

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Entwicklung eines PrP^C-Detektions-Assays zur Analyse
der Fragestellung, welchen Einfluss PRNP-Mutationen
oder Genpolymorphismen in CJK-Patienten auf die PrP^C-
Expression haben**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Marie Charlotte Wohlhage
aus
Berlin

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referentin: Prof. Dr. med. I. Zerr

Korreferent: PD Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer

Drittreferentin: Prof. Dr. med. B. Mollenhauer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Prionerkrankungen.....	1
1.1.1 Geschichtliche Hintergründe zur Erstbeschreibung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	1
1.1.2 Verschiedene Formen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien	1
1.1.3 Das Prion-Protein	2
1.1.4 Codon 129 Polymorphismus	5
1.1.5 PrP ^{Sc} -Typen	6
1.1.6 Klinische Symptome der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	6
1.2 Diagnostik der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung.....	6
1.2.1 Allgemeiner Überblick über die verschiedenen Diagnostikmethoden bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung	6
1.2.2 Die Bedeutung von PrP ^C in der Diagnostik von Creutzfeldt-Jakob.....	8
1.3 Multiparametrische Analyse von Proben mittels Luminex-basierter x-MAP-Technologie.....	8
1.4 Fragestellung.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material	11
2.1.1 Instrumente	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial	11
2.1.3 Chemikalien.....	12
2.1.4 Kits	12
2.1.5 Antikörper für den Multiplex-Assay	12
2.1.6 Beads	13

2.1.7	Liquorproben	13
2.2	Etablierte Methoden.....	14
2.2.1	Bestimmung der PrP ^C -Konzentration mittels Roboscreen-ELISA	14
2.3	Entwicklung einer Multiplexmessung für PrP^C	14
2.3.1	Beadkopplung der Antikörper	14
2.3.2	Bestimmung der Kopplungsrate	16
2.3.3	Biotinylierung der Antikörper	17
2.3.4	PrP ^C -Messung mittels Multiplex-Assay	19
2.4	Stabilitätsmessung des PrP^C	20
2.4.1	PrP ^C -Konzentrationsmessung mit Hilfe des Multiplex-Assays im Verlauf von vier Tagen und in Abhängigkeit von der Lagerung	20
2.4.2	PrP ^C -Konzentrationsmessung mit Hilfe des Western Blots nach bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen	20
2.5	Statistische Analyse	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Entwicklung eines PrP^C-Assays	22
3.1.1	Festlegung des Standardmessbereichs von rPrP	22
3.1.2	Ermittlung des optimalen Messbereichs durch lineare Verdünnungsanalysen	25
3.1.3	Mehrfachmessungen zum Nachweis der Messpräzision und der Methodenpräzision	27
3.1.4	Vergleichende Messanalyse von Liquorproben mittels Multiplex-Assay und Roboscreen ELISA	28
3.2	Analyse des Einflusses unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die PrP^C-Konzentration mittels neu entwickeltem Multiplex-Assay.....	30
3.2.1	Veränderung der PrP ^C -Konzentration in Liquorproben in Abhängigkeit von der Lagerung.....	30
3.2.2	Veränderung der PrP ^C -Konzentration in Liquorproben im Verlauf mehrerer Einfrier-Auftau-Zyklen	32
3.3	Analyse der PrP^C-Konzentration bei Creutzfeldt-Jakob-Patienten und Kontrollpatienten mittels neu entwickeltem Multiplex-Assay	33

3.3.1	Bestimmung der PrP ^C -Konzentration im Liquor von sCJK-, fCJK (E200K)- und FFI-Patienten und bei sCJK-Patienten in Abhängigkeit vom Codon-129- MV-Polymorphismus und PrP ^{Sc} -Typen.....	33
4	Diskussion	36
4.1	Entwicklung eines x-MAP-basierten Assays zur Bestimmung der PrP^C-Konzentration in humanen Liquorproben.....	36
4.2	Einfluss von Kurzzeitlagerungsbedingungen auf die Konzentration von PrP^C im Liquor	42
4.3	Einfluss der Art von Prionerkrankung sowie des PRPN Codon-129- MV-Polymorphismus und der PrP^{Sc}-Typen auf die Konzentration von PrP^C	43
5	Zusammenfassung	48
	Literaturverzeichnis.....	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des humanen PrP ^C	3
Abbildung 2: „Umfaltungstheorie“ nach Prusiner (Prusiner 1995).....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellungen der Beaderkennung (Bio-Rad Laboratories Inc. (b), S. 4).....	9
Abbildung 4: Eine in zwei Schritten aufgezeichnete Carbodiimidreaktion zur Aktivierung der COOH-Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc. (a),S. 4-5).....	16
Abbildung 5: Die Reaktion des Sulfo-NHS-Biotins mit der primären Aminogruppe eines Proteins (Thermo Fisher Scientific Inc. 2012, S.2).....	18
Abbildung 6: rPrP-Standardkurve in einer Verdünnungsreihe von 31,25 ng/ml bis 16000 ng/ml.....	23
Abbildung 7: Leerprobenmessung zur Berechnung der unteren Bestimmungsgrenze.....	24
Abbildung 8: Im Triplikat gemessene rPrP-Standardkurve des unteren Verdünnungsbereichs.	25
Abbildung 9: Verdünnungskurven zweier Liquorproben von 1:400 bis 1:3,13.....	26
Abbildung 10: Im Triplikat gemessene Verdünnungskurve einer Liquorprobe mittlerer PrP ^C -Konzentration.....	26
Abbildung 11: PrP ^C -Konzentrationen dreier Liquorproben, welche an drei verschiedenen Tagen im Triplikat gemessen wurden.....	27
Abbildung 12: PrP ^C -Konzentrationen von 36 Liquorproben, welche an drei verschiedenen Tagen vorbereitet und gemessen wurden.	28
Abbildung 13: Bland-Altman-Diagramm für den Vergleich der PrP ^C -Konzentrations- messungen mittels Multiplex-Assays und Roboscreen ELISA.....	29
Abbildung 14: Gegenüberstellung der PrP ^C -Mittelwerte mit Standardabweichung aus der Messung des Multiplex-Assays und aus der Messung des Roboscreen ELISA.	30
Abbildung 15: PrP ^C -Konzentrationen im Verlauf von 0, 1, 2 und 4 Tagen gemessen (0 d = 100 %).	31
Abbildung 16: Sieben Liquorproben wurden nach 0, 3, 5 und 10 Einfrier-Auftau- Zyklen (cl) mittels Multiplex-Assay gemessen.	32

Abbildung 17: PrP^C-Konzentrationsmessung im Liquor von sCJK-, fCJK (E200K)-,
FFI- und Kontrollpatienten. 34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PrP-spezifische primäre Antikörper	12
Tabelle 2:	PrP-spezifische sekundäre Antikörper.....	13
Tabelle 3:	Sekundärer, biotinylierter Antikörper.....	13
Tabelle 4:	Antikörpermenge für die Beadkopplung.	15
Tabelle 5:	Durchschnittliche Kopplungsraten des Antikörpers.....	17
Tabelle 6:	Spezifische Menge an Biotinlösung, die mit 100µl Antikörper reagiert.	19

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2 Protein (engl.: <i>b-cell lymphoma 2</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumine</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathien
c	zenti (1×10^{-2})
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cl	Zyklus (engl.: <i>cycle</i>)
COOH	Carboxylgruppe
C-Terminus	carboxyterminale Ende von Proteinen
Cu ²⁺	zweifach positiv geladenes Kupferion
d	Tag
Da	Dalton
E200K	Punktmutation des PRNP-Gens (Codon 200, Glutamin ↳ Lysin)
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
fCJK	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FFI	letale familiäre Insomnie (engl.: <i>fatal familial insomnia</i>)
FI-Einheiten	Fluoreszenzintensitätseinheiten
FLAIR	MRT-Sequenz (engl.: <i>fluid attenuated inversion recovery</i>)
g	Gramm
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Krankheit
h	Stunde
HABA	engl.: <i>4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid</i>

iCJK	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
k	kilo (1×10^3)
l	Liter
Liquor	Liquor cerebrospinalis
M	molar (= mol/l)
m	Meter
m-	milli (1×10^{-3})
min	Minute
MM	Homozygotie für Methionin
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	Heterozygotie für Methionin und Valin
μ	mikro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})
NHS	Nitrogenhydroxysuccinimid
nvCJK	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK	Proteinase K
Prion	engl.: <i>proteinaceous infectious particle</i>
PRNP	Prion-Protein-Gen (Mensch)
PrP	Prion-Protein
PrP ^c	zelluläres Prion-Protein (engl.: <i>c-cellular</i>)
PrP ^{Sc}	Pathogenes Prion-Protein (engl.: <i>Sc-Scrapie</i>)
p-Wert	Signifikanzwert (engl.: <i>probability</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
rPrP	rekombinantes humanes PrP
s	Sekunde
SEM	Standardfehler (engl.: <i>standard error of the mean</i>)

sFI	sporadisch, letale familiäre Insomnie
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
V	Volt
VV	Homozygotie für Valin
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zn ²⁺	zweifach positiv geladenes Zinkion

1 Einleitung

1.1 Prionerkrankungen

1.1.1 Geschichtliche Hintergründe zur Erstbeschreibung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung und gehört zur Gruppe der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE). Dieser Oberbegriff für verschiedene, aber vom gleichen Erreger ausgelöste Erkrankungen leitet sich von seiner bewiesenen Übertragbarkeit und der schwammförmigen (spongiösen) Degeneration im Gehirn ab. Klinisch ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit in erster Linie von Demenz und verschiedenen neurologischen Symptomen gekennzeichnet und führt in den meisten Fällen innerhalb weniger Monate zum Tode.

In den 1920er Jahren wurde die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit unabhängig voneinander von dem Neurologen Hans G. Creutzfeldt, wie auch von dem Neuropathologen Alfons M. Jakob erstmals als „spastische Pseudosklerose“ beschrieben (Jakob 1921; Creutzfeldt 1920). Erst später wurde diese Krankheit nach ihren Erstbeschreibern benannt. In den 1950er Jahren wurde man auf eine epidemisch auftretende Krankheit aufmerksam, die in Papua-Neuguinea auftrat und dort von Gajdusek und Zigas untersucht und beschrieben wurde (Gajdusek und Zigas 1957). Übertragen wurde die als „Kuru“ bezeichnete Krankheit durch rituellen Kannibalismus, ohne dass der Erreger zu dieser Zeit bekannt war. Die Verbindung zur Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wurde durch die klinische und neuropathologische Ähnlichkeit hergestellt.

1.1.2 Verschiedene Formen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit kommt beim Menschen in verschiedenen Formen vor. Man unterscheidet sie nach den folgenden Ursachen: Zu den sporadischen Formen zählen die idiopathisch sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK) und die sporadisch letale familiäre Insomnie (sFI), zu den genetischen Formen gehören die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK), die Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Krankheit (GSS) und die letale Familiäre Insomnie (englisch: *Fatal Familial Insomnie*, FFI) und zu den infektiösen Formen gehören die iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK), die Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) und Kuru (Collins et al. 2001; Prusiner 1991).

Die schon seit 1732 in Großbritannien bekannte Prionerkrankung ist die Scrapie bei Schafen und Ziegen, im Altdeutschen auch Traberkrankheit genannt (Parry 1983). Sie geht mit Symptomen wie unaufhörlichem sich Scheuern, Muskelzittern und mit den Augen rollen einher. Neuropathologisch ist die Krankheit durch die spongiformen Degenerationen im zentralen Nervensystem nachweisbar. Bei anderen Tierarten ruft die Prionerkrankung vergleichbare Veränderungen im Gehirn und ähnliche Symptome hervor. Sie werden folgendermaßen benannt: bei Hirschen *Chronic Wasting Disease*, bei Nerzen *Transmissible Mink Encephalopathy*, bei Katzen *Feline Spongiform Encephalopathy* und bei Rindern die in der Bevölkerung wahrscheinlich bekannteste Prionerkrankung *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE) (Prusiner 1998).

1.1.3 Das Prion-Protein

Lange Zeit wurde angenommen, dass der Erreger der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ein langsam wirkender Virus sein könnte, welcher aber niemals nachgewiesen werden konnte. Bis 1982 Stanley B. Prusiner ein Nachweis gelang, mit dem er bewies, dass der Erreger nur aus einem Protein besteht und keine Nukleinsäure mit sich führt (Prusiner 1982). Daher nannte er diese Erregerklasse proteinartige infektiöse Partikel, kurz Prion (Prusiner et al. 1982). Drei Jahre später wurde das Prion-Protein-Gen (*PRNP*) lokalisiert und es wurde festgestellt, dass auch jeder Gesunde dieses Gen besitzt und exprimiert (Oesch et al. 1985).

Das physiologische Prion-Protein (PrP) wurde PrP^C (*cellular prion protein*) und das pathogene PrP wurde PrP^{Sc} (*scrapie prion protein*) genannt. Mittlerweile hat sich PrP^{Sc} als Begriff für alle humanen wie auch tierischen PrP-assoziierten Erkrankungen durchgesetzt.

Im menschlichen Genom wurde das PRNP-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 lokalisiert und besteht aus zwei Exons (Sparkes et al. 1986). Auch bei Säugetieren im Allgemeinen, bei Vögeln und Reptilien konnte das PRNP nachgewiesen werden (Gabriel et al. 1992; Wopfner et al. 1999; Strumbo et al. 2001), was für ein grundlegendes Gen vieler Lebewesen sprechen könnte, obwohl Mallucci et al. 2002 gezeigt hat, dass Mäuse nach postnataler PRNP-Deletion eine unauffällige morphologische wie auch verhaltensunauffällige Entwicklung ohne nachgewiesene Neurodegeneration im Erwachsenenalter aufwiesen (Mallucci et al. 2002).

Das PrP^C des Menschen besteht aus 253 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 35 – 36 kDa. Es besitzt eine strukturierte, stabile C-terminale Domäne und eine unstrukturierte, flexible N-terminale Domäne. Die Sekundärstruktur des PrP^C wird hauptsächlich aus drei α -Helices (42 %) und zwei sehr kurzen Anteilen von β -Faltblättern (3 %) gebildet, welche sich

im C-terminalen Bereich befinden (Pan et al. 1993). Im N-terminalen Bereich befindet sich ein Octarepeat-Segment, welches die Domäne ist, an der die meisten Interaktionen stattfinden (Riek et al. 1997).

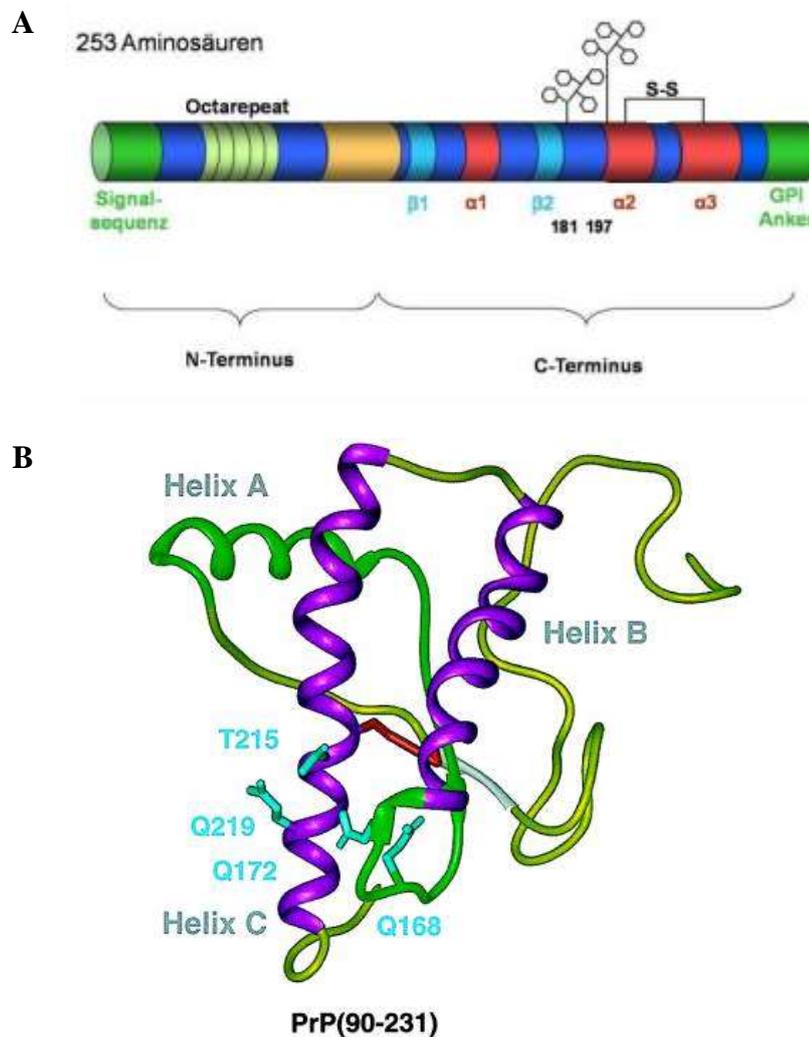


Abbildung 1: Struktur des humanen PrP^C.

In Abb. A ist die Domänenstruktur des PrP^C dargestellt (Becker 2005). In Abb. B sind die Sekundär- und Tertiärstruktur des PrP^C dargestellt (Prusiner 1998).

Das PrP^C kommt vor allem in Caveolae vor, welche in der Zellmembran gelegen sind, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass das PrP^C in irgendeiner Form an der Signaltransduktion teilnimmt (Peters et al. 2003). Der interzelluläre PrP^C-Transport findet über Exosome statt (Fevrier et al. 2004).

Von Ning et al. konnte im Jahr 2005 nachgewiesen werden, dass das PrP^C bei Goldhamstern in Gehirn, Leber, Lunge, Milz, Herz und Nieren gebildet wird, wobei die höchsten Konzentrationen im Gehirn und die niedrigsten Konzentrationen in den Nieren festgestellt wurden (Ning et al. 2005).

In den Zellen dieser Organe erfüllt das PrP^C mehrere Funktionen. Es wurde vermutet, dass das PrP^C mit der Cu²⁺/Zn²⁺ Superoxiddismutase und der Glutathionreduktase korreliert und dadurch die antioxidante Wirkung dieser Enzyme unterstützt (Brown und Besinger 1998; Rachidi et al. 2003). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass die Oktapeptidregion, welche auf dem flexiblen N-Terminus des PrP^C liegt, eine hohe Affinität zu Kupfer-II hat (Hornshaw et al. 1995; Kramer et al. 2001). Da Kupfer-II ein Oxidant ist, könnte man darauf schließen, dass das PrP^C auch alleine antioxidant wirkt. Im Weiteren wurde dem PrP^C eine antiapoptotische Funktion nachgewiesen, da es die Neuronen vor einer Überproduktion des proapoptotischen Bax Proteins schützt (Bounhar et al. 2001). Des Weiteren ist das PrP^C ein Partner von vielen Enzymen unterschiedlichster Funktionen, wie zum Beispiel dem sauren Gliafaserprotein (Oesch et al. 1990), Bcl-2 (Kurschner und Morgan 1995) und Laminin (Graner et al. 2000).

Für die Entstehung des PrP^{Sc} gibt es bis heute zwei verschiedene Theorien: Die eine Entstehungsform des PrP^{Sc} ist auf verschiedene Punktmutationen im PRNP zurückzuführen und konnte anhand von Experimenten mit genmanipulierten Mäusen belegt werden (Prusiner 1993). Die andere Entstehungsform beruht auf der von Prusiner etablierten „Umfaltungstheorie“. Seine Theorie ist, dass sich beim Kontakt eines normalen PrP^C und eines infektiösen PrP^{Sc} die α -Helices des physiologisch vorliegenden PrP^C in die β -Faltblätter der pathologischen Form umwandeln lassen (Prusiner 1994).

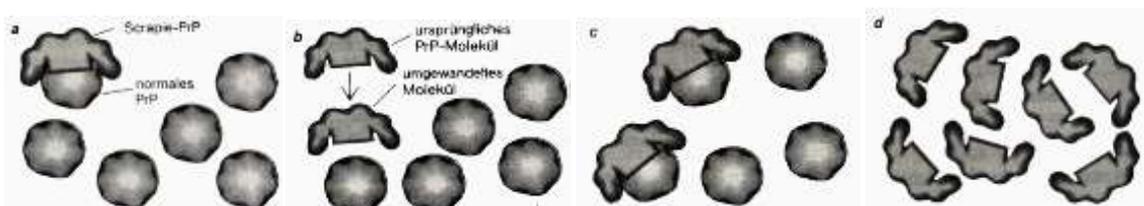


Abbildung 2: „Umfaltungstheorie“ nach Prusiner (Prusiner 1995).

Dem „Dominoeffekt“ ähnlich reagiert das zelluläre „normale“ PrP auf das Scrapie-PrP (a), indem sich das zelluläre PrP auf unbekannte Weise in ein Scrapie-PrP umfalten lässt (b). Nun können beide Scrapie-PrP-Moleküle (c) – das ursprüngliche und das gerade umgefaltete – weitere normale PrP-Moleküle zur Umfaltung in die Scrapie-PrP-Konformation bringen (d).

Diese Umfaltung verändert wesentlich die biochemischen Eigenschaften des Prion-Proteins. PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C Proteinase-resistent und außerdem unlöslich in denaturierenden Lösungsmitteln (Meyer et al. 1986).

Der Vorgang der Infektion der Lymphozyten mit PrP^{Sc} bis zur Invasion des ZNS über die Nervenbahnen wurde im Jahr 2001 als Neuroinvasion bezeichnet (Aguzzi et al. 2001; Nicotera 2001).

1.1.4 Codon 129 Polymorphismus

Im PRNP konnten an der Aminosäureposition 129 ein Polymorphismus mit zwei Sequenzvarianten nachgewiesen werden: die Aminosäure Valin (V) mit dem Codon GTG und die Aminosäure Methionin (M) mit dem Codon ATG. Diese beiden Sequenzvarianten des Codon 129 können drei verschiedene Genotypen ergeben, welche für die Entwicklung von CJK sowie für die klinische Symptomatik und das neuropathologische Läsionsmuster der Erkrankung von Bedeutung sein können (MacDonald et al. 1996; Miyazono et al. 1992; Salvatore et al. 1994). Diese Eigenschaften sind wahrscheinlich auf die konformationsstabilisierende Wirkung des Allels zurückzuführen, wodurch die Umfaltung des PrP^C zum PrP^{Sc} erleichtert oder erschwert werden könnte (Prusiner 1997).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die überwiegende Anzahl (ca. 70 %) der sCJK-Patienten homozygot für PRNP 129M ist, wohingegen weniger als die Hälfte der gesunden Menschen homozygot für PRNP 129M getestet wurden (Palmer et al. 1991; Laplanche et al. 1994; Windl et al. 1996). Die Genotypen des Codon-129-MV-Polymorphismus MV und VV scheinen dagegen seltenere und atypische Formen von CJK hervorzurufen (Parchi et al. 1996), wobei die Homozygotie für PRNP 129V in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Zwei Studien der Jahre 1991 und 1996 konnten zeigen, dass auch die Homozygotie für PRNP 129V ein Risikofaktor für sCJK ist (Palmer et al. 1991; Windl et al. 1996), wobei im Jahr 1994 nachgewiesen wurde, dass der Genotyp PRNP 129VV meist bei Patienten mit iCJK vorkam (Laplanche et al. 1994). In einer weiteren Studie des Jahres 1999 konnte die Homozygotie für PRNP 129V größtenteils bei Patienten mit progressiver Demenz nachgewiesen werden (Parchi et al. 1999).

Eine Homozygotie oder Heterozygotie für Methionin am Codon 129 in Kombination mit der Mutation am Codon 178 führt in den meisten Fällen zur Erkrankung an FFI (Goldfarb et al. 1992).

1.1.5 PrP^{Sc}-Typen

Der Forschergruppe Parchi et al. gelang es im Jahr 1996, zwei PK-resistente PrP^{Sc}-Typen im Western Blot nachzuweisen. Sie unterschieden sich in Größe und Wanderungsgeschwindigkeit und wurden als PrP^{Sc}-Typ 1 und -Typ 2 bezeichnet (Parchi et al. 1996). In Mausexperimenten konnte sogar gezeigt werden, dass die mit PrP^{Sc}-Typ 1 infizierten Mäuse auch im Verlauf nur PrP^{Sc}-Typ 1 bildeten und die mit PrP^{Sc}-Typ 2 infizierten Mäuse nur PrP^{Sc}-Typ 2 (Telling et al. 1996).

Der PrP^{Sc}-Typ 1 wurde in mehreren Studien vorwiegend bei CJK-Patienten mit einer Methioninhomozygotie (MM) festgestellt. In einer Studie mit 300 sCJK-Patienten wurden in 70 % der Fälle mindestens ein Allel Methionin beim Codon 129 in Kombination mit dem PrP^{Sc}-Typ 1 festgestellt. Der PrP^{Sc}-Typ 2 wurde dagegen bei den meisten Patienten mit einer Valinhomozygotie festgestellt (Parchi et al. 1999). Neben dem Codon 129 Polymorphismus haben unter anderem die PrP^{Sc}-Typen Auswirkungen auf die Ausprägung der Symptomatik, den Verlauf und Pathologie der CJK-Fälle.

1.1.6 Klinische Symptome der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Im Vordergrund steht bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit das rasche Fortschreiten der klinischen Symptome. Die Krankheitsdauer der sporadischen Form ist im Allgemeinen wesentlich kürzer als bei der Neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Belay 1999; Zeidler et al. 1997). Die meisten Patienten fallen anfangs durch eine progrediente Demenz, kortikale Sehstörungen, Gangataxien, Intentionstremor oder Myoklonien auf. Aber auch schwere psychiatrische Symptome und akinetischer Mutismus können zu den Symptomen gehören (Aguzzi et al. 2008; Belay 1999). Meist versterben die an der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit erkrankten Patienten im vorangeschrittenen Stadium an Infektionen des Respirations- oder Urogenitaltraktes.

1.2 Diagnostik der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

1.2.1 Allgemeiner Überblick über die verschiedenen Diagnostikmethoden bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

Zu Lebzeiten der Patienten kann nach WHO-Kriterien keine gesicherte Creutzfeldt-Jakob-Diagnose erhoben werden. Bei der Erfüllung verschiedener Kriterien kann man aber auf eine wahrscheinliche oder mögliche Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung schließen. Die gesicherte

Creutzfeldt-Jakob-Diagnose kann erst durch den neuropathologischen oder den immunhistochemischen Nachweis des pathologischen PrP^{Sc} gestellt werden (Zerr et al. 2009). Zur Hauptdiagnosefindung bei wahrscheinlicher oder möglicher Creutzfeldt-Jakob-Krankheit dient vor allem das klinische Krankheitsbild, welches aber nicht in einer Einzeluntersuchung erhoben werden kann, sondern eine Verlaufskontrolle erfordert.

Das EEG ist eine der Untersuchungen, die bei einem Verdacht auf Creutzfeldt-Jakob-Krankheit angewendet werden. In 64 % der Fälle mit typischen EEG-Veränderungen wurde nach dem Tod eine gesicherte Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung nachgewiesen. Die Spezifität bei dieser Untersuchung liegt bei 91 % (Steinhoff et al. 2004). Zu den für die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit typischen EEG-Veränderungen zählen zum Beispiel die *Periodic Sharp Wave Complexes*, die meist im mittleren oder späten Krankheitsverlauf messbar sind (Steinhoff et al. 1996).

Als weitere diagnostische Methode der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit hat sich, neben den klinischen Symptomen, der Nachweis des Proteins 14-3-3 im Liquor erwiesen. Mit einer Sensitivität von 86 % kann das Protein 14-3-3 im Western Blot nachgewiesen werden, wobei die Spezifität dieses Nachweises 68 % beträgt (Zerr et al. 2009). Zu falsch positiven Ergebnissen führt der Nachweis des Proteins 14-3-3 dann, wenn ein Patient an einer akuten destruierenden neurologischen Erkrankung leidet, weshalb diese Untersuchung immer im Hinblick auf den Krankheitsverlauf des Patienten betrachtet werden muss. In Kombination mit Untersuchungen weiterer neuronaler Proteine wie zum Beispiel dem Tau-Protein, S100b oder NSE kann die Sensitivität noch erhöht werden (Beaudry et al. 1999; Otto et al. 1997). Die Diagnose von nvCJK, fCJK, iCJK, GSS und FFI auf die Liquoruntersuchung zu stützen, ist dagegen schwierig, da diese Krankheiten eine geringere Sensitivität für die Liquorproteine aufweisen (Poser et al. 1999).

Im Jahr 2009 wurde eine Multicenterstudie durchgeführt, um die Sensitivität und Spezifität der MRT-Untersuchung bei sporadischer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung zu untersuchen. In den diffusionsgewichteten MRT-Aufnahmen in Kombination mit den FLAIR-Aufnahmen konnten eine Sensitivität von 83 % und eine Spezifität von 83 % festgestellt werden. Außerdem wurde in dieser Multicenterstudie statistisch belegt, dass die Kombination von EEG, Protein 14-3-3-Untersuchung im Liquor und die MRT-Aufnahmen die Sensitivität bei der Creutzfeldt-Jakob-Diagnostik auf 98 % steigert, wobei die Spezifität bei Kombination dieser Parameter auf 71 % absinkt (Zerr et al. 2009).

1.2.2 Die Bedeutung von PrP^C in der Diagnostik von Creutzfeldt-Jakob

Die PrP^C-Konzentration im Liquor hat aktuell noch keinerlei Bedeutung in der Diagnostik von CJK (Zerr et al. 2009). Meyne et al. zeigten 2009 in einer Studie einen ersten Vergleich der PrP^C-Konzentration im Liquor von sCJK-, Morbus Parkinson-, Morbus Alzheimer-, Lewy-Body-Demenz-Patienten und einer Kontrollgruppe. Es konnten signifikante Unterschiede in der PrP^C-Konzentration im Liquor zwischen den degenerativen Erkrankungen und der Kontrollgruppe dargestellt werden. Die degenerativen Erkrankungen untereinander zeigten indes keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede (Meyne et al. 2009).

Weiterhin wurde eine Studie von Torres et al. im Jahr 2012 durchgeführt, welche die PrP^C-Konzentration mit dem Nachweis von 14-3-3 kombinierte. Dabei konnte anhand einer Western Blot-Methode eine entgegengesetzte Entwicklung der Konzentrationen im Verlauf der Krankheit festgestellt werden. Während die 14-3-3-Konzentration zunahm, nahm die PrP^C-Konzentration ab (Torres et al. 2012).

1.3 Multiparametrische Analyse von Proben mittels Luminex-basierter x-MAP-Technologie

Für die Entwicklung des Luminex-Geräts, welches für die Versuche verwendet wurde, wurden der Immunoassay wie auch die Massenspektrometrie als Vorlagen verwendet. Es ging den Entwicklern dieses Geräts darum, viele Proben gleichzeitig messen zu können wie auch eine hohe Anzahl verschiedener Parameter in einem Probenansatz untersuchen zu können. Mit Hilfe der Luminex-Technologie können in 96 verschiedenen Probenansätzen bis zu 200 Parameter gemessen werden.

Die Technik basiert auf unterschiedlich fluoreszierenden Beads, die, ähnlich der Mikrotiterplatte im ELISA, an einen primären Antikörper gebunden sind. Jede Beadnummer hat eine spezifische Fluoreszenz, welche von einem Laser während der Messung detektiert und seiner Beadnummer zugeordnet wird. Der primäre beadgekoppelte Antikörper dient der qualitativen Identifikation des zu messenden Proteins.

Der sekundäre Antikörper, welcher ein anderes Epitop des Proteins erkennt als der primäre Antikörper, ist Biotin-gebunden. An das Biotin wird in einem nächsten Versuchsschritt fluoreszierendes Streptavidin angelagert, welches während der Messung von einem zweiten Laser erkannt und als quantitativer Nachweis verwendet wird.

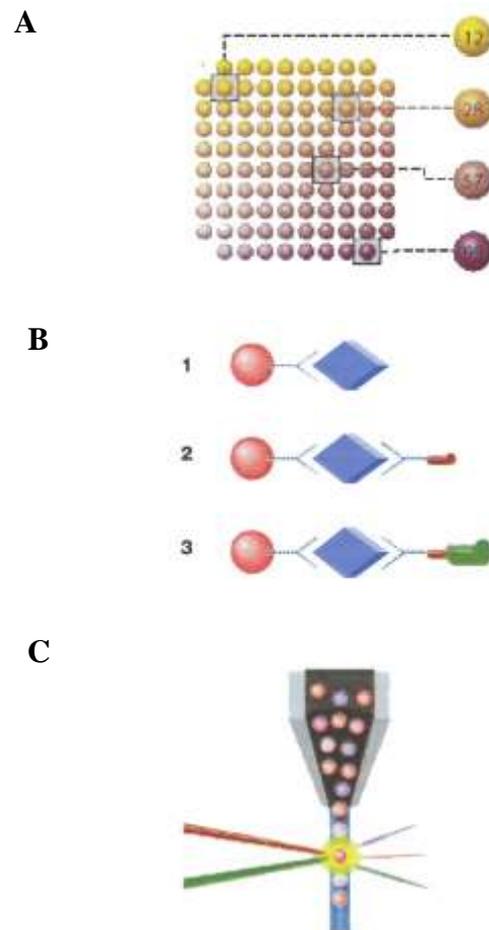


Abbildung 3: Schematische Darstellungen der Beaderkennung (Bio-Rad Laboratories Inc. (b), S. 4).

(A) Die Beads sind in Nummern nach einem spezifischen Farbcode sortiert, um von den Lasern unterschieden und zugeordnet werden zu können.

(B) An das Molekül bindet zuerst der beidrehbare Antikörper (1), danach der biotinylierte Antikörper (2), an den sich das Streptavidin anlagert (3).

(C) Erkennung der Beads und des Streptavidin mit Hilfe von zwei Lasern. Der rote Laser klassifiziert die Beads und der grüne Laser erkennt und quantifiziert das Streptavidin am selben Molekül.

Diese Sandwichmethode kann, da der primäre Antikörper nicht an eine Mikrotiterplatte gebunden ist, sondern an die verschiedenen Beads, zum Nachweis vieler Proteine in einer einzigen Probe angewandt werden. So kann man bis zu 200 verschiedene beidrehbare Antikörper mit dem passenden biotinylierten Antikörper zu einem Probenansatz hinzugeben und innerhalb einer Messung die gesuchten Proteine erkennen und quantifizieren.

1.4 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines x-MAP-basierten Multiplex-Assays zur Bestimmung der PrP^C-Konzentration in Liquorproben. Ein Vorteil dieses Messverfahrens im Vergleich zu bereits etablierten Methoden besteht in der Möglichkeit der gleichzeitigen Erfassung mehrerer Biomarker-Proteine in einem Messansatz.

Neben der Entwicklung eines solchen Assays ist es zudem erforderlich, die Validität dieses neuen Messverfahrens zu überprüfen. Dazu soll der Assay zunächst verschiedenen Tests im Rahmen der explorativen Methodvalidierung unterzogen werden, wie beispielsweise der Mehrfachmessung des Standards und der Verdünnungsanalyse verschiedener Liquorproben. Außerdem werden Liquorproben mit Hilfe des x-MAP-basierten Assays als Triplikatmessungen im Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen Roboscreen ELISA analysiert und die PrP^C-Konzentrationen der einzelnen Proben miteinander verglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Stabilität des PrP^C unter verschiedenen Lagerungsbedingungen zu untersuchen. Insbesondere die Kurzzeitlagerung (vier Tage) der Liquorproben bei Raumtemperatur und bei 4 °C soll auf mögliche PrP^C-Konzentrationsveränderungen untersucht werden. Zudem soll der Einfluss von bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen auf die Konzentration von PrP^C in humanen Liquorproben analysiert werden. Auch diese Konzentrationsmessungen werden mit dem von uns untersuchten Multiplex-Assay durchgeführt.

In einer weiteren Versuchseinheit soll mit Hilfe des neu entwickelten Multiplex-Assays die PrP^C-Konzentration im Liquor von sCJK-Patienten, FFI-Patienten und fCJK (E200K)-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten untersucht werden. Als Kontrollgruppe dient ein Patientenkollektiv, bei dem durch klinische Voruntersuchungen eine Prionerkrankung ausgeschlossen wurde. Außerdem soll der Einfluss des Codon-129-MV-Polymorphismus bei verschiedenen sCJK-Genotypen sowie eine mögliche Rolle der PrP^{Sc}-Typen auf die PrP^C-Konzentration analysiert werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Instrumente, sowie die verschiedenen Untersuchungsmethoden vorgestellt.

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

Geräte	Hersteller
Bio-Plex 200 System	Bio-Rad (München, D)
Bio-Plex pro wash station	Bio-Rad (München, D)
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Laborschüttler	Heidolph (Schwabach, D)
Laborwaage TE 1502S	Sartorius (Göttingen, D)
Magnetrührer MR 3000	Heidolph (Schwabach, D)
Pipettierhilfe, elektrisch	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Sanyo (München, D)
Vortexer	Scientific Industries (New York, USA)
Wallac Victor 2 multilabel counter	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Geräte	Hersteller
E-Cups	Eppendorf (Hamburg, D)
Falkon Röhrchen	Sarstedt (Newton, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Pinzetten	Rettberg (Göttingen, D)
Scheren	Rettberg (Göttingen, D)

2.1.3 Chemikalien

Die in diesen Versuchen verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen hergestellt:

Bezeichnung	Hersteller
Aqua Dest	Ampuwa (Bad Homburg, D)
EDC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sulfo-NHS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tetramethylbenzidin	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe, D)

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Plex Amine Coupling Kit	Bio-Rad (München, D)
Bio-Plex Pro TM Reagent Kit	Bio-Rad (München, D)
Bio-Plex Pro TM Reagent Kit III with Flat Bottom Plate	Bio-Rad (München, D)
ChromaLink TM Biotin Labeling Kit	Solulink (San Diego, USA)
BetaPrion [®] HUMAN EIA Test Kit	Roboscreen (Leipzig, D)

2.1.5 Antikörper für den Multiplex-Assay

Antikörper	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
8G8	Maus	15 µl / 100 µl Beadlösung	Spi-Bio (Massy, Frankreich)
SAF32	Maus	15 µl / 100 µl Beadlösung	Spi-Bio (Massy, Frankreich)
12F10	Maus	15 µl / 100 µl Beadlösung	Spi-Bio (Massy, Frankreich)

Tabelle 1: PrP-spezifische primäre Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
SAF32	Maus	100 µl pro Ansatz	Spi-Bio (Massy, Frankreich)
12F10	Maus	50 µl pro Ansatz	Spi-Bio (Massy, Frankreich)
3F4	Maus	100 µl pro Ansatz	Aus Kollaboration mit RKI

Tabelle 2: PrP-spezifische sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse-IgG	Ziege	1:1000	Pierce (Bonn, D)

Tabelle 3: Sekundärer, biotinylierter Antikörper

2.1.6 Beads

Die nicht-magnetischen wie auch die magnetischen COOH-Beads sind in destilliertem Wasser gelöst und es befinden sich in 1 ml Flüssigkeit $1,25 \times 10^7$ Beads. Es wurden die Beadnummern 44 und 52 für die Versuche verwendet. Die beiden verschiedenen Beads sind laut Herstellerangaben in ihren Konzentrationsmessungen vergleichbar (Bio-Rad Laboratories Inc. (c)).

2.1.7 Liquorproben

Für die Entwicklung eines neuen Detektionsassays (Kap. 3.1) sowie für die Stabilitätsmessungen von PrP^C (Kap. 3.2) sind Liquorproben von Patienten ohne neurodegenerative Erkrankungen verwendet worden.

Die Liquorproben für die PrP^C-Konzentrationsanalyse bei CJK-Patienten in Kap. 3.3 stammten von Patienten, bei denen *post mortem* anhand neuropathologischer Untersuchungen eine gesicherte CJK festgestellt wurde oder von Patienten, bei denen eine wahrscheinliche CJK anhand der diagnostischen Kriterien für CJK festgestellt wurde (WHO 1998; Zerr et al. 2009). Sie wurden unterteilt in sCJK-Patienten, fCJK-Patienten (E200K) und FFI-Patienten. Die Liquorproben der fCJK-Patienten wurden von Frau Dr. Eva Mitrova (Medizinische Universität Bratislava, Slowakei) zur Verfügung gestellt. Die Genotypen der Codon-129-Polymorphismen wurden im Serum der Patienten nach Standardmethoden festgestellt (Windl et al. 1999). Es wurden 43 Liquorproben von sCJK-Patienten (23 weiblich, 20 männlich,

Alter 23 – 85 Jahre, Durchschnittsalter $65 \pm 1,5$ Jahre, 16 MM, 13 MV, 14 VV), 15 Liquorproben von fCJK-Patienten (9 weiblich, 6 männlich, Alter 52 – 73, Durchschnittsalter $57 \pm 1,4$ Jahre), 11 Liquorproben von FFI-Patienten (8 weiblich, 3 männlich, Alter 55 – 85 Jahre) und 45 Liquorproben von Kontrollpatienten (21 weiblich, 24 männlich, Alter 50 – 70 Jahre) untersucht. Bei den Kontrollpatienten wurde eine Erkrankung des ZNS im Verlauf weiterer Untersuchungen ausgeschlossen. Die Diagnosen dieser Patienten waren Depression, Kopfschmerzen, Schwindel, vaskuläre Erkrankungen, generalisiertes Schmerzsyndrom und Polyneuropathie.

2.2 Etablierte Methoden

2.2.1 Bestimmung der PrP^C-Konzentration mittels Roboscreen-ELISA

Zur Konzentrationsmessung des PrP^C diente das BetaPrion[®] HUMAN EIA Test Kit. Die Mikrotiterplatte wurde mit den Proben und einem PrP-Standard beladen. Für den PrP^C-Nachweis im Liquor wurden 100 µl Ansatz von einer 1:20 verdünnten Liquorprobe verwendet. Für die Standardkurve wurde der mitgelieferte PrP-Standard in einer Verdünnung von 1 ng/ml bis 20 ng/ml verwendet. Die beladene Mikrotiterplatte wurde bei 37 °C für 6 min inkubiert. Danach wurden die Proben fünfmal gewaschen und mit 100 µl des monoklonalen, peroxidasegekoppelten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:12 für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden weitere fünfmal gewaschen und 15 min lang mit einer Entwicklungslösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion gestoppt und die Absorptionsmessung bei 450 nm mit Hilfe eines Wallac Victor 2 (multilabel counter) durchgeführt. Die PrP^C-Konzentration der Proben konnte mit Hilfe des rPrP-Standards errechnet werden.

2.3 Entwicklung einer Multiplexmessung für PrP^C

2.3.1 Beadkopplung der Antikörper

Für die Beadkopplung der Antikörper wurde ein Amine Coupling Kit verwendet. Vor der Kopplung wurden die Antikörper mit Hilfe der Micro Bio-Spin 6 Chromatography Columns aufgereinigt, um Natriumazid oder BSA aus der Antikörperlösung zu entfernen, da diese Bestandteile bei der Bead-Kopplungs-Reaktion stören würden.

Die Säule wurde zur Vorbereitung insgesamt dreimal mit 500 µl PBS beladen und bei 1,500 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das dritte Mal

wurde die Säule 4 min lang zentrifugiert. Vor der Zugabe des Antikörpers wurde die Säule in ein E-Cup gestellt, um die Probe nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 1,500 x g zu eluieren.

Antikörper	Menge
8G8	15 µl
SAF32	10 µl
12F10	15 µl

Tabelle 4: Antikörpermenge für die Beadkopplung.

Vor Verwendung der COOH-Beads wurden diese 30 s lang bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext und für 15 s in ein Ultraschallbad gestellt, damit sie sich gleichmäßig verteilen.

100 µl COOH-Beads wurden in ein E-Cup pipettiert und bei 18,500 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und zu dem Bead-Pellet 100µl Bead Wash Buffer hinzugefügt. Um das Pellet wieder zu lösen, wurde das E-Cup für 10 s gevortext und für 10 s in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurde die Lösung bei 18,500 x g für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, um daraufhin die COOH-Beads in 80 µl Bead Activation Buffer zu suspendieren, indem das E-Cup 30 s gevortext und weitere 30 s in ein Ultraschallbad gestellt wurde.

Um die COOH-Beads vollständig zu aktivieren, wurde zu der bestehenden Lösung 10 µl EDC-Lösung und 10 µl Sulfo-NHS-Lösung hinzugegeben, welche zuvor in einer Konzentration von 50 mg/ml in Bead Activation Buffer gelöst wurden. Die nun auf 100 µl aufgefüllte Lösung wurde für 30 s gevortext und lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur in einem Rotator inkubiert.

Die Aktivierung der COOH-Beads wurde abgeschlossen, indem nichtgebundenes EDC und Sulfo-NHS ausgewaschen wurde. Dazu wurden 150 µl PBS zu der Suspension hinzupipettiert, diese wurde dann gevortext und bei 18,500 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und dieser Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt.

Um die COOH-Beads an die Antikörper zu koppeln, wurde das Bead-Pellet mit 100 µl PBS versetzt. Die aktivierten COOH-Beads wurden 30 s lang gevortext und 15 s lang in ein Ultraschallbad gehalten, damit sie sich vollständig in der Flüssigkeit suspendieren.

Danach wurde die jeweilige Menge an Antikörpern zu den aktivierten COOH-Beads pipettiert. Das Volumen wurde mit PBS auf 500 μ l aufgefüllt und lichtgeschützt zwei Stunden lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einem Rotator inkubiert.

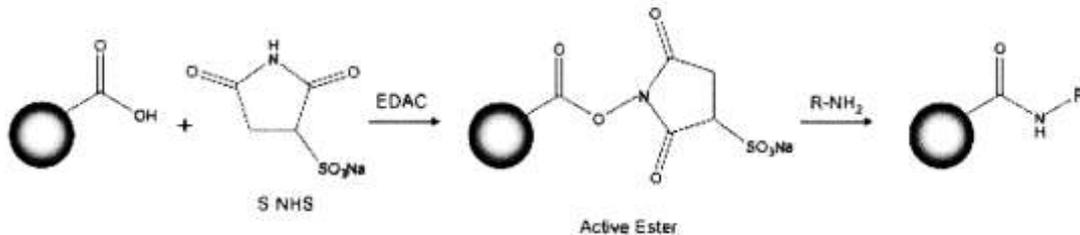


Abbildung 4: Eine in zwei Schritten aufgezeichnete Carbodiimidreaktion zur Aktivierung der COOH-Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc. (a), S. 4-5).

Die beadgekoppelten Antikörper wurden danach bei 18,500 x g 4 min lang zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Um alle nicht gebundenen Überreste auszuwaschen, wurde das Pellet in 500 μ l PBS suspendiert, für 10 s gevortext, bei 18,500 x g 4 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Daraufhin wurde der Kopplungsvorgang mit 250 μ l Blocking Buffer gestoppt, indem diese Lösung nach 15 s Vortexen für 30 min bei Raumtemperatur und lichtgeschützt in einem Rotator in Bewegung gehalten wurde.

Die Probe wurde nach diesen 30 min ein weiteres Mal bei 18,500 x g für 4 min zentrifugiert, um den Überstand verwerfen zu können und die Stoppreaktion abzuschließen. Anschließend wurden die beadgekoppelten Antikörper in 500 μ l Storage Buffer gewaschen. Die Suspension wurde für 10 s gevortext und bei 18,500 x g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Die gewaschenen und vollständig an die COOH-Beads gekoppelten Antikörper wurden in 150 μ l Storage Buffer suspendiert. Lichtgeschützt wurden die Antikörper bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der Kopplungsrate

Die Kopplungsrate wurde nach jeder Beadkopplung eines Antikörpers gemessen. Es wurde ein sekundärer, biotinylierter Antikörper verwendet, der gegen den primären Antikörper gerichtet war, damit während der Messung jeder beadgekoppelte Antikörper von den beiden Lasern qualitativ, wie auch quantitativ gemessen werden konnte.

Für die Positivkontrolle wurde ein biotinylierter, sekundärer Antikörper (Anti-Mouse oder Anti-Rabbit-IgG) 1:1000 in Staining Buffer verdünnt. Davon wurden 50 µl mit 1,5 µl beadgekoppeltem Antikörper versetzt, welcher vorher für 20 s bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext wurde. Für die Negativkontrolle wurden 50 µl Staining Buffer mit 1,5 µl beadgekoppeltem Antikörper versetzt. Diese beiden E-Cups wurden lichtgeschützt in einem Rotator bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

Nachdem die beiden Ansätze für 4 min bei 18,500 x g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet der Negativkontrolle wurde in 50 µl Staining Buffer gelöst und die Positivkontrolle wurde in 50 µl Staining Buffer gelöst, welcher vorher in der Verdünnung 1:1000 mit PE-Streptavidin versetzt wurde. Die beiden Kontrollen wurden für 10 min bei Raumtemperatur ohne Rotator inkubiert.

Die beiden E-Cups wurden für 4 min bei 18,500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu dem Pellet der Positiv- wie auch der Negativkontrolle wurden 125 µl Storage Buffer hinzugegeben und für 15 s gevortext.

Zwei Wells der 96-Well-Platte wurden mit 100 µl Assaybuffer gespült. Danach wurden die beiden Ansätze in jeweils ein Well gegeben, mit dem Bio-Plex 200 System gemessen und der dazugehörenden Software ausgewertet. Empfohlen wurden Kopplungsraten von ca. 20.000 FI-Einheiten.

Antikörper	FI-Einheiten
8G8	15.000 – 20.000
SAF32	5.000 – 10.000
12F10	< 5.000

Tabelle 5: Durchschnittliche Kopplungsraten des Antikörpers.

2.3.3 Biotinylierung der Antikörper

Mit Hilfe des ChromaLink™ Biotin Labeling Kit können Proteine, Antikörper oder Makromoleküle biotinyliert werden. Biotin weist als natürlich vorkommendes Vitamin eine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin auf. Bei der Multiplex-Assay-Methode werden die Proteine anhand des Lasers über Streptavidin quantifiziert, weswegen der zweite Antikörper biotinyliert wird, damit das Streptavidin an diesen Antikörper binden kann.

Das Sulfo-NHS-Biotin ist die am häufigsten verwendete Form zur Biotinylierung. Die NHS-Ester reagieren mit den primären Aminogruppen der Antikörper und es entsteht bei einem pH-Wert von 7 – 9 eine stabile Amidverbindung. Da Lysin zwei Aminogruppen besitzt und ein häufiger Bestandteil der Aminosäureketten von Antikörpern ist, gibt es bei diesen Makromolekülen viele primäre Amine als Ansatzstelle für die Reaktion mit dem Sulfo-NHS-aktivierten Biotin.

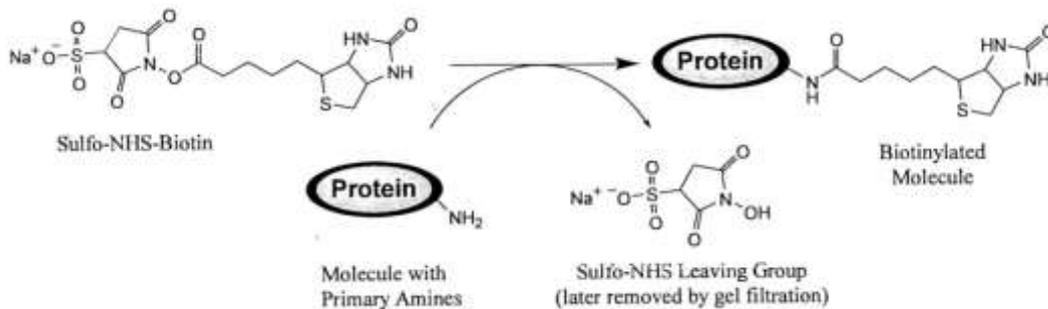


Abbildung 5: Die Reaktion des Sulfo-NHS-Biotins mit der primären Aminogruppe eines Proteins (Thermo Fisher Scientific Inc. 2012, S.2).

Vor der Biotinylierung der Antikörper wurden diese mit Hilfe der ZebaTM-Säulen aufgereinigt. Die Säulen wurden zur Vorbereitung mit 300 μl Modification Buffer beladen und bei 1,500 x g für 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die Säulen konnten daraufhin mit 100 μl Antikörper beladen und bei 1,500 x g für 2 min zentrifugiert werden. Die Depletion von Natriumazid in der Antikörperlösung, sowie die pH-Änderung auf 7,4 durch den Modification Buffer gilt als optimale Voraussetzung für die Biotinylierung der Antikörper.

Die Antikörper wurden in einem E-Cup aufgefangen und eine antikörperspezifische Menge an Biotinlösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit der Pipette durchmischt und lichtgeschützt für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Antikörper	Biotinlösung
SAF32	0,5 µl
12F10	0,5 µl
3F4	0,2 µl

Tabelle 6: Spezifische Menge an Biotinlösung, die mit 100µl Antikörper reagiert.

Um die freien Sulfo-NHS-Biotin-Moleküle aus der Antikörperlösung zu entfernen, wurde der Ansatz durch eine zweite ZebaTM Säule 2 min bei 1,500 x g zentrifugiert. Diese Säulen wurden nach demselben Prinzip wie oben beschrieben dreimal mit 300 µl PBS bei 1,500 x g für 1 min zentrifugiert. Um nachzuweisen, ob eine Biotinylierung der Antikörper stattgefunden hat, wurde eine HABA-Avidin-Lösung hergestellt, bei der 1 mg Avidin zu 60 µl HABA und 1,9 ml PBS hinzugefügt wurde. Daraufhin wurden zu 10 µl Antikörperlösung 90 µl HABA-Avidin-Lösung hinzugegeben. Konnte ein Farbumschlag von farblos zu gelb festgestellt werden, wurde der Test als positiv gewertet. Das E-Cup mit der Antikörperlösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.3.4 PrP^C-Messung mittels Multiplex-Assay

Die PrP^C-Konzentrationsmessungen wurden mit Hilfe eines ProTM Reagent Kits durchgeführt. Bevor die 96-Well-Filterplatte mit den Proben beladen werden konnte, wurden die Wells befeuchtet, indem sie mit 100 µl Assaybuffer befüllt und abgesaugt wurden. Daraufhin wurden die Proben in der jeweiligen Verdünnung und der rekombinante, humane PrP-Standard (rPrP) in die Wells pipettiert und jedes Well mit Assaybuffer auf 50 µl Einheitsvolumen aufgefüllt. 1 µl des primären, beadgekoppelten Antikörpers wurden hinzugefügt, die Filterplatte lichtdicht in Aluminiumfolie verpackt und bei Raumtemperatur zwei Stunden lang oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Danach wurden die Wells mit 100 µl Waschlösung dreimal gewaschen und 50 µl des sekundären, biotinylierten Antikörpers hinzugefügt, welcher zuvor 1:200 in Detection Antibody Diluent verdünnt wurde. Die Filterplatte wurde wieder lichtdicht verpackt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Danach wurde sie dreimal mit 100 µl Waschlösung gewaschen. Das PE-Streptavidin wurde 10 min bevor es in die Wells pipettiert wurde 1:100 in Assaybuffer verdünnt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur stehen gelassen. Von dieser verdünnten PE-Streptavidin-Lösung wurden 50 µl in die Wells pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 300 rpm

inkubiert. Die Filterplatte wurde danach dreimal mit 100 μ l Waschpuffer gewaschen und die Wells mit 125 μ l Assaybuffer aufgefüllt. Die Filterplatte wurde daraufhin 60 s lang bei 1200 rpm geschüttelt. Die Messung wurde mit Hilfe des Bio-Plex 200 Systems durchgeführt und mit der Software Bio-Plex Manager 6.0 ausgewertet.

2.4 Stabilitätsmessung des PrP^C

2.4.1 PrP^C-Konzentrationsmessung mit Hilfe des Multiplex-Assays im Verlauf von vier Tagen und in Abhängigkeit von der Lagerung

Für die Haltbarkeitsmessung des PrP^C wurden jeweils zehn Liquorproben bei unterschiedlicher Lagerung (Raumtemperatur und 4 °C) im Verlauf von vier Tagen im Multiplex-Assay gemessen. Zehn Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert und nach 0, 1, 2 und 4 Tagen wurden jeweils 10 μ l abgenommen und bei – 80 °C eingefroren. Weitere zehn Proben wurden bei 4 °C gelagert, nach 0, 1, 2 und 4 Tagen jeweils 10 μ l abgenommen und bei – 80 °C eingefroren. Nach Ablauf der vier Tage wurden die PrP^C-Konzentrationen der Liquorproben mit Hilfe des Multiplex-Assays gemessen.

2.4.2 PrP^C-Konzentrationsmessung mit Hilfe des Western Blots nach bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen

Für die PrP^C-Konzentrationsmessung im Verlauf von bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen wurden sieben Liquorproben bei – 20 °C gelagert. Die Einfrier-Auftau-Zyklen beinhalteten das Einfrieren auf – 20 °C und das Auftauen auf Raumtemperatur. Bei jedem Einfrier-Auftau-Zyklus wurde von jeder Probe 10 μ l abgenommen und bei – 80 °C gelagert. Nach zehn Zyklen wurde die PrP^C-Konzentration in den Liquorproben der Zyklen 0, 3, 5 und 10 mit Hilfe des Multiplex-Assays nachgewiesen.

2.5 Statistische Analyse

Die Daten in dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 4 ausgewertet. Die Ergebnisse der Auswertungen sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler) angegeben. Da es sich in unseren Gruppen um nicht normalverteilte Variable handelte, wurden die Vergleiche anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney Test (Mann-Whitney-U-Test) berechnet. Vergleiche mit einem p-Wert $<$ 0,05 werden als signifikant bezeichnet. Die Signifikanzniveaus wurden in den Abbildungen wie folgt dargestellt * = p $<$ 0,05; ** = p $<$ 0,01; *** = p $<$ 0,001.

Die Standardkurven zur Berechnung der unbekannt Konzentrationen, welche im Multiplex-Assay gemessen wurden, wurden mit Hilfe der Bio-Plex Software nach dem 4-Parameter Logistic (4PL) nonlinear regression model berechnet.

Zum Vergleich der Messmethoden Roboscreen ELISA und Multiplex-Assay wurden zusätzlich Bland-Altman-Analysen durchgeführt. Dabei werden die Differenzen der einzelnen Messwertepaare als Abweichung vom Mittelwert dargestellt. Die einzelnen Messwertepaare bestehen jeweils aus dem Mittelwert der PrP^C-Konzentration derselben Probe, welche dreimal im Multiplex-Assay und zweimal im Roboscreen ELISA gemessen wurde. Diese Darstellung wurde gewählt, da sie systematische Abweichungen und Ausreißer in Abhängigkeit der Größe der Messwerte graphisch darstellt. In der Graphik sind die Verzerrung (der Mittelwert der Differenzen) und die Übereinstimmungsgrenzen abzulesen. Die Übereinstimmungsgrenzen zeigen an, in welchem Bereich 95 % der Differenzen liegen.

3 Ergebnisse

Die folgenden Versuche, welche mit Hilfe des Multiplex-Assays durchgeführt wurden, wurden mit der Antikörperkombination primärer, beadgekoppelter 8G8-Antikörper und sekundärer, biotinylierter SAF32-Antikörper gemessen.

3.1 Entwicklung eines PrP^C-Assays

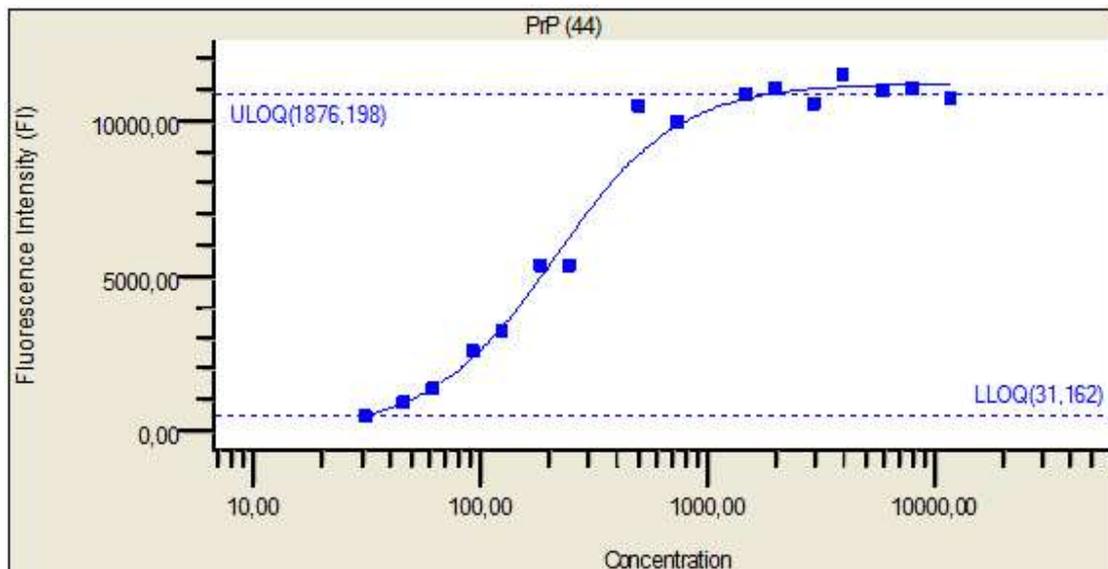
In diesem Abschnitt erfolgt die Darstellung der Versuche, die zur Validierung des Multiplex-Assays als neue Nachweismethode für PrP^C dienen sollen. Es wurden in diesem Ergebnisteil Liquorproben von gesunden Patienten bzw. Patienten ohne neurodegenerative Auffälligkeiten genutzt.

3.1.1 Festlegung des Standardmessbereichs von rPrP

Um den Messbereich des x-MAP-basierten PrP^C-Assays zu definieren, wurde eine Verdünnungsreihe mit rPrP hergestellt. Diese wurde von 16000 ng/ml bis auf 31,25 ng/ml in Standard Diluent verdünnt (Abb. 6). Die Standardkurve wurde mit Hilfe der Bio-Plex Software nach dem 4-Parameter Logistic (4PL) nonlinear regression model berechnet.

Anhand der vorliegenden Standardkurve wurde eine Bestimmungsgrenze von 31,2 ng/ml bis 1876,2 ng/ml rPrP errechnet, wobei die untere Bestimmungsgrenze anhand dieser Messung nicht optimal errechnet werden konnte, da sie nicht ausreichend niedrige Konzentrationen oder Leerwertproben enthielt. Die untere Bestimmungsgrenze wird daher im Folgenden anhand einer Leerwertmessung errechnet (Abb. 7).

Die Konzentration von 1876,2 ng/ml wurde als obere Grenze des Konzentrationsbereichs ermittelt, in dem die Linearität der Standardkurve gegeben ist. Diese Konzentration entspricht jedoch nicht der oberen Grenze des Arbeitsbereiches, da dieser nur mit Mehrfachmessungen definiert werden kann. Dieser wird im Folgenden anhand einer Triplikatmessung festgelegt (Abb. 8).



■ Standard

Abbildung 6: rPrP-Standardkurve in einer Verdünnungsreihe von 31,25 ng/ml bis 16000 ng/ml.

Der lineare Messbereich von rPrP reicht von 31,2 ng/ml bis 1876,2 ng/ml. Die Kurve ist mit Hilfe der Bio-Plex Software dargestellt und nach dem 4-Parameter Logistic (4PL) nonlinear regression model berechnet worden.

Für die Berechnung der unteren Nachweisgrenze sowie der unteren Bestimmungsgrenze von PrP^C im Multiplex-Assay wurde eine Konzentrationsmessung mit der Zehnfachmessung einer Leerprobe (Blank) durchgeführt (Abb. 7). Als Leerwert wurde Assaybuffer ohne Probe mit Antikörpern in der gleichen Versuchsanordnung wie bei unbekanntem Liquorproben verwendet. Daraus ergab sich eine untere Nachweisgrenze von 0,52 ng/ml, welche sich aus dem Mittelwert addiert mit der dreifachen Standardabweichung errechnet (Lee et al. 2006) und eine untere Bestimmungsgrenze von 0,65 ng/ml, welche sich aus dem Mittelwert addiert mit der zehnfachen Standardabweichung ergibt (Andreasson et al. 2015). Die Konzentrationen wurden anhand der im Triplikat gemessenen Standardkurve abgeleitet (Abb. 8).

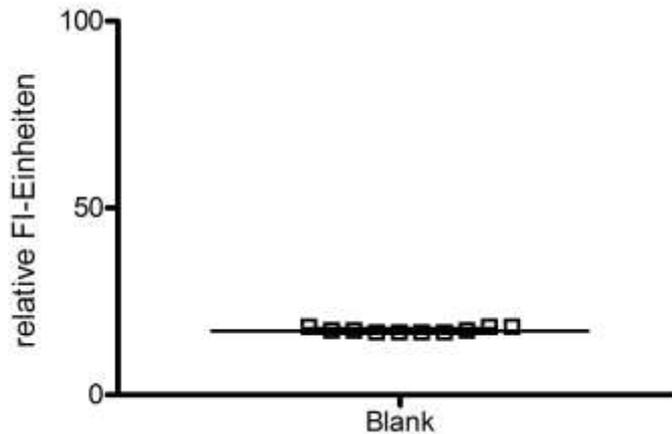


Abbildung 7: Leerprobenmessung zur Berechnung der unteren Bestimmungsgrenze.

Zehnfachmessung einer Leerprobe (Blank), bestehend aus Assaybuffer und Antikörpern mit einem Mittelwert von 17,1 FI-Einheiten und einer Standardabweichung von 0,66 FI-Einheiten. Darstellung der Leerwertkonzentrationen mit Mittelwert und Standardabweichung.

Es wurde, angelehnt an die zu erwartenden Konzentrationen in unbekanntem Liquorproben, ein Arbeitsbereich von 1 ng/ml bis 450 ng/ml festgelegt und dieser Bereich im Triplikat gemessen, um die Messpräzision des Standards nachzuweisen. Die Kurve wurde als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (Abb. 8). Die Standardabweichungen der verschiedenen Konzentrationen lagen jeweils unter 20 % des Mittelwertes, weshalb dieser Bereich als optimaler Arbeitsbereich gilt, obwohl die Linearität der Standardkurve einen größeren Konzentrationsbereich umfasst.

Mit Hilfe dieser Referenzwerte konnte aus den gemessenen FI-Einheiten unbekannter Liquorproben eine PrP^C-Konzentration errechnet werden.

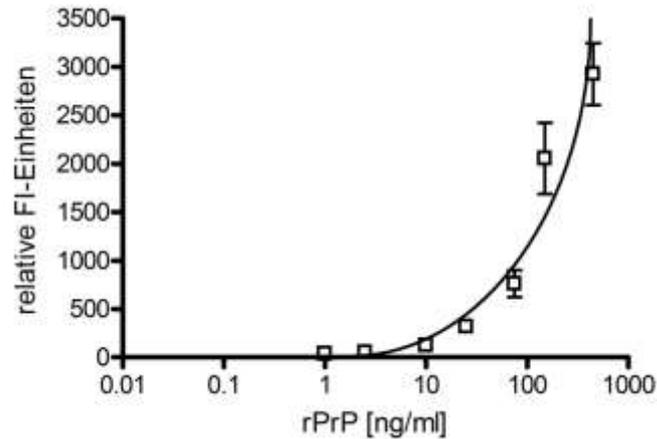


Abbildung 8: Im Triplikat gemessene rPrP-Standardkurve des unteren Verdünnungsbereichs.

Der Messbereich dieser Kurve reicht von 1 ng/ml bis 450 ng/ml, wobei die untere PrP^C-Nachweisgrenze bei 0,52 ng/ml und die untere PrP^C-Bestimmungsgrenze bei 0,65 ng/ml berechnet wurden. Darstellung der rPrP-Konzentrationen mit Mittelwert und Standardabweichung.

3.1.2 Ermittlung des optimalen Messbereichs durch lineare Verdünnungsanalysen

Die Verdünnungsreihe von zwei Liquorproben wurde durchgeführt, um den optimalen Verdünnungsbereich von Liquorproben zur Messung von PrP^C im Multiplex-Assay festzustellen. Die beiden Liquorproben wurden von 1:400 bis 1:3,13 in Assaybuffer verdünnt und mittels Multiplex-Assay gemessen.

Anhand der Kurve (Abb. 9) ist ein parabelähnlicher Verlauf erkennbar. Der Kurvenverlauf der Verdünnungsreihe von 1:400 bis 1:25 ergibt einen linearen Verlauf durch einen gleichmäßigen PrP^C-Konzentrationsanstieg. Im Verdünnungsabschnitt von 1:25 bis 1:3,13 erreicht die Verdünnungskurve ein Plateau, da die gemessenen PrP^C-Konzentrationen ähnlich hohe Werte ergaben. In dem Verdünnungsbereich von 1:25 bis 1:3,13 können demzufolge keine zuverlässigen Messungen gemacht werden.

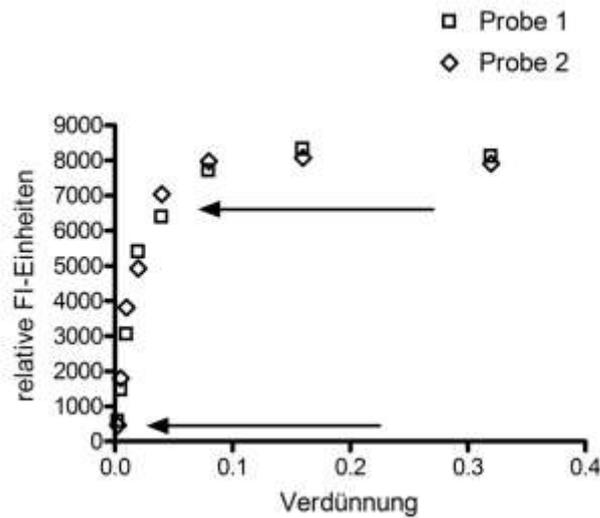


Abbildung 9: Verdünnungskurven zweier Liquorproben von 1:400 bis 1:3,13.

Der optimale Verdünnungsbereich, welcher einen linearen Konzentrationsanstieg zeigt, liegt bei 1:400 bis 1:25.

Die Triplikatmessung einer Probe mit mittlerer Konzentration in dem Verdünnungsbereich von 1:250 bis 1:5 ergab einen optimalen Verdünnungsbereich von 1:250 bis 1:50 (Abb. 10). In den folgenden Versuchen wurde eine Verdünnung von 1:100 gewählt, um hohe wie niedrige PrP^C-Konzentrationen in unbekanntem Liquorproben nachweisen zu können.

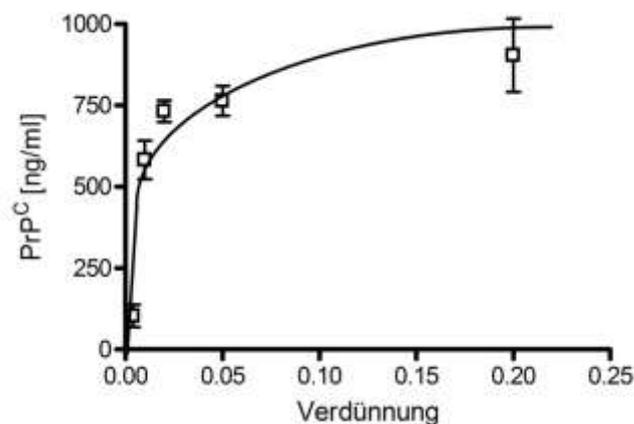


Abbildung 10: Im Triplikat gemessene Verdünnungskurve einer Liquorprobe mittlerer PrP^C-Konzentration.

Die optimale Verdünnung wurde anhand dieser Verdünnungskurve auf 1:100 festgelegt, um hohe wie auch niedrige PrP^C-Konzentrationen in unbekanntem Liquorproben erfassen zu können. Darstellung der PrP^C-Konzentrationen mit Mittelwert und Standardabweichung.

3.1.3 Mehrfachmessungen zum Nachweis der Messpräzision und der Methodenpräzision

Um die Wiederholpräzision des neuen Multiplexverfahrens zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Versuchsanordnungen konzipiert. Die erste Versuchsanordnung sollte anhand von Triplikatmessungen, die an drei Tagen wiederholt wurden, die Messpräzision nachweisen. Die Messungen in einem Versuchsansatz wurden als Serie bezeichnet. Aus den Messungen dieser Versuchsanordnung konnten eine Standardabweichung in der Serie (die Intraassay-Variabilität) sowie eine Standardabweichung zwischen den Serien (die Interassay-Variabilität) errechnet werden. Es wurden drei Liquorproben unbekannter PrP^C-Konzentration analysiert (Abb. 11). Die Standardabweichung in der Serie lag bei der Probe eins bei 56,47 ng/ml (17,4 %), bei der Probe zwei bei 50,67 ng/ml (20,0 %) und bei der Probe drei bei 51,74 ng/ml (18,4 %). Die Standardabweichung zwischen den Serien hingegen lag bei der Probe eins bei 64,44 ng/ml (19,9 %), bei der Probe zwei bei 28,26 ng/ml (11,2 %) und bei der Probe drei bei 35,17 ng/ml (12,5 %). Daraus ergab sich eine Gesamt-Standardabweichung bei der Probe eins von 85,68 ng/ml (26,4 %), bei der Probe zwei von 58,02 ng/ml (22,9 %) und bei der Probe drei von 62,56 ng/ml (22,2 %). Diese Standardabweichungen sind anhand der Formeln aus der Leitlinie zur Methodvalidierung des Umweltbundesamtes berechnet worden (Wellnitz und Gluschke 2005).

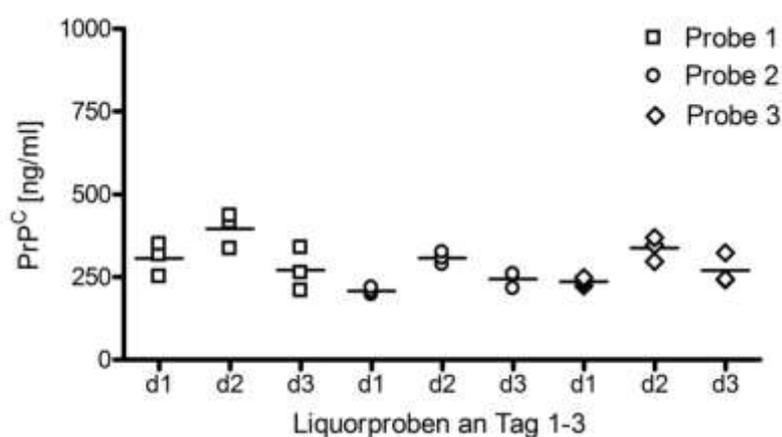


Abbildung 11: PrP^C-Konzentrationen dreier Liquorproben, welche an drei verschiedenen Tagen im Triplikate gemessen wurden.

Durch diese Messung ließ sich die Standardabweichung in der Serie sowie die Standardabweichung zwischen den Serien errechnen, woraus sich die Messpräzision ergab. Darstellung der drei PrP^C-Konzentrationen mit Mittelwert.

In der zweiten Versuchsanordnung wurden die PrP^C-Konzentrationsmessungen von 36 Liquorproben an drei verschiedenen Tagen durchgeführt (Abb. 12). Zu Beginn wurden die Liquorproben aliquotiert, bei -80 °C eingefroren und für jede der drei Messungen frisch vorbereitet. Aus den Messergebnissen konnte für jede Probe eine Standardabweichung errechnet werden. Diese diente als Maß für die Methodenpräzision. Die Standardabweichung der Triplikatmessung lag bei 30 Proben unter 20 %. Bei den übrigen sechs Proben ergab sich eine Standardabweichung von unter 25 %: Probe 7 von 21,1%, Probe 14 von 24,8 %, Probe 15 von 21,4 %, Probe 16 von 20,9 %, Probe 29 von 24,5 % und Probe 31 von 24,7 %.

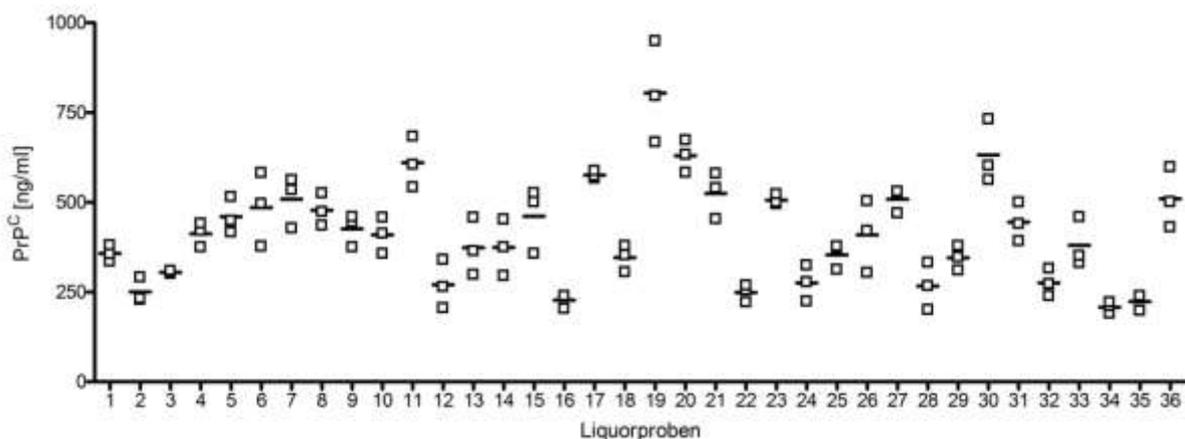


Abbildung 12: PrP^C-Konzentrationen von 36 Liquorproben, welche an drei verschiedenen Tagen vorbereitet und gemessen wurden.

Durch die Errechnung der Standardabweichung ließ sich eine Aussage über die Methodenpräzision tätigen: bei 30 Liquorproben lag die Standardabweichung unter 20 % und bei den sechs weiteren Liquorproben lag die Standardabweichung unter 25 %. Darstellung der PrP^C-Konzentrationen mit Mittelwert.

3.1.4 Vergleichende Messanalyse von Liquorproben mittels Multiplex-Assay und Roboscreen ELISA

Im Folgenden wurden die 36 im Triplikat gemessenen Liquorproben (siehe Kap. 3.1.3) mit der PrP^C-Konzentrationsmessung des kommerziellen PrP-ELISA von Roboscreen verglichen. Die mittels Roboscreen ELISA durchgeführten Messungen derselben 36 Liquorproben wurden im Duplikat durchgeführt. In den folgenden Abbildungen sind die Mittelwerte aus den Triplikat- bzw. Duplikatmessungen dargestellt.

Im graphischen Vergleich nach Bland-Altman zeigte sich, dass der Multiplex-Assay in 95 % der Fälle PrP^C-Konzentrationen misst, die zwischen 51 ng/ml und 446,4 ng/ml größer sind als die PrP^C-Konzentrationen des Roboscreen ELISA (Abb. 13). Diese sogenannten Übereinstimmungsgrenzen bezogen sich auf die PrP^C-Konzentrationen der Mittelwerte aus den jeweiligen Messwertepaaren, welche zwischen 139,3 ng/ml und 510,1 ng/ml lagen. Anhand dieser Darstellung ließ sich erkennen, dass die PrP^C-Konzentrationsdifferenzen zwischen den Messwertepaaren aus Multiplex-Assay und Roboscreen ELISA mit der Konzentration der Mittelwerte anstiegen.

Die mittlere Verzerrung in dieser Berechnung lag bei 248,7 ng/ml. Damit wurde gezeigt, dass der Multiplex-Assay im Durchschnitt PrP^C-Konzentrationen misst, die um 248,7 ng/ml größer sind als die PrP^C-Konzentrationen des Roboscreen ELISA.

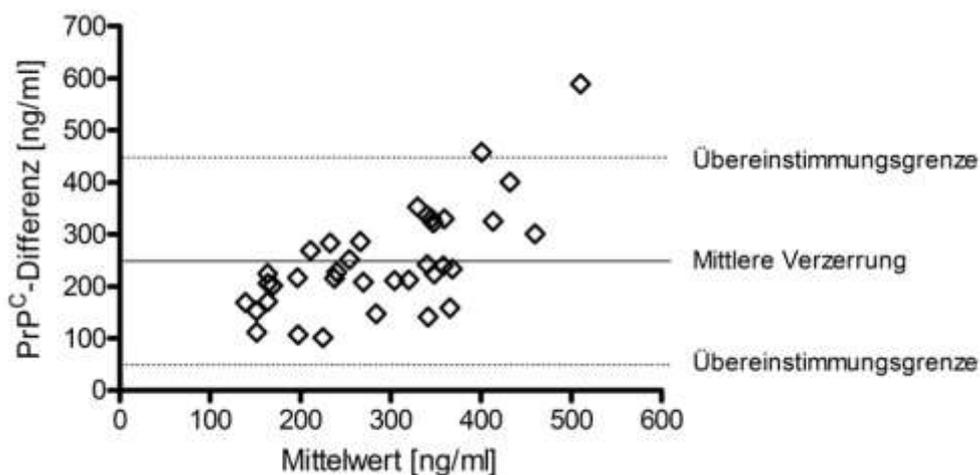


Abbildung 13: Bland-Altman-Diagramm für den Vergleich der PrP^C-Konzentrationsmessungen mittels Multiplex-Assays und Roboscreen ELISA.

Die Übereinstimmungsgrenzen in dieser graphischen Darstellung nach Bland-Altman liegen bei 51 ng/ml und 446,4 ng/ml. Die mittlere Verzerrung wurde mit 248,7 ng/ml berechnet.

Da es sich um verschiedene Detektionssysteme mit unterschiedlichen Standardkurven und Antikörpern handelt, konnte der Vergleich der absoluten Konzentrationen nur bedingt bewertet werden. Um wegen der unterschiedlichen Messbereiche der beiden Nachweismethoden von PrP^C eine Möglichkeit zu haben, einen relativen Vergleich zwischen den beiden Messmethoden aufzuzeigen, wurde eine Darstellung gewählt, in der die PrP^C-Konzentrationswerte des Roboscreen ELISA mit dem Faktor 2,5 multipliziert wurden

(Abb. 14). In dieser vergleichenden Darstellung zeigte sich bei 13 Messwertepaaren eine Abweichung von unter 20 % (Proben 7, 13, 15, 16, 17, 21, 25, 27, 29, 30, 33, 34, 36) und bei zehn weiteren Messwertepaaren eine Abweichung von unter 30 % (Proben 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 22, 23, 26). Neun Messwertepaare wiesen eine Differenz von < 50 % auf (Proben 1, 2, 12, 14, 18, 19, 20, 28, 35) und vier Messwertepaare lagen trotz der Angleichung durch den Faktor 2,5 über 50 % (Proben 4, 24, 31, 32).

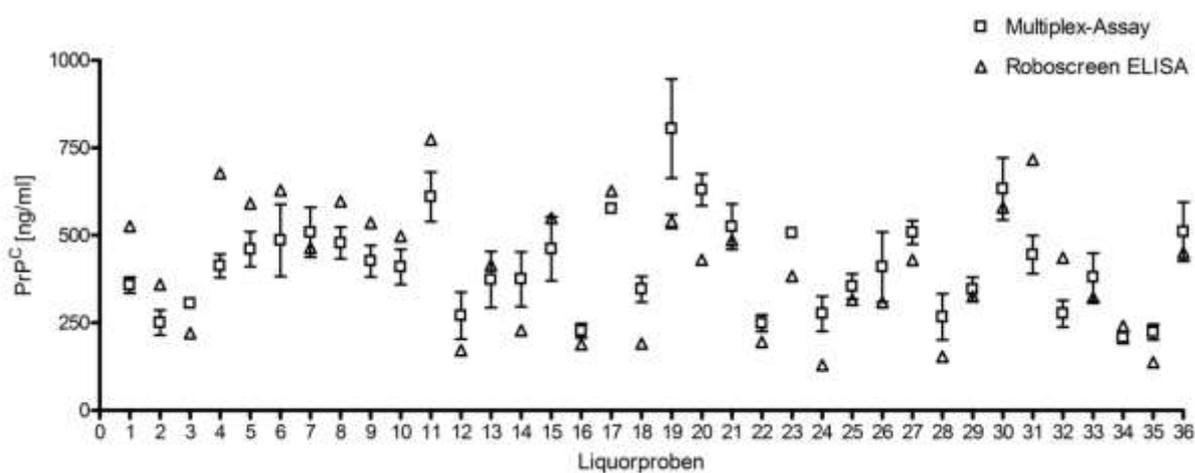


Abbildung 14: Gegenüberstellung der PrP^C-Mittelwerte mit Standardabweichung aus der Messung des Multiplex-Assays und aus der Messung des Roboscreen ELISA.

In dieser Darstellung wurden die PrP^C-Konzentrationen aus der Messung des Roboscreen ELISA mit dem Faktor 2,5 multipliziert, um die zwei unterschiedlichen Messbereiche einander anzugleichen. Darstellung der PrP^C-Konzentrationen mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichungen der Duplikatmessungen, gemessen mittels Roboscreen ELISA-, waren so gering, dass sie in den meisten Probendarstellungen nicht sichtbar sind.

3.2 Analyse des Einflusses unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die PrP^C-Konzentration mittels neu entwickeltem Multiplex-Assay

3.2.1 Veränderung der PrP^C-Konzentration in Liquorproben in Abhängigkeit von der Lagerung

Im folgenden Versuch wurde die Veränderung der PrP^C-Konzentration im Verlauf von 0 bis 4 Tagen in Abhängigkeit von der Lagerung mittels Multiplex-Assay gemessen. Es wurden jeweils zehn Liquorproben bei Raumtemperatur und bei 4 °C gelagert. Von diesen Liquorproben wurden an Tag 0, 1, 2 und 4 Liquor entnommen und bei -80 °C gelagert. Die PrP^C-Konzentration der zwanzig Proben wurde nach vier Tagen auf derselben Multiplex-

Well-Platte gemessen. Die erste Messung von Tag 0 wurde gleich 100 % gesetzt, um einen einheitlichen Ausgangswert für die Beurteilung der Stabilität zu haben.

Die Proben, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, zeigten im Verlauf von Tag 0 bis Tag 4 keine signifikanten Konzentrationsveränderungen (Abb. 15 A). Auch die bei 4 °C gelagerten Proben zeigten keinen signifikanten Konzentrationsunterschied im Verlauf von Tag 0 zu Tag 4 (Abb. 15 B).

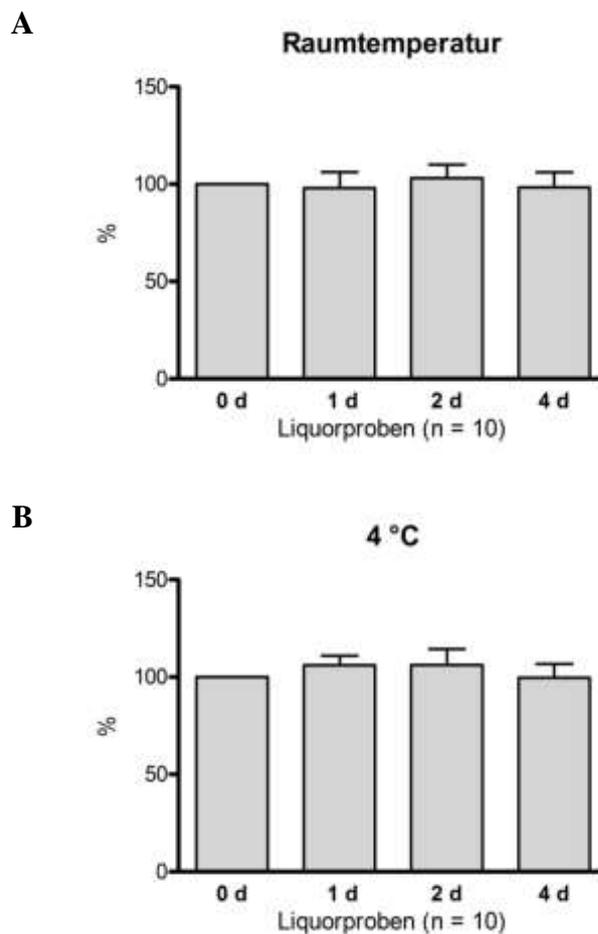


Abbildung 15: PrP^C-Konzentrationen im Verlauf von 0, 1, 2 und 4 Tagen gemessen (0 d = 100 %).

Die PrP^C-Konzentrationen im Verlauf der Lagerung bei Raumtemperatur zeigten keine signifikanten Veränderungen (A). Auch bei den PrP^C-Konzentrationen in den bei 4 °C gelagerten Liquorproben konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (B).

3.2.2 Veränderung der PrP^C-Konzentration in Liquorproben im Verlauf mehrerer Einfrier-Auftau-Zyklen

Für den folgenden Versuch wurden sieben Liquorproben bei -20 °C gelagert und jeweils 10 µl nach 0, 3, 5 und 10 Einfrier-Auftau-Zyklen bei -80 °C gelagert und danach in einem Versuchsansatz mittels Multiplex-Assay gemessen. Die PrP^C-Ausgangskonzentration bei Zyklus 0 (0 cl) wurde gleich 100 % gesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu gewährleisten.

Es wurden zwischen den verschiedenen Stadien der Einfrier-Auftau-Zyklen keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede festgestellt.

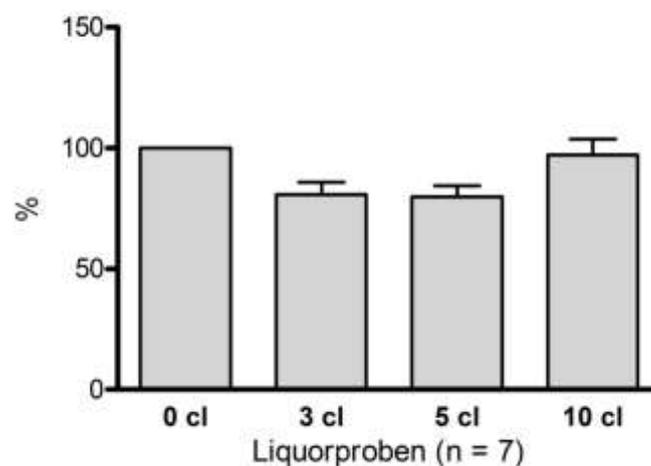


Abbildung 16: Sieben Liquorproben wurden nach 0, 3, 5 und 10 Einfrier-Auftau-Zyklen (cl) mittels Multiplex-Assay gemessen.

Die PrP^C-Ausgangskonzentration bei 0 cl wurde gleich 100 % gesetzt. Zwischen den verschiedenen Zyklen wurden keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede festgestellt.

3.3 Analyse der PrP^C-Konzentration bei Creutzfeldt-Jakob-Patienten und Kontrollpatienten mittels neu entwickeltem Multiplex-Assay

3.3.1 Bestimmung der PrP^C-Konzentration im Liquor von sCJK-, fCJK (E200K)- und FFI-Patienten und bei sCJK-Patienten in Abhängigkeit vom Codon-129-MV-Polymorphismus und PrP^{Sc}-Typen

Im folgenden Versuch wurde die PrP^C-Konzentration im Liquor von sCJK-, fCJK (E200K)-, FFI- und Kontrollpatienten mittels Multiplex-Assay gemessen. Außerdem wurden die sCJK-Patienten zusätzlich auf ihre Codon-129-Polymorphismen stratifiziert und die PrP^C-Konzentrationen der drei sCJK-Genotypen (MM, MV und VV) miteinander verglichen. Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die sCJK-Patienten nach ihren PrP^{Sc}-Typen unterteilt und die PrP^C-Konzentrationen der Patienten mit PrP^{Sc}-Typ 1 und PrP^{Sc}-Typ 2 miteinander verglichen.

Im ersten Vergleich (Abb. 17 A) wurde die PrP^C-Konzentration im Liquor der 15 fCJK (E200K)-Patienten signifikant niedriger gemessen als bei der FFI- und der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Eine signifikant niedrigere PrP^C-Konzentration wurde auch zwischen der Gruppe der fCJK (E200K)-Patienten und der sCJK-Gruppe ($p < 0,01$) nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kontrollgruppe mit 45 Liquorproben signifikant höhere PrP^C-Konzentrationen aufwies als das Patientenkollektiv von sCJK und FFI ($p < 0,001$) (Abb. 17 A).

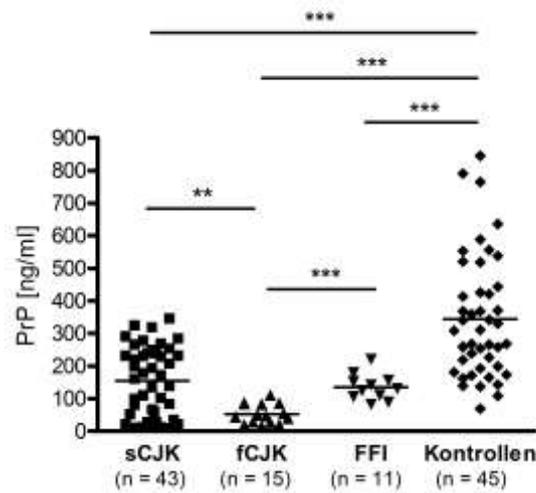
Insgesamt wurde nachgewiesen, dass die PrP^C-Konzentration in den Liquorproben der Kontrollgruppe signifikant höher gemessen wurde als die in Liquorproben von Patienten, welche an einer Prionerkrankung erkrankt waren. Die PrP^C-Konzentrationen der einzelnen Gruppen wurden von 4,5 ng/ml bis 344,25 ng/ml bei sCJK gemessen, beziehungsweise von 15,75 ng/ml bis 111 ng/ml bei fCJK (E200K), von 81,75 ng/ml bis 220,5 ng/ml bei FFI und von 69,4 ng/ml bis 845,42 ng/ml in der Kontrollgruppe.

Die Untersuchung der PrP^C-Konzentrationen im Liquor der sCJK-Patienten zeigte weder in Bezug auf die Codon-129-Polymorphismen MM, MV, VV noch auf die PrP^{Sc} Typen 1 und 2 signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen. Der PrP^C-Konzentrationsmittelwert \pm SEM der drei Codon-129-Polymorphismen-Gruppen entsprach 177,1 ng/ml \pm 23,9 ng/ml (MM), beziehungsweise 121,1 ng/ml \pm 28,4 ng/ml (MV), beziehungsweise 160,3 ng/ml \pm 31,8 ng/ml (VV) (Abb. 17 B).

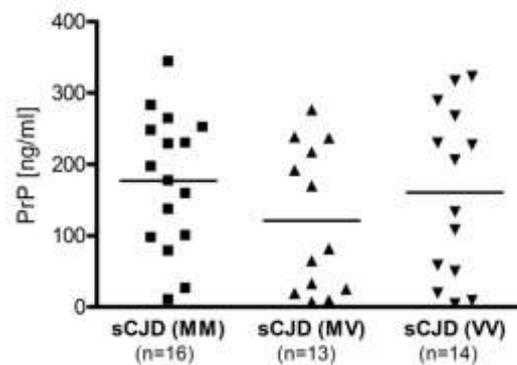
Der PrP^C-Konzentrationsmittelwert \pm SEM der sCJK-Patienten, welche nach ihrem PrP^{Sc}-Typen in Gruppen eingeteilt wurden, entsprach $149 \text{ ng/ml} \pm 19,2 \text{ ng/ml}$ (PrP^{Sc}-Typ 1), beziehungsweise $176,5 \text{ ng/ml} \pm 17,9 \text{ ng/ml}$ (PrP^{Sc}-Typ 2) (Abb. 17 C).

Mit dieser PrP^C-Konzentrationsuntersuchung im Liquor konnten demnach signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Prionerkrankungen sCJK, fCJK (E200K) und FFI sowie zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden. Zwischen den Codon-129-Polymorphismen und den PrP^{Sc}-Typen konnten hingegen keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede festgestellt werden.

A



B



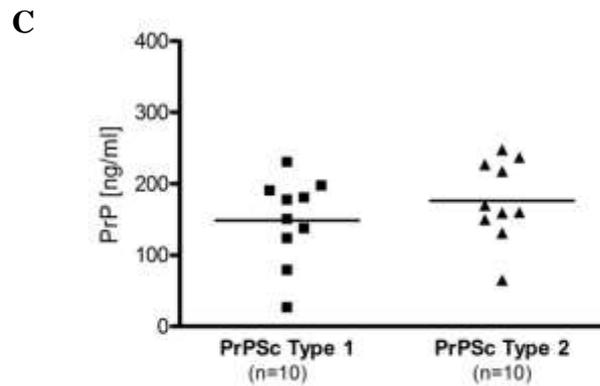


Abbildung 17: PrP^C-Konzentrationsmessung im Liquor von sCJK-, fCJK (E200K)-, FFI- und Kontrollpatienten.

Die PrP^C-Konzentration war im Liquor der fCJK (E200K)-Patienten signifikant niedriger als die der sCJK- und FFI-Patienten wie auch die drei Patientengruppen (sCJK, fCJK (E200K) und FFI) signifikant niedriger gemessen wurden als die Kontrollgruppe (A). Die PrP^C-Konzentrationen der Patientenkollektive mit den verschiedenen Codon-129 Genotypen (MM, MV und VV) wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (B). Auch die PrP^C-Konzentrationen der Patienten mit den PrP^{Sc} Typen 1 und 2 zeigten keine signifikanten Abweichungen der Mittelwerte (C). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Vergleiche der Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4 Diskussion

4.1 Entwicklung eines x-MAP-basierten Assays zur Bestimmung der PrP^C-Konzentration in humanen Liquorproben

Bisher galten bei experimentellen Verfahren der Western Blot und der kommerzielle Roboscreen ELISA als Standardmethoden zur Bestimmung der PrP-Konzentration im Liquor. Anhand einer von uns durchgeführten Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob sich das Methodenspektrum durch ein neuartiges, sensitiveres Multiplexverfahren, bei dem mehrere Proteine in derselben Probe gemessen werden können, erweitern ließe.

Als Vorteil des PrP-Nachweises im Western Blot gilt die große Vielfalt an PrP-spezifischen Antikörpern, welche kommerziell verfügbar sind. Diese sind gegen verschiedene Epitope auf dem PrP gerichtet und es lassen sich verschiedene PrP-Isoformen sowie trunkierte PrP-Fragmente im humanen Liquor darstellen, was mit der ELISA-Methode nicht möglich ist (Schmitz et al. 2010; Schmitz et al. 2014). Der Western Blot ist im Gegensatz zum ELISA ein qualitativer Test und nur semiquantitativ auszuwerten. Dieses Verfahren ist zeitlich aufwendiger und man kann nur eine begrenzte Anzahl an Proben (bis zu 10) auf einem Gel analysieren. Verschiedene Gele sind zudem nur eingeschränkt miteinander vergleichbar.

Bei dem Nachweis von PrP im Liquor mittels ELISA können hingegen 96 Proben inklusive der Standardproben gemessen werden, wodurch eine größere Anzahl von Messungen in kürzerer Zeit durchgeführt werden kann, was auch zu einer besseren Vergleichbarkeit führt. Außerdem ist eine quantitative Auswertung der PrP-Konzentrationen durch das Mitführen eines rPrP-Standards möglich (Engvall und Perlmann 1971).

Bei der Entwicklung des neuen Multiplexverfahrens musste bei der Auswahl der Antikörper darauf geachtet werden, dass beim ersten, beadgekoppelten Antikörper ein anderes Epitop erkannt wird als beim zweiten, biotinylierten Antikörper. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass sich nicht alle verwendeten PrP-Antikörper gleich gut mit den Beads oder mit dem Biotin koppeln ließen. Dies war ersichtlich an den geringen Kopplungsraten des SAF32- oder des 12F10-Antikörpers, weshalb wir uns für den 8G8-Antikörper als ersten Antikörper entschieden. Auch die Reaktion des Sulfo-NHS-Biotins mit den PrP-Antikörpern ließ sich anhand einer Farbreaktion beweisen. In mehreren Versuchen erwies sich die Biotinylierung des SAF32-Antikörpers als am effektivsten.

Es ist davon auszugehen, dass in der hier vorliegenden Arbeit hauptsächlich PrP^C-Konzentrationen und kein Proteinase K-resistentes PrP^{Sc} gemessen wurden, da in Studien wie der von Schmitz et al. gezeigt werden konnte, dass das PrP^{Sc} mit herkömmlichen Methoden (ELISA oder Western Blot) unterhalb der Detektionsgrenze lag (Schmitz et al. 2010; Schmitz et al. 2014). In der Untersuchung von Schmitz et al. wurden sCJK-Liquorproben und Kontroll-Liquorproben (ohne Prionerkrankung) mit verschiedenen Konzentrationen von Proteinase K versetzt und die PrP Expression mit Hilfe des 3F4-Antikörpers detektiert. Im Western Blot zeigten die Banden der beiden Proben in Abhängigkeit von der zugesetzten Proteinase K-Konzentration die gleichen Grauabstufungen bis hin zu keinem Bandennachweis mehr, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass das PrP, welches in unseren Versuchen nachgewiesen wurde, dem PrP^C entspricht (Schmitz et al. 2010; Schmitz et al. 2014).

Mit Hilfe des von uns entwickelten x-MAP-basierten PrP-Assays können, wie im ELISA, bis zu 96 Liquorproben inklusive Standard in einem Versuchsansatz gemessen werden. Der Vorteil dieser Messmethode ist unter anderem, dass bei der Messung einer Liquorprobe gleichzeitig weitere Proteine bestimmt werden können. Deshalb wurde versucht, eine möglichst breite Verdünnungsreihe bei der Vorbereitung der Liquorproben für den Nachweis von PrP^C im Multiplexverfahren zu entwickeln. Dadurch könnte eine Liquorprobe gleichzeitig auf Proteine getestet werden, welche eine spezielle Verdünnung der Liquorprobe benötigen, ohne dass die PrP^C-Konzentrationsmessung in ihrer Qualität gestört wäre. Demnach wäre die Erweiterung des Assays um Proteine wie beispielsweise das Tau, das Phospho-Tau, das 14-3-3-Protein, das S-100b und die γ -Enolase ein Ansatzpunkt für weitere Forschung, welcher sich aus dieser Arbeit ergibt. Die Möglichkeit, in einem Versuchsansatz verschiedene Proteine gleichzeitig nachweisen zu können, verringert die Fehlerquellen und macht einen besseren Vergleich von verschiedenen Proteinkonzentrationen in einer Liquorprobe möglich.

Wir konnten nachweisen, dass das PrP^C in humanen Liquorproben mittels Multiplex-Assay in einer Verdünnung von 1:250 bis 1:50 zuverlässig gemessen werden kann, da die Standardabweichungen der im Triplikat gemessenen Proben in diesem Bereich unter 20 % und im Messbereich des Standards lagen. Wir entschieden uns dafür, in den Versuchen mit unbekanntem Liquorproben eine mittlere Verdünnung von 1:100 anzuwenden.

Der weitere Versuchsaufbau für die Methodvalidierung des neuen Multiplex-Assays orientierte sich an den von Lee et al. und an den von Andreasson et al. aufgeführten Versuchsanforderungen für die Entwicklung von neuen Messverfahren (z.B. ELISA), wobei

die Methodenentwicklung und die explorative Methodvalidierung als grundlegende Orientierung für diese Arbeit dienten (Andreasson et al. 2015; Lee et al. 2006). Zusätzlich orientierten wir uns an den Angaben der Leitlinien zur Methodvalidierung des Umweltbundesamts von 2005, um die Voraussetzungen zu erfüllen, die für eine solche Methodvalidierung notwendig sind. Darin wird unter anderem gefordert, dass das Messgerät wie auch die Chemikalien von bekannter Qualität und akzeptierter Präzision sein müssen (Wellnitz und Gluschke 2005). Wir verwendeten in allen Versuchen das Bio-Plex 200 System von Bio-Rad, welches nach Herstellerangaben gewartet und kalibriert wurde. Die von uns genutzten Chemikalien waren ausschließlich aus kommerziellen Kits und stehen damit unter der regelmäßigen Kontrolle der Firmen.

Der Bereich, in dem die Standardabweichungen zwischen den Standardmessungen unter 20 % lagen, wurde als Arbeitsbereich festgelegt (Andreasson et al. 2015; Guideline on bioanalytical method validation 2011). Die von uns im Triplikate gemessene rPrP-Standardkurve von 1 ng/ml bis 450 ng/ml erfüllte diese Voraussetzung. Als Vorbereitung für diese Triplikatemessung wurde eine Konzentrationsbereichsmessung verwendet, die einen linearen Konzentrationsbereich von 31,2 ng/ml bis 1876,2 ng/ml rPrP ergab. Die Tatsache, dass der Arbeitsbereich nicht dem linearen Bereich der Standardkurve entsprach, zeigt sich laut Lee et al. in den meisten Standardkurven von Immunoassays (Lee et al. 2006). Durch die von uns gewählte obere Begrenzung des Arbeitsbereichs wurden Daten, die über 450 ng/ml lagen, in der Dreifachmessung nicht erhoben, weswegen dazu keine Aussage gemacht werden kann. Wir haben uns gegen eine Vergrößerung des Arbeitsbereiches entschieden, da die PrP^C-Konzentration unbekannter Liquorproben in den von uns genutzten Verdünnungen nie über 450 ng/ml lag.

Die untere Bestimmungsgrenze von 1 ng/ml korrigierten wir durch die Zehnfachmessung eines Leerwertes. Die daraus resultierende Nachweisgrenze von 0,52 ng/ml und Bestimmungsgrenze von 0,65 ng/ml wurden aus Mittelwert und Standardabweichung der Leerproben errechnet (Andreasson et al. 2015; Lee et al. 2006). In Anbetracht der von uns in Kap 3.3 erhobenen Messwerte lässt sich feststellen, dass einige PrP^C-Konzentrationen unter der definierten Nachweisgrenze lagen, was insbesondere für die sehr seltenen Liquorproben von Patienten mit genetischer Prionerkrankung gilt. Unter Annahme der hier berechneten Bestimmungsgrenze von 0,65 ng/ml können die PrP^C-Konzentrationen unter 65 ng/ml nur mit einer geringeren Präzision quantitativ bestimmt werden, wodurch die Diskriminationsfähigkeit zwischen den einzelnen Gruppen aber nicht maßgeblich beeinträchtigt wird.

Da die rPrP-Standardmessung von 31,25 ng/ml bis 16000 ng/ml weit über den linearen Messbereich bis 1876,2 ng/ml hinausgeht, konnte außerdem der *hook effect* ausgeschlossen werden, der durch Kreuzreaktionen oder durch falsche Antikörperverbindungen ein inadäquates Abfallen der Standardkurve in hohen Messbereichen beschreibt (Andreasson et al. 2015; Lee et al. 2006).

Die Überprüfung der Mess- und Methodenpräzision wurde anhand der Messung von 3 bzw. 36 Liquorproben durchgeführt. Diese Liquorproben stammten von Patienten, bei denen keine CJK oder andere neurodegenerative Erkrankungen diagnostiziert wurden, da es sich laut *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* von Thompson et al. zwar um reale Proben bzw. um matrixähnliche Proben handeln sollte, aber nicht um Proben von erkrankten Patienten handeln muss (Thompson et al. 2002). Auch Lee et al. fordern die Versuchsreihe an Proben von erkrankten Patienten erst in der fortgeschrittenen Methodvalidierung durchzuführen (Lee et al. 2006). Es lässt sich jedoch festhalten, dass sich in den erfolgten Triplikatmessungen von Kontrollproben auch niedrige PrP^C-Konzentrationen messen ließen, die sich teilweise mit den zu erwartenden PrP^C-Konzentrationsbereichen in Liquorproben von CJK-Patienten überschneiden.

Die Messpräzision wurde anhand von drei Liquorproben, welche an drei verschiedenen Tagen jeweils dreimal gemessen wurden, geprüft. Die Standardabweichung in der Serie (Probe eins 17,4 %; Probe zwei 20,0 %; Probe drei 18,4 %) wie auch die Standardabweichung zwischen den Serien (Probe eins 19,9 %; Probe zwei 11,2 %; Probe drei 12,5 %) lag bei den drei Proben jeweils unter 20 %. Aus diesen beiden Standardabweichungen, welche als Maß für die Intra- bzw. Interassay-Variabilität gelten, ließen sich anhand der Leitlinien für Methodvalidierung des Umweltbundesamtes für Probe eins eine Gesamt-Standardabweichung von 26,4 %, für Probe zwei von 22,9 % und für Probe drei von 22,2 % errechnen (Wellmitz und Gluschke 2005). Die Gesamt-Standardabweichung liegt demnach nicht unter der Abweichungsgrenze von 20 %, jedoch wird in der aktuellen Literatur in dieser Phase der Methodvalidierung keine einheitliche Standardabweichung von kleiner als 20 % gefordert (Andreasson et al. 2015; Lee et al. 2006). Erst in der fortgeschrittenen Methodvalidierung werden nach Lee et al. im Versuchsansatz eine höhere Probenzahl von sechs Proben sowie eine Gesamt-Standardabweichung von kleiner als 20 % gefordert (Lee et al. 2006).

Die Methodenpräzision hingegen wurde anhand der PrP^C-Konzentration von 36 Liquorproben errechnet, welche an drei verschiedenen Tagen vorbereitet und gemessen wurden. Die Standardabweichungen als Maß für die Methodenpräzision lagen bei 30 Proben unter 20 %

und bei 6 Proben unter 25 %. Auch dies ist in der Phase der explorativen Methodvalidierung als gutes Ergebnis der Wiederholpräzision zu werten. Eine Vergleichspräzision wie z.B. mittels Ringversuchen mit anderen Laboren wurde in diesem Stadium der Methodvalidierung nicht durchgeführt, da es sich nicht um eine kommerziell verfügbare und allgemein angewandte Methode handelt.

Die Überprüfung der Richtigkeit konnte anhand des Vergleichs mit dem Roboscreen ELISA nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden, da es sich um zwei komplett unterschiedliche Nachweisverfahren mit verschiedenen Messbereichen handelt. Die absoluten PrP^C-Konzentrationsdifferenzen zwischen den Messungen des Roboscreen ELISA und des Multiplex-Assays wurden anhand des Bland-Altman-Verfahrens verglichen. Wie von Grouven et al. gezeigt wurde, ist das Bland-Altman-Verfahren eine geeignete Methode, zwei Konzentrationsmessungen miteinander zu vergleichen (Grouven et al. 2007). Diese graphische Darstellung zweier Messmethoden beurteilt nicht nur die durchschnittliche Differenz der Konzentrationswerte, sondern stellt auch die Streuung der einzelnen Konzentrationsdifferenzen, abhängig von der Höhe der Messwerte, dar (Bland und Altman 1986). In unserem Experiment haben wir die PrP^C-Konzentrationsdifferenz eines jeden Messwertepaares von Multiplex-Assay und Roboscreen ELISA dem Mittelwert aus den beiden PrP^C-Konzentrationen gegenübergestellt, wobei die PrP^C-Konzentration des Multiplex-Assays dem Mittelwert der Triplikatmessung und die PrP^C-Konzentration des Roboscreen ELISA dem Mittelwert der Duplikatmessung entsprachen. Die Übereinstimmungsgrenzen zwischen den beiden Messmethoden liegen bei 51 ng/ml und 446,4 ng/ml, was bedeutet, dass der Multiplex-Assay in 95 % der Fälle PrP^C-Konzentrationen misst, die zwischen 51 ng/ml und 446,4 ng/ml größer sind als die PrP^C-Konzentrationen des Roboscreen ELISA. Die mittlere Verzerrung in unserem Vergleich der beiden Messmethoden liegt bei 248,7 ng/ml und drückt die durchschnittliche Differenz der beiden Messmethoden aus. Sie besagt, dass die PrP^C-Konzentrationen des Multiplex-Assays durchschnittlich um 248,7 ng/ml größer sind als die Konzentrationen, welche mittels Roboscreen ELISA gemessen wurden.

Um trotz der verschiedenen Messbereiche zumindest einen relativen Vergleich herstellen zu können, entschieden wir uns für die Angleichung der Messbereiche, indem wir die Ergebnisse des Roboscreen ELISA mit dem Faktor 2,5 multiplizierten. Es ergab sich daraus bei 13 Messwertepaaren eine Differenz von unter 20 %, bei zehn Messwertepaaren von unter 30 %, bei neun Messwertepaaren von unter 50 % und vier Messwertepaare lagen über 50 %.

Diese hohen Differenzen zwischen den Messwertepaaren sowie zwischen den oben besprochenen Übereinstimmungsgrenzen sprechen für eine hohe Variabilität zwischen den beiden Messmethoden. Dieser Effekt könnte unter anderem an den unterschiedlichen Detektionsantikörpern oder an den verschiedenen mitgeführten rPrP-Standards liegen. Auch Pipettierfehler oder die langfristige Stabilität des PrP^C, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, könnten mögliche Ursachen für die Differenzen sein. Weiterhin lässt sich feststellen, dass durch die hohe Variabilität zwischen den beiden Messmethoden die Festlegung eines gemeinsamen Cut-offs nicht sinnvoll erscheint.

Ein Vorteil unserer neu entwickelten x-MAP-basierten Methode zum bestehenden PrP-ELISA von Roboscreen zeigt sich in der Standardkurve, die im Arbeitsbereich von 0,65 ng/ml bis 450 ng/ml einen wesentlich größeren Konzentrationsbereich umfasst, als der mitgelieferte Standard des Roboscreen ELISA, welcher von 1 ng/ml bis 20 ng/ml misst. Hierdurch wollten wir erreichen, nicht nur PrP^C-Konzentrationen in humanen Liquorproben nachweisen zu können, sondern auch PrP^C-Konzentrationsnachweise in anderen Geweben oder Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel im Serum oder im Gehirn zu ermöglichen.

Die Anwendung des Multiplex-Assays in der Prionenforschung würde im Sinne der *good laboratory practice* für die Entwicklung von Immunoassays eine große Anzahl weiterer Versuchsreihen mit Hilfe des Beadkopplungsverfahrens voraussetzen (Lee et al. 2006; Andreasson et al. 2015). Ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsprojekte, welcher sich aus dieser Arbeit ergibt, wäre die Etablierung eines methodisch validierten Messverfahrens, in dem die für die Forschung relevanten Proteine wie Tau, Phospho-Tau, 14-3-3, S-100b und die γ -Enolase gleichzeitig mit der PrP-Konzentration in einem Versuchsansatz bestimmt werden könnten. Hierdurch wäre eine Arbeits- und Zeiteinsparung im Forschungsbereich der neurodegenerativen Erkrankungen denkbar.

Die Weiterführung der Entwicklung des Multiplex-Assays hängt unter anderem von dem Nutzen und der Praktikabilität des PrP^C-Nachweises ab, weswegen in den weiteren Abschnitten unserer Arbeit Messungen zur Stabilität des PrP^C wie auch Messungen von PrP^C im Liquor von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen durchgeführt wurden. Diese Messungen wurden mittels Multiplex-Assay gemessen, um dieses PrP^C-Messverfahren in der Anwendung zu prüfen und mit bestehenden Roboscreen ELISA Messungen vergleichen zu können. Zudem sollte eine Vergleichbarkeit der gemessenen PrP^C-Konzentrationen innerhalb dieser Arbeit gewährleistet werden.

4.2 Einfluss von Kurzzeitlagerungsbedingungen auf die Konzentration von PrP^C im Liquor

Obwohl es schon mehrere veröffentlichte Daten über die PrP^C-Konzentrationsveränderungen im Liquor von CJK-Patienten gibt, sind keine Studien veröffentlicht, die sich mit der Haltbarkeit des PrP^C und den damit verbundenen, möglichen PrP^C-Konzentrationsschwankungen auseinandersetzen.

In der vorliegenden Arbeit konnte innerhalb von bis zu vier Tagen weder bei der Lagerung der Liquorproben bei 4 °C noch bei deren Lagerung bei Raumtemperatur eine signifikante PrP^C-Konzentrationsveränderung in den Liquorproben festgestellt werden.

Eine weitere Aussage zur Haltbarkeit des PrP^C haben wir durch die Konzentrationsmessungen nach bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen erhalten. Innerhalb dieser zehn Zyklen wurden keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsveränderungen zur Ausgangskonzentration von PrP^C (Zyklus 0) festgestellt.

Die hohe Stabilität des PrP^C, welche sich in den nicht signifikanten Konzentrationsänderungen während der Lagerung bei 4 °C und bei Raumtemperatur oder durch die Veränderung des Aggregatzustands des Liquors widerspiegelt, spricht für eine gute Qualität als Biomarker.

Weitere Proteine im Liquor wie zum Beispiel das Gesamt-Tau oder das Phospho-Tau zeigen wie das PrP^C keine Konzentrationsveränderungen durch die Lagerung von Liquor bei Raumtemperatur über 24 h (Kaiser et al. 2007). Die Lagerung von Amyloid- β dagegen wird kontrovers diskutiert. Im Jahr 2007 konnten Kaiser et al. einen signifikanten Konzentrationsanstieg von Amyloid- β im Liquor durch die Lagerung des Liquors bei Raumtemperatur innerhalb von 24 h nach Entnahme feststellen (Kaiser et al. 2007). Im Jahr 2005 dagegen konnten Schoonenboom et al. bei der Lagerung des Liquors bei 4 °C, 18 °C und 37 °C einen Konzentrationsabfall von Amyloid- β um 20 % des Ausgangswerts nach zwei Tagen nachweisen (Schoonenboom et al. 2005). Daraus würde sich ergeben, dass die Konzentration von Amyloid- β nur durch sofortiges Kühlen des Liquors nach Entnahme zuverlässig bestimmt werden kann.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Gesamt-Tau-Konzentration im Liquor nach sechs Einfrier-Auftau-Zyklen sinkt und die Amyloid- β -Konzentration schon nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen abnimmt (Schoonenboom et al. 2005).

Insgesamt ist die Struktur des PrP^C im Liquor in Bezug auf die Haltbarkeit bei einer Lagerung bei 4 °C sowie bei Raumtemperatur mit der Stabilität des Gesamt-Tau und des Phospho-Tau

vergleichbar, da weder bei 4 °C noch bei Raumtemperatur signifikante Konzentrationsunterschiede des PrP^C gemessen werden konnten.

In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die Lagerung von Liquor über bis zu vier Tage bei 4 °C und bei Raumtemperatur keine Konzentrationsveränderungen des PrP^C hervorruft. Diese Eigenschaft ist von Vorteil, da Liquorproben von Patienten aus ganz Deutschland in nur wenigen spezialisierten Prionforschungszentren untersucht werden können und ein regulärer Versand mit der Post möglich wäre.

Weiterhin wird die Stabilität des PrP^C durch bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen nicht beeinflusst, was in der Forschung bei mehreren vergleichenden Versuchen ein weiterer Vorteil ist.

4.3 Einfluss der Art von Prionerkrankung sowie des PRPN Codon-129-MV-Polymorphismus und der PrP^{Sc}-Typen auf die Konzentration von PrP^C

In dieser Arbeit wurden die PrP^C-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit genetischen Prionerkrankungen wie fCJK (E200K) und FFI sowie von Patienten mit sCJK im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, bestehend aus einem Patientenkollektiv ohne Prionerkrankungen, gemessen.

Diese Messungen wurden durchgeführt, um eine eventuelle Verwendung der PrP^C-Konzentration im Liquor als Biomarker zu testen. Die aktuelle Diagnostik aus einer Kombination von EEG, MRT und 14-3-3-Nachweis im Liquor liegt mit der Sensitivität bei 98 % und mit der Spezifität bei 71 % (Zerr et al. 2009). Des Weiteren können die fCJK- wie auch die FFI-Patienten nicht anhand von Liquoruntersuchungen diagnostiziert werden, da diese Krankheitsformen keine erhöhten 14-3-3-Level aufweisen (Sanchez-Juan et al. 2006). Für fCJK und FFI fehlt demnach noch ein zuverlässiger Biomarker im Liquor. Wir haben uns für die Untersuchung des PrP^C entschieden, da durch die verschiedenen Mutationen im PRNP bei Patienten mit fCJK und FFI ein veränderter Enzymmetabolismus eine andere Regulierung der PrP^C-Konzentration mit sich bringen könnte als bei Patienten mit sCJK oder der Kontrollgruppe. Nach den Untersuchungen der Stabilität des PrP^C wollten wir nun mögliche PrP^C-Konzentrationsunterschiede zwischen fCJK (E200K)-, FFI-, sCJK-Patienten und einer Kontrollgruppe nachweisen.

Die weitere Erforschung der PrP^C-Konzentration im Liquor von CJK-Patienten hat außerdem eine direkte Relevanz, wenn man von der „Umfaltungstheorie“ ausgeht, in der angenommen wird, dass das PrP^C sich im Verlauf der Krankheit zum PrP^{Sc} umwandelt (Prusiner 1994).

Bisher ist kein direkter Nachweis mittels ELISA oder Western Blot von PrP^{Sc} in Liquorproben möglich (Tagliavini et al. 1992; Schmitz et al. 2014). Es wäre also denkbar, eine Veränderung der PrP^C-Konzentration im Liquor als indirekten Nachweis einer Prionerkrankung zu etablieren, wenn signifikante PrP^C-Konzentrationsunterschiede in Liquorproben nachzuweisen sind. Dies gilt vor allem für Prionerkrankungen, die mit der aktuellen Diagnostik aus EEG, MRT und 14-3-3-Nachweis schwer nachzuweisen sind, wie zum Beispiel fCJK oder FFI (Sanchez-Juan et al. 2006).

Es konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante PrP^C-Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben der fCJK (E200K)-Patienten und der sCJK-Patienten, der FFI-Patienten wie auch zu denen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch die Liquorproben der FFI-Patienten unterschieden sich in der PrP^C-Konzentration von denen der Kontrollgruppe, wobei kein signifikanter Konzentrationsunterschied zu den Proben der sCJK-Patienten gezeigt werden konnte. Die PrP^C-Konzentrationsbereiche der einzelnen Gruppen überschritten sich trotz signifikanter Konzentrationsunterschiede teilweise. Die PrP^C-Konzentrationen der drei untersuchten Prionerkrankungen wurden in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 4,5 ng/ml bis 344,25 ng/ml gemessen, wogegen die PrP^C-Konzentrationen der Kontrollgruppe in einem Bereich von 108,6 ng/ml bis 845,42 ng/ml gemessen wurden. Es überschritten sich die PrP^C-Konzentrationen der sCJK-Proben mit Werten von 4,5 ng/ml bis 344,25 ng/ml und der FFI-Gruppe mit Werten von 81,75 ng/ml bis 220,5 ng/ml mit dem Konzentrationsbereich der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde der höchste PrP^C-Konzentrationswert der fCJK (E200K)-Gruppe bei 111 ng/ml gemessen, wobei die niedrigste PrP^C-Konzentration der Kontrollgruppe bei 108,6 ng/ml gemessen wurde. Zwischen diesen beiden Gruppen konnte demnach nicht nur eine signifikante PrP^C-Konzentrationsdifferenz festgestellt werden, sondern auch ein anderer PrP^C-Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Daraus ergäbe sich die Möglichkeit, PrP^C als Biomarker für fCJK in Betracht zu ziehen, da die signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede nicht nur in Bezug auf die Kontrollgruppe bestehen, sondern auch auf die Gruppe der sCJK- und FFI-Patienten. Trotzdem müssten im Verlauf des diagnostischen Prozesses andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder die Lewy-Body-Demenz ausgeschlossen werden, da in weiteren Studien keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede zwischen diesen Erkrankungen und CJK festgestellt werden konnten (Meyne et al. 2009). Eine erweiterte Studie mit einer wesentlich höheren Anzahl an Proben wäre dafür eine Voraussetzung.

Außerdem muss bedacht werden, dass die Liquorproben der fCJK (E200K)-Patienten ausschließlich aus der Slowakei zur Verfügung gestellt wurden und in der vorliegenden

Arbeit keine Proben aus Deutschland verwendet wurden. Unterschiedliche Langzeitlagerungsbedingungen der Liquorproben, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, könnten zu PrP^C-Konzentrationsveränderungen geführt haben. Weiterhin könnten die PrP^C-Konzentrationen im Liquor zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen variieren. Dies ist in Bezug auf PrP^C-Konzentrationen noch nicht untersucht worden. Allerdings konnte eine Studie aus dem Jahr 2011 von Kovacs et al. anhand von 39 fCJK (E200K)-Patienten aus verschiedenen Laboren europäischer Länder keine klinischen, neuropathologischen oder biochemischen Unterschiede in Bezug auf die Herkunft der Patienten feststellen, wobei die PrP^C-Konzentration im Liquor kein Bestandteil dieser Arbeit war (Kovács et al. 2011).

Der Konzentrationsabfall von PrP^C im Liquor von fCJK (E200K)-Patienten könnte mit der genetischen Konformationsänderung des PrP^C dieser Patienten zusammenhängen. Die veränderte Ladungsverteilung in den mutierten PrP^C von fCJK (E200K)-Patienten beeinflusst die Salzbrücken im Protein, so dass die Helix destabilisiert ist und die pathogene Transformation von PrP^C zu PrP^{Sc} erleichtert wird (Levy und Becker 2002). Die damit einhergehende lebenslang höhere Aggregationsneigung von PrP im Gehirn könnte dazu führen, dass weniger PrP^C im Liquor nachgewiesen werden kann. Als neuropathologische Veränderungen wurden bei diesen Patienten vor allem Spongiose und Astroglieose im Cortex sowie ein Neuronenverlust nachgewiesen, welches durch vermehrte PrP-Aggregationen im Gehirn ausgelöst werden könnte (Mitrová und Belay 2002; Hsiao et al. 1991).

Andererseits wird dieser Theorie dadurch widersprochen, dass im Gehirn von FFI-Patienten trotz lokalen Abbaus, PrP^{Sc}-Ablagerungen mit immunhistochemischen Methoden selten nachgewiesen werden konnten (Dorandeu et al. 1998). In unserem Versuchsansatz wurde aber wie bei den fCJK (E200K)-Patienten ein signifikanter PrP^C-Konzentrationsabfall im Liquor der FFI-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen. Da auch zwischen den Gruppen der fCJK (E200K)-Patienten und der FFI-Patienten eine signifikante PrP^C-Konzentrationsdifferenz besteht, könnte die geringere PrP^C-Konzentration im Liquor der fCJK (E200K)-Patienten zumindest teilweise durch die PrP-Ablagerungen im Gehirn hergeleitet werden.

Eine weitere Ursache der niedrigen PrP^C-Konzentration im Liquor von fCJK (E200K)-Patienten wie auch von FFI-Patienten könnte die erhöhte Aggregationsneigung von PrP^C im Liquor sein, die dazu führt, dass bestimmte Epitope konformationspezifisch nicht mehr für die von uns verwendeten PrP-Antikörper verfügbar sind. Diese aggregierten Proteine würden dadurch in den PrP^C-Konzentrationsmessungen nicht mehr nachgewiesen werden, so dass ein

PrP^C-Konzentrationsabfall gemessen werden würde, obwohl eine hohe Anzahl an aggregiertem PrP^C im Liquor vorhanden ist.

Wie oben beschrieben, konnten wir nachweisen, dass die PrP^C-Konzentration der Liquorproben von sCJK-Patienten signifikant niedriger gemessen wurden als die der Kontrollgruppe, welches sich mit den Daten von Meyne et al. aus dem Jahr 2009 deckt. Auch in dieser Studie konnte ein PrP^C-Konzentrationsabfall im Liquor von Patienten mit CJK im Gegensatz zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Hypothese der Studie war, dass die Abnahme des PrP^C im Liquor mit der Gehirnatrophie bei zunehmender CJK zusammenhängen könnte (Meyne et al. 2009). Zusätzlich wurde in der Studie von Meyne et al. die Kontrollgruppe in ein junges (< 40 Jahre) und ein altes (> 40 Jahre) Patientenkollektiv unterteilt. In der weiblichen Kontrollgruppe konnte ein signifikanter PrP^C-Konzentrationsanstieg mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden, was in der männlichen Gruppe nicht nachzuweisen war. Da unser Patientenkollektiv eine Altersgruppe von 50 – 70 Jahren umspannt, muss in Betracht gezogen werden, dass dadurch höhere PrP^C-Konzentrationen gemessen wurden als es bei einer jüngeren Kontrollgruppe der Fall gewesen wäre.

Eine weitere Studie von Torres et al. aus dem Jahr 2012 hat PrP^C im Liquor als Nachweis für sCJK anhand eines kleinen Patientenkollektivs schon angewandt. Diese Studie konnte eine entgegengesetzte Konzentrationsentwicklung von PrP^C und 14-3-3 im Liquor von sCJK-Patienten nachweisen. Während im Verlauf der Krankheit die 14-3-3-Konzentration zunahm, wurde eine abnehmende PrP^C-Konzentration gemessen. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des Western Blots gemessen (Torres et al. 2012).

Im Gegensatz dazu werden bei Schafen oder Rindern zur Diagnose von Scrapie beziehungsweise BSE keine regelhaften Liquoruntersuchungen durchgeführt. Es konnte in einem Versuch von Braun et al. im Jahr 1998 festgestellt werden, dass sich die Liquorproben von erkrankten Rindern von den Liquorproben der gesunden Rinder in der Zellzahl, wie auch im Proteingehalt nicht unterschieden (Braun et al. 1998). Untersuchungen über PrP-Konzentrationen im Liquor von Rindern sind bisher noch nicht beschrieben. Auch bei Schafen konnte keine weiterführende Diagnostik anhand der Liquorproben ermittelt werden, wobei Schreuder et al. 1998 eine in vivo-Diagnose von Scrapie anhand einer Tonsillarbiopsie gelang (Schreuder et al. 1998).

Zusätzlich wurden die PrP^C-Konzentrationen im Liquor der sCJK-Patienten mit verschiedenen PRNP Genotypen für Codon-129-MV-Polymorphismen und unterschiedlichen PrP^{Sc}-Typen miteinander verglichen. Bei diesen Vergleichen konnten keine signifikanten

PrP^C-Konzentrationsunterschiede beobachtet werden, obwohl eine Homozygotie für MM als Risikofaktor für Prionerkrankungen gilt (Alperovitch et al. 1999) und auch bei fCJK (E200K)-Patienten mit einer Homozygotie für MM eine signifikant kürzere mittlere Überlebensdauer ($3,7 \pm 2,0$ Monate) festgestellt wurde als bei fCJK (E200K)-Patienten mit einer Heterozygotie für MV ($7,84 \pm 7,3$ Monate) (Mitrová und Belay 2002). Die durchschnittlich kürzere Überlebensdauer von fCJK (E200K)-Patienten mit einer Homozygotie für MM konnte auch von der schon vorher erwähnten Studie von Pocchiari et al. im Jahr 2004 bestätigt werden. In dieser Studie wurde außerdem festgestellt, dass Patienten mit einem PrP^{Sc}-Typen 2a eine signifikant längere Überlebensdauer (8 Monate) aufweisen als Patienten mit dem PrP^{Sc}-Typen 1 (4 Monate) (Pocchiari et al. 2004). Dies spiegelt sich in unserer Studie nicht durch eine signifikante PrP^C-Konzentrationsdifferenz zwischen den beiden PrP^{Sc}-Typen wider. Damit kann die PrP^C-Konzentration im Liquor von CJK-Patienten auch nicht zur Unterscheidung von Codon-129-MV-Polymorphismen, sowie von PrP^{Sc}-Typen genutzt werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Fragestellungen bearbeitet, die sich mit der Entwicklung eines neuen Detektionsassays für PrP^C, der Stabilität von PrP^C unter definierten Lagerungsbedingungen und der Bestimmung der PrP^C-Konzentration bei Patienten mit verschiedenen Prionerkrankungen (sCJK, fCJK, FFI (E200K)) auseinandersetzen.

Der erste Themenbereich befasst sich mit der Untersuchung einer neuen Testmethode zur PrP^C-Konzentrationsmessung im humanen Liquor. Dafür wurde eine x-MAP-basierte Nachweismethode für PrP^C entwickelt. In mehreren Abschnitten wurden die Methodenentwicklung und die explorative Methodvalidierung aufgezeigt. Es konnte ein zuverlässiger Verdünnungsbereich der Liquorproben von 1:250 bis 1:50 nachgewiesen werden. Außerdem konnte ein Arbeitsbereich der rPrP-Standardkurve von 0,65 ng/ml bis 450 ng/ml bei einem linearen Konzentrationsbereich von 31,25 ng/ml bis 1876,2 ng/ml gezeigt werden. Und zuletzt konnte die Mess- und Methodenpräzision anhand unterschiedlicher Mehrfachmessungen mit einer Standardabweichung von kleiner als 25 % bestätigt werden, was dem Stand der explorativen Methodvalidierung entspricht. Allerdings konnte nur eine sehr eingeschränkte Vergleichbarkeit zu dem kommerziell verfügbaren Roboscreen ELISA nachgewiesen werden.

Im zweiten Versuchsteil wurde die Stabilität der PrP^C-Konzentration im humanen Liquor bei verschiedenen Lagerungsbedingungen getestet. Während der vier Tage Lagerung bei 4 °C sowie bei Raumtemperatur konnten unter Anwendung des neuen Multiplex-Assays keine signifikanten PrP^C-Konzentrationsunterschiede gemessen werden. Auch bei den bis zu zehn Einfrier-Auftau-Zyklen konnten keine signifikanten Konzentrationsveränderungen zur Ausgangskonzentration des PrP^C im Liquor festgestellt werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Vergleich über die Regulierung des PrP^C im Liquor von Patienten mit verschiedenen Prionerkrankungen (sCJK, fCJK (E200K), FFI) und von Kontrollpatienten bearbeitet. Die PrP^C-Konzentrationsmessungen der Liquorproben wurden mittels Multiplex-Assay durchgeführt. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen der PrP^C-Konzentration der Kontrollgruppe und der PrP^C-Konzentration der sCJK-Patienten, der fCJK (E200K)-Patienten und der FFI-Patienten festgestellt, aber auch die PrP^C-Konzentration im Liquor der fCJK (E200K)-Patienten unterschied sich signifikant von der PrP^C-Konzentration der sCJK-Patienten und der FFI-Patienten. Außerdem wurden die CJK-

Patienten in Untergruppen von MM, MV, VV, sowie die PrP^{Sc}-Typen eingeteilt, wobei die PrP^C-Konzentration zwischen diesen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Zusammenfassend konnten mit den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen weitere Erkenntnisse über die Nachweismöglichkeiten und die Haltbarkeit des PrP^C sowie über dessen Anwendung gewonnen werden. Unsere Ergebnisse können als Ansatzpunkt für weitere Forschungsprojekte im Bereich der CJK oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen dienen.

Literaturverzeichnis

- Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS (2001): Prions: health scare and biological challenge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2, 118–126
- Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M (2008): Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 11–40
- Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, Pedro Cuesta J de, Hegyi I, Collins S, Kretzschmar H, van Duijn C, Will RG (1999): Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 9165, 1673–1674
- Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk Doorn LJ, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB (2015): A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Frontiers in neurology* 6, 179
- Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, Delasnerie-Lauprêtre N, Richard S, Launay JM, Laplanche JL (1999): 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1, 40–46
- Becker T (2005): BSE, Creutzfeldt-Jakob & Co. [<http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/bse/prion.htm#Das%20Prion-Protein>, Stand: 20.09.2010; Zugriff: 25.01.14]
- Belay ED (1999): Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol*, 283–314
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (a): Bio-Plex Pro™ Magnetic COOH-Beads Bio Plex® COOH Beads Amine Coupling Kit Instruction Kit, o. J., 1–35
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (b): Bio-Plex® Suspension Array System, Bulletin 5405, o. J., 1–7
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (c): Bio-Plex® Suspension Array System, Bulletin 5803A, 2009, 1–8
- Bland JM, Altman DG (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 8476, 307–310
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001): Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem* 42, 39145–39149
- Braun U, Schicker E, Hörnlmann B (1998): Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 4, 101–105
- Brown DR, Besinger A (1998): Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J*, 423–429

- Collins S, McLean CA, Masters CL (2001): Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* 5, 387–397
- Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 57, 1–18
- Dorandeu A, Wingertsman L, Chrétien F, Delisle MB, Vital C, Parchi P, Montagna P, Lugaresi E, Ironside JW, Budka H (1998): Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol.* 3, 531–537
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 9, 871–874
- European Medicines Agency: Guideline on Bioanalytical method validation, o. Verl., o. O. 2011
[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf; Zugriff 17.01.18]
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004): Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 26, 9683–9688
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992): Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 19, 9097–9101
- Gajdusek DC, Zigas V (1957): Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med* 20, 974–978
- Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW (1992): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 5083, 806–808
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A (2000): Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1, 85–92
- Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S (2007): Vergleich von Messmethoden. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, e69-73
- Guideline on Bioanalytical method validation s. European Medicines Agency
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM (1995): Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2, 621–629

- Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB, Gabizon R (1991): Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 16, 1091–1097
- Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 67, 147–228
- Kaiser E, Schönknecht P, Thomann PA, Hunt A, Schröder J (2007): Influence of delayed CSF storage on concentrations of phospho-tau protein (181), total tau protein and beta-amyloid (1-42). *Neurosci. Lett.* 2, 193–195
- Kovács GG, Seguin J, Quadrio I, Höftberger R, Kapás I, Streichenberger N, Biacabe AG, Meyronet D, Sciot R, Vandenberghe R (2011): Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 1, 39–57
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Römer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretschmar H (2001): Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem* 20, 16711–16719
- Kurschner C, Morgan JI (1995): The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1, 165–168
- Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alpérovitch A, Launay JM (1994): Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Neurology* 12, 2347–2351
- Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L (2006): Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharmaceutical research* 2, 312–328
- Levy Y, Becker OM (2002): Conformational polymorphism of wild-type and mutant prion proteins: Energy landscape analysis. *Proteins* 4, 458–468
- MacDonald ST, Sutherland K, Ironside JW (1996): Prion protein genotype and pathological phenotype studies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4, 285–292
- Mallucci GR, Ratté S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002): Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 3, 202–210
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986): Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 8, 2310–2314

- Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2009): Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *J. Alzheimers Dis* 4, 863–873
- Mitrová E, Belay G (2002): Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol* 1, 31–39
- Miyazono M, Kitamoto T, Doh-ura K, Iwaki T, Tateishi J (1992): Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 polymorphism (valine): a comparative study of patients with codon 102 point mutation or without mutations. *Acta Neuropathol.* 4, 349–354
- Nicotera P (2001): A route for prion neuroinvasion. *Neuron* 3, 345–348
- Ning Z, Zhao D, Yang J, Cui Y, Meng L, Wu C, Liu H (2005): Quantification of prion gene expression in brain and peripheral organs of golden hamster by real-time RT-PCR. *Anim. Biotechnol* 1, 55–65
- Oesch B, Teplow DB, Stahl N, Serban D, Hood LE, Prusiner SB (1990): Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* 24, 5848–5855
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 4, 735–746
- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S (1997): Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett* 3, 210–212
- Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991): Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 6333, 340–342
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 23, 10962–10966
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ (1996): Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 6, 767–778
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 2, 224–233
- Parry H (1983): *Scrapie Disease in Sheep*. Academic Press: London, 191
- Peters PJ, Mironov A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M (2003): Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol* 4, 703–717

- Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Gelpi E, Collins S, Lewis V, Sutcliffe T, Guilivi A, Delasnerie-Laupretre N (2004): Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pt 10*, 2348–2359
- Poser S, Mollenhauer B, Kraubeta A, Zerr I, Steinhoff BJ, Schroeter A, Finkenstaedt M, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Felgenhauer K (1999): How to improve the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 2345–2351
- Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 4542, 136–144
- Prusiner SB (1991): Molecular biology of prion diseases. *Science* 5012, 1515–1522
- Prusiner SB (1993): Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol* 11, 1129–1153
- Prusiner SB (1994): Molecular biology and genetics of prion diseases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 1306, 447–463
- Prusiner SB (1995): The prion diseases. *Sci. Am* 1, 48-51, 54-7
- Prusiner SB (1997): Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 5336, 245–251
- Prusiner SB (1998): Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 23, 13363–13383
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP (1982): Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 26, 6942–6950
- Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S, Favier A (2003): Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J. Biol. Chem* 11, 9064–9072
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K (1997): NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 2, 282–288
- Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M, Pocchiari M (1994): Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Hum. Genet.* 4, 375–379
- Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, Cuadrado-Corrales N, Sánchez-Valle R, Mitrováa E, Stoeck K, Sklaviadis T, Kulczycki J, Hess K (2006): CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 4, 637–643
- Schmitz M, Lüllmann K, Zafar S, Ebert E, Wohlhage M, Oikonomou P, Schlomm M, Mitrova E, Beekes M, Zerr I (2013): Association of prion protein genotype and scrapie prion protein type with cellular prion protein charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic or familial prion diseases. *Neurobiol. Aging* 5, 1177–1188

- Schmitz M, Schlomm M, Hasan B, Beekes M, Mitrova E, Korth C, Breil A, Carimalo J, Gawinecka J, Vargas D, Zerr I (2010): Codon 129 polymorphism and the E200K mutation do not affect the cellular prion protein isoform composition in the cerebrospinal fluid from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2024–2031
- Schoonenboom NS, Mulder C, Vanderstichele H, van Elk E, Kok A, van Kamp GJ, Scheltens P, Blankenstein MA (2005): Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin. Chem.* 1, 189–195
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA (1998): Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet. Rec.* 21, 564–568
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T (1986): Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 19, 7358–7362
- Steinhoff BJ, Räcker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I, Kretschmar H, Weber T (1996): Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol* 2, 162–166
- Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, Schulz-Schaeffer W, Poser S, Kretschmar HA (2004): Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol* 5, 702–708
- Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T (2001): Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* 2, 170–174
- Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Salmona M, Bugiani O, Frangione B (1992): A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 1398–1404
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996): Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 5295, 2079–2082
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2012): Instructions EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit, 1-7
- Thompson M, Ellison SL, Wood R (2002): Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855
- Torres M, Cartier L, Matamala JM, Hernández N, Woehlbier U, Hetz C (2012): Altered Prion protein expression pattern in CSF as a biomarker for Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS ONE* 4, e36159

- Wellnitz J, Gluschke M: Leitlinie zur Methodvalidierung im BLMP, Umweltbundesamt, Berlin 2005
[<https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf>, Zugriff 27.10.17]
- WHO (1998): Human transmissible spongiform encephalopathies. *Wkly. Epidemiol. Rec* 47, 361–365
- Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, Silva R de, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC (1996): Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum. Genet.* 3, 259–264
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, Oberdieck C, Bodemer M, Poser S, Kretzschmar HA (1999): Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum. Genet* 3, 244–252
- Wopfner F, Weidenhöfer G, Schneider R, Brunn A von, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schätzl HM (1999): Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol* 5, 1163–1178
- Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA (1997): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 9082, 903–907
- Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, Breithaupt M, Vargas D, Meissner B, Ladogana A (2009): Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* Pt 10, 26