriale 0,25 % (w/v)]. Da für die Standards nur eine Menge von 1 ml homogenisierter Fäzes aufgearbeitet wurde und daher das Endpellet deutlich kleiner blieb, wurde eine größere Menge Hirnmateriale verwendet, um ein deutlich erkennbares Pellet zu gewährleisten. Den Ansätzen für die Positivkontrollen wurden verschiedene Konzentrationen (10^{-6} - 10^{-5} HÄ je ml) von infektiösem Hirnmateriale zugegeben. Des Weiteren wurde auch hier 10 %iges N-Hirnhomogenat als Trägermateriale zugegeben [Endkonzentration Hirnmateriale 0,25 % (w/v)]. Danach wurden die Proben mit dem Ultraturax homogenisiert, mit der Ultraschallfingersonde behandelt und in Reaktionsgefäßen zu je 1 ml aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

4.3.3 Biochemische Extraktion des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc} aus Fäzesproben

Die folgenden Zentrifugationen wurden bei 4 °C durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt ist. Die Zentrifugationen erfolgten im TLA-45 Rotor von Beckman bzw. einem vergleichbaren Rotor von Hitachi. Je 4 Milliliter der Fäzesproben, aufgeteilt auf drei Reaktionsgefäße, wurden 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert [1.500 x g] (Zentrifugation 1a). Der resultierende Überstand wurde in drei 1,5 ml Polyallomer- Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt, die Pellets wurden mit jeweils 0,5 ml TBS versetzt und mit dem Vortex gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation der resuspendierten Pellets im TLA-45 Rotor [3 min bei 5.000 rpm] (Zentrifugation 1b) wurden die Überstände abgenommen und mit den Überständen der Zentrifugation 1a vereinigt. Die verbleibenden Pellets wurden verworfen. Die vereinigten Überstände aus den Zentrifugationen 1a und 1b wurden im TLA-45 Rotor 40 min bei 20.000 rpm zentrifugiert. [25.000 x g] (Zentrifugation 2a). Die resultierende Überstände wurde abgehoben und verworfen. Die Pellets aus der Zentrifugation 2a wurden in jeweils 700 µl 1 % (w/v) Sacrosyl / TBS aufgenommen und mit der Ultraschallfingersonde resuspendiert (Lösung 2). Diese Suspension wurde im TLA-45 Rotor 40 min **bei 20 ° C** mit 20.000 rpm zentrifugiert [25.000 x g] (Zentrifugation 2b). Die Überstände aus der Zentrifugation 2b wurden auf zwei neue Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) vereinigt und das Pellet wurde verworfen. Die Überstände wurden im TLA-45 Rotor 2,5 h mit 45.000 rpm zentrifugiert [125.000 x g] (Zentrifugation 3). Der resultierende Überstand wurde abgehoben und verworfen. Die Pellets aus Zentrifugation 3 wurden in jeweils 500 µl 0,1 % (w/v) Sacrosyl / 10 % (w/v) NaCl / TBS aufgenommen und mit der Ultraschallnase homogenisiert und anschließend

vereinigt. Nach Zugabe von 12,5 µg Proteinase K (d.h. Zugabe von 12,5 µl einer Stammlösung mit 1 mg Proteinase K / ml) wurden die Proben 15 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz im TLA-45 Rotor 2,5 h mit 45000 rpm zentrifugiert (Zentrifugation 4). Der resultierende Überstand wurde vom Pellet abgehoben und verworfen. Das Pellet wurde in 20 µl Probenpuffer (2xLPP) aufgenommen, 5 min gekocht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3.4 Erstellung eines Standards für den Western Blot aus Hamsterhirn

Für die Erstellung eines Standards für die Western Blotuntersuchungen wurde folgender Ansatz angesetzt: 50 µl des 1:10 Hirnhomogenats in TBS wurden mit 5 µl 13 %iger (v/v) Sarcosyl- und 10 µl einer 1 mg/ml PK-Stammlösung gemischt, und 1 h bei 37° C im Thermomixer inkubiert. In diesen 65 µl Lösung befanden sich 5×10^{-3} HÄ (Lsg. A) Zu Lösung A wurden 435µl 2xLPP gegeben und 5 min im Wasserbad gekocht. Bis zum weiteren Gebrauch wurde diese Stammlösung bei -20 °C gelagert. Für die Auftragung auf das Gel wurden die benötigten Verdünnungen aus dieser Stammlösung durch Verdünnen mit 2 x LPP frisch erstellt. In 10 µl dieser Lösung befanden sich 10^{-4} HÄ.

4.4 PET-Blot Verfahren

4.4.1 Vorbereitung

Von den in Paraffin eingebetteten Darmproben wurden mit einem Schlittenmikrotom 4-6 µm dicke Schnitte angefertigt, im Wasserbad gestreckt und vorsichtig auf eine NC-Folie (0,45 µm) überführt. Die Schnitte wurden bei 50°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

4.4.2 Durchführung

Da es bis jetzt keine Antikörper gibt, die zwischen der zellulären und der pathologischen Form des PrP unterscheiden können, wird bei der Färbung von Paraffinschnitten sowohl PrP^{Sc} als auch PrP^C angefärbt. Eine Identifizierung des pathologischen PrP^{Sc} ist dabei jedoch nicht möglich. Bei dem PET-Blot wird jedoch nur PrP^{Sc} angefärbt, da PrP^C durch die Inkubation mit Proteinase K abgebaut wird (Schulz-Schaeffer et al., 2000).

Für die Färbung von Darmschnitten wurde das ursprüngliche Protokoll modifiziert.

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 2 x 5 min in Xylol, 2 x 3 min in 95 %

Isopropanol, 2 x 3 min in 70 % Isopropanol, 1 x 3 min in 50 % Isopropanol und 1 x 5 min in A. bidest. [0,1 % (v/v) Tween] gelegt. Anschließend wurde die Membran 10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Färbung wurde die Membran mit TBST angefeuchtet und zunächst 30 min bei 60 °C mit 1,5 mg / ml Collagenase A in Collagenase-Puffer inkubiert. Danach erfolgte bei 55 °C die Inkubation mit 15 µg / ml Proteinase K in PK-Puffer (8 Stunden). Nach 3 x 10 min Waschen mit TBST erfolgte eine 10 min Denaturierung mit 3 M Guanidiniumthiocyanat. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBST und 30 min Blockierung in 0,2 % (w/v) Casein in TBST wurde die Membran über Nacht mit dem Erstantikörper 3F4 (Verdünnung 1:2.500) bzw. mit NMS (Normal Maus Serum) (Verdünnung 1:25.000) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen und anschließend 60 min mit dem sekundären Antikörper (Rabbit anti-Mouse, AP-konjugiert, 1:2.000 in 0,2 % (w/v) Casein in TBST verdünnt) inkubiert. Die Membran wurde 5 x 10 min mit TBST gewaschen und 2 x 10 min in NTM vorinkubiert. Die Membran wurde 3-10 min in der Färbelösung (NBT / BCIP) inkubiert, bis deutliche Signale entwickelt waren. Nach einem kurzen Spülen in TBST wurde die Färbereaktion durch eine 5 minütige Inkubation in der Stopplösung gestoppt. Nach dreimaligem, kurzem Waschen mit TBST wurden die Schnitte getrocknet.

4.5 Immunhistochemische Methoden

4.5.1 Vorbereitung

Von den in Paraffin eingebetteten Darmproben wurden mit einem Schlittenmikrotom 4-6 µm dicke Schnitte angefertigt, im Wasserbad gestreckt und vorsichtig auf einen Super Starfrost Objektträger überführt. Die Schnitte wurden bei 37°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

4.5.2 Durchführung

Zunächst wurden die Schnitte rehydriert, je 5 min in folgenden Bädern: Xylol I, Xylol II, Ethanol 99 %, Ethanol 95 %, Ethanol 70 % und H₂O. Nach 10 min Inkubation in 1 % (v/v) H₂O₂ / Methanol und je 5 min Waschen in A. dest. und PBSB erfolgte eine 15-minütige Inkubation (Blockierung) mit 5% Normal Kaninchen Serum. Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (1:400 in PBSB verdünnt) bzw. NMS (1:2000 in PBSB

verdünnt) erfolgte für 60 Minuten. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBSB erfolgte für 60 min die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Kaninchen Anti-Maus biotinyliert (1:400 in PBSB verdünnt). Nach 30 min Inkubation mit dem ABC-Komplex (30 min vor Gebrauch angesetzt) und 3 x 5 min Waschen mit PBS erfolgte eine 5-10 minütige Färbung mit DAB. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser ab gespült, 30 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt und erneut mit Leitungswasser ab gespült. Nach einem kurzen differenzieren in 70 % Ethanol mit 1 % (v/v) HCl und 10 min Bläuen in Leitungswasser wurden die Schnitte dehydriert (je 5 min in 70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 99 % Ethanol, Xylol I und Xylol II) und mit DPX eingedeckt.

4.6 Analytische biochemische Methoden

4.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyarcylamidgelelektrophorese (SDS-disk PAGE)

4.6.1.1 Grundlagen

Mit Hilfe der SDS-Polyarcylamidgelelektrophorese (SDS-disk PAGE) können Nukleinsäuren und Proteine in Abhängigkeit von Masse und Ladung aufgetrennt und nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Elektrophorese können die aufgetrennten Proteine mobilisiert werden, um sie mit weiteren Methoden wie z.B. spezifischen Immunreaktionen untersuchen zu können.

Um der Gefahr der Hydrolyse der Peptidbindungen bei niedrigen pH-Werten vorzubeugen, werden die Elektrophoresen bei höheren pH-Werten (etwa 8.8) durchgeführt. Bei diesem pH-Wert liegen fast alle bekannten Proteine in negativ geladener Form vor. In einem elektrischen Feld wirkt auf eine Ladung Q die Kraft:

$$F_{\text{elektr.}} = Q \cdot U$$

wobei U die angelegte Spannung ist.

Durch diese Kraft erfahren die Proteine eine Beschleunigung in Richtung auf die Anode. Der beschleunigenden Kraft entgegen wirken die im Gel nicht unerheblichen Reibungskräfte F_{Reibung} mit:

$$F_{\text{Reibung}} = 6 \pi r v \eta$$

mit r = Stokes'scher Radius

v = Geschwindigkeit

η = Viskosität des Mediums

Jedes Protein wandert mit einer bestimmten konstanten Geschwindigkeit, die von seiner Ladung und seiner Größe (und damit von seinem Molekulargewicht) abhängt, durch das Gel. Dieses besteht aus einem vernetzten Copolymer von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Unter den angegebenen Bedingungen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine vom Ladungszustand und der Masse ab. Ein hochgeladenes schweres Protein könnte genauso schnell wandern, wie ein schwachgeladenes leichtes. Um die Trennung der Proteine vom Ladungszustand unabhängig zu gestalten, wird den Gelen SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) zugesetzt. Das SDS entsteht durch Veresterung von Schwefelsäure mit Dodekanol. Dadurch entsteht ein Molekül mit lipophilem Schwanz und hydrophilem Kopf. Als Detergenz denaturiert SDS die Proteine und kann über seinen unpolaren Molekülteil mit den unpolaren Seitenketten der Proteine in Wechselwirkung treten. Durch die assoziierten SDS-Moleküle erhalten alle Proteine soviel Ladung, dass deren Wanderungsgeschwindigkeit und damit ihre Trennung von der Ladung unabhängig und ausschließlich eine Funktion der Molekülgröße wird.

Mit dieser Methode können aber nur Moleküle mit größeren Massendifferenzen aufgetrennt werden. Um eine Fokussierung des Proteingemisches auf dem Gelbett des Trenngels zu ermöglichen, verwendet man die diskontinuierliche Gelelektrophorese. Dazu wird das auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellte Trenngel von einem sauren, weitmaschigen Sammelgel mit pH 6,8 überschichtet. Da dieses Sammelgel nur schwach vernetzt ist, wird es von allen Proteinen, unabhängig von ihrer Größe sehr schnell passiert, was zu einer Konzentrierung der Proteine in einer kleinen Bande an der Grenzfläche zum Trenngel führt. Durch Variation des Vernetzungsgrades des Trenngels können unterschiedliche Molekulargewichtsunterschiede aufgelöst werden. Die Proteinbanden in den Gelen können auf verschiedene Arten sichtbar gemacht werden. Unter anderem können die Proteine mit dem blauen Farbstoff Coomassie-Blue sichtbar gemacht werden, zum anderen eignen sich auch sehr empfindliche Silberfärbungen zur Detektion von Proteinbanden.

Um spezifische Proteine mittels immunochemischer Reaktionen anzufärben, müssen diese nach einer Elektrophorese aus dem Gel heraus auf eine immobilisierende Blotmembran transferiert werden.

4.6.1.2 Durchführung

Es wurden 12,5 %ige Trenngele mit einer Höhe von ca. 5,5 cm gegossen, die mit wassergesättigtem Butanol überschichtet wurden und 30 min bei 60°C im

Wärmeschrank auspolymerisierten. Nach dem Absaugen des Butanols wurde ein 5 %iges Sammelgel gegossen, das in 10 min bei 60°C auspolymerisierte.

Die Gelkammern wurden zusammengesetzt und mit Lämmli Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben wurden unter dem Puffer aufgetragen und liefen bei 15 mA / Gel (Sammelgel) bzw. 20 mA / Gel (Trenngel) ca. 60 Minuten.

4.6.2 Elektrochemischer Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot)

4.6.2.1 Grundlagen

Die Proteine können mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Membran transferiert ("geblottet") werden. Blotmembranen bestehen aus Nitrocellulose (NC) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF, Immobilonmembran) und haben eine sehr hohe Proteinbindungskapazität. Für den Proteintransfer wird das Gel auf die Trägermembran gelegt, und es wird eine Spannung senkrecht zu der Auflagefläche angelegt. Nach einiger Zeit sind die Proteine aus dem Gel heraus auf die Membran gewandert und auf der Oberfläche der Membran fixiert. Dort können sie entweder unspezifisch angefärbt oder weiteren immunochemischen bzw. molekularbiologischen Analysen unterworfen werden.

Die geblotteten Proteine können mit spezifischen Antikörpern weiterbehandelt und dadurch identifiziert werden, wobei die Antikörper spezifisch nur mit bestimmten Proteinen eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingehen. Dieses Verfahren bezeichnet man als Immunprinting oder Immunoblotting. Da die Membran eine relativ hohe Proteinbindungskapazität hat, und alle Proteine, damit auch aufgebrauchte Antikörper, unspezifisch binden würde, müssen freie Bindungsstellen der Membran vor der Antikörperbehandlung blockiert werden. Durch eine Vorbehandlung mit einer konzentrierten Proteinlösung, z.B. Magermilchpulver, Ziegen-Normalserum oder Rinderserumalbumin werden die Bindungsstellen der Membran geblockt, und der Antikörper bindet nur noch antigenspezifisch, also an den gesuchten Proteinen.

Durch Verwendung eines sekundären Antikörpers, an den ein Enzym gekoppelt ist (z.B. alkalische Phosphatase) kann das nachzuweisende Protein dann visualisiert werden. Zum einen kann dies durch eine Farbreaktion auf der Membran selbst oder durch Chemolumineszens und Darstellung auf Röntgenfilmen erfolgen.

4.6.2.2 Durchführung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zwischen den Glasplatten herausgenommen und das Sammelgel entfernt. Für den Blot unter „semi-dry“ Bedingungen wurden zwischen den benetzten Graphitelektroden der Blotapparatur (Biometra) zunächst zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, auf denen die mit Methanol benetzte und in Transferpuffer äquilibrierte Membran gelegt wurde. NC Membranen wurden nur in Transferpuffer äquilibriert und nicht mit Methanol allein benetzt. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und darüber kamen wieder zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere.

Alle verwendeten Gele hatten eine Größe von ca. 50 cm², so dass der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA pro Gel erfolgte, um eine Stromstärke von 4 mA pro cm² zu gewährleisten. Der Blot erfolgte über 20 Minuten auf eine 0,45 µm dicke NC- bzw. PVDF-Membran.

4.6.3 Detektion mit mAb 3F4 und NBT / BCIP auf PVDF-Folie

Alle angegebenen Mengen beziehen sich auf Blotfolien der Größe 5,5 cm x 9 cm.

Die Blotfolie wurde 30 min in 5% (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt (50 ml / Folie) und 2 x 5 min in Waschpuffer gespült. Danach wurde die Folie 1 h bei 37°C mit dem monoklonalen primären Antikörper 3F4 inkubiert 1:2.000 in TBS mit 3 % (v/v) BSA verdünnt (20 ml / Folie). Der Antikörper 3F4 wurde aus Zellkultur gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Huser, Robert Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Folie wurde 3 x 5 min in Waschpuffer gespült und 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert (biotinyliertes anti Maus IgG aus der Ziege [Dako, Hamburg]) 1:2.000 in dem 2.AK-Puffer mit 3 % (v/v) BSA verdünnt (20 ml / Folie). Nach 3 x 5 min Waschen mit TBS wurde die Folie 30 min bei 4°C mit dem verdünnten Streptavidin-Biotin-Komplex inkubiert, der 30 min vor Gebrauch mit folgenden Lösungen angesetzt worden war: 0,6 ml Tris-Puffer, 5,4 µl Reagenz A (Streptavidin) und 5,4 µl Reagenz B (biotinylierte alkalische Phosphatase). Die Lösung wurde gemischt, 30 min bei RT gelagert und zum Gebrauch mit Tris-Puffer 1:50 verdünnt (30 ml / Folie). Die Folie wurde 2 x 5 min mit TBS und 1 x 5 min mit dem 2.AK Puffer (ohne BSA) gewaschen. Bis zur Entwicklung der Blotsignale wurde die Folie in der Färbelösung (je 0,132 ml der NBT- und BCIP-Lösung mit 20 ml Substratpuffer gemischt) geschwenkt. Danach wurde die Folie einmal mit H₂O gewaschen und die Färbereaktion durch eine

10minütige Inkubation mit 20 mM EDTA / TBS gestoppt. Die Membran wurde zwischen Filterpapieren von Flüssigkeitsresten befreit und dann getrocknet.

4.6.4 Detektion mit mAb 3F4 und CDP-Star mit Nitro Block II auf NC und PVDF-Folie

Alle angegebenen Mengen beziehen sich auf Blotfolien der Größe 5,5 cm * 9 cm. Die Blotfolie wurde 30 min in 5% (w/v) Magermilchpulver / TBST (TBS mit 0,05% (w/v) Tween20 / 2,5 % (v/v) Ziegen-Normalserum bei RT geschüttelt (50 ml / Folie) und anschließend 2 x 5 min in TBST gespült. Die Folie wurde über Nacht (ca. 16 h) bei 4 °C mit dem monoklonalen primären Antikörper 3F4 inkubiert 1:2.000 in 5% (w/v) Magermilchpulver / TBST / 2,5 % (v/v) Ziegen-Normalserum verdünnt (20 ml / Folie). Der Antikörper 3F4 wurde aus Zellkultur gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Huser, Robert Koch-Institut, Berlin zur Verfügung gestellt. Am nächsten Tag wurde die Folie 3 x 5 min in TBST gespült und 15 min in 2,5 % (v/v) Ziegen-Normalserum / TBST inkubiert (20 ml / Folie), bevor sie 90 min bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde (AP-konjugiertes anti Maus IgG aus der Ziege [Fa. Dako, Hamburg]), 1:10.000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver / TBST / 2,5 % (v/v) Ziegen-Normalserum verdünnt (20 ml / Folie). Im Anschluss wurde die Folie 2 x 5 min und 1 x 60 min in TBST und 2 x 2 min in Assay-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der überschüssige Assay-Puffer von der Folie entfernt und die Folie in 5 ml CDP- Star mit Nitroblock II (Ready to use Lösung) 3,5 min inkubiert. Die Membran wurde zwischen Filterpapieren von den Resten der CDP-Lösung befreit, in den Development-Folder gelegt und in eine Filmkassette überführt. Der Film wurde 60 min (bei PVDF-Membran nur 7,5 min) exponiert (Film Kodak XAR-2) und entwickelt.

4.6.5 Detektion mit mAb 3F4 und CDP-Star ohne Nitro Block auf PVDF-Folie

Alle angegebenen Mengen beziehen sich auf Blotfolien der Größe 5,5 cm * 9 cm. Die Blotfolie wurde 30 min in 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST (TBS mit 0,05 % (w/v) Tween20) bei RT geschüttelt (50 ml / Folie). Die Folie wurde über Nacht (ca. 16 h) bei 4 °C mit dem monoklonalen primären Antikörper 3F4 inkubiert 1:2.000 in 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST verdünnt (20 ml / Folie). Der Antikörper 3F4 wurde aus Zellkultur gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Huser, Robert Koch-

Institut, Berlin zur Verfügung gestellt. Am nächsten Tag wurde die Folie 3 x kurz mit TBST abgespült und dann 3 x 5 min in 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST gespült. Die Folie wurde 90 min bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert (AP-konjugiertes anti Maus IgG aus der Ziege [Fa. Dako, Hamburg]), 1:10.000 in 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST verdünnt (20 ml / Folie). Danach wurde die Folie 3 x kurz mit TBST und 2 x kurz mit 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST abgespült und anschließend 60 min mit 3 % (w/v) Magermilchpulver / TBST gewaschen. Die Folie wurde 2 x 5 min in Assay-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der überschüssige Assay-Puffer von der Folie entfernt. Die Folie wurde in eine Petrischale gelegt und in 5 ml CDP-Star (1:50 mit Assaypuffer verdünnt) 5 min inkubiert. Die Membran wurde zwischen Filterpapieren von den Resten der CDP-Lösung befreit, in den Development-Folder gelegt und in eine Filmkassette überführt.. Die Filmkassette wurde ca. 60 min liegen gelassen, bevor der Film 30 min exponiert (Film Kodak XAR-2) und anschließend entwickelt wurde.

4.6.6 PNGase-F-Verdau nach Aufarbeitung

Das Prion-Protein liegt nach dem Verdau durch die Proteinase K als PrP 27-30 in einem Gemisch aus Di- Mono- und Nicht-Glykosilierter Form vor. Daher zeigt sich im Western Blot ein charakteristisches PrP Bandentriplett. Die PNGase F baut diese Zuckerreste am Prion-Protein ab. Durch Deglykosilierung des PrP 27-30 verschieben sich die Molekulargewichte des vormaligen Bandentriplets alle auf die Höhe der unglykosilierten Bande bei ca. 19-20 kDa. Insofern lässt sich durch den PNGase F-Verdau die Identität des PrP 27-30-Signals im Western Blot verifizieren. Für die Behandlung mit PNGase F wurden zwei identische Proben aufgearbeitet. Die Endpellets wurden nach der Aufarbeitung in 12,5 μ H₂O manuell resuspendiert, mit 1,25 μ l 10x Denaturierungspuffer versetzt, 10 min auf 99°C erhitzt und kurz anzentrifugiert. Der Suspension wurden nun je 2 μ l G7-Puffer und 2 μ l 10% (w/v) NP40 zugesetzt und gemischt. In das erste Reaktionsgefäß wurden 2 μ l H₂O und in das zweite 2 μ l PNGase-F pipettiert, gemischt und kurz anzentrifugiert. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C, wurden die Proben kurz anzentrifugiert. Nun wurden in jedes Reaktionsgefäß je 20 μ l 2xLPP zugegeben, dann erneut gemischt und 5 min auf 99°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben im Western Blot untersucht.

4.7 Verwendete Lösungen:

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem und autoklaviertem Wasser angesetzt

2xLPP	0,125 M Tris / HCl 4 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Glyzerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) Mercaptoethanol	pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris / HCl	pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl	pH 6,8
Lämmli Elektrophoresepuffer	250 mM Tris 1 % (w/v) SDS 1,92 M Glycin	pH 8,3–8,7
10 % Ammoniumpersulfat- Lösung (APS)	in H ₂ O	
TEMED	pur	
Transferpuffer	48 mM Tris 38 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % (v/v) Methanol	pH 9,0
TBS	10 mM Tris / HCl 133 mM NaCl	pH 7,5
TBST	10 mM Tris / HCl 0,05 % (w/v) Tween 20 133 mM NaCl	pH 7,5

PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl	pH 7,4
PBSB	8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 1 % (w/v) BSA 137 mM NaCl 2,7 mM KCl	pH 7,4
Waschpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ Puffer 0,9 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Tween 20	pH 7,5
Assay-Puffer	100 mM NaCl 100 mM Tris / HCl	pH 9,5
2.Antikörper-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris / HCl	pH 7,5
Substratpuffer	100 mM Tris / HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	pH 9,5
Puffer für die Blotverstärkung	50 mM Tris / HCl	pH 7,6
Färbelösung NBT	50 mg / ml Nitro Blue Tetrazolium (NBT) in 70 % Dimethylformamid (DMF verdünnt mit Ethanol)	
Färbelösung BCIP	25 mg/ml 5-Bromo-4-chloro- 3-indolyl-phosphat (BCIP) in DMF	

Stopp-Lösung für die Blot-Färbung	20 mM EDTA	
NTM	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂	pH 9,5
Tris-Puffer		
Guanidiniumthiocyanat	10 mM Tris/HCl 3 M GdnSCN	pH 7,8
Collagenase Puffer	10 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 100 mM CaCl ₂ 0,5 % (v/v) Brij 35	pH 7,8
PK Puffer	100 mM NaCl 0,5 % (v/v) Brij 35 in 10 mM Tris / HCl	pH 7,8
PLP	200 mM Lysinhydrochlorid 100 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ Puffer 8 % (w/v) Paraformaldehyd 10 mM NaJO ₄	pH 7,4

4.8 Verwendete Chemikalien

BCIP	Sigma (Steinheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Brij 35-Lösung	Merck (Darmstadt)
BSA	Serva (Heidelberg)
Casein	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Glycin	Serva (Heidelberg)
Glyzerin	Roth (Karlsruhe)
Guanidiniumthiocyanat	Merck (Darmstadt)
HCl	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Lysinhydrochlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Steinheim)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄ Dinatriumphosphat	Merck (Darmstadt)
NaH ₂ PO ₄ Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
NaJO ₄ Natrium Perjodat	Sigma (Steinheim)
NaOH	Merck (Darmstadt)
NBT	Sigma (Steinheim)
Paraffin	Roth (Karlsruhe)
Sarcosyl	Serva (Heidelberg)
SDS	Serva (Heidelberg)
TEMED	GIBCO BRL (Eggenstein)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Tris	Sigma (Steinheim)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Xylol	Roth (Karlsruhe)

4.9 Sicherheitsmaßnahmen und Desinfektion

4.9.1 Sicherheitsmaßnahmen

Bei allen Arbeiten wurden Schutzkittel und Einmalhandschuhe aus Latex getragen. Bei der Entnahme und Präparation der Organe wurden zusätzlich Schnittschutzhandschuhe und Nitrilhandschuhe getragen. Bei der Organentnahme wurde außerdem ein Augen- und Mundschutz getragen. Arbeiten mit infektiösem Material, vor allem die Arbeiten, die mit der Entstehung von Aerosolen verbunden waren, wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Baker, Stanford, USA) durchgeführt.

4.9.2 Desinfektion

Alle benötigten und potentiell kontaminierten Verbrauchsmaterialien und Lösungen wurden in Behältern gesammelt und 1 h bei 134 °C autoklaviert. Präparationsbestecke wurden in einem dreistufigen Verfahren dekontaminiert. Nach einer mindestens 24 stündigen Inkubation in 2 M NaOH folgte eine mindestens 12 stündige Inkubation in 0,2 % (w/v) SDS / 0,3 % (w/v) NaOH . Nach weiteren 2 h Inkubation in einem weiteren Bad mit 2 M NaOH wurde das Präparationsbesteck sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült und dann in autklavierten Behältern aufbewahrt.

Kontaminierte Oberflächen wurden mit einer 0,2 % (w/v) SDS / 0,3 % (w/v) NaOH-Lösung bzw. 2 M NaOH dekontaminiert.