

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung Prion-Protein-spezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper. Die Induktion solcher Antikörper ist aufgrund von Immuntoleranzeffekten sehr schwierig, da zelluläres Prion-Protein (PrP^{C}) ein bei allen bisher untersuchten Spezies natürlicherweise vorkommendes Protein ist. Zur Umgehung dieser Effekte wurden für diese Arbeit 32 Hühner und 32 Mäuse mit 16 synthetischen Peptiden immunisiert, die entsprechend der PrP -Aminosäuresequenz des Schafes synthetisiert waren. In ihrer Gesamtheit überspannten diese Peptide die volle Länge des Proteins. Die erhaltenen Anti-Peptidseren wurden anschließend mittels Immunoblot auf PrP -reaktive Antikörper getestet. Insgesamt wurden 24 PrP -spezifische Seren erhalten, 13 von Hühnern und 11 von Mäusen, die mit zellulärem (PrP^{C}) und/oder pathologischem (PrP^{Sc}) Schaf-Prion-Protein interagierten. Durch Verwendung von Peptiden als Antigene war es gelungen, gegen zehn der sechzehn ausgewählten Teilbereiche des Proteins PrP -affine Antikörper zu stimulieren. Ausgenommen davon waren lediglich a) der Signalsequenzbereich des primären Translationsproduktes (entsprechend den Peptiden Nr. 1 und 2), b) das carboxyterminale Ende des Proteins (entsprechend dem Peptid Nr. 16), c) ein zwischen den Spezies hoch konservierter Abschnitt des PrP (entsprechend dem Peptid Nr. 8) und d) ein Bereich entsprechend dem Peptid Nr. 13.

Die mit Schaf-Prion-Protein reagierenden Seren wurden ferner mittels Immunoblot auf ihre Kreuzreaktivität mit PrP^{C} 's anderer Säuger, wie Ziege, Rind, Mensch, Schwein, Hund, Katze, Nerz, Meerschweinchen, Hamster, Maus und Kaninchen, geprüft. PrP^{C} jeder dieser Spezies wurde von mindestens zwei verschiedenen Seren gut erkannt. Somit stehen nun Antikörper gegen PrP^{C} 's von zwölf Säugetierspezies zur Verfügung. Mäuse, die mit den Peptiden Nr. 3, 6, 10, 11 und 15 immunisiert waren und PrP -reaktive Antiseren gebildet hatten, wurden zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) verwendet. Die erhaltenen mAk wurden auf ihre Erkennung a) von zellulärem und pathologischem PrP vom Schaf und anderen Säugetierspezies mittels Immunoblot, b) von verschiedenen PrP^{C} -Präparationen (affinitäts-chromatographisch und immun-affinitäts-chromatographisch aufgereinigtes PrP^{C} sowie bakteriell synthetisiertes PrP^{C}) mittels ELISA und c) von nicht-denaturiertem PrP^{C} mittels Immunpräzipitation und noch zellassozierten PrP^{C} mittels Immunfluoreszenz und Immunperoxidase untersucht.

Diese Untersuchungen ergaben

- 1) sechs mAk, (gerichtet gegen die Peptide Nr. 6, 10 und 15), die PrP^C vom Schaf und von elf weiteren Säugetierspezies (s.o.) im Immunoblot detektierten. Sie erkannten ebenfalls pathologisches Prion-Protein von Schaf, Ziege, Rind und, wenn auch schwächer, von Hamster und Maus.
- 2) vier mAk (gerichtet gegen Peptide-Nr. 6 und -Nr. 10), die nicht denaturiertes PrP^C von Wiederkäuern aus kruden Gehirnhomogenaten präzipitierten. Humanes PrP^C wurde von den gegen Peptid Nr. 10 gerichteten mAk ebenso gut erkannt. Die Kreuzreaktivitäten mit den PrP^Cs anderer Säugetierspezies waren nicht mit denen im Immunoblot identisch.
- 3) drei in der Immunfluoreszenz und im Immunperoxidase-Assay spezifisch mit zellassoziertem PrP^C auf murinen Neuroblastomzellen und ovinen Chorioidplexuszellen reagierende mAk.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden, ebenfalls um die Immuntoleranz zu umgehen, sieben PrP⁰⁰-'Knock-Out'-Mäuse mit Schaf-PrP^C (5) und -PrP^{Sc} (2) immunisiert. In allen immunisierten PrP⁰⁰-Mäusen konnten auf diese Weise PrP^C- und PrP^{Sc}-spezifische Antiseren stimuliert werden.

Nach Untersuchungen mittels eines Peptid-ELISA erwiesen sich die Proteinbereiche entsprechend der Peptide Nr. 4, 5, 7 und 10 für PrP^C als immunogen. Bei PrP^{Sc} waren dies dagegen die Bereiche entsprechend den Peptiden Nr. 7, 8 und 9. Es bleibt noch unbeantwortet, weshalb es nach Testen von fast 4000 Hybridomüberständen nicht gelang, PrP-spezifische *monoklonale* Antikörper aus diesen PrP⁰⁰-Mäusen zu isolieren.

Die gewonnenen monoklonalen als auch polyklonalen Antikörper eignen sich hervorragend sowohl für die Diagnostik der Scrapie und der BSE als auch für Untersuchungen zur Aufklärung der Pathogenese der spongiformen Enzephalopathien der Wiederkäuer.

Silke Harmeyer

The production of monoclonal and polyclonal antibodies against ovine prion protein

8 SUMMARY

The aim of this study was the generation of prion-protein-specific monoclonal and polyclonal antibodies. Induction of such antibodies has proved to be difficult due to immunotolerance since cellular prion protein (PrP^C) is a naturally expressed protein in all hitherto examined species. In order to circumvent these effects of immunotolerance, in this study 32 chicken and 32 mice were immunized with 16 synthetic peptides which were synthesized according to the ovine PrP-amino acid sequence. In total these peptides covered the full length of the prion-protein.

The induced anti-peptide sera were then tested for PrP-reactive antibodies. Twenty-four out of 64 anti-peptide sera exhibited reactivity with ovine PrP^C and PrP^{Sc}, 13 of which were raised in chicken and 11 in mice.

By the use of peptides as antigens PrP-affine antibodies could successfully be stimulated against ten of the sixteen preselected regions of the protein. However, no epitopes were detected **a**) in the region of the signal sequence of the primary translation product (according to peptide no. 1 and 2), **b**) at the carboxyterminus of the protein (according to peptide no. 16), **c**) in a region of the protein highly conserved among species (according to peptide no. 8) and **d**) in a region corresponding to peptide no. 13. Sheep-prion-protein-reactive antisera were further tested by immunoblot for their crossreactivity with cellular prion-protein of other mammalian species including goat, cattle, man, pig, dog, cat, mink, guinea-pig, hamster, mouse and rabbit. PrP^C of each of these species was detected by at least two different antisera. Thus specific antisera for PrP^C of twelve different species are now available.

Mice immunized with peptides no. 3, 6, 10, 11 and 15 that had produced PrP-reactive antibodies were further used for the generation of monoclonal antibodies (mab). The resulting mabs were examined for their binding **a**) to PrP^C and PrP^{Sc} of sheep and other mammalian species in immunoblot, **b**) to different preparations of PrP^C (purified by affinity-chromatography, by immunaffinity-chromatography and PrP^C synthesized in *E. coli*) by ELISA and **c**) to non-denatured PrP^C by immunoprecipitation and still cell-associated PrP^C by immunofluorescence and immunoperoxidase.

This study resulted in

- 1) six mabs (directed against the peptides no. 6, 10 and 15) that detected PrP^C of sheep and eleven other mammalian species (see above) in immunoblot. These mabs also reacted with pathological PrP of sheep, goat and cattle and less strong with PrP^{Sc} of hamster and mouse.
- 2) four mabs (directed against the peptides no. 6 and 10) that were able to immunoprecipitate non-denatured PrP^C of ruminants from crude brain-homogenates. Human PrP^C was also detected by mabs directed to peptide no. 10. Crossreactions of these mabs with PrP^C of other mammalian species were not identical with those observed in immunoblot.
- 3) three mabs that reacted specifically with cell-associated PrP^C in murine neuroblastoma cells and ovine choroidplexus cells in immunofluorescence and immunoperoxidase assays.

In a further attempt, also to circumvent immunotolerance, seven PrP^{0/0}-'knock-out'-mice were immunized with ovine PrP^C (5) and PrP^{Sc} (2). PrP^C- and PrP^{Sc}-reactive antisera were successfully raised in all immunized PrP^{0/0}-mice and all sera detected both PrP-isoforms in immunoblot.

Based on ELISA-studies the regions of PrP^C according to the amino acid sequences of the peptides no. 4, 5, 7 and 10 proved to be immunogenic. In contrast immunodominant regions for PrP^{Sc} turned out to be the regions corresponding to the amino acid sequences represented by the peptides no. 7, 8 and 9. It still remains unclear, why the generation of PrP-specific *monoclonal* antibodies from these PrP^{0/0}-mice remained unsuccessful despite screening nearly 4000 hybridoma supernatants.

The generated monoclonal and polyclonal antibodies are well suited for the diagnosis of scrapie and BSE as well as for studies to elucidate the pathogenesis of the spongiform encephalopathies in ruminants.