

III – 4 Prionen

Von M. BEEKES, Berlin

Einleitung

Die Labordiagnostik konventioneller Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilzen beruht häufig auf Methoden zum Nachweis wirtsseitiger Immunreaktionen oder erregerspezifischer Nukleinsäuren. Prionen, die Verursacher transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE), stellen jedoch eine gänzlich andersartige Gruppe von Krankheitserregern dar (→ Kapitel VIII – 4.2.3). Prionen besitzen weder eine proteinkodierende Nukleinsäure, noch lösen sie bekannte Immunreaktionen in Tieren und Menschen aus. Sie stellen daher besondere Anforderungen an die Labordiagnostik.

Prionen sind infektiöse Proteinpartikel, die im Wesentlichen aus einer pathologisch aggregierten Isoform des wirtskodierten Prionproteins (PrP) bestehen [1, 2]. Die Prion-bildenden Konformere des PrP werden als PrP^{Sc} oder PrP^{TSE} („Sc“ für Scrapie und „TSE“ für transmissible spongiforme Enzephalopathie) bezeichnet [2, 3]. Die Replikation von Prionen erfolgt mutmaßlich durch einen Mechanismus, der Ähnlichkeit zum Wachstum von Kristallisationskeimen aufweist. Bei diesem Replikationsprozess, der als nukleationsabhängige (PrP-) Polymerisation bezeichnet wird [4, 5], rekrutieren „keim“- (englisch: „seeding“)-aktive PrP^{TSE}-Oligomere oder -Polymere das zelluläre Prionprotein (PrP^C) und bauen es in fehlgefalteter Form in ihre wachsende amyloide oder amyloid-ähnliche Aggregatstruktur ein. Wenn PrP^{TSE}-Aggregate schließlich in kleinere Fragmente zerfallen, führt dies zur Multiplikation von PrP-Partikeln mit proteiner Seeding-Aktivität und verursacht so

eine weitere autokatalytische Replikation des pathologischen Proteinzustandes.

Der labordiagnostische Nachweis von Prionen erfolgt in der Regel anhand von autopsisch oder biopsisch entnommenen zentralnervösen oder lymphoiden Gewebeproben aus Tieren oder Menschen. Bis heute gibt es kein routinemäßig breit anwendbares Testverfahren zur Detektion von Prionen in *ante mortem* gewonnenen Probenmaterialien. Allerdings konnten moderne Analysemethoden verschiedentlich bereits erfolgreich zum Nachweis von Prionen in Blut [6, 7], Urin [7, 8] oder Fäzes [7, 9] eingesetzt werden.

Tierbasierte Bioassays für Prionen

Das klassische und bis heute als Goldstandard betrachtete Verfahren zum Nachweis von TSE-Erregern sind Bioassays in Labortieren, zu meist Mäusen oder syrischen Goldhamstern. Dabei wird das zu testende Probenmaterial in Tiere gegeben (z.B. unter Narkose intrazerebral injiziert) und anschließend beobachtet, ob diese an einer TSE erkranken und krankheitstypische histopathologische Merkmale im zentralen Nervensystem (ZNS) ausprägen. Dies erlaubt nicht nur eine direkte Bestimmung der *in vivo*-Infektiösität von Prionen mittels „Inkubationszeit-Intervall Assays“ oder Endpunkttitrationen [10], sondern auch eine Differenzierung unterschiedlicher Prionstämme [11]. Tierbasierte Bioassays haben einen hohen diagnostischen Informationswert, sind jedoch zeitaufwändig, teuer und teilweise auch in ethischer Hinsicht problematisch. Aus

Tierschutz- wie Praktikabilitätsgründen wurden und werden sie daher zunehmend durch Alternativmethoden ersetzt.

Zellassays für Prionen

In vitro kann Prioninfektiosität qualitativ und quantitativ seit einigen Jahren auch mithilfe von Zellkulturverfahren nachgewiesen werden [12]. Bislang gibt es aber nur relative wenige Zellassays zur Titration von Prionen. Deren Anwendbarkeit ist zudem häufig stark eingeschränkt, da sie oft jeweils nur mit einem oder wenigen der zahlreichen experimentellen oder natürlichen Prionstämme nutzbar sind. Aufgrund methodischer Fortschritte ist es inzwischen aber beispielsweise möglich, die Infektiosität verschiedener Maus-adaptierter Scrapie-Prionen (22L, RML) in quantitativen Zellassays durch Nutzung subklonierter Neuroblastom-Zellen zu titrieren [13–15]. Darüber hinaus erlauben RK13-Zellen, die jeweils transgen PrP von Maus, Schaf oder Zerviden exprimieren, eine Titration von RML-Prionen [16], einem natürlichen Schaf-Scrapie-Isolat (PG127) [16], bzw. Prionen der Chronic Wasting Disease (CWD) [17].

Assays zum Nachweis prion-assoziiertes Seeding-Aktivität

Das Konzept der Prionreplikation durch keimabhängige PrP-Polymerisation legt nahe, die Seeding-Aktivität von PrP^{TSE} als wesentliches biochemisches Gegenstück zur biologischen Prioninfektiosität anzusehen. Prion-assoziierte Seeding-Aktivität konvertiert normales Proteinase K-sensitives PrP^C in abnormal aggregiertes und üblicherweise Proteinase K-resistentes Prionprotein (PrPres). Durch die Einführung der Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)-Technik im Jahr 2001 ist es möglich geworden, diese proteinöse Seeding-Aktivität von Prionen *in vitro* zu erfassen [18].

Verschiedene methodische Verbesserungen der PMCA-Technologie wie die quantitative PMCA und der „Real-Time Quaking Induced Conversion Assay“ (RT-QuIC), erlauben inzwischen eine direkte Titration von Prion-assoziiertes Seeding-Aktivität *in vitro* [19–21]. Saa und Cervenakova [22] haben kürzlich eine Übersichtsarbeit zum aktuellen Stand und zukünftigen Entwicklungspotenzial der PMCA- und QuIC-Technology publiziert.

Die Einführung der PMCA und des RT-QuIC erfolgten mit dem Hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K, der seit Langem in der grundlagenorientierten und angewandten Prionforschung intensiv genutzt wird [18–20]. Beim systematischen Vergleich von Infektiosität und Seeding-Aktivität in 263K Scrapie-Proben zeigte sich empirisch eine konsistente quantitative Korrelation dieser beiden Prion-Aktivitäten [20, 21].

Verfahren zum Nachweis des pathologischen Prionproteins PrP^{TSE}

Da PrP^{TSE} den Hauptbestandteil von Prionen darstellt [2, 23], nutzt eine Reihe unterschiedlicher diagnostischer Verfahren das pathologische Prionprotein als molekulare Surrogat-Marker für Prionen [23, 24].

Elektronenmikroskopischer Nachweis Scrapie-assoziiertes Fibrillen

Eine in der TSE-Forschung lange Zeit zur Prion-Diagnostik verwendete Methode war der elektronenmikroskopische Nachweis fibrillärer Aggregate aus PrP^{TSE}, sog. „Scrapie-assoziiertes Fibrillen“ (SAF, Abb. 1) in Detergenzextrakten aus Hirngewebe [25, 26].

Die elektronenmikroskopische Darstellung von SAF wurde in den vergangenen Jahren weitgehend durch Antikörper-basierte Methoden zum Nachweis von PrP^{TSE} ersetzt.



Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme Scrapie-assoziiierter Fibrillen (Balken: 100 nm). (Freundliche Gabe von M. Özel und H. Diring, Robert Koch-Institut, Berlin)

Antikörper-basierte Nachweisverfahren für PrP^{TSE}

Immunhistochemischer PrP^{TSE}-Nachweis

Zum immunhistochemischen (IHC) Nachweis von PrP^{TSE} werden Mikrotom-Schnitte fixierter

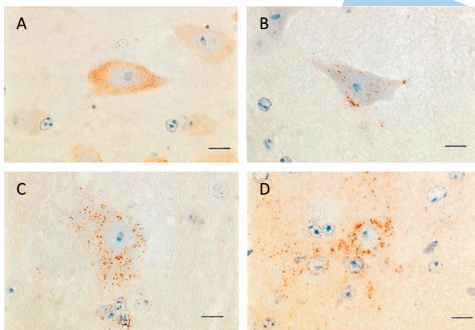


Abb. 2: Immunhistochemische Anfärbung von PrP^{TSE} im Gehirn Prion-infizierter syrischer Goldhamster. (A) Nicht-infiziertes Kontrolltier. Die homogene bräunliche Färbung resultiert von zellulärem PrP in Neuronen. (B) Frühes Infektionsstadium. Punktförmige Ablagerungen von PrP^{TSE} sind innerhalb und nahe der Oberfläche eines individuellen Neurons erkennbar. (C und D) Mit zunehmender Infektionsdauer nehmen die punktförmigen PrP^{TSE}-Einschlüsse in Neuronen zahlen- und intensitätsmäßig zu, und PrP^{TSE}-Ablagerungen erscheinen auch außerhalb von Nervenzellkörpern im Neuropil. Balken: 10 µm. (Abbildung von P.A. McBride, Institute for Animal Health, Edinburgh; ähnlich publiziert in: [29])

oder tiefgefrorener Gewebeproben angefertigt und mit anti-PrP (α PrP)-Antikörpern markiert. Bei der mikroskopischen Untersuchung der antikörpermarkierten Gewebeschnitte stellt sich PrP^{TSE} dann u.a. in Form charakteristischer plaque-artiger, punktförmiger oder feingranulärer Anfärbungen dar [27, 28].

Western Blot-Nachweis von PrP^{TSE}

Der Nachweis von PrP^{TSE} mittels Western Blot erfolgt in der Regel anhand frischer oder tiefgefrorener (unfixierter) Gewebeproben. Um die Testsensitivität zu erhöhen, kann das PrP^{TSE} zunächst aus einer größeren Gewebeprobe extrahiert und aufkonzentriert werden. Dies ist u.a. durch Detergenzextraktionen [30, 31], Immunpräzipitationen [32, 33] oder Fällungen mit Phosphorwolframsäure [34, 35] möglich.

Sofern keine konformationsspezifischen Antikörper [33, 36] zur Extraktion oder Detektion des PrP^{TSE} verwendet werden, ist es grundsätzlich erforderlich, das zelluläre Prionprotein durch Behandlung mit Proteinase K (PK) zu entfernen. Während PK zelluläres PrP vollständig abbaut, wird PrP^{TSE} von dieser Protease in der Regel lediglich aminoterminal um ungefähr 70 Aminosäuren verkürzt. Es verbleibt ein Protease-resistenter Kern des PrP^{TSE}, welcher als PrP27-30 schließlich im Western Blot sichtbar gemacht wird [30, 37, 38]. PrP27-30 erscheint im Western Blot typischerweise als Banden-Triplett. Diese Banden repräsentieren zweifach-, einfach- und unglykosylierte Formen des Proteins. Anhand des Intensitätsverhältnisses der unterschiedlichen Glykoformen und des jeweiligen elektrophoretischen Wanderungsmusters lassen sich unterschiedliche Isotypen von PrP27-30 unterscheiden und zur Stammdifferenzierung nutzen (Abb. 3) [28, 39].

Unterschiedliche Western Blot-Kits zum Nachweis von PrP^{TSE} sind kommerziell erhältlich und für die Verwendung in TSE-Diagnostiklaboratorien validiert und zugelassen [41].



Abb. 3: Western Blot-Nachweis von PrP₂₇₋₃₀ in PK-behandelten Hirnhomogenaten von syrischen Goldhamstern, die mit den unterschiedlichen Prion-Stämmen 263K (1), BSE-H (2) und ME7-H (3) infiziert waren. Anhand der elektrophoretischen Mobilität der untersten (unglykosylierten) Proteinbande sowie der relativen Färbeintensitäten der mittleren (monoglykosylierten) und oberen (diglykosylierten) Proteinbanden lassen sich die drei Prion-Stämme unterscheiden. (Abbildung aus dem Labor des Autors; ähnlich publiziert in: [40])

Nachweis von PrP^{TSE} im PET-Blot und Histoblot

Der PET (Paraffin-embedded tissue)-Blot kombiniert analytische Elemente der Immunhistochemie mit denen des Western Blots. Beim PET-Blotting werden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte auf eine Nitrocellulosemembran aufgezogen und anschließend mit Proteinase K behandelt. Dadurch ist es möglich, eine spezifische immunhistochemische Detektion von pathologischem PK-resistentem Prionprotein *in situ* zu erzielen [42]. IHC und PET-Blotting stellen sich ergänzende mikroskopische Techniken dar, mit deren Hilfe eine komplementäre Untersuchung der PrP^{TSE}-Ablagerung in benachbarten Gewebeschnitten möglich ist.

Anstelle von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten können auch Kryo-Gewebeschnitte auf Nitrocellulosemembranen aufgebracht, und zum nachfolgenden spezifischen Nachweis von pathologischem Prionprotein mit PK behandelt werden. Diese Detektionstechnik bezeichnet man als Histoblot [43].

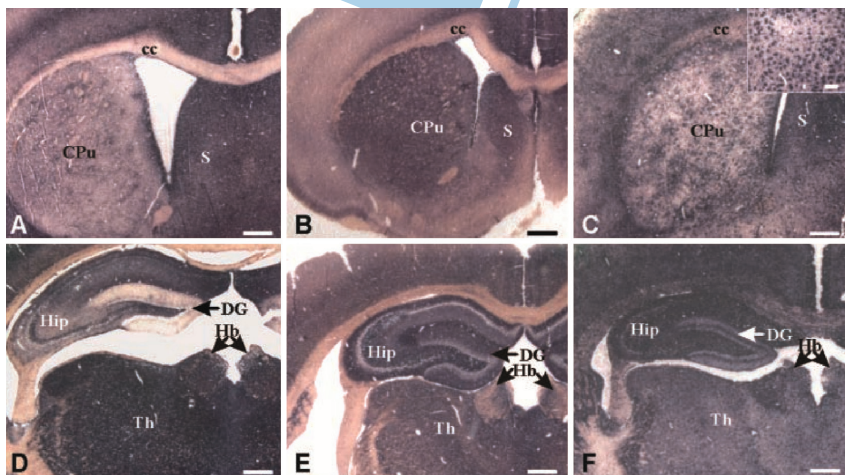


Abb. 4: PET-Blot-Nachweis von PrP₂₇₋₃₀ in Hirngewebsschnitten von syrischen Goldhamstern, die mit den unterschiedlichen Prion-Stämmen 263K (A, D), ME7-H (B, E) und BSE-H (C, F) infiziert waren. BSE-H zeigt anders als 263K und ME7-H plaque-artige PrP-Ablagerungen in bestimmten Hirnarealen (C vs. A und B). 263K und ME7-H zeigen stark unterschiedliche Färbeintensitäten im Gyrus dentatus (D vs. E). Anhand dieser Unterschiede lassen sich die drei Stämme im PET-Blot voneinander abgrenzen. Balken: 500 µm; im vergrößerten Ausschnitt von C: 100 µm. Abkürzungen: cc, Corpus callosum; CPu, Nucleus caudatus/Putamen (Striatum); DG, Gyrus dentatus; Hb, Habenulae; Hip, Hippocampus; S, Septum; Th, Thalamus. (Abbildung aus dem Labor des Autors; ähnlich publiziert in: [40])

Festphasenabsorptionsassays zum Nachweis von PrP^{TSE}

Festphasenabsorptionsassays zum PrP^{TSE}-Nachweis, in ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)- und zahlreichen anderen Formaten, sind grundsätzlich mit Homogenaten frischer oder tiefgefrorener unfixierter Gewebe, Blut oder Körperflüssigkeiten möglich (zur Übersicht: [44, 45]). PrP^{TSE} kann dafür optional durch Immunpräzipitation, Fällung mit Phosphorwolframsäure oder andere Verfahren aufkonzentriert (s.o.), mit Proteinase K behandelt und zur besseren Adsorption denaturiert werden. Die Adsorption des PrP^{TSE}/PrP27-30 an die Festphase des Assays kann über αPrP-Antikörper, Glykosaminoglykane oder andere Bindungsmoleküle (z.B. polymere „Seprion“-Liganden, die nur aggregierte Proteinformen binden [46]) erfolgen. Die Markierung des gebundenen PrP^{TSE}/PrP27-30 erfolgt mit markierten αPrP-Antikörpern. Zur Signalzeugung sind diese Antikörper beispielsweise mit

- Enzymen (ELISA),
- Europium (DELFIAs [dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay]),
- Rhodamine Red-X (SOFIA [surrounding optical fibre immunoassay]), oder
- DNA (immuno-polymerase chain reaction) konjugiert.

Zur Detektion des pathologischen Prionproteins existieren zahlreiche Varianten und Formate von Festphasenadsorptionsassays. Zwei dieser Formate, der CDI (conformation-dependent immunoassay [47]) und der auf Seprion-Liganden basierende Test [46] erfordern keinen Prozessierungsschritt mit Proteinase K, was für bestimmte Zwecke vorteilhaft sein kann. Letzteres gilt insbesondere, wenn PK-sensitive PrP^{TSE}-Formen detektiert werden sollen. Verschiedene der genannten Festphasenadsorptionsassays sind kommerziell erhältlich und für die Verwendung in Diagnostiklaboratorien validiert und zugelassen.

Sonstige Nachweisverfahren für pathologisches Prionprotein

Speziellere Verfahren zum Nachweis von pathologischem Prionprotein sind

- die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie [48],
- die multispektrale Ultraviolettfluoreszenzspektroskopie [49], und
- die Kapillarelektrophorese [50].

Schlussbemerkung und Ausblick

Der vorstehende Artikel soll einen kompakten Überblick über historisch und aktuell häufig verwendete Verfahren der laborgestützten Priondiagnostik geben, und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Neben der Verbesserung PrP^{TSE}-basierter Nachweismethoden stellt die Suche nach alternativen molekularen Biomarkern für Prionkrankheiten mittels

- proteomischer [51, 52],
- nukleinsäurebasierter [53, 54],
- infrarotspektroskopischer [55, 56] oder
- anderer Ansätze (z.B. Protein 14-3-3 [57, 58]) einen weiteren Schwerpunkt der Forschung zur laborbasierten TSE-Diagnostik dar. Es bleibt abzuwarten, welche Rolle solche Biomarker in der Priondiagnostik zukünftig übernehmen.

Praktische Hinweise

Weiterführende Literatur:

Vertiefende und weitergehende Informationen zur Thematik finden sich u.a. in Übersichtsarbeiten von Lukan et al. [44], Sobrova et al. [50] und Nicholson [45].

Weitere Informationen sind erhältlich über das

Nationale Referenzzentrum für die Surveillance Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien

Universitätsklinikum Göttingen

Neurologische Klinik

Robert Koch-Str. 40

37075 Göttingen

Homepage: www.cjd-goettingen.de

Ansprechpartner: Frau Prof. Dr. I. Zerr

Telefon: 0551/39-6636, oder -8454 oder -8401

Telefax: 0551/39-7020

E-Mail: epicjd@med.uni-goettingen.d

Literatur

- [1] Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136–144
- [2] Prusiner SB (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 13363–13383
- [3] Brown P, Cervenakova L (2005). A prion lexicon (out of control). *Lancet (London, England)* 365: 122
- [4] Come JH, Fraser PE, Lansbury PT (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90: 5959–5963
- [5] Soto C (2011). Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* 36: 151–158
- [6] Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, Campbell T, Lowe J, Mead S, Rudge P, Collinge J, Jackson GS (2011). Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 377: 487–493
- [7] Rubenstein R, Chang B, Gray P, Piltch M, Bulgin MS, Sorensen-Melson S, Miller MW (2010). A novel method for preclinical detection of PrPSc in blood. *J Gen Virol* 91: 1883–1892
- [8] Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park KW, Maderna E, Suardi S, Haik S, Brandel JP, Ironside J, Knight R, Tagliavini F, Soto C (2014). Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Eng J Med* 371: 530–539
- [9] Krüger D, Thomzig A, Lenz G, Kampf K, McBride P, Beekes M (2009). Faecal shedding, alimentary clearance and intestinal spread of prions in hamsters fed with scrapie. *Vet Res* 40: 4
- [10] Prusiner SB (1987). Bioassays of prions. In: Prusiner SB, McKinley MP (eds) (1987). *Prions – Novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease*. Academic Press, San Diego, New York, Toronto, 65–81
- [11] Bruce ME, Fraser H (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 125–138
- [12] Vilette D (2008). Cell models of prion infection. *Vet Res* 39: 10
- [13] Klöhn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003). A quantitative, highly sensitive

- cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 11666–11671
- [14] Mahal SP, Demczyk CA, Smith EW, Klöhn PC, Weissmann C (2008). Assaying prions in cell culture: the standard scrapie cell assay (SSCA) and the scrapie cell assay in end point format (SCEPA). *Methods Mol Biol* 459: 49–68
- [15] Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J (2009). Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions absorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 106: 3479–3483
- [16] Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Lacroux C, Andreoletti O, Vilette D (2011). A simple, versatile and sensitive cell-based assay for prions from various species. *PLoS one* 6, e20563
- [17] Bian J, Napier D, Khaychuck V, Angers R, Graham C, Telling G (2010). Cell-based quantification of chronic wasting disease prions. *J Virol* 84: 8322–8326
- [18] Saborio GP, Permann B, Soto C (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810–813
- [19] Chen B, Morales R, Barria MA, Soto C (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods* 7: 519–520
- [20] Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS pathogens* 6, e1001217
- [21] Pritzkow S, Wagenführ K, Daus ML, Boerner S, Lemmer K, Thomzig A, Mielke M, Beekes M (2011). Quantitative detection and biological propagation of scrapie seeding activity in vitro facilitate use of prions as model pathogens for disinfection. *PLoS one* 6, e20384
- [22] Saa P, Cervenakova L (2015). Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Res* 207: 47–61
- [23] Colby DW, Prusiner SB (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a006833
- [24] Aguzzi A, Calella AM (2009). Prions: Protein aggregation and infectious disease. *Physiol Rev* 89: 1105–1152
- [25] Stack MJ, Aldrich AM, Kitching AD, Scott AC (1995). Comparative study of electron microscopic techniques for the detection of scrapie-associated fibrils. *Res Vet Sci* 59: 247–254
- [26] Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE (1983). Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 306: 474–476
- [27] Ironside JW, McCordle L, Horsburgh A, Lim Z, Head MW (2002). Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS* 110: 79–87
- [28] Ironside JW, Ritchie DL, Head MW (2005). Phenotypic variability in human prion diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 565–579
- [29] Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79: 601–607
- [30] Beekes M, Baldauf E, Diring H (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77: 1925–1934
- [31] Baldauf E, Beekes M, Diring H (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* 78: 1187–1197
- [32] Biasini E, Tapella L, Mantovani S, Stravalaci M, Gobbi M, Harris DA, Chiesa R (2009). Immunopurification of pathological prion protein aggregates. *PLoS one* 4, e7816
- [33] Korth C, Streit P, Oesch B (1999). Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein. *Methods Enzymol* 309: 106–122
- [34] Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4: 1157–1165
- [35] Huang H, Rendulich J, Stevenson D, O'Rourke K, Balachandran A (2005). Evaluation of Western blotting methods using samples with or without sodium phosphotungstic acid precipitation for diagnosis of scrapie and chronic wasting disease. *Can J Vet Res* 69: 193–199
- [36] Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B (1997). Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390: 74–77
- [37] Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly

- sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358: 171–180
- [38] Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Kratzel C, Mai J, Beekes M (2004). Preclinical deposition of pathological prion protein PrP^{Sc} in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* 113: 1465–1472
- [39] Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66: 213–239
- [40] Thomzig A, Spassov S, Friedrich M, Naumann D, Beekes M (2004). Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem* 279: 33847–33854
- [41] Gray JG, Dudas S, Czub S (2011). A study on the analytical sensitivity of 6 BSE tests used by the Canadian BSE reference laboratory. *PLoS one* 6, e17633
- [42] Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Droese W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 156: 51–56
- [43] Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB (1992). Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 89: 7620–7624
- [44] Lukan A, Vranac T, Curin Serbec V (2013). TSE diagnostics: recent advances in immunoassaying prions. *Clinical & Dev Immunol* 2013, 360604
- [45] Nicholson EM (2015). Detection of the disease-associated form of the prion protein in biological samples. *Bioanalysis* 7: 253–261
- [46] Lane A, Stanley CJ, Dealler S, Wilson SM (2003). Polymeric ligands with specificity for aggregated prion proteins. *Clin Chem* 49: 1774–1775
- [47] Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, DiDoreno S, Vergara J, Ball H, Legname G, Leclerc E, Solfrosi L, Serban H, Groth D, Burton DR, Prusiner SB, Williamson RA (2002). Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20: 1147–1150
- [48] Birkmann E, Schafer O, Weinmann N, Dumpitak C, Beekes M, Jackman R, Thorne L, Riesner D (2006). Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem* 387: 95–102
- [49] Rubenstein R, Gray PC, Wehlburg CM, Wagner JS, Tisone GC (1998). Detection and discrimination of PrP^{Sc} by multi-spectral ultraviolet fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 100–106
- [50] Sobrova P, Rývolová M, Adam V, Kizek R (2012). Capillary electromigration based techniques in diagnostics of prion protein caused diseases. *Electrophoresis* 33: 3644–3652
- [51] Herbst A, McIlwain S, Schmidt JJ, Aiken JM, Page CD, Li L (2009). Prion disease diagnosis by proteomic profiling. *Journal of proteome research* 8: 1030–1036
- [52] Moore RA, Faris R, Priola SA (2015). Proteomics applications in prion biology and structure. *Expert review of proteomics* 12: 171–184
- [53] Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 40: 10937–10949
- [54] Beck J, Urnovitz HB, Groschup MH, Ziegler U, Brenig B, Schutz E (2009). Serum nucleic acids in an experimental bovine transmissible spongiform encephalopathy model. *Zoonoses and public health* 56: 384–390
- [55] Lasch P, Schmitt J, Beekes M, Udelhoven T, Eiden M, Fabian H, Petrich W, Naumann D (2003). Antemortem identification of bovine spongiform encephalopathy from serum using infrared spectroscopy. *Anal Chem* 75: 6673–6678
- [56] Schmitt J, Beekes M, Brauer A, Udelhoven T, Lasch P, Naumann D (2002). Identification of scrapie infection from blood serum by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Chem* 74: 3865–3868
- [57] Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL, Golanska E, Baldeiras I, Satoh K, Sanchez-Valle R, Ladogana A, Skinningsrud A, Hammarin AL, Mitrova E, Llorens F, Kim YS, Green A, Zerr I (2015). Validation of 14-3-3 Protein as a Marker in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnostic. *Mol Neurobiol* (Epub ahead of print)
- [58] Llorens F, Zafar S, Ansoleaga B, Shafiq M, Blanco R, Carmona M, Grau-Rivera O, Nos C, Gelpi E, Del Rio JA, Zerr I, Ferrer I (2015). Subtype and regional regulation of prion biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41: 631–645