

Fourier-Transform-Infrarot- mikrospektroskopische Charakterisierung transmissibler spongiformer Enzephalopathien

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der
Freien Universität Berlin
eingereichte Dissertation

von
Janina Kneipp
aus Jena

Berlin, Dezember 2001

Termin der Verteidigung: 28. Februar 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Naumann

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Pflüger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Literatur	1
1.1.1	Charakter und Verbreitung transmissibler spongiformer Enzephalopathien	1
1.1.2	Ätiologie transmissibler spongiformer Enzephalopathien	2
1.1.3	Histopathologie transmissibler spongiformer Enzephalopathien	4
1.1.4	Diagnostik transmissibler spongiformer Enzephalopathien	7
1.1.5	Das Scrapie-263K-Hamster-Modell	10
1.2	Problemstellung der Arbeit	11
1.3	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	12
1.3.1	Grundlagen der Infrarotspektroskopie	12
1.3.2	Prinzip der FTIR-Spektroskopie und Vergleich mit dispergierender Spektroskopie	15
1.3.3	Ortsaufgelöste FTIR-Spektroskopie	18
1.3.4	IR-Spektren biologischer Moleküle	19
1.3.5	FTIR-Spektroskopie an Zellen und Geweben	20
2	Material und Methoden	25
2.1	Probenpräparation	25
2.1.1	Präparation von Gewebedünnschnitten aus Hirnen oral infizierter Hamster	25
2.1.2	Präparation der Dünnschnitte von Spinalganglien	26
2.1.3	Präparation von hydratisierten Gewebeproben aus den Hirnen intraperitoneal infizierter Hamster	27
2.2	Vergleichende Histologie	27
2.2.1	Nissl-Färbungen	27
2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	29
2.2.3	Immunhistochemie	29
2.3	FTIR-Mikrospektroskopische Messungen an Hirngewebe	30
2.3.1	Experimenteller Aufbau	30
2.3.2	Wahl der Blendengröße am Mikroskop	31
2.3.3	Orientierung innerhalb der Probe	31
2.3.4	Ablauf und Parameter der durchgeführten Messungen	32

Inhaltsverzeichnis

2.4	IR-Mikrospektroskopie an Spinalganglien mit einer Synchrotronstrahlungsquelle	33
2.5	Messungen an hydratisierten Gewebestückchen ohne Ortsauflösung . . .	34
2.6	Auswertung der mikrospektroskopischen Messungen	34
2.6.1	Aufbereitung der Rohdaten, Ableitung, Normierung	34
2.6.2	Chemical mapping	35
2.6.3	Clusteranalyse	36
2.6.4	Kartierung auf Grundlage von Clusteranalysen	38
2.6.5	Extraktion und Sortierung von Einzelspektren auf Basis der Klassifizierungsergebnisse	38
2.6.6	Künstliche neuronale Netze	39
2.6.7	Zusammenfassung der Vorgehensweise bei der Auswertung der mikrospektroskopischen Daten des Hirngewebes	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Allgemeine Merkmale der Hirngewebsspektren	45
3.1.1	Absorptionscharakteristik	45
3.1.2	Qualität der Spektren	47
3.2	Spektrale Charakterisierung von Ebene I (Hirnnervenkerne in der Medulla oblongata)	48
3.2.1	Ergebnisse der histologischen Färbungen und <i>chemical mapping</i> der Hirnnervenkerne auf Grundlage des Proteingehalts	48
3.2.2	Klassifizierung der Spektren der Hirnnervenkerne mittels Clusteranalyse	49
3.2.3	Extraktion von Einzelspektren von DMNV/ SolN und HypN auf Basis der Klassifizierungsergebnisse	52
3.3	Spektrale Charakterisierung von Ebene II (Region der Kleinhirnkerne)	53
3.3.1	Histologische Merkmale und <i>chemical mapping</i> der untersuchten Kleinhirnregion	53
3.3.2	Klassifizierung der Spektren mittels Clusteranalyse	53
3.3.3	Auswahl und Extraktion von Einzelspektren von IntN und weißer Substanz auf Basis der Klassifizierungsergebnisse	55
3.4	Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren	56
3.4.1	Berechnung von Mittelwerten aus Einzelspektren	56
3.4.2	Der Bereich 1480–950 cm ⁻¹	56
3.4.3	Der Bereich 1800–1500 cm ⁻¹	62
3.4.4	Der Bereich 3050–2800 cm ⁻¹	63
3.5	Ergebnisse der Clusteranalysen	65
3.5.1	Clusteranalysen von Spektren jeweils einer histologischen Struktur	65
3.5.2	Clusteranalysen von Spektren aus mehreren histologischen Strukturen	66
3.6	Identifizierung von Spektren mit Hilfe künstlicher neuronaler Netze . .	69
3.6.1	Konstruktion von Datensätzen	69

3.6.2	Ergebnisse der Varianzanalysen zur Merkmalsselektion	69
3.6.3	Klassifizierung der Spektren	70
3.7	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen des Hirngewebes . .	70
3.8	Ergebnisse der Synchrotron-Messungen an Spinalganglien	71
3.9	Ergebnisse der Messungen an Gewebestückchen	75
4	Diskussion	79
4.1	Zuordnung der Spektren zu histologischen Strukturen	79
4.2	Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster	81
4.2.1	Unterschiede in Lipiden	81
4.2.2	Veränderungen an Proteinen, Detektierbarkeit von PrP ^{Sc}	83
4.2.3	Veränderungen an Phospholipiden, Kohlenhydraten und Nukle- insäuren	86
4.3	Unterscheidung von Spektren mit Mustererkennungsverfahren	88
4.4	Anmerkungen zu den vergleichenden Immunfärbungen	89
4.5	Ortsauflösung und Detektierbarkeit pathologischer Merkmale	90
4.6	Betrachtung der spektralen Änderungen im Zusammenhang mit der Pathogenese	93
4.7	Diagnostisches Potential der Methode	95
4.8	Ausblick	98
5	Zusammenfassung	99
6	Abstract	103
	Literaturverzeichnis	105
	Abkürzungen	119
	Verwendete Software	121
	Publikationsliste	123
	Danksagung	125

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1	Energieniveaus eines anharmonischen Oszillators und Morse-Potential	14
1.2	Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers	15
2.1	Coronale Schnittebenen und Verwendung der sequentiellen Schnitte	27
2.2	Ungefärbtes Ganglion-Präparat und Beispiel für einen untersuchten Ausschnitt	33
2.3	Skizze eines typischen <i>multilayer perceptrons</i>	39
3.1	Originalspektren der untersuchten anatomischen Strukturen in den Ebenen I und II mit den für Hirngewebe typischen Absorptionsbanden und Ableitungen	46
3.2	<i>Chemical map</i> von Ebene I (Übersichtskarte)	49
3.3	<i>Chemical maps</i> für die Detailmessungen in Ebene I	50
3.4	Ergebnis einer Clusteranalyse mit den Daten aus einer Detailmessung in Ebene I	50
3.5	<i>Chemical Map</i> von Ebene II (Übersichtskarte)	54
3.6	<i>Chemical maps</i> für die Detailmessungen in Ebene II	54
3.7	Ergebnis einer Clusteranalyse mit den Daten aus einer Detailmessung in Ebene II	55
3.8	Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz aus 4 Kontrolltieren und 4 kranken Tieren im terminalen Stadium (1480–950 cm ⁻¹)	57
3.9	Differenzen der in Abb. 3.8 dargestellten Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz	59
3.10	Mittelwertspektren von DMNV/SolN aus Kontrolltieren und kranken Tieren für drei Zeitpunkte nach Inokulation (terminal, 120 d. p. i., 90 d. p. i.)	61
3.11	Differenzen von Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN und IntN 120 d. p. i. und von DMNV/SolN zum Zeitpunkt 90 d. p. i. (1300–1000 cm ⁻¹)	62
3.12	Zweite Ableitungen von Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz im Bereich 1800 cm ⁻¹ –1500 cm ⁻¹ aus 4 Kontrolltieren und 4 Scrapie-infizierten Tieren im terminalen Stadium von Scrapie-263K	63

Abbildungsverzeichnis

3.13	Zweite Ableitungen der Mittelwerte aus 4 Kontrolltieren und 4 Scrapie-infizierten Tieren im terminalen Stadium ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$)	64
3.14	Ergebnisse der Clusteranalysen von Spektren verschiedener histologischer Strukturen aus Kontrollhirnen und Scrapie-infizierten Hirnen (Mittelwertspektren der Strukturen in den einzelnen Individuen)	67
3.15	Immunfärbungen mit dem Antikörper mAb3F4	72
3.16	Mit dem Antikörper 3F4 angefärbter Dünnschnitt eines Spinalganglions aus einem Hamster im terminalen Stadium von Scrapie 263K und sequentieller, für die IR-Messungen am Synchrotron verwendeter Dünnschnitt	73
3.17	Position des Maximums der Amid I-Bande als Funktion des Ortes für drei der an Ganglion-Dünnschnitten durchgeführten Messungen	73
3.18	Originalspektren ($1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) aus verschiedenen Bereichen von Zellen eines infizierten Ganglions und eines gesunden Ganglions	74
3.19	(a) Verhältnis der zweiten Ableitungen an den Positionen 1655 cm^{-1} und 1637 cm^{-1} als Funktion des Ortes für einen Datensatz aus einem infizierten Ganglion. (b) Zweite Ableitungen einzelner Spektren aus den verschiedenen Bereichen der in (a) dargestellten Ganglionzelle	74
3.20	Erste Ableitungen von Spektren hydratisierter Proben von Medullagewebe aus vier Hamstern im terminalen Stadium von Scrapie und vier Kontrolltieren	76
3.21	Ergebnisse von Clusteranalysen mit den Spektren des hydratisierten Medullagewebes von Scrapie-infizierten und Kontrollhamstern nach i. p.-Infektion.	77
4.1	Position des Maximums der Amid I-Bande für mit $10\text{ }\mu\text{m}$ Blendengröße aufgenommene Spektren eines Ganglion-Dünnschnitts und für daraus berechnete Mittelwerte über Flächen von $30\text{ }\mu\text{m}$ Kantenlänge	93

Tabellenverzeichnis

1.1	Absorptionsbanden wichtiger Biomoleküle im mittleren Infrarot	21
2.1	Probenbezeichnungen der oral infizierten Tiere	26
2.2	Probenbezeichnungen der intraperitoneal infizierten Tiere	28
3.1	Anzahl der Spektren der Detailmessungen in den Ebenen I und II für alle Hirne und Ergebnisse der Clusteranalysen zur Identifizierung der histologischen Strukturen	51
3.2	Ergebnisse der Clusteranalysen mit Spektren von scheininfizierten und Scrapie-infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation für unterschiedliche anatomische Strukturen unter Verwendung des Bereiches $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$	66
3.3	Anzahl der mit einfaktorieller Varianzanalyse ausgewählten Datenpunkte für die verschiedenen Scrapie-Stadien und anatomischen Strukturen	70
3.4	Identifizierungsgenauigkeit künstlicher neuronaler Netze für Spektren von drei anatomischen Strukturen und drei Zeitpunkten nach Inokulation	71

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Stand der Literatur

1.1.1 Charakter und Verbreitung transmissibler spongiformer Enzephalopathien

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) oder sogenannte Prionen-Krankheiten sind eine Gruppe chronischer neurodegenerativer Erkrankungen in verschiedenen Säugerarten. Sie können im Menschen sporadisch, genetisch oder infektiös bedingt sein. Im Verlauf der Krankheit, welche immer zum Tode führt, kommt es zu fortschreitenden Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Scrapie ist die älteste dokumentierte Krankheit vom TSE-Typ und wurde erstmals 1732 beschrieben (Collee und Bradley, 1997). Sie kommt bei Schafen und Ziegen weltweit mit Ausnahme von Australien und Neuseeland vor. Weitere TSE-Formen sind die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Haus- und Großkatzen, die TME (engl.: *transmissible mink encephalopathy*) beim Nerz, eine Krankheit bei nordamerikanischen Hirschen und Elchen, die sogenannte *chronic wasting disease* (CWD), sowie die Exotische Ungulaten-Enzephalopathie bei Huftieren in Zoos (Collee und Bradley, 1997). Eine der bekanntesten Krankheiten des TSE-Formenkreises ist die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind. 1986 wurde in Großbritannien der erste Fall von BSE histopathologisch bestätigt (Wells et al., 1987). In den Folgejahren kam es im Vereinigten Königreich zu einer Epidemie, welche mehr als 178000 Rinder befiel (*Department for Environment, Food and Rural Affairs* (UK), Stand Nov. 2001; Scott et al., 1999). Der BSE-Erreger löste in Experimenten auf oralem Wege Enzephalopathien bei Kühen, Schafen, Ziegen und Nerzen (Diringer, 1995; Collee und Bradley, 1997), Mäusen (Fraser et al., 1992; Jeffrey et al., 1992b; Bruce et al., 1994) und nicht-humanen Primaten (Bons et al., 1999) aus. Die Ergebnisse einer Reihe von Experimenten sprechen dafür, daß der Erreger der BSE auf den Menschen übertragen wurde. Hierzu zählt z. B. die erfolgreiche Übertragung von BSE auf Makaken (Lasmézas et al., 1996), welche im Gehirn histopathologische Veränderungen, die denen der seit 1996 bekannten Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) beim Menschen (Will et al., 1996) ähneln, hervorrief. Collinge et al. zeigten 1996, daß das Glykosylierungsmuster des krankheitsspezifischen Prion-Proteins (PrP^{Sc}) bei vCJD mit dem von BSE-Proben, jedoch nicht mit dem der klassischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921), einer genetisch, sporadisch oder iatrogen bedingten TSE

1 Einleitung

beim Menschen, übereinstimmt (Collinge et al., 1996). Weiterhin spricht der Vergleich von Läsionsprofilen, neuropathologischen Veränderungen und PrP-Isoformen bei verschiedenen Übertragungsexperimenten von BSE, vCJD und CJD auf definierte Maus-Modelle dafür, daß BSE und vCJD vom gleichen TSE-Erreger verursacht werden und damit indirekt für eine Übertragung von BSE auf den Menschen (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997; Scott et al., 1999). Für die Übertragung von Scrapie auf den Menschen gibt es bisher keine epidemiologischen Hinweise. Die durch in vitro durchgeführte Übertragbarkeitsversuche entstandene Vermutung, daß eine Übertragbarkeit von BSE auf den Menschen ähnlich niedrig sei wie die von Scrapie (Raymond et al., 1997) wurde nicht bestätigt. 111 Menschen in Großbritannien, vier in Frankreich und einer Irland sind seit 1995 an vCJD erkrankt (*Department of Health* (UK), Stand Nov. 2001; *Institut de Veille Sanitaire* (Frankreich), Stand Nov. 2001; WHO, Stand Juni 2001). Die Inzidenz der „klassischen“ CJD-Erkrankungen beträgt 1-2 Fälle pro 10^6 Menschen pro Jahr, wobei über 80% der Fälle spontan auftreten (Collee und Bradley, 1997). 12-15% der Erkrankungen sind genetisch bedingt und beinhalten das sogenannte Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) (Brown et al., 1987; Gambetti et al., 1995; Silvestrini et al., 1997). Iatrogene Übertragungen von CJD durch Dura mater- oder Hornhauttransplantationen (Harvey und Coyle, 1992), Verwendung von infektiösen neuro/chirurgischen Instrumenten (Brown et al., 1990; Zobeley et al., 1999) oder aus menschlichen Hypophysen gewonnenem Wachstumshormon können ebenfalls stattfinden. Eine weitere beim Menschen vorkommende TSE ist Kuru. Diese Krankheit kommt nur im Stamm der Fore auf Papua-Neuguinea vor und wurde durch endokannibalistische Trauerriten übertragen. Kuru konnte mittlerweile komplett eingedämmt werden (Gajdusek, 1977).

1.1.2 Ätiologie transmissibler spongiformer Enzephalopathien

Die möglichen Ursachen der sporadischen CJD-Erkrankungen, die über 80% aller CJD-Fälle ausmachen, sowie der Ursprung der natürlichen Scrapie beim Schaf sind weitgehend ungeklärt. Unter Umständen wirken bestimmte Umwelteinflüsse (z. B. bestimmte anorganische Substanzen oder eine veränderte Umgebung im Gehirn aufgrund von Alterungsprozessen) als Auslöser für somatische Mutationen oder für die spontane Fehlfaltung des Proteins PrP (s. u.). Im Zusammenhang mit vererbbaaren TSE beim Menschen sind mehrere Mutationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 bekannt (Huang et al., 1996). Bei mehreren infektiösen TSE des Menschen wird vermutet, daß genetische Prädisposition eine Voraussetzung für die Infizierbarkeit sein könnte. So waren z. B. alle bisher an vCJD erkrankten Menschen homozygot für ein Allel des *PRNP*-Gens (humanes Prion-Protein-Gen), welches im Codon 129 die Aminosäure Methionin kodiert (Will et al., 1996). Ähnliche Beobachtungen wurden für Scrapie beim Schaf gemacht, wo ein Auftreten bestimmter prp-Allele und die Anfälligkeit für Scrapie zum Teil an bestimmte Züchtungen gekoppelt ist (Dickinson et al., 1974). Bei der Übertragung von TSE auf eine andere Art verlängert sich meist die Zeit

bis zum Auftreten klinischer Symptome, oder die Krankheit bricht nicht aus (Bruce et al., 1994; Hill et al., 2000). Die Ursache für die Verlängerung der Inkubationszeit wird in der sog. „Speziesbarriere“ vermutet (Prusiner, 1997).

Die Tatsache, daß TSE durch Infektion verursacht werden können, und daß auch sporadisch oder genetisch bedingte TSE infektiös sind, wirft die Frage nach der Natur des Erregers dieser Krankheiten auf. Hierzu gibt es mehrere Hypothesen.

Die Prionen-Theorie geht von der Infektiösität des pathologischen Proteinmoleküls PrP^{Sc}, das sich im Krankheitsverlauf ansammelt, aus. Dieses ist das einzige Molekül, das in jeder infektiösen Präparation gefunden wird (Prusiner, 1982). Man nimmt an, daß es der hauptsächliche, wahrscheinlich der einzige Bestandteil des übertragbaren Agens, welches Prion (engl.: *proteinaceous infectious particle*) genannt wird, ist (Prusiner, 1982; McKinley et al., 1983; Weissmann, 1991). PrP^{Sc} entsteht durch ein post-translationales Ereignis, bei dem Konformationsänderungen der normalen, zellulären Isoform PrP^C beteiligt sind (DeBurman et al., 1997). PrP^C ist ein Sialoglykoprotein, welches normalerweise an der Oberfläche von Neuronen und in geringerem Maße auch in anderen Zelltypen exprimiert ist. Es wurde in allen bisher untersuchten Säuger-Genomen gefunden. Die beiden PrP-Isoformen unterscheiden sich stark in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften. PrP^C ist im Gegensatz zu PrP^{Sc} in milden Detergenzien löslich und läßt sich mittels Proteinase K (PK) komplett verdauen. PrP^{Sc} verhält sich gegenüber einem solchen Verdau partiell resistent und wird nur bis auf einen PK-resistenten Kern, aufgrund seines Molekulargewichtes PrP27-30 genannt, abgebaut. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, daß PrP^C hauptsächlich aus α -helikalen und ungeordneten Strukturen besteht, während PrP^{Sc} einen viel höheren β -Faltblatt-Anteil besitzt (Caughey et al., 1991; Hornemann et al., 1997; Pan et al., 1993; Baldwin et al., 1994). Experimente, in denen gezeigt wurde, daß man mit einem großen Überschuß an PrP^{Sc} Protease-resistentes PrP Tierart- (Kocisko et al., 1995) und Erregerstamm-spezifisch (Bessen et al., 1995) in vitro erzeugen kann (Kocisko et al., 1994; Horiuchi und Caughey, 1999), waren wichtige Argumente für die Prionen-Theorie. Ein Nachweis von Infektiösität des in vitro erzeugten PrP^{Sc} im Tierversuch steht noch aus und würde zur Klärung der Frage beitragen, ob tatsächlich nur das Proteinmolekül infektiöses Agens ist. Probleme bei einem solchen Experiment bereitet jedoch der Überschuß an PrP^{Sc}, der zugegeben werden muß, um vergleichsweise wenige PrP^C-Moleküle umzufalten (Hill et al., 1999a; Eigen, 1996). Eine Möglichkeit, Faltung induzierendes von in vitro umgefaltetem Prion zu unterscheiden und nur die Infektiösität des in vitro erzeugten PrP^{Sc} im Tierversuch zu messen, besteht in der Verwendung von Mäusen, denen ein Teil ihres *Prnp*-Gens durch die korrespondierende Sequenz aus dem Hamster-*Prnp*-Gen ersetzt wurde, und die im Gegensatz zu normalen Mäusen gegenüber Hamster-Scrapie empfindlich sind. Das von ihnen exprimierte chimäre PrP^C konnte in vitro durch Hamster-PrP^{Sc} in chimäres PrP^{Sc} umgefaltet werden (Hill et al., 1999a). Mit diesem Produkt wurden normale Mäuse infiziert, so daß eine Erkrankung an TSE, die im Experiment jedoch nicht hervorgerufen wurde, nicht durch das zur Fehlfaltungsinduktion verwendete Hamster-PrP^{Sc}, sondern nur durch das in vitro erzeugte, chimäre (Hamster-Maus)-PrP^{Sc} verursacht worden wäre (Hill et al., 1999a). Aus dem negativen Ergebnis dieses Versuches läßt

1 Einleitung

sich schlußfolgern, daß für den Erwerb von Infektiösität nicht nur PK-resistentes PrP, sondern zusätzliche, noch unbekannte Kofaktoren notwendig sind (Wadsworth et al., 1999). Die Verbreitung und Erhaltung von unterschiedlichen Erregerstämmen über mehrere Generationen in Inzucht-Mäusen, welche alle homozygot für ein spezifisches PrP-Allel sind, bedeutet, daß die Information über den Erregerstamm nicht in der PrP-Primärstruktur kodiert ist (Wadsworth et al., 1999). Mittlerweile wurde gezeigt, daß unterschiedliche Erregerstämmen mit verschiedenen Glykosylierungsmustern (Collinge et al., 1996) und PrP-Konformationen (Safar et al., 1998) einhergehen.

Im Gegensatz zur Prionen-Hypothese besteht die Virus-Hypothese auf der Notwendigkeit der Existenz einer viralen Nukleinsäure im TSE-Erreger (Diringer, 1991; Manuelidis et al., 1995; Narang, 1996). Da die Erklärung der Existenz von Erregerstämmen mittels der Prionen-Theorie nicht ohne Schwierigkeiten möglich ist, und weil in einigen Experimenten eine Entkopplung von Infektiösität und PrP^{Sc} gezeigt wurde (Huang et al., 1996; Lasmézas et al., 1997; Hill et al., 1999a), gehen die Vertreter dieser Hypothese davon aus, daß PrP^{Sc} nicht essentiell für die Scrapie-Replikation ist, sondern daß vielmehr eine kleine Nukleinsäure obligatorisch dafür sein muß. Hierbei könnte PrP^C als Rezeptor für das Virus dienen und anschließend seine Konformation zu PrP^{Sc} ändern. Seine dadurch veränderte Rezeptorspezifität könnte eine weitere Infektion erleichtern. Mit der Hypothese könnten ebenso wie mit der Prionen-Hypothese die sporadischen und genetischen TSE erklärt werden. Der Nachweis der erregerspezifischen Nukleinsäure, deren Größe auf maximal 1,5 kb geschätzt wird, steht jedoch noch aus (Diringer et al., 1998a). Die sogenannte Virino-Hypothese nimmt eine sehr kleine, nicht-kodierende, wirtsfremde Nukleinsäure als Scrapie-spezifisches Genom an. Diese ist von einem wirtseigenen Protein, z. B. dem aggregierten Prion-Protein, umhüllt (Dickinson und Outram, 1979).

Eine Kombination von Ansätzen der Prionen- und der Virus-Hypothese wurde von Weissmann vorgeschlagen (Weissmann, 1991). Seine sogenannte *unified hypothesis* schlägt vor, daß das infektiöse Agens, das Holoprion, aus dem pathogenen Apoprion (=PrP^{Sc}) und dem Coprion (einer Nukleinsäure), welches die Stammspezifität ausmacht, besteht (Weissmann, 1991). Durch komplette Zerstörung oder Austausch der Nukleinsäure müßte sich dann die Stammspezifität aufheben oder verändern lassen.

1.1.3 Histopathologie transmissibler spongiformer Enzephalopathien

1.1.3.1 PrP-Ablagerungen

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, besitzt das Protein PrP zwei Isoformen, eine normale, zelluläre Form (genannt PrP^C) und eine post-translational veränderte, gegenüber Proteinase K partiell resistente Form (PrP^{Sc}), welche sich während des Krankheitsprozesses im ZNS und in peripheren Nerven ansammelt. Die Akkumulation von PrP^{Sc} beginnt bereits in sehr frühen Krankheitsstadien und vor dem Auftreten der unten beschriebenen weiteren histopathologischen Veränderungen (Diedrich et al., 1991a). Das Protein bildet zunächst kleinere diffuse, mikrodisperse und in einigen TSE

später im Krankheitsprozeß auch größere, z.T. plaqueförmige, amyloide Ablagerungen in und um Neuronen. Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, daß PrP^{Sc} am Plasmalemma von Perikaryen und Dendriten einzelner neuronaler Zellen und spezifischer Gruppen Scrapie-infizierter Neuronen produziert wird und von dort in den extrazellulären Raum des umgebenden Neuropil diffundiert (Jeffrey et al., 1994). Die Aggregation von PrP kann nahe der Zelloberfläche auftreten, wenn eine ausreichende Konzentration im extrazellulären Raum erreicht ist (Jeffrey et al., 1994). Andere Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Umfaltungsprozeß von PrP in cytoplasmatischen Vesikeln stattfindet (Weissmann, 1991). PrP^{Sc} aggregiert und bildet sogenannte Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) (Diringer et al., 1983; Jeffrey et al., 1995), welche in der Literatur häufig auch als *prion rods* bezeichnet werden (Prusiner et al., 1983). Das Ausmaß und die Größe der PrP-Ablagerungen unterscheiden sich in den verschiedenen TSE, d. h. bei unterschiedlichen Kombinationen von Erregerstamm, Wirtsspezies und PrP-Genotyp. Die Abwesenheit von Amyloidplaques in einigen TSE beim Menschen und bei Tieren und ihr relativ spätes Auftreten im Krankheitsprozeß bei einigen experimentellen Formen lassen vermuten, daß Amyloid nicht der Auslöser für die entstehenden neuropathologischen Schäden ist (Ceroni et al., 1995), sondern daß bereits PrP^{Sc}-Moleküle und kleinere Aggregate dafür hinreichend sein könnten. In einem Modell von Scrapie in der Maus konnte PrP^{Sc} auch an Astrozyten detektiert werden, bevor es an Neuronen beobachtet wurde (Diedrich et al., 1991a). Diese Beobachtung wurde in anderen Experimenten nicht bestätigt und scheint von der TSE und vom Tiermodell abhängig zu sein (P. A. McBride, persönliche Auskunft). Immunhistochemische Ultrastrukturuntersuchungen zeigten außerdem, daß PrP^{Sc}-Ablagerungen in Gliazellen in den Lysosomen vorliegen, was eher eine Abbaufunktion dieser Zellen für anormales bzw. überschüssiges PrP^{Sc} vermuten läßt (Jeffrey et al., 1995).

1.1.3.2 Astrozytose

Wie bei vielen anderen neurodegenerativen Krankheiten sind Hypertrophie und vermehrte Proliferation von Astrozyten auch ein Merkmal transmissibler spongiformer Enzephalopathien. Astrozytose tritt z.T. sehr früh im Krankheitsverlauf (Eklund et al., 1963; Williams et al., 1994) und vermehrt in Gebieten starker Vakuolisierung und PrP^{Sc}-Ablagerungen auf (Williams et al., 1994). Die Astrozyten proliferieren u. a. in den durch Neuronenverlust entstehenden Freiräumen im Parenchym. Trotzdem ist Astrozytose häufig bereits vor dem Auftreten detektierbarer Neurodegeneration feststellbar (Williams et al., 1994; Diedrich et al., 1991b). In der grauen Substanz des Rückenmarks, im Hirnstamm, Diencephalon und Hippocampus, aber auch in der weißen Substanz der Hirnhemisphären und im Corpus callosum wurden vergrößerte Astrozyten beobachtet (Eklund et al., 1963). In den Astrozyten kommt es zur Hypertrophie der Zellfortsätze. Diese enthalten Filamente spezifischer Proteine, wie z. B. GFAP (glial fibrillar acidic protein) und Vimentin, welche bio- und immunhistochemisch nachgewiesen wurden. Es sind auch verschiedene andere Proteine, unter ihnen Apolipoprotein E und Cathepsin D, aktiviert (Diedrich et al., 1991b). Außerdem häufen sich Glykogeneinschlüsse.

1.1.3.3 Vakuolisierung und Mikrogliose

Bei allen Krankheiten vom TSE-Typ sind ähnliche histopathologische Veränderungen im Gehirn beobachtbar. Hierzu zählt eine Vakuolisierung in der grauen (Wells et al., 1987), häufig auch in der weißen Substanz (Eklund et al., 1963; Jeffrey et al., 1992b) unterschiedlicher Hirnregionen (Jeffrey et al., 1991), welche zum charakteristischen spongiformen Erscheinungsbild der TSE führt. Ausmaß und Verteilung dieser Läsionen in den unterschiedlichen Hirnregionen werden als Läsionsprofil bezeichnet und hängen hauptsächlich vom Stamm des Erregers und, z. B. bei Mäusen, vom murinen Tierstamm und PrP-Genotyp ab (Fraser und Dickinson, 1968). Bei Tieren ist in manchen TSE Vakuolisierung fast nicht beobachtbar, während in menschlichen TSE-Formen das Ausmaß an Vakuolisierung den sogenannten status spongiosis, der das gesamte Hirnparenchym durchsetzt, erreichen kann (Jeffrey et al., 1995). Im Zusammenhang mit der zunehmenden Vakuolisierung kann es zur neuronalen Autophagie, d. h. zum Selbstverdau von Cytoplasma kommen (Jeffrey et al., 1992b, 1995). Während des Krankheitsverlaufes sind jedoch fortschreitender Neuronenverlust und fortschreitende Vakuolenbildung nicht unmittelbar aneinander gebunden. Bei Scrapie ist Vakuolisierung schon von frühen Krankheitsstadien an beobachtbar (Jeffrey et al., 1991, 1995). Der Vorgang ist jedoch kein eindeutiges Merkmal für TSE, sondern vielmehr ein allgemeines Merkmal für Degeneration, hervorgerufen durch krankheits- oder seneszenzbedingt erhöhte Abbauaktivitäten im endosomalen bzw. lysosomalen System der Zellen im Gehirn (Jeffrey et al., 1991). Insbesondere im frühen Krankheitsstadium einer TSE ist die Unterscheidung zwischen „regulären“, in gesunden Kontrolltieren beobachteten Vakuolen, Fixierungsartefakten und tatsächlichen Scrapie-bedingten Vakuolen schwierig (Liberski et al., 1989). Es wurde beobachtet, daß „pathologische“ Vakuolen sich von Vakuolen in Kontrolltieren meistens durch das Vorhandensein einer einfachen oder doppelten Membran und membranösen bzw. granulären Inhalt unterscheiden (Jeffrey et al., 1991). Sie wurden in Dendriten, Axonen und deren Endigungen und in neuronalen Perikaryen beobachtet (Jeffrey et al., 1995). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben den Ursprung einiger Vakuolen in Mitochondrien und im glatten endoplasmatischen Retikulum gezeigt (Jeffrey et al., 1991, 1995). Myelin-assoziierte Vakuolen liegen direkt im Myelin im Zytoplasma der Oligodendrozyten (Jeffrey et al., 1991), wo sie eine Abschwächung der Schwann'schen Scheiden zur Folge haben (Eklund et al., 1963; Liberski et al., 1989).

Im Zusammenhang mit dem Auftreten von Vakuolisierung ist meist ein Zuwachs an Mikroglia beobachtbar. Eine Aktivierung der Mikroglia verläuft zeitlich parallel zur Ablagerung von PrP^{Sc} und geht häufig dem Neuronensterben (s. u.) voraus (Giese et al., 1998). Verschiedene Befunde deuten darauf hin, daß die Mikroglia dafür verantwortlich ist, daß PrP^{Sc} oder ein Konversionsintermediat neurotoxisch wirken können (Giese et al., 1998). Die Zellen der Mikroglia gelten als im Gewebe angestammte Makrophagen im Zentralnervensystem. Eine Vermehrung der Mikrogliazellen könnte daher als lokale, modifizierte Entzündungsreaktion gewertet werden (Jeffrey et al., 1995). Diese Hypothese wird vor allem durch die beobachtete Hochregulierung von Leukozytenantigenen mit Funktionen in Phagozytose, Leukozytenaktivie-

rung und Antigenpräsentation gestützt (Williams et al., 1994). Ansonsten sind bei Scrapie-Infektionen keine deutlichen Immunantworten zu beobachten (Eklund et al., 1963).

1.1.3.4 Neuronenverlust

Zu den histologischen Merkmalen von TSE zählt neben der Vakuolisierung im Neuropil und in den neuronalen Perikaryen ein fortschreitender Neuronenverlust. Dieser wurde zwar für natürliche Scrapie bisher nicht beschrieben, jedoch für experimentelle Formen von Scrapie in der Maus und für BSE (Jeffrey et al., 1995; Giese et al., 1995). Es ist wahrscheinlich, daß Zelltod durch Autophagie einen nicht unbeträchtlichen Anteil am Neuronenverlust in TSEs ausmacht. Von Mitochondrien ausgehende Vakuolisierungsvorgänge (Choi et al., 1998) deuten auf nekrotische Vorgänge während des Zelltods in TSE hin (Eklund et al., 1963; Park et al., 2000). Die Mechanismen des Neuronensterbens sind jedoch wahrscheinlich sowohl Apoptose als auch sekundäre Nekrose (Park et al., 2000). So sind z. B. einige für Apoptose verantwortliche spezifische Proteine differentiell exprimiert (Park et al., 2000). Es lassen sich außerdem Apoptosemerkmale wie schrumpfendes Zellvolumen, kondensierte Zellkerne und Apoptosekörper (Giese et al., 1995; Lucassen et al., 1995), sowie DNA-Fragmentierung (Fairbairn et al., 1994; Giese et al., 1995; Lucassen et al., 1995) beobachten. Apoptose scheint als Mechanismus sehr wahrscheinlich, wenn man zudem die bei TSE fehlende Immunantwort (Giese et al., 1995) und die spezifische Bindung von PrP an Bcl-2, ein Protein, welches durch Bindung an das Protein Bax normalerweise Zelltod verhindert (Kurschner und Morgan, 1995), in Betracht zieht.

Die Reihenfolge der pathologischen Ereignisse, die bei TSE zur Apoptose führen, ist nicht genau geklärt. PrP^{Sc}-Ablagerungen und Aktivierung der Mikroglia gehen der Apoptose-typischen DNA-Fragmentierung und noch später erfolgender Vakuolisierung voraus. Dies deutet darauf hin, daß Aktivierung von Mikroglia nicht direkt zum Neuronenverlust führt (Giese et al., 1998; Williams et al., 1997).

1.1.4 Diagnostik transmissibler spongiformer Enzephalopathien

1.1.4.1 Klinische Symptome

Die klinischen Symptome der verschiedenen TSE ähneln sich stark und treten aufgrund massiver Schädigungen des Gewebes von Hirnstamm, Kleinhirn und gesamtem Cortex auf. Im Fall von Scrapie beim Schaf äußern sie sich in einer Störung der Koordination der Bewegungsabläufe (Ataxie) und in inkompletter Lähmung der vier Extremitäten (Tetraparese). Die erkrankten Schafe leiden außerdem unter ruckartigen Zuckungen einzelner Muskeln (Myoklonien) sowie dem für die Namensgebung ausschlaggebenden Juckreiz. Die Symptome in den verschiedenen Tiermodellen steigern sich im Krankheitsverlauf von Hypersensitivität gegenüber Lärm, Schreckhaftigkeit und anderen Verhaltensänderungen und plötzlichen Bewegungen bis zur kompletten Ataxie und

1 Einleitung

Unfähigkeit zur Futtermittelaufnahme (Kimberlin und Walker, 1977). Auf Rinder übertragene Scrapie liefert neben Lethargie und Appetitlosigkeit ähnliche klinische Symptome wie BSE (Cutlip et al., 1994), allerdings fehlen die z.T. für BSE beschriebene Aggressivität, Übererregbarkeit bei akustischen Reizen oder Berührung und Hypermetrie von Extremitäten (Wells et al., 1987). Als an CJD erkrankt gilt ein Patient mit progressiver Demenz und typischen Veränderungen im EEG, der zudem an mindestens zwei der folgenden Symptome leidet: Myoklonien, visuellen oder cerebellären Störungen, pyramidalen und/oder extrapyramidalen Störungen und akinetischem Mutismus (Otto et al., 1998b). Die Diagnose von vCJD im lebenden Patienten bereitet größere Schwierigkeiten als die von sporadischer CJD (Hill et al., 1999b). Veränderungen im EEG, bei denen man allerdings nicht das für CJD typische Muster findet, sind auch bei vCJD zu beobachten. Neben dem klinischen Bild sind für eine sichere Diagnose der Krankheit jedoch der positive Nachweis von PrP^{Sc} und die Neuropathologie im Hirn ausschlaggebend.

1.1.4.2 Detektion von PrP^{Sc}

Die Detektion von PrP^{Sc} stellt bis jetzt den einzigen eindeutigen biochemischen Nachweis von TSE dar. PrP^{Sc} ist in den Geweben des lymphoretikulären Systems und des Nervensystems nachweisbar. Die Diagnose von Scrapie im lebenden Tier ist möglich, da hier PrP^{Sc} im lymphatischen Gewebe des dritten Augenlids bei Schafen und in den Tonsillen nachgewiesen werden kann. vCJD ist im Gegensatz zu CJD und anderen Prionen-Erkrankungen und neurodegenerativen Krankheiten ebenfalls durch Akkumulation von PrP^{Sc} in den Tonsillen gekennzeichnet, so daß die Tonsillenbiopsie einen möglichen diagnostischen Test von vCJD darstellt (Hill et al., 1999b). Da die Untersuchung von Nervengewebe zu Lebzeiten (z. B. durch Hirnbiopsie) eine Methode ist, von der in den häufigsten Fällen aus verschiedenen Gründen –nicht zuletzt ethischen– abgesehen wird, ist eine definitive Diagnose aller anderen TSE meist nur post mortem möglich.

Die Nachweismethoden für die pathologische Form des Prion-Proteins sind vielfältig. Fibrillen oder amorphe Aggregate von PrP lassen sich in biochemischen Extrakten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erkennen (Diringer et al., 1983; Meyer et al., 1986; Jeffrey et al., 1995). Methoden der Lichtmikroskopie zeigen die Ergebnisse unterschiedlicher histologischer Verfahren. Nach Färbung mit Kongorot erscheinen Amyloidablagerungen im Gewebe doppelbrechend. Zudem sind Anfärbungen mittels Immunhistochemie möglich. Diese macht auch kleinere PrP^{Sc}-Aggregate detektierbar. Durch die unterschiedlichen Ablagerungsmuster von PrP^{Sc} können grundsätzlich verschiedene Erregerstämme voneinander unterschieden werden. Bisher existiert ein monoklonaler Antikörper, 15B3, welcher an ein konformatives Epitop des PrP^{Sc}-Moleküls aus Kühen, Mäusen und Menschen bindet, das erst durch die Fehlfaltung und/oder Aggregation des Proteins entsteht (Korth et al., 1997). Alle anderen Antikörper präzipitieren sowohl mit PrP^{Sc} als auch mit PrP^C und werden für den immunhistochemischen Nachweis von PrP^{Sc}-Aggregaten verwendet, welche nach einer Anfärbung von Paraffin- oder Gefrierschnitten vor einem schwachen PrP^C-Hintergrund erscheinen.

Die Untersuchung von Gewebeschnitten kann auch in Form eines sogenannten Histoblots erfolgen, bei dem ein Gefrierschnitt auf eine Blotmembran aufgebracht wird. Auf der Membran wird dann ein limitierter Verdau durch Proteinase K durchgeführt, nach welchem anschließend über einen Antikörper PrP^{Sc} in seiner räumlichen Verteilung im Gewebe detektiert werden kann (Taraboulos et al., 1992). Durch Verwendung Paraffin-eingebetteter Gewebeschnitte konnte mit dem sogenannten PET-Blot auch die Darstellung von PrP^{Sc}/PrP27–30 nach PK-Verdau unter Erhaltung mit anatomischer Details, welche im unfixierten Gewebe beim Histoblot zumeist verlorengehen, erzielt werden (Schultz-Schaeffer et al., 2000). Die Kombination von sehr guter räumlicher Auflösung der Paraffinschnitte und Sensitivität eines Western Blots führt dazu, daß PrP^{Sc} sehr früh im Krankheitsverlauf und (durch den Proteinase-K-Verdau) hochspezifisch detektiert werden kann.

Neben der Detektion des Markers PrP^{Sc} in Gewebeschnitten mit histologischen Methoden werden biochemische Nachweismethoden angewendet. Die Aufreinigung des Proteins aus Gewebe mit anschließendem Immunoblot (Meyer et al., 1986; Beekes et al., 1995), wobei die Detektion des primären Antikörpers mit Nachweissystemen unterschiedlicher Sensitivitäten erfolgen kann, hat, wie bereits für den Histoblot geschildert, den Vorteil, daß PrP^{Sc} durch vorgeschalteten Proteinase-K-Verdau eindeutig nachgewiesen wird. Auch der kommerziell von der Schweizer Firma Prionics eingesetzte BSE-Test funktioniert nach diesem Prinzip. Die Detektion von PrP^{Sc} im dot-blot-Immunoassay (Serban et al., 1990) und in rohen Gewebeextrakten mit Hilfe von ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Grathwohl et al., 1997), welche in anderen kommerziellen Tests angewendet wird, sind ebenfalls möglich.

PrP^{Sc} ist in einigen Fällen von CJD in kleinen Mengen auch im Liquor cerebrospinalis enthalten, wo seine Aggregate mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) mit hoher Spezifität detektiert wurden (Bieschke et al., 2000). Da die Detektion einzelner Aggregate mit FCS an sich eine extrem empfindliche Methode ist, wirft eine Sensitivität von 21% jedoch die Frage auf, ob PrP^{Sc} immer im Liquor von CJD-Patienten zu finden ist.

1.1.4.3 Andere diagnostische Verfahren

Liquor kann neben dem Nachweis von PrP^{Sc} bei CJD-Patienten auch mittels Nachweis anderer allerdings unspezifischer Markermoleküle zur Diagnostik von TSE verwendet werden. So sind z. B. Neuronen-spezifische Enolase (Zerr et al., 1995), ein von Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiertes Protein, und tau (Otto et al., 1997), das auch bei Alzheimer erhöht im Liquor vorliegt, bei CJD in erhöhter Konzentration nachweisbar. Das Protein 14-3-3, welches vermutlich bei massiven degenerativen Prozessen wie z. B. Hirninfarkten und Infektionen mit Neuronenverlust, nicht jedoch bei Alzheimer-Krankheit im ZNS freigesetzt wird, kann bereits vor Eintreten der klinischen Symptome von CJD im Liquor gemessen werden (Hsich et al., 1996). Für die Diagnosesicherung in der langsamer fortschreitenden vCJD ist es jedoch zu unspezifisch (Hill et al., 1999b). S-100, ein Markerprotein für aktivierte Astroglia wurde im Liquor und auch im Serum von CJD-Patienten und in Scrapie-infizierten Ham-

1 Einleitung

stern nachgewiesen und kann unterstützend zur Diagnose herangezogen werden (Otto et al., 1998b,a). Studien in Scrapie-infizierten Hamstern haben jedoch gezeigt, daß die erhöhten S-100-Serumspiegel auf die symptomatische Krankheitsphase beschränkt sind (Beekes et al., 1999).

TSE sind überdies durch einen Infektiösitätsnachweis identifizierbar. Ruft Nervengewebe eines Tieres, wenn es homogenisiert Versuchstieren durch Injektion oder Fütterung verabreicht wird, in den Versuchstieren eine TSE hervor, so kann davon ausgegangen werden, daß das Tier, von dem das Gewebe stammte, an einer TSE erkrankt war. Dies trifft insbesondere auf Verimpfung bzw. Verfütterung an dieselbe Tierart zu. Bei der Verwendung von Testtieren einer anderen als der zu untersuchenden Art bedeutet das Fehlen klinischer Symptome allerdings nicht zwangsläufig einen negativen TSE-Befund, da hier ein subklinischer Verlauf der Krankheit möglich ist (Hill et al., 2000).

1.1.5 Das Scrapie-263K-Hamster-Modell

Der Scrapie-Erreger wurde in einigen Experimenten auf Zellkulturen übertragen (Rubenstein et al., 1994; Daude et al., 1997) konnte jedoch in keinem System bisher effektiv kultiviert werden (Collee und Bradley, 1997). Er ist experimentell vom Schaf auf Schafe (Collis und Kimberlin, 1983), Ziegen, Mäuse (Eklund et al., 1963; Fraser und Dickinson, 1968), Hamster und Ratten (Kimberlin und Walker, 1977) sowie eine Vielzahl anderer Arten wie z. B. auch Rinder (Gibbs et al., 1990; Cutlip et al., 1994; Collee und Bradley, 1997) übertragbar. Insbesondere die Adaption von Scrapie als TSE-Archetyp auf Nager stellt aufgrund des relativ schnellen Krankheitsverlaufes im Vergleich zum Zeitverlauf bei Schafen und Ziegen ein günstiges System für Modellstudien zu molekularen Krankheitsursachen, Übertragungswegen und Pathogenese dar. Der Tierversuch ist zudem bisher die einzige Möglichkeit, den Erreger nachzuweisen und seine Infektiösität auszutitrieren (Prusiner, 1982).

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell ist der mit dem Scrapie-Stamm 263K infizierte Syrische Hamster (*Mesocricetus auratus*). Scrapie 263K ist neben Sc237 und 139H (DeArmond et al., 1992) einer der drei wichtigsten auf den Hamster adaptierten Scrapie-Stämme. Die Zeit bis zum Auftreten klinischer Symptome beträgt ungefähr die Hälfte derjenigen Scrapie-Maus-Modellen, und der Infektiösitätstiter in den Hirnen infizierter Tiere im klinischen Stadium ist mit $1-3 \times 10^9$ LD₅₀ pro Gramm Hirngewebe beträchtlich höher (Kimberlin und Walker, 1977; Diringer et al., 1998b).

Die Hamster werden mit einem Homogenat des Hirngewebes aus terminal Scrapiekranken Tieren infiziert. Die Infektion kann intraperitoneal (i. p.), intracerebral (i. c.), intraokular (i. o.) oder oral (durch Fütterung des Homogenates) erfolgen. Die verschiedenen Infektionswege unterscheiden sich stark in den Inkubationszeiten. Die Inkubationszeit ist i. c. mit 50-60 Tagen am kürzesten (Kimberlin und Walker, 1986). Sie hängt u. a. vom Geschlecht der Hamster und der Infektionsdosis ab (Kimberlin und Walker, 1977). In i. p. infizierten Tieren verlängert sich bei gleicher Dosis die Zeit bis zum Auftreten klinischer Symptome um ca. 40 Tage (Czub et al., 1988). Die Dauer der Replikation des Erregers im Gehirn ist nach i. p.-Infektion jedoch kürzer (51-58 Ta-

ge) als nach i. c.-Infektion (81–88 Tage) (Kimberlin und Walker, 1986). Eine Infektion über den oralen Weg ist weniger effektiv als eine Infektion i. c. (Faktor 10^5) (Diringer et al., 1994, 1998b).

Bei Infektion mit 263K über den oralen Weg mit 10 mg Hirnhomogenat kann ca. 90 Tage nach der Infektion (d. p. i.) Infektiösität im Halsbereich des Rückenmarks und im Gehirn festgestellt werden (Beekes et al., 1996). Eng damit korreliert ist das Auftreten des TSE-spezifischen Amyloid-Proteins (PrP^{Sc}), welches mittels Immunhistochemie zunächst im Nucleus dorsalis nervi vagi (DMNV) nachweisbar und kurz danach im Nucleus solitarius (SolN) und im den Zentralkanal auskleidenden Ependym zu finden ist (Beekes et al., 1998). Innerhalb des Gehirns erfolgt eine Ausweitung der befallenen Gebiete in rostraler Richtung. Ungefähr 120 d. p. i. kann man PrP^{Sc} in den meisten Kerngebieten der Medulla oblongata, im Nucleus fastigii und Nucleus interpositus des Kleinhirns, im Thalamus und Hypothalamus sowie an einigen Stellen im parietalen, cingulaten und frontalen Cortex nachweisen (Beekes et al., 1998). 150–160 Tage nach der oralen Infektion ist ein klinisches Krankheitsstadium erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist PrP^{Sc} mit Ausnahme der Riechkolben fast überall im Gehirn auffindbar. Infektiösität und PrP^{Sc} besitzen eine Verdopplungsrate von 2 bzw. 2,6 Tagen in Gehirn und cervicalem Rückenmark (Beekes et al., 1996). Im Rückenmark ist PrP^{Sc} ca. 90 d. p. i. zwischen den thorakalen Wirbeln T4 und T9 im Western Blot und immunhistochemisch (Beekes et al., 1996, 1998; Baldauf et al., 1997) nachweisbar. Von dort aus breitet es sich dann sowohl cranial bis in den Cervicalbereich als auch caudal in die Thoraxsegmente der Medulla aus (Beekes et al., 1998). Das frühzeitige Auftreten von PrP^{Sc} im verlängerten Rückenmark, das in neueren Studien bereits 62 d. p. i. beobachtet wurde (McBride et al., 2001), ließ auf eine Ausbreitung des Scrapie-Erregers entlang parasymphathischer efferenter Fasern des Vagusnervs vom Darm aus zum DMNV oder über sensorische afferente Fasern des Nervus vagus zum nodosalen Ganglion und weiter zum Nucleus solitarius (McBride und Beekes, 1999) schließen. Gleichzeitig wandert das infektiöse Agens entlang des Nervus splanchnicus über efferente Fasern und den coeliakalen und mesenterischen Ganglionkomplex oder über afferente Fasern ins thorakale Rückenmark (McBride et al., 2001). Die Beteiligung peripherer Nerven bei der Ausbreitung des Agens konnte auch durch PrP^{Sc}-Ablagerungen in Ganglien des peripheren und enterischen Nervensystems und im Vagusnerv gezeigt werden (McBride und Beekes, 1999; McBride et al., 2001).

1.2 Problemstellung der Arbeit

Ungeachtet vieler noch ungeklärter Fragen, die die Ätiologie, Pathogenese und Pathologie transmissibler spongiformer Enzephalopathien betreffen, kann davon ausgegangen werden, daß die durch das infektiöse Agens hervorgerufenen pathologischen Veränderungen als krankheitsspezifische Modifikationen von Zusammensetzung und Struktur auf molekularem Niveau beobachtet werden können. Daher ist es von großem Interesse, neuartige Methoden für die Untersuchung dieser molekularen Aspekte von TSE zu finden. In der vorliegenden Arbeit sollte hierfür ein neuer Ansatz, welcher

1 Einleitung

die FTIR-Spektroskopie verwendet, vorgestellt werden. Die Experimente wurden am Modell des Erregers Scrapie 263K im Syrischen Hamster durchgeführt.

Mit schwingungsspektroskopischen Methoden, wie beispielsweise der Infrarotspektroskopie, können Aussagen über die Struktur von Biomolekülen und die Zusammensetzung von biologischen Materialien getroffen werden. Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe der Infrarotspektroskopie ein Verfahren zu entwickeln, das es erlaubt, durch TSE hervorgerufene molekulare Veränderungen im Gewebe zu untersuchen. Es sollte dabei herausgefunden werden, ob und in welchen anatomischen Strukturen derartige Veränderungen auftreten. Für die Lösung dieses Problems sollte eine mikrospektroskopische Methode, welche eine Aufnahme von Infrarotspektren in Abhängigkeit des Ortes innerhalb von Gewebeschnitten gestattet, eingesetzt werden. Neben der dafür notwendigen Optimierung apparativer Parameter mußte die Erkennung von Spektren spezifischer Gewebestrukturen in großen Datensätzen ermöglicht werden, auf deren Grundlage Spektren aus TSE-infizierten und gesunden Hirnen miteinander verglichen werden konnten. Zur Bewertung der ortsauflösenden Methode sollten die mikrospektroskopischen Daten mit Spektren aus integrierenden IR-Messungen an größeren Proben volumina ohne Ortsauflösung verglichen werden.

Da davon auszugehen war, daß sich in den IR-Spektren beobachtete krankheitsspezifische Veränderungen nicht auf einzelne spektrale Parameter beschränken, sollten insbesondere multivariate Verfahren der Mustererkennung für die Identifizierung von Spektren aus infiziertem Nervengewebe nutzbar gemacht werden. Hierzu bieten sich nicht-überwachte Verfahren wie z. B. hierarchische Clusteranalysen, aber auch überwachte neuronale Netze an.

Um feststellen zu können, ab welchem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf IR-spektroskopisch detektierbare Veränderungen im Gewebe auftreten, sollte eine kinetische Untersuchung stattfinden. Eventuelle Möglichkeiten, TSE-spezifische Veränderungen im Gewebe möglichst früh nach einer Infektion aufzudecken und damit auch die Frage, ob die Methode als Grundlage für die Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren dienen könnte, sollten anhand von Ergebnissen dieser Zeitverlaufsstudie erörtert werden. Es sollte weiterhin geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen aus histologischen Untersuchungen bekannten Aspekten der Scrapie-Pathogenese und den beobachteten spektralen Änderungen besteht.

1.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

1.3.1 Grundlagen der Infrarotspektroskopie

In Molekülen können die Atome zu Schwingungen angeregt werden. Die Energie von Molekülschwingungen wird durch die einzelnen Atome bestimmt, durch ihre Masse, Anordnung und die Bindungsstärken zwischen ihnen. Die Energie molekularer Schwingungen liegt im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums ($\lambda=1 \mu\text{m}-1 \text{mm}$ bzw. $\bar{\nu}=10000 \text{cm}^{-1}-10 \text{cm}^{-1}$). Die als Reziprokes der Wellenlänge definierte Wellenzahl $\bar{\nu}$ ist proportional zur Schwingungsenergie und wird hauptsächlich für die Charakte-

risierung von Strahlung im Infrarot verwendet. Ein Infrarotabsorptionsspektrum ist üblicherweise eine Darstellung der Absorption von Strahlung als Funktion der Wellenzahl und wird durch die Lage der Maxima aller Absorptionsbanden charakterisiert. Die Lage und Zahl der Schwingungsenergieniveaus läßt Schlüsse auf die Molekülstruktur zu.

Die Zahl der Normalschwingungen f eines Systems entspricht der Anzahl seiner Freiheitsgrade, die noch nicht für andere Bewegungen verbraucht sind. Ein N -atomiges Molekül hat zunächst $3N$ Freiheitsgrade. Es gibt 3 Translations- und 3 Rotationsfreiheitsgrade (bei einem linearen Molekül nur 2, weil die Rotation um die Längsachse nicht gezählt wird), und für die Normalschwingungen bleibt als Rest $f = 3N - 6$ bzw. $f = 3N - 5$ für lineare Moleküle. Die Schwingungen eines Moleküls lassen sich als lineare Überlagerungen aller seiner Normalschwingungen beschreiben. Während zweiatomige Moleküle nur einen Schwingungsfreiheitsgrad besitzen und nur Schwingungen in Richtung der Bindung vollführen können (Valenz- oder Streckschwingungen), gibt es bei Molekülen mit mehr als zwei Atomen mehrere Freiheitsgrade der Schwingung. Zusätzlich zu den Streckschwingungen treten noch Schwingungen, bei denen sich die Bindungswinkel ändern, auf. Diese heißen Deformations- oder Biegeschwingungen.

Bei Molekülen mit mehreren Normalschwingungen kann es vorkommen, daß ein Oberton exakt oder fast dieselbe Frequenz wie eine Grundschiwingung besitzt. In diesem Falle findet ein Energieaustausch zwischen diesen beiden Schwingungen statt, welcher dazu führt, daß im Schwingungsspektrum zwei Absorptionsbanden an dicht nebeneinanderliegenden Frequenzen oberhalb und unterhalb des erwarteten Frequenzwertes mit ungefähr gleicher Intensität auftreten. Dieser Effekt ist am stärksten ausgeprägt, wenn beide die Frequenzen von Grundschiwingung und Oberton exakt übereinstimmen. Er wird Fermi-Resonanz genannt und ist ein häufiges Phänomen in den Schwingungsspektren vielatomiger Moleküle.

Molekülschwingungen unterliegen nicht exakt den Gesetzen einer harmonischen Bewegung. Ihre Energie wird durch ein Morse-Potential beschrieben. Dieses ist bezüglich des Gleichgewichtsabstandes der Atome im Molekül nicht symmetrisch wie das Potential des harmonischen Oszillators (siehe Abb. 1.1 auf der nächsten Seite). Die Ursache dafür ist ein abstoßendes Potential kurzer Reichweite, welches das gegenseitige Durchdringen der Atome verhindert, indem es dem anziehenden Coulomb-Potential entgegenwirkt. Die Schwingungen können deshalb nicht als einfache harmonische Schwingungen behandelt werden, sondern sind anharmonisch. In der Nähe des Minimums ist die Abweichung der Morse-Kurve vom Parabel-Potential nur klein, und der harmonische Oszillator ist in diesem Bereich eine gute Näherung. Mit steigender Energie bewegen sich die Atome aus ihrer Gleichgewichtsposition heraus und befinden sich in der nichtparabolischen Region des Potentials. Weitere Vergrößerung des Abstandes führt schließlich zur Dissoziation der chemischen Bindung. Die Form des Morse-Potentials ist spezifisch für das jeweilige Molekül bzw. eine funktionelle Gruppe. Sie hängt von der Frequenz, die der des harmonischen Oszillators entspräche, der Dissoziationsenergie sowie der reduzierten Masse des Moleküls ab.

Quantenmechanisch sind nur bestimmte diskrete Energiewerte für die Schwingungen des Moleküls erlaubt. Die Energieterme des anharmonischen Oszillators lauten in

1 Einleitung

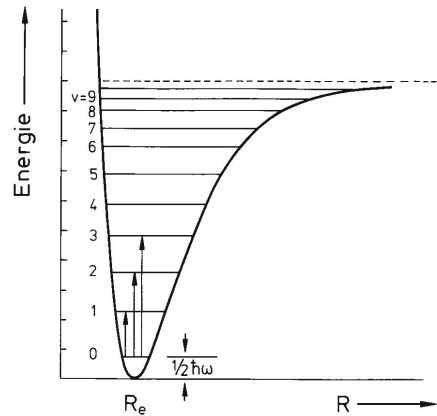


Abbildung 1.1: Energieniveaus eines anharmonischen Oszillators und Morse-Potential. $\frac{1}{2}\hbar\omega$ ist die Nullpunktsenergie, die Dissoziationsenergie wird durch die gestrichelte Linie angegeben.

Näherung

$$E_n = h\nu \left(n + \frac{1}{2} \right) - x_e h\nu \left(n + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (1.1)$$

x_e ist die sogenannte Anharmonizitätskonstante. Der Abstand zwischen den Energieniveaus nimmt also mit steigenden Energiewerten ab (z. B. Haken und Wolf, 1992). Die kleinste Energie, die ein Molekül besitzen kann, ist die Nullpunktsenergie. Für die Näherung des harmonischen Oszillators wird sie gegeben durch

$$E_0 = \frac{1}{2} \cdot h \cdot \nu_{vib} \quad (1.2)$$

Die Besetzung der Energieniveaus E_n unterschiedlicher Schwingungsquantenzahlen n ist im thermischen Gleichgewicht nach Boltzmann proportional zu dem Besetzungsfaktor $e^{-E/kT}$ von der Temperatur abhängig. Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im Schwingungsgrundzustand. Absorbiert ein Molekül Strahlung, deren Energie der Differenz zu einem höheren Zustand entspricht, so geht es in diesen Zustand über. Einer Auswahlregel für optische Übergänge gehorchend sind nur diejenigen Übergänge, bei denen sich die Schwingungsquantenzahl um ± 1 ändert, also immer Übergänge zum benachbarten Energieniveau, erlaubt. Mit geringerer Wahrscheinlichkeit können jedoch außer einer einfach angeregten Schwingung auch Obertöne angeregt werden. Dabei gilt: $\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$, wobei sich die relativen Intensitäten ungefähr wie $1 : x_e : x_e^2 : x_e^3 \dots$ verhalten. x_e ist eine kleine Zahl (Größenordnung 10^{-2}), deshalb nehmen die Intensitäten der Obertöne sehr schnell ab. Die Wahrscheinlichkeit für Übergänge von $4 \leftarrow 0$ ist bereits so klein, daß solche Obertöne im allgemeinen nicht mehr zu beobachten sind. Für das Auftreten der Obertöne ist also die Anharmonizität notwendig. Damit eine Schwingung eines Moleküls IR-spektroskopisch aktiv ist, muß mit der Schwingung ein elektrisches Dipolmoment verbunden sein, das sich

beim entsprechenden Übergang ändert (Auswahlregel für elektrische Dipolstrahlung). Schwingen z. B. zwei gleichartige Atome gegeneinander, existiert kein Dipolmoment, und damit auch keine Dipolmomentänderung. Deshalb sind die Schwingungsfrequenzen von homonuklearen zweiatomigen Molekülen wie z. B. N_2 oder O_2 IR-inaktiv.

1.3.2 Prinzip der FTIR-Spektroskopie und Vergleich mit dispergierender Spektroskopie

Hauptbestandteil eines FTIR-Spektrometers ist ein Interferometer, dessen Funktionsweise hier zunächst beschrieben werden soll. Der Prototyp eines solchen Interferometers, auf den die heutigen Interferometer in FTIR-Spektrometern zurückgehen, wurde 1880 von Michelson entwickelt. In Abb. 1.2 ist der Strahlengang in einem solchen

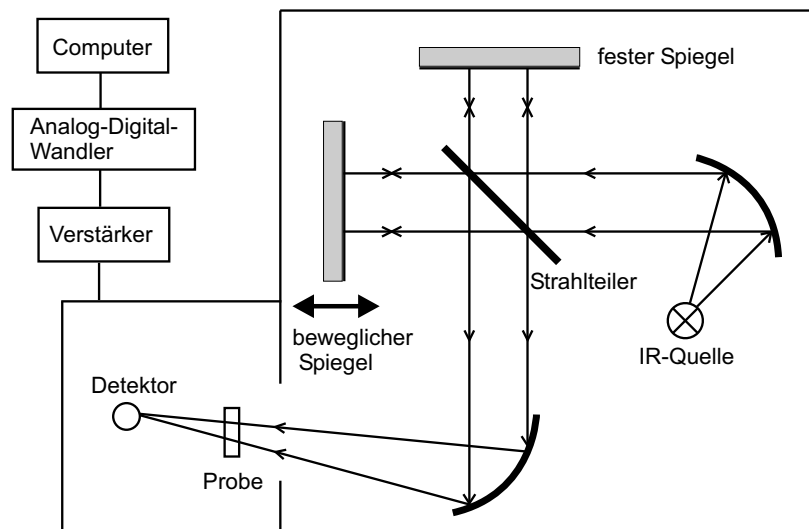


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers

Michelson-Interferometer dargestellt. Das parallele Licht fällt von einer weißen Lichtquelle auf einen halbdurchlässigen Spiegel. Dabei gelangt die eine Hälfte der dort auftreffenden Strahlung durch den Strahlteiler hindurch zu dem der Lichtquelle gegenüberliegenden beweglichen Spiegel. Die andere Hälfte wird zum festen Spiegel reflektiert. Beide Spiegel besitzen dieselbe Entfernung zum Strahlteiler. Sowohl der feste als auch der bewegliche Spiegel reflektieren das Licht dorthin zurück. Der vom beweglichen Spiegel reflektierte Anteil des Lichts wird am Strahlteiler reflektiert, der am festen Spiegel reflektierte Anteil durchdringt den Strahlteiler (vgl. Abb. 1.2). Hinter dem Strahlteiler kommt es zur Interferenz beider Strahlen. Bei einer Auslenkung x des beweglichen Spiegels besitzen die verschiedenen Wellenlängen des weißen Lichts einen unterschiedlichen Gang- bzw. Phasenunterschied gegenüber Strahlen derselben Wellenlänge, die am festen Spiegel reflektiert werden. Die Interferenz ist hinter dem Strahlteiler je nach Phasenunterschied (also je nach Wellenlänge) konstruktiv oder destruktiv. Mit der Spiegelbewegung wird der Phasenunterschied und also die Inten-

1 Einleitung

sität der einzelnen Wellenlängen am Strahlteiler moduliert. Sie ändert sich für jede Wellenlänge mit einer Kosinusfunktion. Strahlen mit kleiner Wellenlänge interferieren schon bei kleinen Spiegelauslenkungen x destruktiv, größere Wellenlängen bei größeren Auslenkungen. Die Überlagerung der Intensitäten aller Wellenlängen als Funktion der Auslenkung des beweglichen Spiegels heißt Interferogramm und kann mit Gl. 1.3 beschrieben werden.

$$I(x) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos 2\pi\tilde{\nu}x \, d\tilde{\nu} \quad (1.3)$$

$B(\tilde{\nu})$ ist hierbei der Fourier-Koeffizient. Nach Fourier-Transformation (FT) erhält man die Darstellung der Intensität in Abhängigkeit von der Frequenz, die als IR-Spektrum bezeichnet wird.

$$B(\tilde{\nu}) = 2 \int_0^{+\infty} I(x) \cos 2\pi\tilde{\nu}x \, dx \quad (1.4)$$

Befindet sich eine Probe im Strahlengang des Interferometers, z. B. direkt hinter der Lichtquelle oder vor dem Detektor, und absorbiert diese einen Teil der Strahlung, dann verändert sich entsprechend das Interferogramm, und die Intensitäten für die entsprechenden Energien sind geringer als im Spektrum der Lichtquelle ohne Probe. Die absorbierte Energie ist proportional zur Zahl der absorbierenden Molekülgruppen und deren spezifischem Extinktionskoeffizienten. Es gilt das Gesetz von Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1.5)$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ bestimmt die Intensität des Übergangs entsprechend Gl. 1.5, die Extinktion (engl.: *absorbance*) wird in Absorptionseinheiten angegeben. Aus dem Verhältnis der Intensitäten mit Probe (I) und ohne Probe (I_0), welches als Transmission bezeichnet wird, errechnet sich das Absorptionsspektrum:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1.6)$$

Die Auflösung $\Delta\tilde{\nu}$ im FTIR-Spektrometer wird davon bestimmt, wieviel des Interferogramms beobachtet werden kann, d. h., wie weit der Spiegel maximal ausgelenkt wird. Für eine sehr hohe Auflösung muß der Spiegelweg x sehr groß werden:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{x_{max}} \quad (1.7)$$

Die Auslenkung des Spiegels ist endlich, demnach liegt das Intensitätsintegral nicht von 0 bis ∞ vor, und das Interferenzmaximum nimmt nicht kontinuierlich für größere x ab, sondern wird periodisch mit abnehmender Amplitude moduliert. Deshalb geht der Fouriertransformation eine Faltung mit einer sogenannten Apodisierungsfunktion voraus, welche das Interferogramm je nach Wahl der Funktion um das Intensitätsmaximum herum glättet (siehe z. B. Stuart, 1997). Bei der Wahl der Apodisierungsfunktion muß ein Kompromiß zwischen der Glättung des Interferogramms und der spektralen

Auflösung gefunden werden. Je größer die Dämpfung im Interferogramm, desto breiter ist die dazugehörige spektrale Linie. Da die Datenaufnahme und die FT mit dem Rechner erfolgen, wird das Interferogramm mittels eines Satzes diskreter Datenpunkte beschrieben, und es erfolgt eine diskrete Fourier-Transformation mittels Fast-Fourier-Transform-(FFT)-Algorithmus, durch welche die in Gl. 1.4 auf der vorherigen Seite beschriebene kontinuierliche FT approximiert wird. Durch dieses näherungsweise Herangehen kann der Fall eintreten, daß ein Maximum im Interferogramm zwischen zwei bei der FT berechneten Datenpunkten liegt. Dieses Problem wird reduziert, indem durch Anhängen von Nullen an die beiden Flanken des Interferogramms die Spiegelauslenkung und damit die spektrale Auflösung künstlich erhöht wird (engl.: *zero fill*). Die Zahl der angehängten Nullen richtet sich u. a. nach der Linienbreite.

Die Empfindlichkeit, mit der Molekülschwingungen beobachtet werden können, hängt u. a. von den Detektoreigenschaften ab. Detektoren mit hoher Empfindlichkeit sind z. B. Quantendetektoren wie der MCT-Detektor (Hg-Cd-Te), deren Elektronen durch das einfallende Licht in das Leitungsband angeregt werden und ein elektrisches Signal liefern. Bei anderen Detektoren ändert das IR-Licht die Polarisierbarkeit und erzeugt dadurch an einem Kondensator ein verändertes Spannungssignal. Als Lichtquelle im mittleren Infrarot dient meist ein thermischer Strahler, wie z. B. ein sogenannter Globar, ein SiC-Stab, der durch Stromdurchgang auf ca. 1500 K aufgeheizt wird.

Konventionelle Doppelstrahl-Spektrometer enthalten dispergierende Elemente (ein Gitter oder ein Prisma, sowie Eintritts- und Austrittsspalt am Monochromator). Besonders bei hohen Auflösungen wirkt sich diese Konstruktion nachteilig auf das Signal/Rausch-Verhältnis aus. Durch Drehen des Gitters bzw. Prismas treffen die einzelnen Wellenlängen nacheinander auf die Probe bzw. die Referenz und den Detektor. Die Verwendung eines FT-Spektrometers bietet gegenüber einem Doppelstrahl folgende entscheidende Vorteile:

1. Die Lichtquelle im FTIR-Spektrometer ist polychromatisch, und der Spalt wird durch eine größere, kreisförmige Apertur ersetzt. Dadurch wird eine Gesamtintensität erreicht, welche groß genug ist, um vom Detektor mit einem guten Signal/Rausch-Verhältnis aufgenommen zu werden. Die bessere Durchlässigkeit wird als Jaquinot-Vorteil bezeichnet.
2. Alle Wellenlängen der weißen Quelle werden gleichzeitig gemessen. Dieser Multiplex- oder Felgett-Vorteil genannte Vorzug führt zu einem enormen Zeitgewinn gegenüber einem dispersiven System.
3. Die Spiegelposition und somit die Lagen der einzelnen Wellenlängen werden durch einen He-Ne-Laser sehr exakt bestimmt und sind genau reproduzierbar (Wellenzahlgenauigkeits- oder Connes-Vorteil).
4. Zusätzlich wird der Einfluß von Streulicht eliminiert, da dieses nicht die zur Fourier-Transformation erforderliche Intensitätsvariation in Abhängigkeit von der Spiegelbewegung des Michelson-Interferometers aufweist.

1.3.3 Ortsaufgelöste FTIR-Spektroskopie

1.3.3.1 FTIR-Mikrospektrometrie

Für die Untersuchung von Proben, welche nicht homogen sind, sondern in denen sich die chemische Zusammensetzung ortsabhängig ändert, wie dies z. B. bei vielen biologischen Proben der Fall ist, bieten sich Meßverfahren an, welche die Aufnahme von IR-Spektren von kleinen Probenvolumina abhängig vom Ort ermöglichen. Zur Realisierung kleiner Volumina ist ein Infrarot-Mikroskop hervorragend geeignet. Die Grundschnwingungen der meisten Moleküle besitzen Energien im Bereich des mittleren Infrarot ($4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$). Die meisten optischen Medien der Bauteile eines konventionellen Lichtmikroskops absorbieren im IR. Dementsprechend muß die Mikroskopoptik Anpassungen an den Wellenlängenbereich aufweisen. An die Stelle von refraktiven treten reflektierende Systeme, z. B. sogenannte Cassegrain-Objektive. Für Transmissionsmessungen werden die Proben nicht auf Objektträger aus Glas, sondern auf IR-durchlässige Probenträger aus BaF_2 , CaF_2 oder ZnSe aufgebracht.

Die räumliche Auflösung, die mit einem solchen IR-Mikroskop erzielt werden kann, errechnet sich wie die eines Lichtmikroskops nach dem Abbé-Kriterium. Danach gilt für die Auflösung l für kreisförmige Blenden und bei einem Brechungsindex von 1 (keine Linse im Cassegrain-Objektiv):

$$l = \frac{0,61\lambda}{\sin \delta} \quad (1.8)$$

Für Wellenlängen λ von 14500 bis 2000 nm (d. h. für $\bar{\nu}$ von $700\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$) ergibt sich bei einer größtmöglichen numerischen Apertur des Cassegrain-Objektivs (d. h. bei größtmöglichem Öffnungswinkel δ) ein theoretischer Wert von 9 bis 1 μm , wobei die Auflösung durch die größte Wellenlänge bestimmt wird. Die beste Auflösung, die für ein Spektrum im mittleren Infrarot erzielt werden kann, liegt daher bei ca. 10 μm . Diese theoretische Grenze ist beim Arbeiten mit klassischen thermischen Strahlern praktisch nicht realisierbar, da der Photonenfluß pro Fläche zu gering ist.

Der Blendendurchmesser kann also nicht beliebig klein gewählt werden. Er ist durch einen weiteren Parameter, das Signal/Rausch-Verhältnis, begrenzt. Beim „Rauschen“ des MCT-Detektors handelt es sich um sogenanntes thermisches Rauschen. Das Signal/Rausch-Verhältnis verschlechtert sich bei Verkleinerung der Blende, da die Größe des Signals durch die reduzierte Detektorfläche abnimmt, während das durch thermisch angeregte Elektronen verursachte Rauschen konstant bleibt. Bei einer kreisförmigen Blende wächst das Rauschen damit quadratisch mit der Verkleinerung des Blendendurchmessers. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird jedoch nicht nur durch die Blendengröße beeinflusst. Mit der Verwendung eines Rechners für die Datenaufnahme ist es möglich, von einer kleinen Fläche viele Interferogramme (als *scans* bezeichnet) aufzunehmen und sie zu addieren, um so durch Mittelung das Rauschen zu reduzieren. Indem man viele *scans* aufaddiert, läßt sich somit das Signal/Rausch-Verhältnis auch bei relativ kleinem Blendendurchmesser verbessern. Allerdings kommt es dadurch zu einer signifikanten Erhöhung der Meßzeit. Bei Mittelung mehrerer Interferogramme addiert sich das Signal linear mit ihrer Anzahl, während das Rauschen aufgrund

seines statistischen Charakters proportional zur Quadratwurzel der *scan*-Anzahl anwächst. Um das Verhältnis Signal/Rauschen zu verdoppeln, muß also das Vierfache an *scans* aufsummiert werden. Auch die Digitalisierung des analogen Signals am Analog-Digital-Wandler trägt zum Rauschen bei.

Das oben erwähnte Problem eines zu geringen Photonennflusses pro Fläche und Raumwinkel bei kleinen Blenden kann behoben werden, indem man andere, brillantere Strahlungsquellen verwendet. In dieser Arbeit wurden einige Messungen an einer Synchrotron-Strahlungsquelle durchgeführt. Synchrotronstrahlung entsteht, wenn sich Elektronen auf einer gekrümmten Bahn mit relativistischen Geschwindigkeiten durch ein Magnetfeld bewegen. Diese Strahlung umfaßt den gesamten Energiebereich zwischen fernem Infrarot und Röntgenstrahlung. Die Brillanz von Synchrotronlicht, d. h. der Photonenfluß (bzw. die Leistung) pro Fläche und Öffnungswinkel, ist aufgrund kleiner Öffnungswinkel und geringer effektiver Strahlungsfläche ungefähr zwei bis drei Größenordnungen höher als die Brillanz von thermischen Strahlern. Der Einsatz einer Synchrotron-Strahlungsquelle erlaubt deshalb eine Verwendung von Blendengrößen in der Nähe der Beugungsgrenze mit einem guten Verhältnis von Signal zu Rauschen (Carr, 2001). IR-Mikrospektroskopie-Apparaturen mit Synchrotronlicht als Strahlungsquelle wurden mehrfach erfolgreich zur Untersuchung von Biomaterialien wie Gewebeschnitten (siehe z. B. Choo et al., 1996) und auch von lebenden Zellen (Jamin et al., 1998) verwendet. Die Leistung an der Probe beträgt im mittleren Infrarot bei einer beleuchteten Fläche von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ca. 5 mW (Jamin et al., 1998), und es wurde gezeigt, daß die Aufheizung einer biologischen Probe bei derartigen Messungen vernachlässigbar ist (Martin et al., 2001).

Eine neue Entwicklung der letzten Jahre ist die Anwendung großflächiger, aus vielen Detektorelementen bestehender Detektoren, sogenannter *focal plane arrays* (FPA) in der orts aufgelösten FTIR-Spektroskopie, ohne oder in Verbindung mit einem Mikroskop. Während man mit einem konventionellen Einzeldioden-Detektor und einem IR-Mikroskop ein Spektrum nach dem anderen aufnimmt, bietet die Anwendung eines FPA-Detektors einen enormen Zeitvorteil, da hier von vielen Orten in der Probe gleichzeitig Spektren aufgenommen werden können. Je nach Anzahl der Detektorelemente variiert die Größe eines Datensatzes in zwischen 4096 und 10^6 Spektren (Lewis et al., 1996). Ein Nachteil von FPA-Systemen ist das relativ kleine Verhältnis von Signal zu Rauschen. Dieses liegt für die bei den flächigen Anordnungen verwendeten Photodioden um Größenordnungen unterhalb dessen eines kleinflächigen MCT-Detektorelementes.

1.3.4 IR-Spektren biologischer Moleküle

Wie bereits aus Abschnitt 1.3.1 hervorging, vermittelt ein Schwingungsspektrum wesentliche Informationen über die Struktur eines Moleküls. Infrarotspektroskopie ist deshalb eine wichtige Methode zur Strukturaufklärung von Biomolekülen. Man kann aus der Anwesenheit charakteristischer Absorptionsmaxima im IR-Spektrum auf die Anwesenheit der dazugehörigen Moleküle bzw. Molekülgruppen in einer Probe schließen. Ein großes Molekül, wie z. B. ein Protein, besitzt ein sehr komplexes Schwin-

1 Einleitung

gungsspektrum. Die Wechselwirkung von Molekülschwingungen sowie eine direkte Kopplung bestimmter funktioneller Gruppen in Makromolekülen haben zur Folge, daß sich die Absorption von charakteristischen Gruppen gegenüber derselben Gruppe in einer anderen Umgebung unterscheiden kann. Bereits geringste Veränderungen der Umgebung eines biologischen Moleküls, seiner Sekundärstruktur, der Protonierung einzelner Molekülgruppen, die Änderung der Mikroumgebung von Seitenketten oder die Bildung von Wasserstoffbrücken führen zu charakteristischen Änderungen seines IR-Spektrums. In Tab. 1.1 sind die Absorptionsbanden einiger funktioneller Gruppen in wichtigen Biomolekülen aufgeführt.

Lipide bilden die Membranen sowohl als äußere Begrenzung der Zellen als auch intrazellulär, wie z. B. im endoplasmatischen Retikulum und in Organellenmembranen. Sie besitzen eine Reihe von Absorptionsbanden im Bereich zwischen 3000 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} . Diese werden auf die symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen von CH_3 - und CH_2 -Gruppen der Fettsäuren in den Phospholipiden zurückgeführt. Die genaue Bandenzuordnung ist aus Tab. 1.1 auf der nächsten Seite ersichtlich. Die asymmetrischen Schwingungen der Moleküle besitzen jeweils eine höhere Energie als die dazugehörigen symmetrischen Schwingungen. Auch die CH_3 - und CH_2 -Gruppen von Proteinen und aller anderen Moleküle tragen zur Absorption von Strahlung in diesem Bereich des Spektrums bei. Die Biegeschwingungen von CH_3 und CH_2 liegen im Bereich zwischen 1470 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} . Proteine als langkettige polymere Moleküle weisen eine Vielzahl Absorptionsbanden auf. Insbesondere die Amid I-Bande, hauptsächlich hervorgerufen durch $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingungen der sekundären Amidstrukturen im Peptidrückgrat, gibt Auskunft über die Sekundärstruktur eines Proteinmoleküls (siehe Tab. 1.1). Weitere IR-aktive Biomoleküle sind Nucleinsäuren, welche in Form von DNA und RNA auftreten. Im Bereich zwischen 1250 cm^{-1} und 900 cm^{-1} sind $\text{P}=\text{O}$ -Schwingungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat zu beobachten. Die $\text{C}=\text{O}$ -, $\text{C}=\text{N}$ -, oder $\text{C}=\text{C}$ -Schwingungen der einzelnen Basen liegen in einem Spektralbereich, in dem auch die Absorption der Proteinkomponenten sehr hoch ist (ca. 1700 cm^{-1} - 1600 cm^{-1}), und werden daher aufgrund des im Vergleich zum Proteingehalt niedrigen Nucleinsäuregehaltes meist von den Amid I-Banden überlagert. Die Ringschwingungen der Nucleinsäuren besitzen weniger Energie und lassen sich zwischen 1500 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} ansiedeln. Als sogenannte Fingerprint-Region wird der Spektralbereich zwischen 900 cm^{-1} und 600 cm^{-1} bezeichnet. Er enthält sehr spezifische spektrale Information, die sich insbesondere aus sehr intensitätsschwachen Ringschwingungen verschiedener Aromaten, wie z. B. Tyrosin, Tryptophan und Nucleotiden, zusammensetzt.

1.3.5 FTIR-Spektroskopie an Zellen und Geweben

Auch komplexe Materialien wie Zellen und Gewebe können mit dem Ziel, Strukturaussagen auf Grundlage von Infrarotspektren zu treffen, untersucht werden. Das Infrarotspektrum einer biologischen Probe setzt sich aus den charakteristischen Absorptionsbanden aller in ihr enthaltenen Moleküle (Proteine, Lipide, Nucleinsäuren etc.) zusammen. Deshalb bildet die Analyse charakteristischer Absorptionsbanden die Grundlage für die meisten bioanalytischen Anwendungen. Bei der Anwendung der

1.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Tabelle 1.1: Absorptionsbanden wichtiger Biomoleküle im mittleren Infrarot (nach: Parker, 1983; Stuart, 1997; Wood, 1998; Diem et al., 1999; Naumann, 2000)

Absorptionsbande (cm ⁻¹)	Zuordnung	
~3300	N-H-Streckschwingung (Amid A-Bande)	Proteine
~3100	N-H-Streckschwingung in Fermi-Resonanz mit 1. Oberton der Amid II-Bande (Amid B-Bande)	Proteine
~3010	=C-H-Streckschwingungen in Alkenen	Lipide
2959 und 2872	asymmetrische bzw. symmetrische C-H-Streckschwingung von -CH ₃ -Gruppen	Lipide, Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren
2921 und 2852	asymmetrische bzw. symmetrische C-H-Streckschwingung von -CH ₂ -Gruppen	Lipide, Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren
~1745-1735	C=O-Streckschwingung (Ester)	Phospholipide, Thymin, Uracil
~1695-1620	verschiedene Komponenten der Amid I-Bande (C-O- und C-N-Streckschwingungen)	Proteine
~1690-1675, ~1638-1620	antiparallele β -Faltblattstrukturen, β -turns (Amid I)	Proteine
~1655	α -helikale Strukturen, ungeordnete Strukturen (Amid I)	Proteine
~1550	Amid II-Bande (N-H-Biegeschwingung, C-H-Streckschwingung, C-O-Biegeschwingung, C-C- und N-C-Streckschwingungen)	Proteine
~1515	Tyrosin (Aminosäureseitenketten)	Proteine
~1465	C-H-Deformationsschwingung von -CH ₂ -Gruppen	Lipide, Proteine, Nukleinsäuren
~1450	asymmetrische C-H-Deformationsschwingung von -CH ₃ -Gruppen	Proteine, Lipide
~1400	C=O-Streckschwingung von -COO ⁻ -Gruppen	Fettsäuren, Aminosäureseitenketten
~1390	symmetrische C-H-Deformationsschwingung von -CH ₃ -Gruppen	Proteine, Lipide
~1310-1200	gekoppelte C-H/N-H-Deformationsschwingung (Amid III)	Proteine
~1250-1220	asymmetrische P=O-Streckschwingung in PO ₂ ⁻	Nukleinsäuren, Phospholipide
~1200-900	C-O-P- und C-O-C-Streckschwingungen, Ringschwingungen	Polysaccharide, Cholesterol, Ester
~1170	asymmetrische CO-O-C-Streckschwingung	Lipide
~1080	symmetrische P=O-Streckschwingung in PO ₂ ⁻	Nukleinsäuren, Phospholipide
~1070	symmetrische CO-O-C-Streckschwingung	Lipide
~1050	verschiedene überlappende Banden von C-O-Streckschwingungen von CH ₂ OH-Gruppen, C-O-Streckschwingungen und C-O-Biegeschwingungen von C-OH-Gruppen, sowie C-O-P-Streckschwingungen	Riboseskelett von Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide
~970	Riboseketten	RNA
~720	C-H-Pendelschwingung von -CH ₂ -Gruppen	Lipide, Proteine, Nukleinsäuren

1 Einleitung

IR-Spektroskopie für biologische Proben können diese entweder hydratisiert oder getrocknet untersucht werden. Wasser, Lösungsmittel und Hauptbestandteil aller Zellen, besitzt mehrere Normalschwingungen im Bereich des mittleren Infrarot, die den übrigen Banden im Spektrum der Proben überlagert sind. Deshalb ist es günstig, von den Spektren ein Wasserspektrum zu subtrahieren, um die Information aus diesen Regionen des IR-Spektrums besser sichtbar zu machen. Eine weitere Lösung des Problems der Wasserabsorption bietet das Arbeiten mit getrockneten Proben, wie z. B. auf speziellen Probenträgern angetrockneten Zellsuspensionen oder Gewebeschnitten.

Eine wachsende Zahl an Arbeiten zeigte während des letzten Jahrzehnts, daß die IR-Spektroskopie viele nützliche Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin bietet. So ist es seit längerem möglich, Bakterien bis auf Stammebene genau zu identifizieren (Naumann et al., 1991). Die Identifizierung verschiedener Gewebetypen ist ebenfalls möglich. Je nach molekularer Zusammensetzung der 4 Grundgewebetypen (Bindegewebe, Muskel-, Epithel- und Nervengewebe) unterscheiden sich deren IR-Spektren (Jackson und Mantsch, 1996; Jackson et al., 1995). Ausgehend von der Annahme, daß pathologische Veränderungen im Gewebe primär Veränderungen der molekularen Zusammensetzungen und Molekülstrukturen sind und somit schwingungsspektroskopisch detektierbar sein sollten, folgten eine Reihe IR-pathologischer Untersuchungen an unterschiedlichsten Geweben und Körperflüssigkeiten (Jackson und Mantsch, 1997; Wang et al., 1996). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sich maligne und nicht-maligne Zellen bei Leukämie (Schultz et al., 1996) voneinander unterscheiden lassen. Zudem wurden verschiedene humane Tumoren wie Melanom (Lasch, 1999), Colon-Karzinom (Lasch und Naumann, 1998) und Brustkrebs (Jackson und Mantsch, 1997) anhand ihrer IR-Spektren charakterisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde Nervengewebe untersucht, welches einen der relativ häufig IR-spektroskopisch untersuchten Gewebetypen darstellt. Hirngewebe bietet gute Voraussetzungen, chemische Zusammensetzung und Wechselwirkungen zwischen biologischen Molekülen mittels IR-Spektroskopie, insbesondere auch mit ortsauflösenden Verfahren, in situ zu untersuchen, denn es läßt sich anatomisch und histologisch einfach in zwei Kategorien, graue und weiße Substanz, einteilen. Die meisten bisher publizierten Arbeiten diskutieren anhand von IR-Spektren die chemische Zusammensetzung von weißer im Vergleich zu grauer Substanz (siehe z. B. LeVine und Wetzels, 1993; Choo et al., 1993). Die Spektren dieser beiden Gewebetypen unterscheiden sich sehr deutlich voneinander, so daß Dünnschnitte von Hirngewebe sich für die Erprobung von Verfahren der Bildgebung im nahen und mittleren Infrarot gut eignen (Lewis et al., 1996). Im Kleinhirn (Cerebellum), einer Hirnregion, in welcher verschiedene Gewebeschichten systematisch und histologisch eindeutig identifizierbar vorliegen, sind spektrale Unterschiede zwischen weißer und grauer Substanz besonders einfach und ohne aufwendige vergleichende Histologie zu untersuchen. Hier wurden Spektren von zwei Strukturen der grauen Substanz (Stratum moleculare und Stratum granulosum) im Hirn von Ratten, denen D₂O im Trinkwasser verabreicht worden war, voneinander und von denen weißer Substanz anhand ihrer verschiedenen Metabolismusraten und daher variierenden Deuteriumeinbauraten unterschieden (Wetzels et al., 1998). Eine Analyse von Peakfrequenzen der Streckschwingungen der CH₂-Gruppen

1.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

in Membranlipiden zeigte die Möglichkeit der Unterscheidung einer vierten Schicht im Kleinhirn, der Purkinje-Zellen, mittels FTIR-Mikrospektrometrie (Lester et al., 1998). Durch Kombination bildgebender Verfahren mit multivariaten Methoden können zudem Variationen spektraler Muster mit histologischen Substrukturen innerhalb von Stratum moleculare und Stratum granulosum sichtbar gemacht werden (Kneipp, 1998).

Im Zusammenhang mit IR-Studien an weißer Substanz wurden mehrere pathologische Zustände, die diese Struktur betreffen können, IR-spektroskopisch untersucht (Choo et al., 1993; LeVine und Wetzell, 1993). In den für multiple Sklerose typischen Läsionen der Myelinscheiden sind u. a. die Intensitäten der CH-Banden deutlich gegenüber denen in gesunder weißer Substanz reduziert (Choo et al., 1993). Weiterhin konnte die FTIR-Mikrospektrometrie genutzt werden, um Amyloid-Plaques in Dünnschnitten von menschlichem Alzheimer-Hirngewebe zu charakterisieren (Choo et al., 1996). Diese krankheitsspezifischen Proteinablagerungen sind durch einen hohen Anteil an β -Faltblatt-Strukturen gekennzeichnet, welcher durch Absorptionsänderungen im Bereich der Amid I-Bande im Spektrum sichtbar wird (vgl. Tab. 1.1 auf Seite 21).

1 Einleitung

2 Material und Methoden

2.1 Probenpräparation

2.1.1 Präparation von Gewebedünnschnitten aus Hirnen oral infizierter Hamster

2.1.1.1 Tierversuche und Probenentnahme

Gleichaltrige weibliche Tiere eines Laborstammes von *Mesocricetus auratus* wurden oral mit dem Scrapie-Erreger 263K infiziert. Hierfür wurde ein Homogenat von Hirngewebe terminal an Scrapie-263K erkrankter Hamster verwendet. Mit einem Trockenfutter-Pellet wurden 100 μl Hirnhomogenat (ca. $1-3 \times 10^7$ LD₅₀ intraperitoneal, entspricht $1-3 \times 10^2$ LD₅₀ peroral) an jedes Tier verfüttert. Derselben Anzahl Kontrolltiere wurde Hirnhomogenat gesunder Hamster peroral verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation wurden je 4 infizierte und 4 Kontrolltiere mit CO₂ getötet. Das terminale Krankheitsstadium war abhängig vom einzelnen Individuum 150–160 Tage nach Infektion erreicht. Tiernummern, Probennummern und jeweiliger Zeitpunkt im Krankheitsverlauf sind in Tab. 2.1 auf der nächsten Seite zusammengefaßt. Nach Entnahme von Blut und Liquor cerebrospinalis für andere Experimente wurden den Tieren die Hirne entnommen, mit Gefriermedium (Leica Tissue Freezing Medium) auf Korkplättchen aufgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.1.1.2 Präparation der Kryoschnitte

Die auf Korkplättchen aufgefrorenen Hirne wurden mit Gefriermedium auf den Metall-Probenhaltern im Kryotom fixiert. Beginnend von caudal wurden coronale Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10 μm angefertigt (Kammertemperatur: -17 °C, Messertemperatur: -21 °C). Zunächst wurden mehrere Schnitte auf Objektträger aufgenommen und zur Kontrolle Schnellfärbungen mit Kresylviolett oder Methylenblau durchgeführt, um die Position im verlängerten Rückenmark bestimmen zu können. Es wurden zwei coronale Ebenen im Bereich des verlängerten Rückenmarks und des Kleinhirnes untersucht (siehe Abb. 2.1 und Ergebnisteil). In Ebene I liegen die Kerne verschiedener Hirnnerven, Ebene II verläuft u. a. durch die Kerne des Kleinhirns. Nach Erreichen bzw. Annäherung an die gewünschte coronale Ebene wurden dann jeweils 5 sequentielle Schnitte wie in Abb. 2.1 skizziert für Vergleichsfärbungen (2 à 10 μm), FTIR-Mikrospektrometrie (1 à 10 μm) und Immunhistochemie (2 à 8 μm) angefertigt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Probenbezeichnungen und Entnahmezeitpunkt im Krankheitsverlauf der für die Versuche verwendeten Hirne.

Zeitpunkt nach Infektion		Probenbezeichnung im Versuch	Tiernummer
90 d.p.i.	263K	o17	CR15/49
		o18	CR15/50
		o19	CR15/51
		o20	CR15/52
	Kontrollen	o21	CR15/74
		o22	CR15/75
		o23	CR15/76
		o24	CR15/77
120 d.p.i.	263K	o25	CR15/53
		o26	CR15/54
		o27	CR15/55
		o28	CR15/56
	Kontrollen	o29	CR15/78
		o30	CR15/79
		o31	CR15/80
		o32	CR15/81
terminales Stadium	263K	o33	CR15/57
		o34	CR15/60
		o35	CR15/61
		o36	CR15/63
	Kontrollen	o37	CR15/82
		o38	CR15/85
		o39	CR15/86
		o40	CR15/88

Die für die IR-Spektroskopie vorgesehenen Proben wurden auf 1 mm dicke, polierte BaF₂-Kristalle aufgebracht. Die Schnitte trocknen an der Luft bei Raumtemperatur sofort an. Mit den IR-Messungen wurde i. d. R. am selben Tag begonnen. Nach Abschluß der Messungen wurden die Proben für eventuelle weitere Untersuchungen im Exsikkator unter Stickstoffatmosphäre und im Dunkeln gelagert. Die Proben für die immunhistochemischen Färbungen wurden nach ca. 2 Stunden Antrocknen bei Raumtemperatur bis zum Färben bei -26 °C gelagert.

2.1.2 Präparation der Dünnschnitte von Spinalganglien

Ein Scrapie-infizierter syrischer Hamster im terminalen Krankheitsstadium und ein Kontrolltier wurden mit CO₂ getötet, mehrere Spinalganglien entnommen und diese

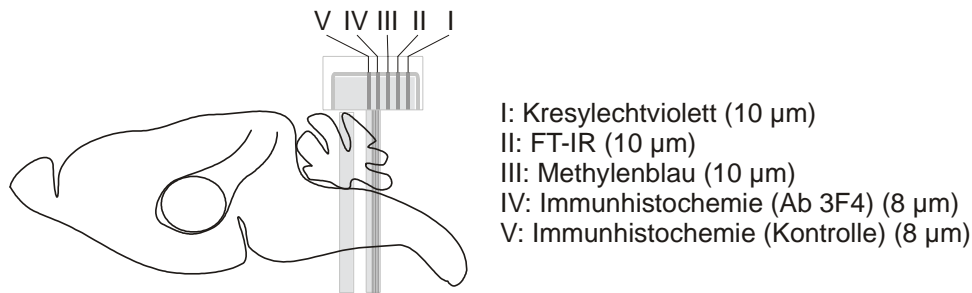


Abbildung 2.1: Skizze eines Hirnes in Seitenansicht mit den beiden coronalen Schnittebenen und Verwendung der sequentiellen Schnitte

in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Einbetten der Ganglien in Gefriermedium wurden Kryo-Dünnschnitte von 16 μm Dicke angefertigt. Hierbei wurde jeweils abwechselnd ein Schnitt auf einem Standard-Objektträger und einem 1 mm dicken, polierten BaF_2 -Probenträger angetrocknet. Ein Teil der Schnitte auf den Objektträgern wurde mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, mit den anderen wurde eine Immunfärbung durchgeführt.

2.1.3 Präparation von hydratisierten Gewebeproben aus den Hirnen intraperitoneal infizierter Hamster

Weibliche Tiere eines Laborstammes von *Mesocricetus auratus* wurden intraperitoneal mit dem Scrapie-Erreger 263K infiziert. Derselben Anzahl gleichaltriger Kontrolltiere wurde Hirnhomogenat gesunder Tiere i. p. injiziert. Im terminalen Stadium (130 ± 4 d. p. i.) und 102 d. p. i. wurden je vier infizierte und vier Kontrolltiere mit CO_2 getötet. Die Hirne wurden wie in Abschnitt 2.1 beschrieben entnommen und bei -70°C gelagert. Um ein Antrocknen des Gewebes zu vermeiden, wurden in gefrorenem Zustand (im Probenraum eines Kryostaten) winzige Scheibchen Medullagewebes in einer Küvette von 8 μm Weglänge zwischen zwei polierte CaF_2 -Fenster gepreßt, so daß das gesamte Küvettenvolumen mit dem Gewebe ausgefüllt war. Von jedem Hirn wurden mehrere dieser Quetschpräparate angefertigt (siehe Tab. 2.2 auf der nächsten Seite).

2.2 Vergleichende Histologie

2.2.1 Nissl-Färbungen

Zur Orientierung in den Dünnschnitten aus dem Gehirn (siehe Abb. 2.1) und für spätere Vergleiche wurde der jeweils vor und hinter der mit IR-Spektroskopie untersuchten Probe liegende Schnitt auf Objektträgern mit Kresylechtviolett (CFV) bzw. Methylenblau gefärbt (siehe z. B. Knoche, 1979a). Mit Kresylechtviolett lassen sich die Kerne der Nervenzellen und die Nissl-Substanz anfärben. Somit werden die Perikaryen sichtbar und die Kerne der Hirnnerven im verlängerten Rückenmark können

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2: Probenbezeichnungen und Entnahmezeitpunkt der verwendeten Hirne von intraperitoneal infizierten Hamstern.

Zeitpunkt nach Infektion		Tiernummer	Probenbezeichnung im Versuch	Anzahl Präparationen
102 d. p. i.	263K	CR15/13	p25	4
		CR15/14	p27	2
		CR15/15	p29	5
		CR15/16	p31	3
	Kontrollen	CR15/33	p26	3
		CR15/34	p28	6
		CR15/35	p30	5
		CR15/36	p32	6
terminales Stadium	263K	CR15/18	p33	3
		CR15/20	p35	3
		CR15/17	p37	3
		CR15/19	p39	4
	Kontrollen	CR15/37	p34	4
		CR15/38	p36	6
		CR15/30	p38	5
		CR15/39	p40	3

von der sie umgebenden weißen Substanz unterschieden werden. Wie Kresylechtviolett ist auch Methylenblau eine Nissl-Färbung. Zusätzlich werden damit Nuclei, Nucleoli und Chromatin angefärbt.

2.2.1.1 Anfärbung mit Kresylechtviolett

Die Schnitte wurden 10 min in 0.1 % wäßriger Kresylechtviolett-Lösung gefärbt. Nach Spülen in H₂O erfolgte ein Ausdifferenzieren in 70 % Ethanol und Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol, Ethanol-Xylol-Gemisch 1:2, Xylol). Die Schnitte wurden mit D. P. X. (Sigma-Aldrich) eingedeckt.

2.2.1.2 Anfärbung mit Methylenblau

Die Schnitte wurden 5–10 min in einer 0.2 % Methylenblau-Lösung gefärbt. Nach Spülen in H₂O und Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol, Ethanol-Xylol-Gemisch 1:2, Xylol) wurden die Schnitte mit D. P. X. (Sigma-Aldrich) eingedeckt.

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Einige der Dünnschnitte der Spinalganglien (siehe 2.1.2) wurden zu Vergleichszwecken mit Hämatoxylin und Eosin nach folgendem Protokoll angefärbt:

5–10 min	Hämatoxylinlösung
15 min	Abspülen der Schnitte und Bläuen in Leitungswasser
	Differenzieren in salzsaurem Ethanol (70 %)
	Auswaschen und Bläuen in Leitungswasser
5–10 min	Eosinlösung
	Abspülen mit Aqua dest.
	aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol), Ethanol-Xylol-Gemisch 1:2, Xylol
	D. P. X. (Sigma-Aldrich) zum Eindecken

2.2.3 Immunhistochemie

Parallel zu den FTIR-Messungen wurden jeweils zwei der sequentiellen Schnitte aus den Hirnen (siehe Abb. 2.1 auf Seite 27) und auch jeweils ein sequentieller Schnitt der Ganglien-Präparate (Abschnitt 2.1.2 mit dem Antikörper 3F4 (Kascsak et al., 1987) bzw. als Kontrolle angefärbt. Dieser Antikörper bindet an ein Epitop von 4 Aminosäuren (109–112) des Proteins PrP aus Mensch und Hamster sowohl in dessen zellulärer Form (PrP^C) als auch in der pathologischen Form (PrP^{Sc}). Er wurde aus einer Zellkultur gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Huser, Robert Koch-Institut, zur Verfügung gestellt. Die Färbung der Gefrierschnitte erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Taraboulos et al. (Taraboulos et al., 1992):

5 min	Fixierung in 50 % Ethanol
5 min	Fixierung in 100 % Ethanol
5 min	Fixierung in 50 % Ethanol
	Rehydratisieren in destilliertem Wasser
15 min	10 % phosphatgepuffertes Formalin
5 min	100 mM NH ₄ Cl
	0.5 % Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich) in PBS (pH 7.8)
10 min	Denaturierung in 3 M Guanidiniumthiozyanat/ 10 mM TrisHCl (pH 7.8)
über Nacht	Inkubation mit 10 % fötalem Kälberserum in TBST/ 0.2 % Tween 20 bei 4 °C
1 h 45 min	Inkubation mit Antikörper 3F4 (1:100) in PBS/ 1 % Rinderserumalbumin bei 37 °C
	Inkubation der Kontrollen mit normalem Mausserum (Dako) (1:100) in PBS/ 1 % Rinderserumalbumin bei 37 °C
3 × 5 min	Waschen der Schnitte in PBS/ 0.2 % Rinderserumalbumin

2 Material und Methoden

1 h	Inkubation mit biotinyliertem sekundärem Antikörper Ziege-anti-Maus (Dako E 0433) (1:200) in PBS/ 1 % Rinderserumalbumin bei Raumtemperatur
3 × 4 min	Waschen der Schnitte in PBS/ 0.2 % Rinderserumalbumin
30 min	Inkubation mit Vectastain ABC-Kit (Vector Laboratories, Inc.) bei Raumtemperatur (biotinylierte Meerrettichperoxidase bindet über Avidin an den sekundären Antikörper)
2 × 5 min	Waschen der Schnitte in PBS/ 0.2 % Rinderserumalbumin
9 min	Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin Spülen in destilliertem Wasser
5 min	Verstärkung der Färbung in 0.5 % CuSO ₄ -Lösung
5 min	Überfärben mit Hämatoxylinlösung nach Mayer (Knoche, 1979b) Bläuen in Leitungswasser aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol), Ethanol-Xylol-Gemisch 1:2, Xylol D.P.X. (Sigma-Aldrich) zum Eindecken

2.3 FTIR-Mikrospektroskopische Messungen an Hirngewebe

2.3.1 Experimenteller Aufbau

Für die FTIR-mikrospektrometrischen Messungen wurde ein Spektrometer vom Typ IFS28/B der Firma Bruker Optik (Ettlingen, Deutschland) verwendet. Das modulierte IR-Licht wird aus dem Strahlengang in ein Mikroskop (IR-Mikroskop A 590, Bruker Optik) eingekoppelt, wo es als Lichtquelle im Durchlicht- (für Transmissionsmessungen) bzw. im Auflichtmodus (für Messungen in Reflexion) dient. Im Transmissionsmodus tritt das Licht von unten durch den auf dem Objektisch liegenden Probenträger und wird über zwei Cassegrain-Objektive auf ein Detektorelement abgebildet. Vor dem zweiten Objektiv befand sich eine verstellbare Lochblende, deren Durchmesser zwischen 0,3 mm und 3,75 mm in 250 μ m-Schritten variiert werden konnte. Die Vergrößerung des verwendeten Objektivs war 15 \times , so daß der resultierende Blendendurchmesser (der Durchmesser eines durch die Blende begrenzten Meßpunktes) 1/15 des Durchmessers der Lochblende betrug. Bei dem verwendeten Detektor handelte es sich um einen MCT-(HgCdTe)-Detektor, welcher mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Anstelle des IR-Lichts aus dem Spektrometer kann beim verwendeten Mikroskop auch eine sichtbare Quelle verwendet werden, so daß Meßpunkte in der Probe über ein Videobild ausgewählt werden können. Das Mikroskop war mit einem rechnergesteuerten (x,y)-Tisch (Feinpositioniersystem MCL, Lang GmbH Hüttenberg, Deutschland) ausgestattet, der es erlaubte, einzelne Meßpunkte in der Probe anzusteuern. Mit Hilfe der verwendeten Meßsoftware OPUS (Bruker Optik) konnten auch Punktraster innerhalb der Probe festgelegt werden, von deren Positionen dann in einer bestimmten Reihenfolge Spektren aufgenommen wurden (*mapping*-Option). Das Mikroskop war von einem

Kasten aus Plexiglas umgeben, in welchen CO₂- und Wasserdampf-reduzierte Luft aus einem Spülgas-Generator eingeleitet wurde. Das Spektrometer wurde ebenfalls mit Trockenluft gespült, um die Absorptionsbanden von H₂O und CO₂ zu reduzieren.

2.3.2 Wahl der Blendengröße am Mikroskop

Je nach Wahl des Durchmessers der vor dem Detektor sitzenden Blende können unterschiedlich große Bereiche in der Probe mit einem Spektrum erfaßt werden. Je kleiner die Blende gewählt wird, desto höher ist die Ortsauflösung, d. h. desto kleinere Gewebestandteile (z. B. Bereiche spezieller Zelltypen, große Einzelzellen oder unterschiedliche extrazelluläre Bereiche) können spektral charakterisiert werden. Ein bei größerer Blende gemessenes Spektrum ist dementsprechend immer ein Mittel aus der Strukturinformation aller in der abgebildeten Fläche enthaltenen Gewebekomponenten. Der praktische Blendendurchmesser für die Messungen am Hirngewebe wurde entsprechend der Problemstellung gewählt. Für die Unterscheidung von Gewebestrukturen im Gehirn hat sich die Verwendung eines Blendendurchmessers von 50 µm als günstig erwiesen. Die größten Nervenzellen im Hirn eines Hamsters haben ungefähr diese Größe bzw. sind etwas kleiner. In den meisten Hirnstrukturen werden von einer solchen Blende meist mehrere Zellen (ein Verband von Neuronen mit umgebenden Gliazellen und extrazellulärer Matrix) eingeschlossen.

2.3.3 Orientierung innerhalb der Probe

Die meisten IR-Mikroskope bieten die Möglichkeit, als Lichtquelle vom IR auf eine konventionelle Mikroskoplampe zu wechseln und die Probe im Durchlicht durch ein Okular zu beobachten oder ein Videobild im Sichtbaren aufzuzeichnen. Die Vergrößerung des IR-Mikroskops im sichtbaren Modus betrug 300× (Objektiv 15×), so daß der mit der Videokamera beobachtbare Ausschnitt der Gewebefläche relativ klein war. Insbesondere die Schnitte des verlängerten Rückenmarks erschienen im ungefärbten Zustand bei dieser Vergrößerung relativ homogen, und eine genaue Orientierung war nicht immer gut möglich. Deshalb wurden die zugehörigen sequentiellen, gefärbten Schnitte für die Orientierung in der Probe verwendet. Da Gefrierschnitte im Gegensatz zu Paraffinschnitten vor einer Übersichtsfärbung nicht fixiert werden, bleibt ihre Größe dieselbe wie im ungefärbten, unentwässerten Zustand. Ein konventionelles Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera wurde für die Nissl-gefärbten Schnitte in einer Übersicht (25×) benutzt. Mit der zur Kamera gehörigen Bildverarbeitungssoftware (Axiovision, Zeiss) konnten die Abstände zwischen beliebigen Punkten im Mikroskopbild vermessen werden. Die Ausstattung des IR-Mikroskops mit einem computergesteuerten Kreuztisch gestattete ein gezieltes und reproduzierbares Anfahren einzelner Meßpunkte in x- und y-Richtung und ein mikrometergenaues Ausmessen der Probe. Nach Festlegen eines markanten Punktes, der sowohl in der IR-Probe als auch im gefärbten Schnitt vorhanden war (z. B. dem Rand des Schnittes, dem 4. Hirnventrikel, dem Querschnitt der Arteria basilaris an der Unterseite der Medulla oblongata o. ä.), konnte von diesem aus dann exakt der Startpunkt für die Messung eines Areals in der Probe bestimmt

werden. In einigen Fällen wurde auch vor der Messung ein Übersichtsbild ($25\times$) des ungefärbten IR-Präparates angefertigt, was später die Orientierung bei 300facher Vergrößerung sehr erleichterte. Im Bereich des Cerebellum ist eine Zuordnung von Strukturen im ungefärbten Präparat auch bei stärkerer Vergrößerung wesentlich einfacher als in der Medulla oblongata, da graue und weiße Substanz in Schichten angeordnet sind und unterschiedlich antrocknen.

2.3.4 Ablauf und Parameter der durchgeführten Messungen

Alle Absorptionsspektren wurden mit einer spektralen Auflösung von 6 cm^{-1} über den Bereich von 4000 cm^{-1} bis 700 cm^{-1} im Transmissionsmodus aufgenommen. Die Interferogramme wurden mit einer Happ-Genzel-Funktion apodisiert und ein *zero fill factor* (siehe 1.3.2) von 4 eingesetzt. Für die Messungen wurde die Software OPUS 3.0.2 (Bruker, Ettlingen) verwendet. Es wurde die darin enthaltene *mapping*-Option, die das Festlegen eines Punktrasters und das Ansteuern der festgelegten Meßpunkte ermöglicht, angewendet. Vor Beginn einer solchen *mapping*-Messung wurde ein Spektrum durch den BaF_2 -Probenträger mit denselben Meßparametern, welche auch für die Probenmessungen verwendet wurden, als Referenz aufgezeichnet. Die Anzahl der Interferogramme, die pro Spektrum aufaddiert wurden, um ein entsprechendes Signal/Rausch-Verhältnis zu realisieren, unterschied sich für die verschiedenen Messungen und richtete sich nach der Blendengröße. Die im folgenden beschriebenen Messungen wurden an jedem der in Tab. 2.1 auf Seite 26 aufgeführten Hirne durchgeführt.

Zunächst wurde mit der in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Methode die Region der zentral in der Medulla lokalisierten Hirnnervenkerne eingegrenzt und davon eine Übersichtsmessung durchgeführt. Hierfür wurde ein Blendendurchmesser von $100\text{ }\mu\text{m}$ gewählt. Für jedes Spektrum wurden 64 Interferogramme aufsummiert. Es wurden Spektren in einem Punktraster mit einem Abstand in x- und in y-Richtung von jeweils $80\text{ }\mu\text{m}$ auf einer Fläche von ca. $3000\text{ }\mu\text{m} \times 2000\text{ }\mu\text{m}$ (durchschnittliche Angabe, für die einzelnen Proben variierten die Flächen leicht) aufgenommen. Dies ergab ca. 1000 Spektren pro Übersichtsmessung. Mit Hilfe des *chemical mapping* (siehe 2.6.2) wurde eine Karte erstellt. In diesen Karten konnten dann die Region der Hirnnervenkerne von der sie umgebenden weißen Substanz genau abgegrenzt und ihre exakten Ortskoordinaten bestimmt werden. Diese wurden für eine anschließende Detailmessung, welche nur ein *mapping* der Hirnnervenkerne beinhaltete, benutzt.

Die detaillierten Messungen hatten im Gegensatz zu den Übersichtsmessungen nicht die vollständige Kartierung einer großen Meßfläche zum Ziel. Es sollten dabei gezielt Einzelspektren der aus den Übersichten ausgewählten Strukturen mit guter Qualität aufgenommen werden. Dafür wurde ein Blendendurchmesser von $50\text{ }\mu\text{m}$ verwendet und über 512 *scans* gemittelt. Der Abstand im Punktraster betrug $60\text{ }\mu\text{m}$. Von jeder Probe wurden ca. 130 Spektren aufgenommen (genaue Anzahlen siehe Tab. 3.1 auf Seite 51).

Für die Messungen in der zweiten coronalen Schnittebene, welche im Bereich der Kleinhirnerne durchgeführt wurden, wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Untersuchung der Kerne der Hirnnerven in der Medulla oblongata. Zunächst fand eine Über-

2.4 IR-Mikrospektroskopie an Spinalganglien mit einer Synchrotronstrahlungsquelle

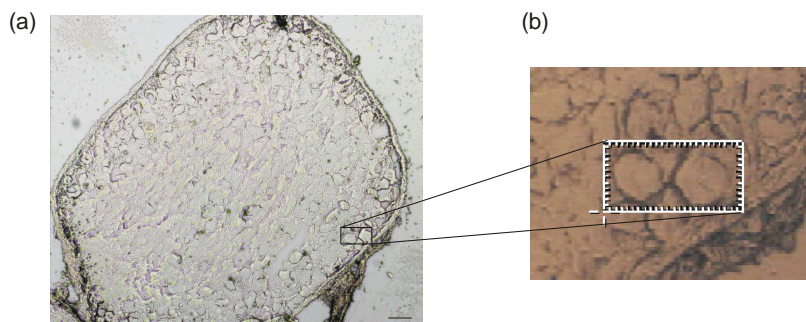


Abbildung 2.2: (a) Ungefärbter Dünnschnitt eines Ganglions ($10\times$), Maßstab: $50\ \mu\text{m}$ und (b) Beispiel für ein in einer Messung untersuchtes Gewebeareal (aufgenommen mit der *mapping*-Software *Atlμs*).

sichtsmessung bei $100\ \mu\text{m}$ Blendendurchmesser und $64\ \text{scans}$ statt. Nach dieser groben Kartierung wurden in der Region des Nucleus interpositus eine bis zwei detaillierte Messungen bei $50\ \mu\text{m}$ mit $512\ \text{scans}$ durchgeführt. Während jeder dieser Detailmessungen wurden ca. $120\text{--}130$ Spektren aufgenommen (genaue Anzahlen siehe Tab. 3.1 auf Seite 51).

2.4 IR-Mikrospektroskopie an Spinalganglien mit einer Synchrotronstrahlungsquelle

Innerhalb der Schnitte von Spinalganglien sollten kleine, lokalisierte Änderungen in den Spektren in Abhängigkeit vom Ort betrachtet werden. Für die Untersuchung einzelner Neuronen in den Ganglien war daher eine besonders hohe Ortsauflösung von Interesse. Diese konnte mit einem Globar als Strahlungsquelle nicht erzielt werden (siehe 1.3.3.1). Deshalb wurden diese Messungen an der *National Synchrotron Light Source* im *Brookhaven National Laboratory* (Upton, NY, USA) am Strahlrohr U10B durchgeführt. Das Synchrotronlicht wird als Lichtquelle in ein Spektrometer vom Typ Magna System 860 (Nicolet, Madison, WI) eingekoppelt. Es besitzt am Strahlrohr U10B Energien von ca. $8000\ \text{cm}^{-1}$ bis $400\ \text{cm}^{-1}$. An das Spektrometer war ein Mikroskop vom Typ Contiu μm (SpectraTech, Shelton, CT) gekoppelt. Für die Messungen wurden ein $32\times$ Cassegrain-Objektiv und eine quadratische Schneidenblende gewählt, deren Seitenlänge nach Abbildung durch das Objektiv auf die Probe $10\ \mu\text{m}$ betrug. Mit der Software *Atlμs* 5. 2. wurden *mapping*-Messungen ähnlich den bereits in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen durchgeführt. Nach Aufnahme eines lichtmikroskopischen Bildes des zu untersuchenden Präparates wurde in diesem ein Punktraster in einer rechteckigen Fläche für die jeweilige Messung definiert (siehe Abb. 2.2). Die Schrittweite zwischen den Spektren betrug bei den meisten Messungen $4\ \mu\text{m}$, in einigen Fällen auch $8\ \mu\text{m}$. In den meisten Fällen wurden die Messungen gezielt auf ein einzelnes oder einige wenige Neuronen im Ganglion begrenzt. Nach Aufnahme eines Referenzspektrums durch einen leeren Punkt auf dem BaF_2 -Probenträger wurden im Transmissionsmodus

Spektren von der definierten Meßfläche aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug 8 cm^{-1} , als Apodisierungsfunktion wurde eine Happ-Genzel-Funktion eingesetzt, für das *zero filling* wurde „*level 2*“ in der Spektrometersoftware Omnic 5.2. (Nicolet) gewählt. Für jedes mit der Blendengröße $10\ \mu\text{m}$ aufgenommene Spektrum wurden 256 Interferogramme gemittelt.

2.5 Messungen an hydratisierten Gewebestückchen ohne Ortsauflösung

Für Vergleichszwecke mit den mikrospektroskopischen Messungen wurden auch einige Gewebeproben mit einer konventionellen Methode ohne Ortsauflösung untersucht. Die Messungen wurden in den in 2.1.3 beschriebenen CaF_2 -Küvetten, von denen sich 8 Stück in einem dicht verschlossenen Probenrad befanden, im Bakterienautomaten eines Spektrometers vom Typ IFS28/B (Bruker Optik, Ettlingen) unter Benutzung des DTGS-Detektors durchgeführt. Dabei wurden Absorptionsspektren mit einer Auflösung von 6 cm^{-1} und unter Verwendung eines *zero fill factor* von 4 über den Bereich von $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. Für jedes Spektrum wurden 64 Interferogramme aufaddiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte durch direkte Vergleiche der Spektren und mit dem unter Abschnitt 2.6.3 beschriebenen *Scaling to First Range*-Verfahren der Clusteranalyse.

2.6 Auswertung der mikrospektroskopischen Messungen

2.6.1 Aufbereitung der Rohdaten, Ableitung, Normierung

Die Spektren einer Messung lagen jeweils in einer Datei (*multifile*) vor. Aus dieser wurden die Einzelspektren extrahiert und mit Namen versehen, welche die Art der Messung, die Nummer des Hirnes sowie eine Spektrennummer (welche der Reihenfolge entsprach, in der die Spektren während der *mapping*-Messung aufgenommen wurden) eindeutig angaben. Nach der Extraktion wurde die Qualität der Spektren überprüft. Hierbei wurden die Parameter Gewebedicke und Wasserdampf evaluiert. Als Maß für die Gewebedicke wurde die integrale Extinktion zwischen 1770 und 1100 cm^{-1} verwendet, der Wasserdampfgehalt wurde anhand der Intensitäten der Banden bei $1792,4\text{ cm}^{-1}$ und $1844,6\text{ cm}^{-1}$ aus den zweiten Ableitungen bestimmt (siehe auch Lasch, 1999). Da nach Aufnahme des Hintergrundspektrums die *mapping*-Messungen jeweils mehrere Stunden dauerten, während denen sich die Luftfeuchtigkeit in einigen Messungen änderte, war trotz Trockenluftspülung des Mikroskops in einigen Datensätzen eine Änderung der Wasserdampfabsorption in den Spektren im Zeitverlauf beobachtbar. Aus diesem Grunde wurde bei Spektren, die Absorptionsbanden von Wasserdampf aufwiesen, eine Wasserdampfkorrektur durchgeführt. Dafür wurden „leere“ Messungen mit den in der Probenmessung verwendeten Parametern durchgeführt und die so

erhaltenen Wasserdampfspektren für die Korrektur verwendet. Sie wurden mit einem für jedes zu korrigierende Spektrum variierenden Korrekturfaktor multipliziert und anschließend von den Spektren subtrahiert.

Von allen Spektren wurde die erste, in vielen Fällen auch die zweite Ableitung gebildet. Das Differenzieren der Spektren vor der Spektrenauswertung bietet mehrere Vorteile. Das Problem variierender Basislinien (also einer sich zum Absorptionwert hinzuaddierenden Konstanten), häufig bedingt durch Streueffekte, wird in den Ableitungen unterdrückt. Zudem erscheinen die Banden im Spektrum deutlicher, da mit der Ableitung ein Gradient beobachtet wird und selbst für kleine Extrema ein klar erkennbarer Nulldurchgang vorhanden ist. Eine zweite Ableitung liefert eine negative Amplitude für jede Bande im Absorptionsspektrum. Dieser Vorteil wird besonders bei komplexen Spektren deutlich, da hier Absorptionsbanden, die im Originalspektrum verdeckt oder als „Schultern“ anderer Banden erscheinen, auf Kosten der breiteren Banden verstärkt werden. Mit den unscheinbareren Banden tritt auch das Rauschen in den Ableitungen deutlicher hervor. Deshalb wurde bei der Bildung der ersten und zweiten Ableitungen mit OPUS jeweils ein Savitzky-Golay-Algorithmus mit 9 Glättungspunkten verwendet. Bei dieser Anzahl Glättungspunkte wird das Rauschen einerseits genügend reduziert, und der Signalverlust reicht andererseits aber nicht dazu aus, ein Verschwinden kleinerer Banden zu bewirken.

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Spektren untereinander wurden diese (bzw. ihre Ableitungen) entweder über den zu vergleichenden Bereich oder über den gesamten Bereich des Spektrums mit der Software OPUS (OS/2) vektornormiert. Dazu wird ein Spektrum als Vektor angesehen, dessen Koordinaten durch die Datenpunkte im betrachteten Spektralbereich gebildet werden. Bei einer Vektornormierung wird jede Koordinate y_i (Absorptionwert bzw. erste oder zweite Ableitung) des Vektors durch seinen Betrag dividiert:

$$x_i = \frac{y_i}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (y_j)^2}} \quad (2.1)$$

Damit ist die Summe der Quadrate aller normierten Funktionswerte x_i 1 (Euklidische Norm):

$$\sum_{i=1}^n (x_i)^2 = 1 \quad (2.2)$$

2.6.2 Chemical mapping

Chemical mapping, häufig auch als *functional group mapping* bezeichnet, ist eine Kartierungsmethode auf Grundlage eines einzelnen Parameters, der für jedes Spektrum eines *mapping*-Datensatzes ausgelesen oder bestimmt wird. Das für die Messung festgelegte Punktraster (vgl. Abschnitt 2.3.4) entspricht einer Matrix, deren Spaltenanzahl die Zahl der Meßpunkte in x-Richtung und deren Zeilenanzahl die Zahl der Meßpunkte in y-Richtung enthält. Der ausgelesene spektrale Parameter (z. B. die Intensität einer

2 Material und Methoden

Bande, das Verhältnis der Intensitäten zweier Banden o.ä.) kann daher als Funktionswert des Ortes, ähnlich dem Höhenprofil in einer Landkarte abgebildet werden.

Bei den Übersichtsmessungen der Hirnnerven- und der Kleinhirnkerne wurde mit überlappenden Blenden gearbeitet (100 μm Blendendurchmesser, 80 μm Abstand zwischen den Meßpunkten, siehe Abschnitt 2.3.4). Dadurch wurde die gesamte bei der Messung abgerasterte Gewebefläche erfaßt. Bei der Lokalisierung von Kernen in der Medulla oblongata wie auch im Kleinhirn müssen Strukturen weißer und grauer Substanz voneinander abgegrenzt werden. Dazu eignet sich das sogenannte Protein/Lipid-Verhältnis (Verhältnis der Intensitäten des Amid-Bereiches und des Bereiches der CH-Streckschwingungen) als Funktion für die Kartierung aufgrund seines guten Kontrastes besonders (siehe auch Abschnitt 3.2.1). Mit Hilfe der *chemical maps* wurden ausgehend vom Ursprung der Messung die Koordinaten der Strukturen, von denen detailliertere Messungen durchgeführt werden sollten, präzise bestimmt.

Für die Anfertigung dieser Karten wurde eine seit längerer Zeit in der Arbeitsgruppe etablierte, ursprünglich von P. Lasch für die IR-Bildrekonstruktion humaner Tumoren entwickelte Methode verwendet (siehe z. B. Lasch et al., 1998). Mit Hilfe eines Makros für OPUS (OS/2) wurden alle Originalspektren zunächst basislinienkorrigiert und nach einer Vektornormierung über den Bereich 1770–1100 cm^{-1} das Verhältnis der integralen Intensitäten in den Bereichen 1700–1480 cm^{-1} und 3000–2838 cm^{-1} für jedes Spektrum berechnet. Es wird im folgenden als Protein/Lipid-Verhältnis (PLV) bezeichnet. Mit dem Programm MATRIX wurde dieser Wert für jedes Spektrum wieder mit der aus der Messung bekannten Ortsinformation verknüpft. Die hierbei entstandenen Matrizen wurden mit ORIGIN 6.1 in 3D-Diagrammen als Kontur-Farbabbildungen dargestellt.

Mit den Daten aus den Detailmessungen wurde ebenfalls eine Auftragung des Protein/Lipid-Verhältnisses durchgeführt. Da bei diesen Messungen jedoch keine überlappenden Blenden verwendet wurden (50 μm Blendendurchmesser, 60 μm Abstand zwischen den Meßpunkten), kann ein *chemical map* einer solchen Detailmessung nicht als komplette Gewebekarte betrachtet werden. In einer Kontur-Farbabbildung in ORIGIN 6.1 wird jedoch standardmäßig zwischen den Meßpunkten bis zur Bildschirmauflösung interpoliert, so daß sich in jedem Fall ein vollständiges Bild ergibt, in dem auch die in der Übersichtskarte dargestellten Strukturen mit einer (aufgrund der kleineren Blende) besseren Ortsauflösung erscheinen. ORIGIN 6.1 bietet auch die Möglichkeit, von einer interpolierenden Darstellung in die scheinbar schlechtere, jedoch realistische Auflösung der tatsächlichen Pixelspektren zu wechseln. Die genaue Zuordnung einzelner Spektren zu einer bestimmten Spektrengruppe in späteren Auswerteschritten wurde dadurch erleichtert (siehe z. B. Abb. 3.3 auf Seite 50).

2.6.3 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse ist ein Klassifizierungsverfahren, bei dem Objekte aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Gruppen zusammengefaßt werden. Die Spektren sind multivariate Objekte, bei denen die Absorptionswerte in einem oder mehreren für die Klassifizierung zu verwendenden Spektrenabschnitten die Variablen sind. Für die multivariate Klassi-

fizierung der Spektren wurde ein hierarchisches Clusteranalyse-Verfahren angewendet. Es handelt sich hierbei um ein unüberwachtes Verfahren, d. h. die Spektren werden ohne zusätzliche Information aufgrund ihrer Ähnlichkeit, welche in Form der spektralen Distanz berechnet wird, in Klassen sortiert. Für die Berechnung der spektralen Distanzen wurde die Methode *Scaling to First Range* verwendet, die neben anderen Methoden für die Distanzberechnung im Modul *Ident* von OPUS (OS/2) wählbar ist. Dabei wird zunächst der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r für jeden Frequenzbereich separat unter dessen Vektornormierung bestimmt:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^k (a_{n,i} - a_m) \cdot (b_{n,i} - b_m)}{\sqrt{\sum_{i=1}^k (a_{n,i} - a_m)^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^k (b_{n,i} - b_m)^2}} \quad (2.3)$$

k ist die Anzahl der Datenpunkte im Spektralbereich, a_n und b_n sind die normierten, a_m und b_m die mittleren Intensitäten der Spektren a und b . Da der Pearson'sche Korrelationskoeffizient als Distanzmaß Werte zwischen -1 (inverse Spektren) und $+1$ (identische Spektren) annehmen kann, besitzt die sogenannte spektrale Distanz D , welche anschließend zur Skalierung berechnet wird, Werte zwischen 2000 (inverse Spektren) und 0 (identische Spektren) (Helm et al., 1991a,b):

$$D = (1 - r) \cdot 1000 \quad (2.4)$$

Man kann die Klassifizierung mit dem *Scaling to First Range*-Verfahren für mehrere Frequenzbereiche durchführen. Dabei wird die spektrale Distanz für einen Bereich berechnet und die Abstände in den restlichen Bereichen darauf skaliert. Aus den damit gewonnenen spektralen Distanzmatrizen D wird ein Mittelwert für die verschiedenen Frequenzbereiche bestimmt, bei dem die Distanzen der einzelnen Bereiche noch unterschiedlich gewichtet werden können.

Für die Zusammenfassung in Cluster auf Basis der spektralen Distanzen D wurde der Ward's-Algorithmus angewendet. Bei der Bildung der Cluster wird auf ein möglichst geringes Ansteigen der sogenannten Heterogenität H geachtet, so daß sich relativ homogene Gruppen bilden. Zunächst werden n_p und n_q ähnliche Spektren zu Gruppen p und q zusammengefaßt. Anschließend werden n_i dieser Gruppen zu einer neuen Gruppe i fusioniert:

$$H_{r,i} = D_{r,i} = \frac{(n_p + n_i) \cdot D_{p,i} + (n_q + n_i) \cdot D_{q,i} - n_i \cdot D_{q,i}}{n + n_i} \quad (2.5)$$

Das Ergebnis einer Clusteranalyse kann in Form eines Dendrogrammes, das wie ein Stammbaum die Hierarchie der Fusionierung der Gruppen im Zusammenhang mit der Heterogenität H veranschaulicht, dargestellt werden (siehe z. B. Abb. 3.4 im Kapitel 3).

Die bis jetzt beschriebene Methode wurde auf die ersten Ableitungen der Spektren aller Detailmessungen angewendet. Sie diente der Klassifizierung der Spektren aus diesen Messungen entsprechend verschiedenen Hirnstrukturen und war Grundlage für den Vergleich identischer Strukturen in kranken und gesunden Hirnen. Alle Spektren der

einzelnen Datensätze wurden je einer Clusteranalyse über den Bereich 1480–950 cm^{-1} unterzogen. Für die Vergleiche von Spektren aus infizierten und Kontrollhirnen wurden ebenfalls Clusteranalysen durchgeführt. Die Auswahl von Spektralbereichen für die Clusteranalyse wurde zunächst nach visuellen Unterschieden zwischen den Spektren getroffen. Anschließend wurden mehrere Bereiche auf Trennbarkeit zwischen den Kategorien „infiziert“ und „nicht infiziert“ untersucht.

2.6.4 Kartierung auf Grundlage von Clusteranalysen

Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten spektralen Klasse kann in Form eines diskreten Wertes (einer ganzen Zahl, eines Farbwertes etc.) ausgedrückt werden. Wird dieser Wert jedem Spektrum in einem *mapping*-Datensatz zugeordnet und wieder mit der Ortsinformation jedes Spektrums verknüpft, entsteht eine spektrale Karte auf Basis der räumlichen Verteilung des multivariaten Merkmals (also eines spektralen Musters). Diese Karten sind abhängig von der Wahl des für die Clusteranalyse ausgewählten Spektralbereiches. Eine derartige Muster-basierte Kartierung wurde für alle Detailmessungen durchgeführt und diente der korrekten Zuordnung von Spektren einer bestimmten spektralen Klasse zu histologischen Strukturen innerhalb der kartierten Bereiche. Es wurde dafür das auf der Software Matlab basierende Programm CytoSpec von P. Lasch freundlicherweise zur Verfügung gestellt. CytoSpec verwendet für die Clusteranalyse ebenfalls den unter Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Algorithmus.

2.6.5 Extraktion und Sortierung von Einzelspektren auf Basis der Klassifizierungsergebnisse

Für den Vergleich von Spektren identischer Strukturen in Hirnen Scrapie 263K-infizierter Tiere und denen von Kontrolltieren wurden auf Grundlage der Ergebnisse der Clusteranalysen aus jedem Datensatz die Spektren einer spektralen Klasse, die einer histologischen Struktur zuzuordnen waren, extrahiert. Hierbei erfolgte eine Umordnung der Spektren aus Datensätzen der einzelnen Individuen in Datensätze, die die Spektren einer spezifischen histologischen Struktur aus allen Individuen eines gemeinsamen Infektionsstadiums enthielten. Dadurch wurden die großen Spektrenmengen besser handhabbar und für andere automatisierte Auswerteverfahren vorsortiert. Aufgrund der unter 2.6.1 beschriebenen eindeutigen Nomenklatur war jedoch ebenso der gezielte Vergleich individueller Einzelspektren unproblematisch.

Für die Sortierung in Datensätze bestimmter histologischer Strukturen wurde zunächst nur das Klassifizierungsergebnis der individuellen Clusteranalysen berücksichtigt, welches in Form des Dendrogramms und einer Spektrenliste, „Diagnose“ genannt, von OPUS (OS/2) ausgegeben wird. Auf Grundlage der Dateiinformation in der Spektrenliste wurden nun mit dem Programm KOPIER alle in einer Klasse enthaltenen Spektren aus dem Datensatz jeder Probe in ein Verzeichnis sortiert, das die entsprechende histologische Struktur und ein Infektionsstadium repräsentierte. Diese Prozedur wurde für alle für den Vergleich von krank und gesund interessanten spektralen Klassen bzw. histologischen Strukturen aller Datensätze durchgeführt. Im An-

schluß daran wurden alle Spektren, die aufgrund ihrer räumlichen Zuordnung in den Clusteranalyse-basierten Karten und *chemical maps* nicht der Struktur zuzuordnen waren, zu der sie gruppiert worden waren, manuell aus den neu zusammengestellten Datensätzen entfernt. Dies war jedoch nur bei sehr wenigen Datensätzen und wenigen Spektren notwendig.

2.6.6 Künstliche neuronale Netze

2.6.6.1 Funktionsprinzip der verwendeten *multilayer perceptrons*

Neben der unter 2.6.3 beschriebenen Clusteranalyse gibt es weitere Möglichkeiten der Klassifizierung von Spektren auf Grundlage von spektralen Mustern. Die Mustererkennung mit Hilfe von künstlichen neuronalen Netzen (engl.: *artificial neural networks*, ANNs) wird von selbstlernenden Systemen miteinander verschalteter Einheiten (sog. genannter Neuronen) nach dem Vorbild der in einem Gehirn verknüpften Nervenzellen bewerkstelligt. Neben den sogenannten selbst-organisierenden Kohonen-Netzen und auto-assoziativen künstlichen neuronalen Netzen, die unüberwachte, exploratorische Methoden (z. B. für Clusteranalysen) darstellen (Goodacre, 2000), gibt es auch Netze, die unbekannte Objekte aufgrund vorher beim Lernen gesammelter „Erfahrungen“ identifizieren. Diese überwachte Form der Klassifizierung kann von radialen Basisfunktionen (RBFs) und von *multilayer perceptrons* (MLPs) durchgeführt werden. In dieser

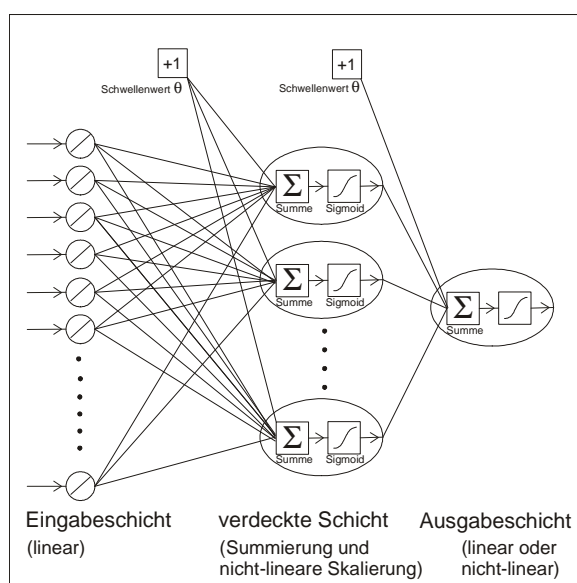


Abbildung 2.3: Skizze eines typischen *multilayer perceptrons* (nach Goodacre, 2000)

Arbeit wurden gebräuchliche 3-schichtige *multilayer perceptrons* (siehe z. B. Goodacre, 2000; Udelhoven et al., 2000) verwendet. Diese bestehen aus einer Eingabeschicht, einer sog. verdeckten Schicht und einer Ausgabeschicht. Jedes Neuron einer Eingabe (*input*)-Schicht (die multivariaten Daten) ist mit jedem Neuron der verdeckten Schicht

2 Material und Methoden

verbunden, welche wiederum mit einer Schicht von Ausgabe (*output*)-Neuronen verbunden sind (siehe Abb. 2.3). Die Zahl der Ausgabeneuronen entspricht der Zahl der zu identifizierenden Klassen. Die abstrakten Verbindungen zwischen den Neuronen besitzen jeweils einen reellen Wert, Gewicht w_i genannt, mit dem ein die Verbindung passierender *input* i_i skaliert wird. Die Summe der „Signale“ *net* an einem Neuron der verdeckten Schicht beträgt also:

$$net = i_1w_1 + i_2w_2 + i_3w_3 + \dots + i_nw_n + \Theta = \sum_{i=1}^n i_iw_i + \Theta \quad (2.6)$$

Θ ist dabei der Schwellenwert des Neurons (der die Stelle der größten Steigung einer monoton anwachsenden Aktivierungsfunktion angibt, d. h. ab wann ein Neuron aktiv ist), n ist die Zahl der Eingabeneuronen. Die Summe der skalierten *inputs* und des Schwellenwertes wird durch eine Aktivierungsfunktion zwischen 0 und +1 skaliert, d. h. es wird ein neuer Aktivierungszustand berechnet, welcher den *output*-Wert *out* des Neurons ergibt. Als Aktivierungsfunktion gebräuchlich ist eine sigmoidale Funktion:

$$out = \frac{1}{1 + e^{-net}} \quad (2.7)$$

Die *out*-Signale jedes verdeckten Neurons werden von den Neuronen der Ausgabenschicht summiert und wiederum durch die Aktivierungsfunktion skaliert. Wenn das Netz einen *input* erhält, durchläuft dieser das Netz wie beschrieben bis zu einem Ausgabeneuron. Der Unterschied (Fehler) zwischen der tatsächlichen und der gewünschten Ausgabe wird rückwärts (gegenläufig zum Signalfluß) durch das Netz geleitet, wobei bei jedem Durchlauf die Gewichte w_i der Neuronen modifiziert werden. Dieser Zyklus wird so oft durchlaufen, bis der Fehler ein Minimum erreicht hat. Für den Lernprozeß eines ANN (d. h. die Angleichung der Gewichte etc.) existiert eine Vielzahl an Algorithmen. Der eben beschriebene Algorithmus ist der sogenannte *backpropagation*-Algorithmus. Eine Weiterentwicklung dieses Lernschemas, genannt *resilient propagation* (Rprop) (Riedmiller und Braun, 1993), benutzt für jedes Gewicht einen Änderungswert Δ_{ij} , der zur Bestimmung der Schrittweite der Gewichtsänderungen herangezogen wird. In diesen gehen der Gradient der Fehlerfunktion (Ableitung nach der Wichtung) und die beiden Lernparameter η^- und η^+ , die die Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Änderungswerte vorgeben, ein.

2.6.6.2 Aufbau von Trainings-, Validierungs- und Testdatensätzen

In dieser Arbeit wurden die neuronalen Netze zur Identifizierung von Spektren aus Scrapie-infizierten und Kontrollhirnen angewendet. Dabei wurde die Identifizierung separat für jede der untersuchten histologischen Strukturen innerhalb eines der drei Infektionsstadien durchgeführt. Mit drei untersuchten histologischen Strukturen und drei Krankheitsstadien lagen somit 9 voneinander unabhängige Datenmengen vor.

Für das Training eines MLP werden zwei Datensätze benötigt, ein sogenannter Trainingsdatensatz und ein Validierungsdatensatz. Die Größe eines Validierungsdatensatzes sollte jeweils die Hälfte der Anzahl Spektren im dazugehörigen Trainingsdatensatz

2.6 Auswertung der mikrospektroskopischen Messungen

betragen. Die Menge an Spektren, die der Identifizierung durch das neuronale Netz unterzogen werden, wird als Testdatensatz bezeichnet.

Zuerst wurde jeder Datensatz in zwei Teile im Verhältnis 2:1 aufgeteilt. In diesen Teildatensätzen wurden die Spektren in einer festen, jedoch völlig willkürlichen Folge angeordnet. Nun wurden die unabhängigen Testsätze (die aus Spektren bestehen sollten, die weder für das Training noch für die Validierung benutzt wurden) nach folgendem Prinzip konstruiert: beginnend mit dem ersten Spektrum in jedem der beiden Teildatensätze wurde jedes siebente Spektrum entfernt und dem Testdatensatz zugeordnet. Das bei der anfänglichen Aufteilung in die beiden Teildatensätze festgelegte Verhältnis der Spektrenzahlen von 2:1 blieb somit während der Konstruktion eines unabhängigen Testsatzes erhalten. Der größere der beiden Datensätze diente beim anschließenden Training eines Netzes als Trainings-, der kleinere als Validierungsdatsatz. Im Anschluß an das Training wurden die Spektren des Testsatzes, die weder für das Training noch für die Validierung verwendet worden waren, identifiziert.

Danach wurde der Vorgang wiederholt und wieder jedes siebente Spektrum in den Testsatz eingeordnet, diesmal jedoch beginnend mit dem zweiten Spektrum in der anfangs festgelegten Reihenfolge der Spektren. Die Spektren, die vorher den Testsatz gebildet hatten, waren damit Teile des Trainings- bzw. Validierungssatzes. Dem Rotationsprinzip folgend wurden so 7 unabhängige Testsätze erstellt und 7 voneinander unabhängige Netze trainiert. Auf diese Weise wurden alle Spektren einer histologischen Struktur in einem Infektionsstadium unabhängig voneinander durch neuronale Netze identifiziert. Die für das Training verwendeten spektralen Merkmale waren für diese 7 Netze identisch, sie wurden vor dem Training des ersten Netzes festgelegt (siehe 2.6.6.3).

2.6.6.3 Merkmalsselektion

Für das Training der Netze wurden über den gesamten Spektralbereich vektornormierte erste Ableitungen der Originalspektren verwendet. Die Auswahl der für das Training der Netze verwendeten spektralen Merkmale wurde mit dem Modul „Selektion“ der Software SYNTHON NeuroDeveloper 2.1 vorgenommen. Um die Zahl der Daten zu reduzieren, wurde zunächst der Mittelwert über jeweils zwei benachbarte Datenpunkte im Spektrum gebildet. Auf Grundlage von visuellen Unterschieden in Mittelwertspektren und Klassifizierungsergebnissen bei Clusteranalysen wurden nun spektrale Fenster definiert, so daß Bereiche ohne verwertbare spektrale Information, z. B. zwischen 2700 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} , ausgeschlossen wurden. Innerhalb der ausgewählten Spektralbereiche wurden mittels Varianzanalyse die Wellenzahlen, die sich in den vorgegebenen Klassen signifikant unterschieden, ausgewählt. Die Zahl dieser so ausgewählten Datenpunkte überschritt jedoch trotz Eingrenzung der spektralen Fenster in einigen Datensätzen die Zahl der für das Training vorhandenen Spektren, so daß das Verhältnis von Spektren zu angleichbaren Gewichten zu niedrig und die Trainierbarkeit des Netzes dadurch eingeschränkt gewesen wären. Deshalb wurde für einen minimalen Signifikanzwert zudem eine maximale Anzahl signifikanter Datenpunkte festgelegt, die für das Training verwendet werden durften. In vielen Fällen lag

jedoch die Zahl der ausgewählten Datenpunkte für ein festgelegtes Signifikanzniveau α weit unterhalb der Größe des Trainingsdatensatzes, so daß diese zweite Bedingung hinfällig war.

Die zur Merkmalsselektion verwendete einfaktorische Varianzanalyse hat sich beispielsweise auch für die Klassifizierung von Bakterien-Spektren mit Hilfe neuronaler Netze bewährt (Udelhoven et al., 2000) und ist in SYNTHON NeuroDeveloper 2.1 implementiert. Sie überprüft den Einfluß einer unabhängigen Variablen (der spektralen Klassen) auf eine abhängige Variable (die Spektrenwerte), deren Varianz untersucht wird. Für den Vergleich der beobachteten Varianzen s^2 wird eine F -Verteilung herangezogen:

$$F_{emp} = \frac{s_{zwischen}^2}{s_{innerhalb}^2} = \frac{\frac{1}{k-1} \sum_i n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{\frac{1}{n-k} \sum_{i,j} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \quad (2.8)$$

n_i ist dabei die Anzahl der Spektren in einer spektralen Klasse i , \bar{x} der Gesamtmittelwert aller Klassen. Alle Datenpunkte, bei denen das Verhältnis der Varianzen s^2 innerhalb der spektralen Klasse i und zwischen den Klassen einen kritischen F -Wert überschreitet, welcher durch das Signifikanzniveau α , die Anzahl der spektralen Klassen k und die Gesamtzahl n der Spektren x_{ij} festgelegt ist, kommen für das Netzwerktraining in Frage und werden vom NeuroDeveloper in eine Datei geschrieben. Existieren mehr als zwei spektrale Klassen, muß jedoch überprüft werden, ob sich wirklich alle Gruppen-Mittelwerte \bar{x}_i signifikant voneinander unterscheiden, oder ob einer der Mittelwerte als Ausreißer einen signifikanten F -Wert verursacht hat. Dafür kann mit dem SYNTHON NeuroDeveloper 2.1 auch der Scheffé-Test (Scheffé, 1953) durchgeführt werden, bei dem eine kritische Mittelwertsdifferenz Diff_{krit} zwischen einzelnen Gruppen j und l überschritten werden muß:

$$\text{Diff}_{krit} = \sqrt{\left(\frac{1}{n_j} + \frac{1}{n_l}\right) \cdot (k-1) \cdot s_{innerhalb}^2 \cdot F_{(k-1, n-k, 1-\alpha)}} \quad (2.9)$$

2.6.6.4 Training der Netze und Identifizierung von Spektren

Für das Training der Netze wurde ebenfalls die im vorigen Abschnitt 2.6.6.3 erwähnte Software SYNTHON NeuroDeveloper 2.1 verwendet. Es wurden damit 3-schichtige *multilayer*-Netze konstruiert (siehe 2.6.6.1). Die Zahl der Eingabeneuronen entsprach dabei der Zahl der selektierten Datenpunkte, die verdeckte Schicht bestand aus 10–20 % der Anzahl der Eingabeneuronen, und die Ausgabeschicht enthielt entsprechend den beiden Kategorien „infiziert“ und „nicht-infiziert“ zwei Neuronen. Die Netze wurden mit dem Rprop-Algorithmus trainiert. Die verwendeten Lernparameter besaßen folgende, in der Software voreingestellte Werte: $\eta^- = 0,5$, $\eta^+ = 1,2$, $\Delta_{max} = 50$, $\Delta_0 = 0,1$. Das Training wurde nach Erreichen des minimalen *sum-squared error* für den Validierungsdatensatz abgebrochen und das trainierte Netz gespeichert.

Für die Identifizierung der Spektren aus den Testdatensätzen wurden die Netzdateien wieder geladen und das Klassifizierungsergebnis evaluiert. Hierfür wurde das sogenannte *winner takes all*-Kriterium verwendet. Dabei mußte die Aktivierung eines

Neurons der Ausgabeschicht den kritischen Betrag 0,7 überschreiten und die Differenz der höchsten und zweithöchsten Aktivierung mindestens 0,3 betragen. Wenn dies nicht zutraf, galt das Spektrum als nicht klassifizierbar. Das Klassifizierungsergebnis wurde mit der tatsächlichen Herkunft der jeweiligen Spektren aus infizierten bzw. Kontrolltieren verglichen.

2.6.7 Zusammenfassung der Vorgehensweise bei der Auswertung der mikrospektroskopischen Daten des Hirngewebes

Zum besseren Verständnis sollen vor einer detaillierten Darstellung der Versuchsergebnisse an dieser Stelle noch einmal die zum Teil bereits aus den vorigen Abschnitten in diesem Kapitel hervorgehende Auswertungstaktik und die verwendeten Methoden kurz zusammengefaßt werden. Auf Grundlage der zuerst durchgeführten Übersichtsmessungen in jeder der zwei untersuchten Schnittebenen wurde nach einer groben Kartierung mit Hilfe eines *chemical mapping* und dem Vergleich mit den histologischen Färbungen Detailmessungen durchgeführt. In diesen sind die zu untersuchenden Hirnstrukturen bereits grob eingegrenzt. Anhand von Clusteranalysen und einer erneuten, auf der Clusteranalyse basierenden Kartierung wurden zunächst hirnstrukturspezifische Spektren aus den Datensätzen dieser Detailmessungen ausgewählt (Abschnitte 3.2 und 3.3). Für die Vergleiche von Daten aus den Kontrollhirnen mit denjenigen aus Scrapie-infiziertem Gewebe wurden jeweils Spektren identischer anatomischer Strukturen verglichen. Hierbei fanden Clusteranalysen und künstliche neuronale Netze, sowie der Vergleich von Mittelwertspektren Verwendung (Abschnitt 3.4).

2 *Material und Methoden*

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Merkmale der Hirngewebspektren

3.1.1 Absorptionscharakteristik

In Abb. 3.1 auf der nächsten Seite ist eine Auswahl typischer Spektren aus mikrospektroskopischen Messungen von Hirngewebe gezeigt. Die dargestellten Einzelspektren wurden weder basislinienkorrigiert noch normiert oder auf andere Weise vorbehandelt und sind in der Intensität und den Absorptionsmerkmalen repräsentativ für ihre Gruppen in allen untersuchten Proben. Alle Spektren besitzen die für Gewebe charakteristischen Absorptionsbanden in den verschiedenen Frequenzbereichen des mittleren Infrarotspektrums. Sie lassen sich grob in drei spektrale Bereiche aufteilen. Zwischen 3050 und 2800 cm^{-1} wird die Absorption durch Banden der asymmetrischen und symmetrischen C–H-Streckschwingungen der CH_2 - und CH_3 -Methylengruppen von Fettsäuren, die z. B. Bestandteil von Zellmembranen sind, dominiert. Wie aus Abb. 3.1a hervorgeht und mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, sind diese Banden im Spektrum der weißen Substanz besonders prominent ausgeprägt, eine spektrale Eigenschaft, die auf den hohen Myelingeht dieser Struktur zurückführbar ist. Um 3012 cm^{-1} befindet sich in allen Spektren eine kleine, deutliche Bande der C–H-Streckschwingungen in =C–H-Gruppen der ungesättigten Fettsäuren.

In der Region zwischen 1800 und 1500 cm^{-1} sind die C=O-Streckschwingung von Estern bei 1738 cm^{-1} neben der Amid I (1656 cm^{-1}) und der Amid II-Bande (1544 cm^{-1}) deutlich zu erkennen. Unterhalb von 1500 cm^{-1} fallen die Banden der asymmetrischen (1466 cm^{-1}) und der symmetrischen (1391 cm^{-1}) CH-Biegeschwingung von CH_2 -Gruppen auf, wiederum besonders intensiv in den Spektren der weißen Substanz (siehe Abb. 3.1a, blaues Spektrum). Zu niedrigeren Schwingungsenergien hin schließt sich der sogenannte „Fingerprint-Bereich“ der Spektren an, der Beiträge verschiedener funktioneller Gruppen bzw. Moleküle enthält, wie z. B. die asymmetrische (1239 cm^{-1}) und symmetrische (1080 cm^{-1}) P=O-Streckschwingung von Phosphodiestergruppen tragenden Molekülen, die asymmetrische O=C–O–C-Streckschwingung bei 1170 cm^{-1} , sowie Beiträge verschiedener Ringschwingungen von Polysacchariden und Schwingungen im Rückgrat von Nukleinsäuren.

Die hier beschriebenen Absorptionsbanden sind in allen Spektren des Hirngewebes vorhanden. Ihre Intensität und die genauen Positionen ihrer Maxima sind in den verschiedenen untersuchten Hirnstrukturen unterschiedlich. So lassen sich, wie bereits oben erwähnt, weiße und graue Substanz (z. B. Kerne im Cerebellum) al-

3 Ergebnisse

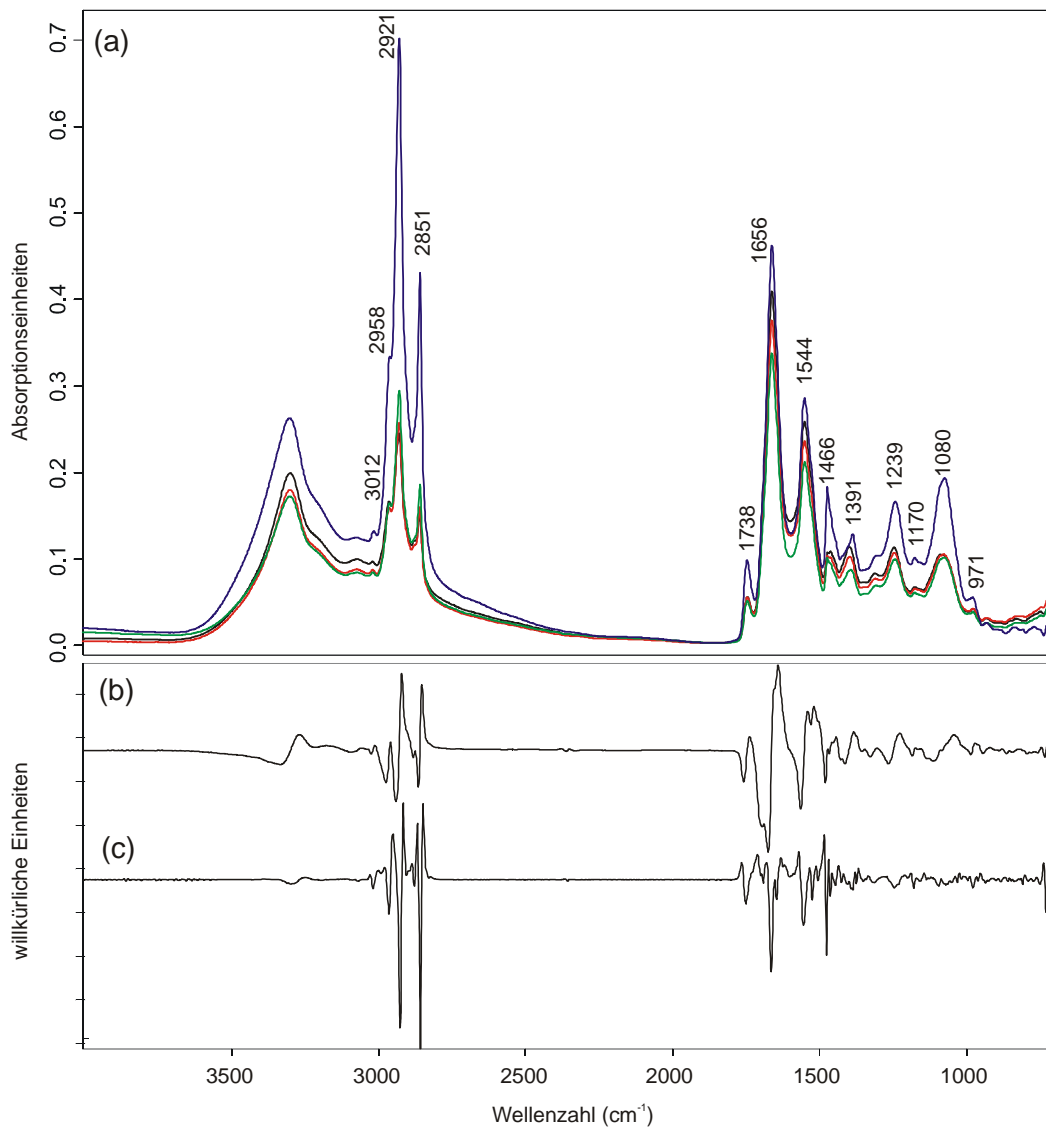


Abbildung 3.1: (a) Originalspektren der untersuchten anatomischen Strukturen in den Ebenen I und II (vgl. Abb. 2.1 auf Seite 27). Aus den Messungen an Schnitt Ebene I sind ein Spektrum aus dem Nucleus nervi hypoglossi (rot) und ein Spektrum aus dem Nucleus dorsalis nervi vagi (schwarz) dargestellt, aus den Messungen an Ebene II ein Spektrum der weißen Substanz aus der cerebellären Marklamelle (blau) und ein Spektrum aus dem Nucleus interpositus cerebelli (grün). Die für Hirngewebe charakteristischen Absorptionsbanden sind in (a) gekennzeichnet. Sie sind in allen Spektren vorhanden. (b) Erste Ableitung des roten Spektrums. (c) Zweite Ableitung des blauen Spektrums.

lein anhand der Intensität der charakteristischen Lipidabsorptionsbanden zwischen 3050 und 2800 cm^{-1} voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 3.1a). In den nächsten Abschnitten werden verschiedene Klassifizierungskriterien für Spektren unterschiedlicher histologischer Strukturen unter Zuhilfenahme eines oder mehrerer der hier aufgeführten spektralen Merkmale angewendet werden. Für die Auswertungen wurden, wie in Abschnitt 2.6.1 bereits beschrieben, häufig die Ableitungen der Originalspektren verwendet. Abb. 3.1b und c zeigen eine erste bzw. eine zweite Ableitung von zwei der in a dargestellten Hirngewebsspektren. In der ersten Ableitung erscheinen die Absorptionsmaxima als Nulldurchgänge, in der zweiten Ableitung als Minima. Hier ist eine deutliche Anschärfung der Banden zu beobachten (siehe Abb. 3.1c).

3.1.2 Qualität der Spektren

Beim Betrachten der Originalspektren sind die unterschiedlichen Absorptionsintensitäten der Spektren aus den verschiedenen Gewebestrukturen besonders auffällig. Aufgrund dieser Intensitätsunterschiede wurden die Spektren vor allen vergleichenden Auswerteschritten vektornormiert (vgl. auch 2.6). Da die Spektren der weißen Substanz extrem hohe Absorptionsintensitäten im Bereich der C–H-Streckschwingungen aufwiesen (siehe Abb. 3.1), bei welcher die Linearitätsbedingung des MCT-Detektors (Absorption < 1) gerade noch erfüllt war und andererseits jedoch die Absorption der Strukturen in der grauen Substanz noch eine genügend hohe Intensität auch im intensitätsschwächeren „Fingerprint-Bereich“ besitzen mußten, war die gewählte Schichtdicke von 10 μm die einzige Möglichkeit, die Auswertbarkeit aller in einem Datensatz enthaltenen Spektren zu gewährleisten. Die Schnitte besaßen im gefrorenen, vollhydratisierten Zustand eine homogene Schichtdicke. Nach dem vollständigen Antrocknen waren die verschiedenen Strukturen dann aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte verschieden dick und daher allein anhand der optischen Dichte unterscheidbar.

Die Absorptionsintensitäten waren innerhalb einer bestimmten histologischen Struktur in allen 24 untersuchten Proben gut reproduzierbar. Unter Verwendung der ersten Ableitungen wurde das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) für den Amid I-Bereich (1700–1600 cm^{-1}) und für den „Fingerprint-Bereich“ (1450–950 cm^{-1}) bestimmt. Im Amid-Bereich betrug das S/N zwischen 500 und 670 in allen Spektren, bei 1450–950 cm^{-1} zwischen 60 und 80 in den Strukturen der grauen Substanz und in den Spektren der weißen Substanz ungefähr 120.

Neben dem Signal/Rausch-Verhältnis wurde beim Qualitätstest (siehe 2.6.1) auch der Wasserdampfgehalt der Spektren bestimmt. Die Intensität der beiden Indikatorbanden (1792,4 cm^{-1} und 1844,6 cm^{-1}) überschritt i. d. R. nicht die Werte 2×10^{-5} bzw. 3×10^{-5} in den zweiten Ableitungen. In einigen Datensätzen waren jedoch stärkere Schwankungen in der Absorption von Wasserdampf beobachtbar. Bei Spektren, die eine höhere Wasserdampfabsorption zeigten, wurde vor der Auswertung des Amid-Bereiches deshalb eine Wasserdampfkorrektur durchgeführt (siehe 2.6.1).

3.2 Spektrale Charakterisierung von Ebene I (Hirnnervenkerne in der Medulla oblongata)

3.2.1 Ergebnisse der histologischen Färbungen und *chemical mapping* der Hirnnervenkerne auf Grundlage des Proteingehalts

Für die Datensätze aus den Übersichtsmessungen von Ebene I, welche zunächst mit einem Blendendurchmesser von 100 μm in jeder Probe durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 2.3.4), wurden *chemical maps* auf Grundlage des sogenannten Protein/Lipid-Verhältnisses angefertigt (siehe 2.6.2). Hierfür wurde für jedes Spektrum eines Datensatzes das Verhältnis der Integrale der Amid I und -II-Banden (integrale Intensität zwischen 1700 und 1480 cm^{-1}) und der CH-Streckschwingungsbanden der CH_2 - und CH_3 -Gruppen, die hauptsächlich in langkettigen Fettsäuren enthalten sind, bestimmt (integrale Intensität zwischen 3000 und 2838 cm^{-1}). Die Amid-Region wird durch die Absorption von Proteinen dominiert und diente daher als Indikator für den Proteingehalt, während die Absorptionsintensität des „Fettsäurebereiches“ als proportional zur Lipid-Konzentration angesehen wurde. Die Übersichtskarten ähnelten sich stark in den verschiedenen Hirnen. Aus Platzgründen ist hier exemplarisch eine der 24 IR-Karten abgebildet. Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite zeigt eine Übersichtsmessung in Ebene I der Probe o33. Die Kerne in der Medulla oblongata haben einen relativ hohen Proteingehalt und sind deshalb von der sie umgebenden, lipid-reichen weißen Substanz gut abgrenzbar. Ein Vergleich dieser IR-Übersichtskarte mit der daneben dargestellten Kresylviolett-Färbung des angrenzenden Schnittes und mit einem anatomischen Atlas (Franklin und Paxinos, 1997) ermöglichte die Zuordnung der Kerne der Hirnnerven und eine Eingrenzung eines Areals für die folgende Detailmessung, welches als Gitter in der Übersichtskarte eingezeichnet ist. Das Protein/Lipid-Verhältnis unterschied sich zwischen dem dorsaler lokalisierten Bereich von Nucleus dorsalis nervi vagi (im folgenden abgekürzt als DMNV) und Nucleus tracti solitarii (SolN) und dem ventral darunter liegenden Nucleus nervi hypoglossi (HypN) deutlich, der HypN erschien proteinärmer. Histologisch unterscheiden sich die beiden Bereiche durch eine unterschiedliche Dichte an Zellkörpern, im HypN liegen die Neuronen stärker vereinzelt vor, während sie in DMNV und SolN dichter beieinander liegen. Auch in lichtmikroskopischen Bildern der ungefärbten Präparate konnte man die beiden Strukturen in den angetrockneten Proben grob unterscheiden, allerdings waren hier natürlich keine Zellen erkennbar.

Eine Kartierung dieser Kerne auf Grundlage der PLV-Daten aus den Detailmessungen zeigte ebenfalls ein reduziertes Protein/Lipid-Verhältnis für den HypN (PLV zwischen 1,0 und 2,5) im Vergleich zum DMNV und SolN (PLV zwischen 2,78 und 4,5) (siehe Abb. 3.3 auf Seite 50). DMNV und SolN waren auf Basis des Proteingehalts nicht gut voneinander unterscheidbar. Aus Platzgründen können die Detailkarten wiederum nur für eine Auswahl von Proben gezeigt werden. Die Rekonstruktion dieser Karten erfolgte im Gegensatz zu der in Abb. 3.2 gezeigten Übersichtskarte ohne farb-

3.2 Spektrale Charakterisierung von Ebene I (Hirnnervenkerne in der Medulla oblongata)

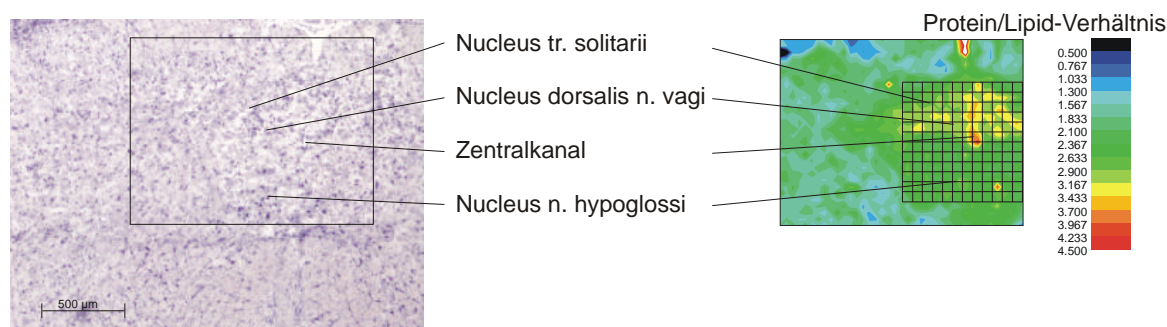


Abbildung 3.2: *Chemical map* von Ebene I. Übersichtskarte, basierend auf dem Protein/Lipid-Verhältnis der Infrarotspektren (rechts) und Kresylviolett-Färbung des angrenzenden Schnittes (links). Es sind die Daten für ein Individuum (o33) dargestellt. Die Messungen wurden mit einem Blendendurchmesser von $100\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Die wichtigsten Kerne in der Medulla oblongata wurden beschriftet. Das Gitter markiert das Areal, das für die detaillierte Messung in dieser Probe festgelegt wurde (siehe auch Abb. 3.3).

liche Interpolation zwischen den einzelnen Pixeln, d. h. jedes Pixel in einer solchen Karte repräsentiert mit seinem Farbwert das PLV genau eines Spektrums. In Abgrenzung zu Mittelwertspektren werden die Einzelspektren einer *mapping*-Messung in den folgenden Abschnitten auch häufig als „Pixelspektren“ bezeichnet werden.

3.2.2 Klassifizierung der Spektren der Hirnnervenkerne mittels Clusteranalyse

Um neben Proteinen und Lipiden möglichst auch andere Moleküle, wie z. B. Kohlenhydrate und Nukleinsäuren zur Unterscheidung histologischer Strukturen mittels spektraler Informationen heranzuziehen, wurden Clusteranalysen als multivariate, hierarchische Klassifizierungsmethoden mit allen Datensätzen der detaillierten Messungen durchgeführt. Hierfür wurde der gesamte Bereich von 1480 bis $950\ \text{cm}^{-1}$ verwendet, weil dieser Absorptionsbeiträge aller Molekülgruppen in Form von Schwingungen der Lipide (Biegeschwingungen), Estergruppen, Phosphatgruppen, Kohlenhydrate (Ring-schwingungen), Nukleinsäuren etc. enthält. Für die Clusteranalyse wurden jeweils die 1. Ableitungen aller Pixelspektren eines Datensatzes verwendet. Die Anzahl der Spektren in allen Detailmessungen von Ebene I sind in Tab. 3.1 auf Seite 51 für alle Proben aufgeführt. In Abb. 3.4 ist ein typisches Ergebnis einer solchen Clusteranalyse für die Kerne aus Ebene I in Form eines Dendrogrammes dargestellt. In der Karte ist das Klassifizierungsergebnis für jedes Spektrum des Datensatzes aufgetragen. Mit der Clusteranalyse konnte eine Abgrenzung der Spektren aus unterschiedlichen histologischen Strukturen voneinander erreicht werden. Es zeigte sich, daß die beiden Hauptklassen im Dendrogramm den Spektren von DMNV und SolN einerseits und Spektren von HypN andererseits zuzuordnen waren. Die Heterogenität zwischen beiden Hauptklassen stellt ein Maß für die spektrale Distanz (vgl. Dendrogramm in

3 Ergebnisse

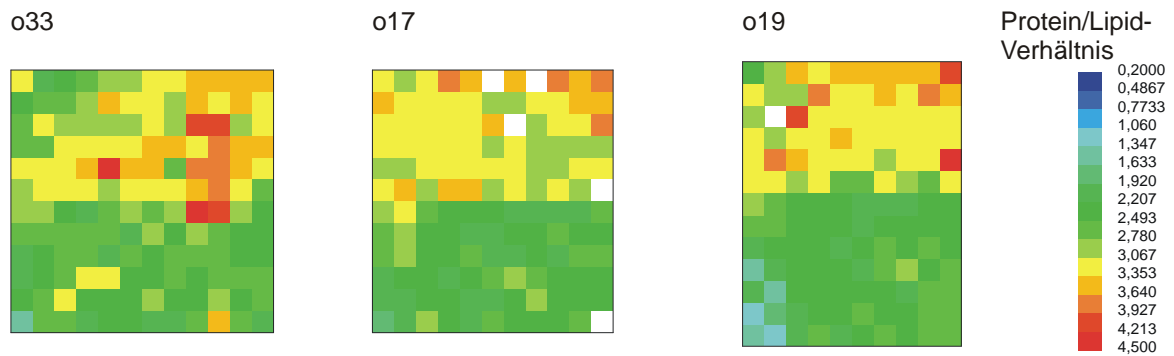


Abbildung 3.3: *Chemical maps* ohne Interpolation zwischen den Pixelspektren für die Detailmessungen in Ebene I. Der Bereich enthält die Kerne HypN und DMNV/SolN. Die Messungen wurden mit einem Blendendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Für jedes Spektrum, repräsentiert durch ein Pixel, wurde das Protein/Lipid-Verhältnis als Funktion des Ortes aufgetragen. Dargestellt sind die Karten exemplarisch für die drei Proben o33, o17 und o19 (v. l. n. r.). Die Unterschiede in der Karte von Probe o33 im Vergleich zum dargestellten Raster in Abb. 3.2 erklären sich durch die Verwendung einer kleineren Blende bei diesen Messungen und der damit verbundenen unterschiedlichen Ortsauflösung.

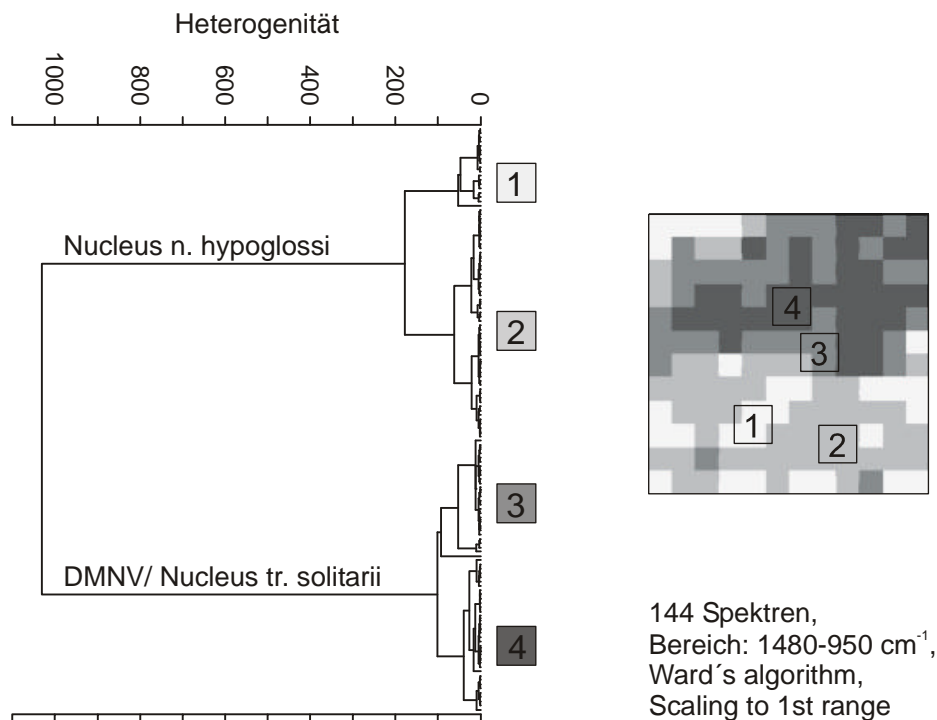


Abbildung 3.4: Ergebnis einer Clusteranalyse mit den Daten aus einer Detailmessung in Ebene I unter Benutzung der spektralen Information im Bereich $1480-950\ \text{cm}^{-1}$. Dendrogramm (links) und Muster-basierte Karte des Gewebeausschnitts (rechts). Dargestellt ist der Datensatz für ein Individuum (o33) (vgl. Abb. 3.3).

3.2 Spektrale Charakterisierung von Ebene I (Hirnnervenkerne in der Medulla oblongata)

Tabelle 3.1: Anzahl der Spektren der Detailmessungen in den Ebenen I und II für alle Hirne und dazugehörige maximale *inter-class*-Heterogenitäten als Ergebnisse der Clusteranalysen zur Identifizierung der histologischen Strukturen

Zeitpunkt	Probe	Ebene I				Ebene II				Σ IntN	Σ weiße Substanz
		Spektrenzahl	Heterogenität	Σ DMNV/ SolN	Σ HypN	Spektrenzahl	Heterogenität	Σ IntN	Σ weiße Substanz		
90 d.p.i.	S	o17	132	1200	122	228	156	250	403	52	
		o18	130	900			143	400			
		o19	130	1200			132	1200			
		o20	126	1000			135	400			
	N	o21	130	1100	94	233	143	700	397	88	
		o22	130	1400			144	450			
		o23	130	1000			130	300			
		o24	130	1100			117	600			
120 d.p.i.	S	o25	126	900	119	184	126	500	319	88	
		o26	130	1200			130	1000			
		o27	143	1400			110	1600			
		o28	126	1000			99	450			
	N	o29	104	600	107	122	121	1700	335	63	
		o30	104	1100			135	900			
		o31	130	700			108	800			
		o32	120	700			132	700			
terminal	S	o33	144	1100	229	210	156	1800	362	123	
		o34	132	1500			130	800			
		o35	144	1100			130	450			
		o36	156	3000			121	800			
	N	o37	154	3000	178	223	117	350	364	62	
		o38	126	1400			130	400			
		o39	143	900			126	800			
		o40	156	600			144	700			

Abb. 3.4) zwischen allen Strukturen innerhalb der Meßfläche dar. Sie diene der groben Abschätzung für die Unterschiedlichkeit der Strukturen und ist für alle anderen Proben ebenfalls in Tab. 3.1 enthalten. Sie ist jedoch u. a. von der Zahl der Spektren im Datensatz abhängig.

Innerhalb jeder der beiden großen Klassen DMNV/SolN und HypN ließen sich Untergruppen von Spektren erkennen (in Abb. 3.4 numeriert von 1–4). Es ließe sich vermuten, daß die Unterklassen 3 und 4 eine Aufspaltung der Spektren der Strukturen DMNV und SolN darstellen. Dieser Annahme sprach jedoch die räumliche Verteilung der in den Clustern enthaltenen Spektren im Vergleich mit der Histologie entgegen. Es ist mit dem derzeitigen Stand der Methoden nicht möglich, herauszufinden, ob und welche histologischen (Sub)strukturen innerhalb von DMNV, SolN und HypN durch die spektralen Unterklassen repräsentiert werden. In den nachfolgenden Vergleichen werden aus diesem Grunde die Spektren von DMNV und SolN als eine spektrale Klasse, bezeichnet als DMNV/SolN, betrachtet.

Einige Spektren, die in Abb. 3.4 der Klasse HypN (Klassen 1 und 2) zugeordnet werden, gehörten aufgrund ihrer Topologie in der Muster-basierten Karte nicht zum HypN sondern eher zu einem an den SolN grenzenden Kern (möglicherweise der dorsale oder intermediäre Nucleus reticularis). Eine solche Klassifizierung von Spektren, welche weder zu HypN noch zu DMNV/ SolN gehören, trat bei einigen wenigen (2–3) Messungen auf, bei denen neben Spektren dieser Kerne noch ein geringer Teil eines anderen Kerns in der Medulla oblongata in der Umgebung des intermediären SolN mit vermessen wurde. Eine falsche Zuordnung zum HypN für die späteren Auswertungen wurde jedoch in allen Fällen durch die räumliche Zuordnung vermieden.

3.2.3 Extraktion von Einzelspektren von DMNV/ SolN und HypN auf Basis der Klassifizierungsergebnisse

Eine der Grundvoraussetzungen für den im Abschnitt 3.4 beschriebenen Vergleich von Spektren aus infizierten und Kontrollhirnen ist die Betrachtung identischer histologischer Strukturen. Deshalb wurden auf Grundlage der Clusteranalysen der Detailmessungen in der Medulla oblongata aus jedem Datensatz alle Spektren der Klasse DMNV/ SolN wie unter 2.6.5 beschrieben isoliert. Derselbe Vorgang wurde für alle Spektren der Klasse HypN wiederholt. Die Spektren lagen nun sortiert nach den drei betrachteten Infektionsstadien und nach der Art der Probe in „Scrapie-infiziert“ (S) und „nicht-infiziert“ (N) vor, so daß für jede histologische Struktur 6 Kategorien existierten. Die Anzahl der Spektren in jeder dieser Kategorien ist für alle untersuchten Strukturen in Tab. 3.1 wiedergegeben.

3.3 Spektrale Charakterisierung von Ebene II (Region der Kleinhirnkerne)

3.3.1 Histologische Merkmale und *chemical mapping* der untersuchten Kleinhirnregion

Wie für die Übersichtsmessungen in der Medulla oblongata (siehe 3.2.1) wurden auch für die Schnitte im Bereich der Kleinhirnkerne (Ebene II) Übersichtskarten zur Erleichterung der Orientierung in der Probe angefertigt (Beispiel in Abb. 3.5 auf der nächsten Seite). Die Auftragung des Protein/Lipid-Verhältnisses ergibt ein kontrastreiches Bild, in welchem beim Vergleich mit dem parallelen, Nissl-gefärbten Schnitt alle in diesem Ausschnitt enthaltenen Strukturen des Kleinhirnes gut erkennbar waren. Die Schichten des cerebellären Cortex, insbesondere das Stratum granulosum wiesen aufgrund ihrer hohen Dichte an kleinen, eng beieinanderliegenden Neuronen einen hohen PLV (ca. 4,5) auf, während das PLV der Marklamelle (Substantia alba) deutlich unterhalb von 1 lag. Eingebettet in die weiße Substanz sind der Nucleus medialis cerebelli und der Nucleus interpositus cerebelli als protein-reichere Strukturen mit einem PLV von 1,3 bis 2,9 deutlich erkennbar. Die Schnittebene lag caudal vom Nucleus lateralis, so daß dieser der drei Kleinhirnkerne nicht in den Schnittebenen enthalten war.

Ausgehend von den Übersichtskarten wurde in Ebene II anschließend eine detaillierte Messung im Bereich des Nucleus interpositus (IntN) in allen Hirnen durchgeführt. Analog zur Vorgehensweise in Ebene I (vgl. Abb. 3.3 auf Seite 50) wurde der relative Proteingehalt als Funktion des Ortes ohne Interpolation zwischen den Pixelspektren aufgetragen (siehe Abb. 3.6). Das Beispiel o27 in Abb. 3.6 zeigt, daß die Unterscheidung zwischen Spektren des IntN und denen des auf der rechten Seite angrenzenden Stratum granulosum (vgl. auch mit der Darstellung in Abb. 3.5) nur auf Grundlage des PLV nicht möglich ist. Hier liefert die Topologie in den Karten die für die Strukturunterscheidung notwendige Information.

3.3.2 Klassifizierung der Spektren mittels Clusteranalyse

Mit Hilfe der Clusteranalyse über den Bereich $1480\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, die analog zu den Detailmessungen in Ebene I auch für die Messungen des Nucleus interpositus durchgeführt wurde, können für das Beispiel o27 drei Hauptklassen im Dendrogramm unterschieden werden (siehe Abb. 3.7 auf Seite 55). Eine orts aufgelöste Darstellung des Klassifizierungsergebnisses (rechts in Abb. 3.7) zeigt, daß sich die Spektren des IntN (Klasse 2 im Dendrogramm) von denen der anderen eventuell in der Messung enthaltenen Strukturen grauer Substanz (Klasse 3, Stratum granulosum, ein Teil des Nucleus vestibularis in der unterhalb angrenzenden Medulla oblongata und den Zwischenraum auskleidende Ependymzellen) mit Hilfe der Clusteranalyse unterscheiden lassen. Einige der in diesem Bereich liegenden Spektren wurden auch zur Klasse 2 (IntN) zugeordnet (siehe Abb. 3.7), aufgrund ihrer Ortszuordnung wurden sie jedoch nicht für die weiteren Auswerteschritte verwendet. In fast allen Fällen enthielten die Datensätze jedoch nur

3 Ergebnisse

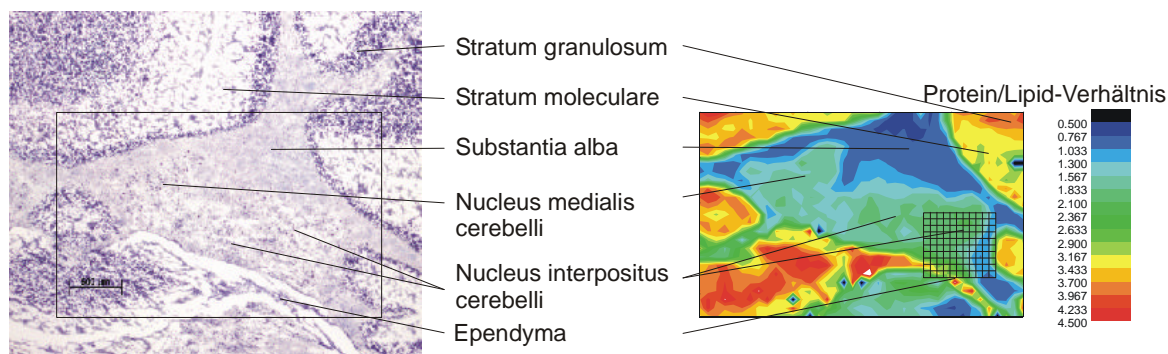


Abbildung 3.5: *Chemical Map* von Ebene II. Übersichtskarte, basierend auf dem Protein/Lipid-Verhältnis der Infrarotspektren (rechts) und Kresylviolett-Färbung des angrenzenden Schnittees (links). Die Daten sind exemplarisch für ein Individuum (o27) dargestellt. Die Messungen wurden mit einem Blendendurchmesser von $100\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Die Kleinhirnerne und andere Cerebellum-Strukturen wurden beschriftet. Das Gitter gibt das für die detaillierte Messung an dieser Probe eingegrenzte Areal an (vgl. auch Abb. 3.6).

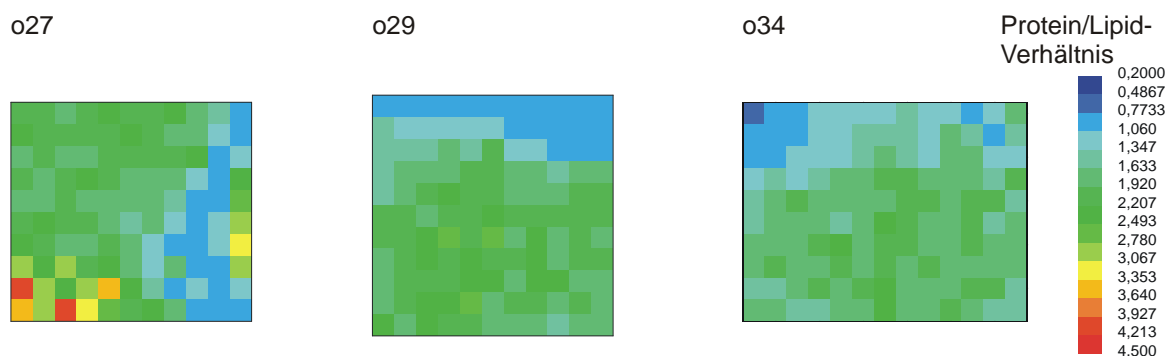


Abbildung 3.6: *Chemical maps* ohne Interpolation für die Detailmessungen in Ebene II. Der Bereich enthält Teile des Nucleus interpositus (grün) und an ihn grenzende weiße Substanz der Marklamelle (blau). Für jedes Spektrum, repräsentiert durch ein Pixel, wurde das Protein/Lipid-Verhältnis als Funktion des Ortes aufgetragen. Dargestellt sind die Karten für die drei Proben o27, o29 und o34 (v.l.n.r.) Die Messungen wurden mit einem Blendendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ durchgeführt.

Spektren von IntN und von umgebender weißer Substanz der Marklamelle (siehe z. B. o29 und o34 in Abb. 3.6). Die maximalen Heterogenitäten zwischen den Spektren der weißen Substanz und denen von IntN in den Dendrogrammen für die Detailmessungen in Ebene II sind zusammen mit der Anzahl der Spektren pro Datensatz für alle Hirne in Tab. 3.1 auf Seite 51 enthalten.

3.3 Spektrale Charakterisierung von Ebene II (Region der Kleinhirnkerne)

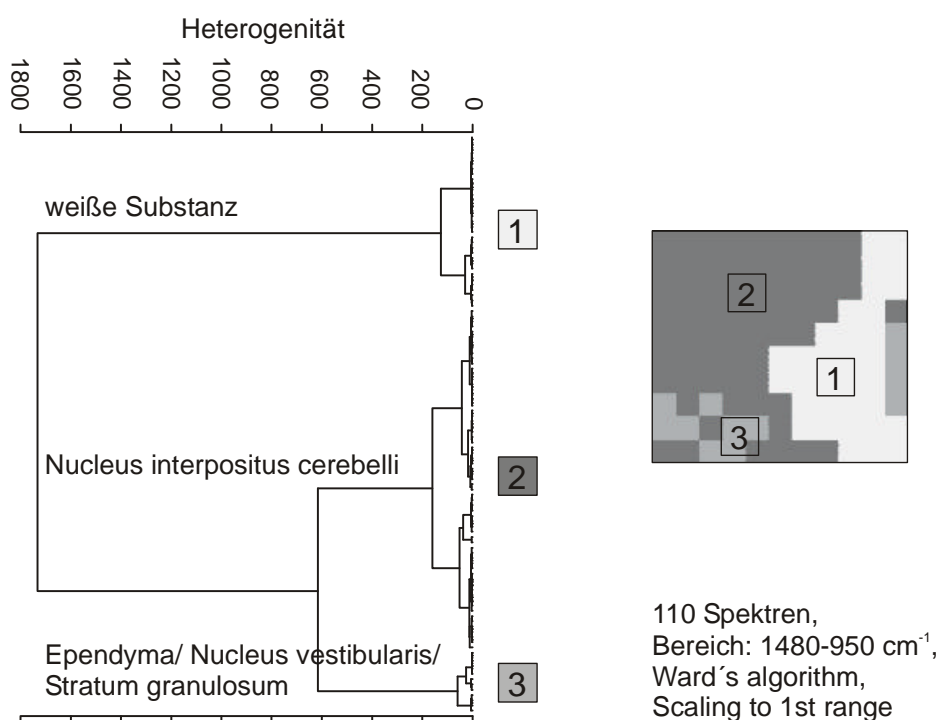


Abbildung 3.7: Ergebnis einer Clusteranalyse mit den Daten aus einer Detailmessung in Ebene II unter Benutzung der spektralen Information im Bereich 1480–950 cm⁻¹. Dendrogramm (links) und Muster-basierte Karte des Gewebeausschnitts (rechts). Es wurde der Datensatz für ein Individuum (o27) dargestellt (vgl. Abb. 3.6).

3.3.3 Auswahl und Extraktion von Einzelspektren von IntN und weißer Substanz auf Basis der Klassifizierungsergebnisse

Wie für die Datensätze von Ebene I bereits unter 3.2.3 beschrieben wurde, konnten auf Basis der Clusteranalyse-Ergebnisse die für den Vergleich von Spektren aus infiziertem und gesundem Gewebe notwendigen Spektren identischer Kerngebiete aus den Datensätzen extrahiert werden. Im untersuchten Kleinhirnbereich soll sich der Vergleich auf die Spektren von IntN und (mit Einschränkungen wegen geringer Anzahl) auf diejenigen der weißen Substanz der Marklamelle beschränken, da diese in allen Messungen enthalten und durch Clusteranalyse gut voneinander und von eventuell in den Datensätzen enthaltenen Spektren anderer Strukturen trennbar waren. Die Anzahl der Spektren von IntN und weißer Substanz eines jeweiligen Infektionsstadiums ist für die Spektren der infizierten (S) und der Kontrolltiere (N) in Tab. 3.1 auf Seite 51 vermerkt. Die Spektren der weißen Substanz wurden mit für den Vergleich von Scrapie-infizierten mit Kontrollhirnen herangezogen, weil sie zufällig in allen Datensätzen von Ebene II enthalten waren. Da ihre Anzahl im Vergleich zu den Spektren von IntN und denen von DMNV/SolN und HypN in der Medulla oblongata jedoch sehr gering war (siehe Tab. 3.1 auf Seite 51), konnten einige Auswertungen mit ihnen

nicht vergleichbar durchgeführt werden.

3.4 Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren

3.4.1 Berechnung von Mittelwerten aus Einzelspektren

Viele der nach den Clusteranalyse-Ergebnissen sortierten Einzelspektren wurden neben den in Abschnitt 3.1 aufgeführten Qualitätskriterien auch auf spektrale Merkmale, welche Spektren aus Scrapie-infizierten und Kontrolltieren unterscheidbar machen könnten, untersucht. Dabei fielen besonders bei den Spektren aus den Tieren im terminalen Krankheitsstadium bereits mehrere Unterschiede gegenüber Spektren aus den Kontrollen auf. Ein systematischer Vergleich der Spektren für jede untersuchte Struktur und jeden Zeitpunkt war auf diese Weise aufgrund der sehr großen Zahl von ungefähr 4700 Einzelspektren jedoch unmöglich. In den Abschnitten 3.5 und 3.6 wird deshalb die Klassifizierung von Einzelspektren mit Hilfe von statistischen Verfahren beschrieben. Die visuelle Abschätzung eventuell vorhandener spektraler Unterschiede vor Anwendung dieser Methoden und eine Eingrenzung der Spektralbereiche, in denen die Unterschiede auftraten, wurden an Mittelwertspektren vorgenommen. Der Vergleich von Spektren war zudem notwendig, um die Qualität der durch ein automatisiertes Verfahren detektierten spektralen Unterschiede bzw. die Ursache für ein bestimmtes Klassifizierungsergebnis untersuchen und vergleichen zu können.

Zunächst wurden die Spektren aus jeweils einer Struktur für jedes Individuum gemittelt. Damit reduzierte sich die Zahl von 4705 Einzelspektren (Summe der Spektren aus allen Strukturen und Individuen) auf 96 (4×24). Diese Herangehensweise ermöglichte u. a. ein effektives Vergleichen von individuellen Unterschieden.

Für den Vergleich der histologischen Strukturen untereinander und der verschiedenen Infektionsstadien innerhalb einer Struktur wurden Mittelwerte aller Absorptionsspektren der in den Spalten „ Σ DMNV/SolN“, „ Σ HypN“, „ Σ IntN“ und „ Σ weiße Substanz“ von Tab. 3.1 zusammengefaßten Gruppen gebildet. Dementsprechend lag dann für jede der 4 untersuchten histologischen Strukturen und jeden der drei Zeitpunkte nach Inokulation getrennt für infizierte und Kontrolltiere je ein Mittelwertspektrum vor (insgesamt 24 Mittelwerte).

3.4.2 Der Bereich $1480\text{--}950\text{ cm}^{-1}$

In Abb. 3.8 auf der nächsten Seite sind erste Ableitungen von Mittelwertspektren aus DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz abgebildet. Die Spektren stammen von Tieren im terminalen Stadium von Scrapie und denen der dazugehörigen scheininfizierten Kontrollgruppe. Da in den ersten Ableitungen alle Maxima als Nullstellen erscheinen, wurden zur besseren Orientierung die Positionen einiger für Hirngewebe charakteristischer Absorptionsbanden markiert (vgl. auch Abb. 3.1 auf Seite 46). Der

3.4 Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren

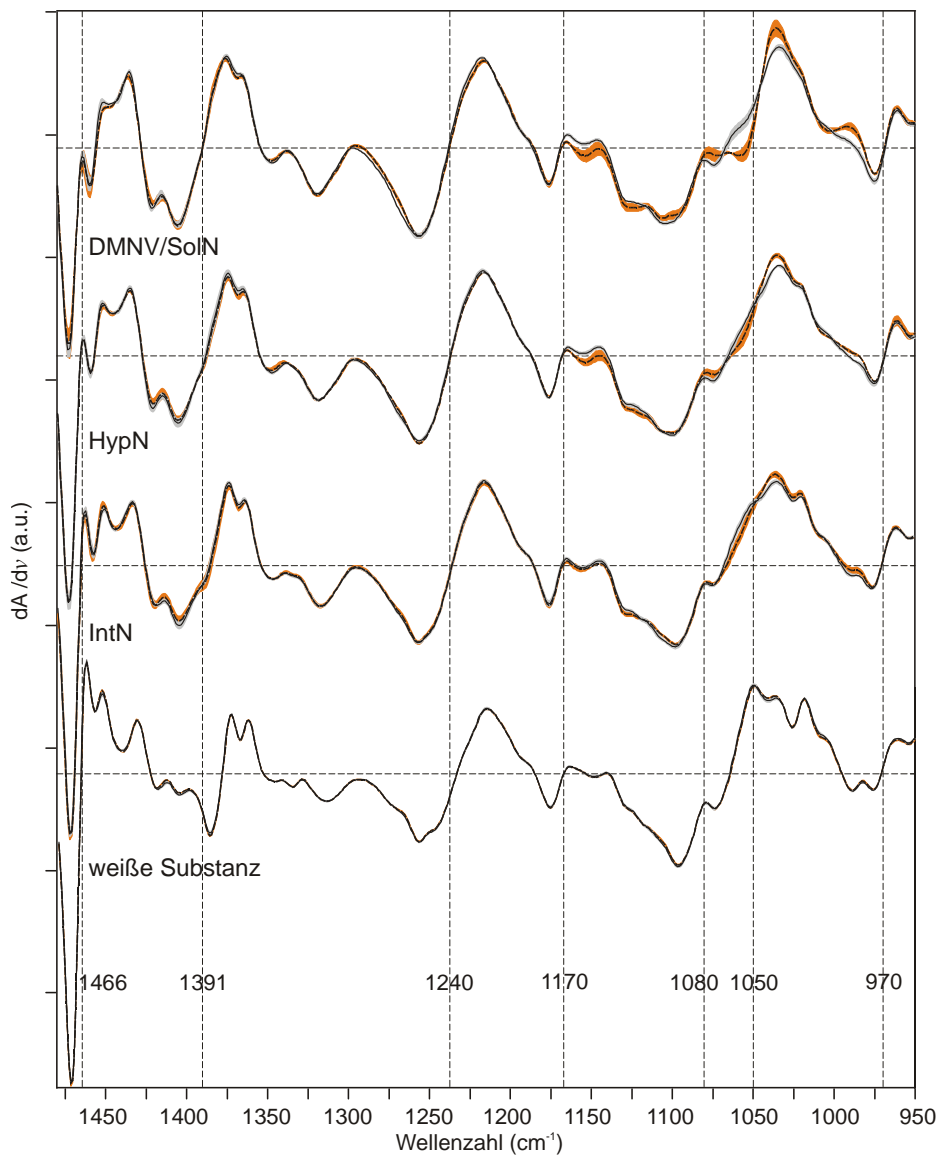


Abbildung 3.8: Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz aus 4 Kontrolltieren (durchgezogen) und 4 kranken Tieren (gestrichelt) im terminalen Stadium. Es sind die normierten ersten Ableitungen der Mittelwerte aus jeweils 4 Tieren mit ihren Standardabweichungen (rot: Scrapie-infiziert, grau: Kontrollen) dargestellt. Die Anzahl der Spektren, aus denen die Mittelwerte berechnet wurden, gehen aus den in Tab. 3.1 auf Seite 51 aufgeführten Spektrenguppen im terminalen Krankheitsstadium hervor. In den 1. Ableitungen erscheinen Absorptionsmaxima als Nullstellen. Zur besseren Orientierung in den Ableitungen sind die Nulllinien und die Wellenzahlen der für Hirngewebe typischen Absorptionsmaxima markiert.

3 Ergebnisse

dargestellte Spektralbereich entspricht dem für die Clusteranalysen in den Abschnitten 3.2.2 und 3.3.2 verwendeten. Beim Vergleich der Spektren aus den Kontrolltieren (alle durchgezogenen Spektren in Abb. 3.8) werden einige spektrale Unterschiede zwischen den vier histologischen Strukturen deutlich. Auf sie war auch die Trennung zwischen den Spektren der unterschiedlichen Gewebestrukturen in den Clusteranalysen im vorigen Unterkapitel zurückzuführen. An den Banden der asymmetrischen und der symmetrischen CH-Biegeschwingungen (1466 cm^{-1} bzw. 1391 cm^{-1}) und im Bereich der symmetrischen C–O–C-Streckschwingungen (zwischen 1060 cm^{-1} und 1000 cm^{-1}) wurden Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz, aber auch zwischen den Strukturen der grauen Substanz beobachtet (DMNV/SolN, HypN, IntN, siehe Abb. 3.8). Alle Mittelwertspektren in Abb. 3.8 sind mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt (rot: Standardabweichungen der Spektren aus den Scrapie-infizierten Tieren, grau: Standardabweichungen der Spektren aus den Kontrolltieren). Beim Vergleich der Standardabweichungen in den drei Strukturen der grauen Substanz fiel auf, daß diese für die Spektren der Kontrollgruppe kleiner waren als für die Spektren der infizierten Hirne. In den Spektren der weißen Substanz waren die Standardabweichungen für beide Gruppen im Vergleich zu den beiden Medulla-Kernen und zum IntN am kleinsten. Dies ist um so überraschender, als die Zahl der Spektren, die für die Berechnung der Mittelwerte in der weißen Substanz zur Verfügung stand, sehr gering war (siehe Spalte „ Σ weiße Substanz“ Tab. 3.1 auf Seite 51). Die kleine Standardabweichung in der weißen Substanz deutet auf eine große Homogenität der biochemischen Zusammensetzung dieser Struktur innerhalb eines Tieres und zwischen verschiedenen Individuen hin.

Beim Vergleich der beiden Mittelwerte für jede der untersuchten Gewebestrukturen ließen sich in der in Abb. 3.8 gezeigten Region zwischen 1480 cm^{-1} und 950 cm^{-1} sehr viele Unterschiede zwischen den Spektren aus Scrapie-infizierten Tieren im terminalen Stadium und Kontrolltieren erkennen. Veränderungen der Spektren von DMNV/SolN, HypN und IntN waren vor allem an vielen Positionen zwischen 1200 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} zu finden, wo verschiedene Esterkomponenten und Kohlenhydrate zur Absorption beitragen. In diesem Bereich wird die Absorption durch C–C-, C–O–P- und C–O–C-Streckschwingungen, sowie P=O-Streckschwingungen dominiert. Die Änderungen bei 1170 cm^{-1} , die besonders im DMNV/SolN und im HypN ausgeprägt waren, können der Absorptionsbande der asymmetrischen C–O–C-Streckschwingung der Esterfunktion zugeordnet werden. Auch die Absorption bei 1050 cm^{-1} , wahrscheinlich einer Ringschwingung von Zuckermolekülen zuzuordnen, war verändert und führte zu einer charakteristischen Änderung der Bandenform, welche in den kranken Tieren in den Spektren aller Gewebestrukturen erkennbar war. Der besonders in den Hirnnervenkernen DMNV/SolN und HypN erkennbare auffällige Unterschied bei ca. 1080 cm^{-1} , wo sich das Absorptionsmaximum der symmetrischen P=O-Streckschwingung von PO_2^- -Gruppen befindet, entsteht wahrscheinlich durch Veränderungen am Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren und/oder an Phospholipidmolekülen sowie anderen phosphorylierten Molekülen. Das Absorptionsmaximum der asymmetrischen P=O-Streckschwingung der PO_2^- -Gruppen (bei 1240 cm^{-1}) wies im DMNV/SolN eine leichte Verschiebung auf, die auch im HypN angedeutet war. In der weißen Substanz

3.4 Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren

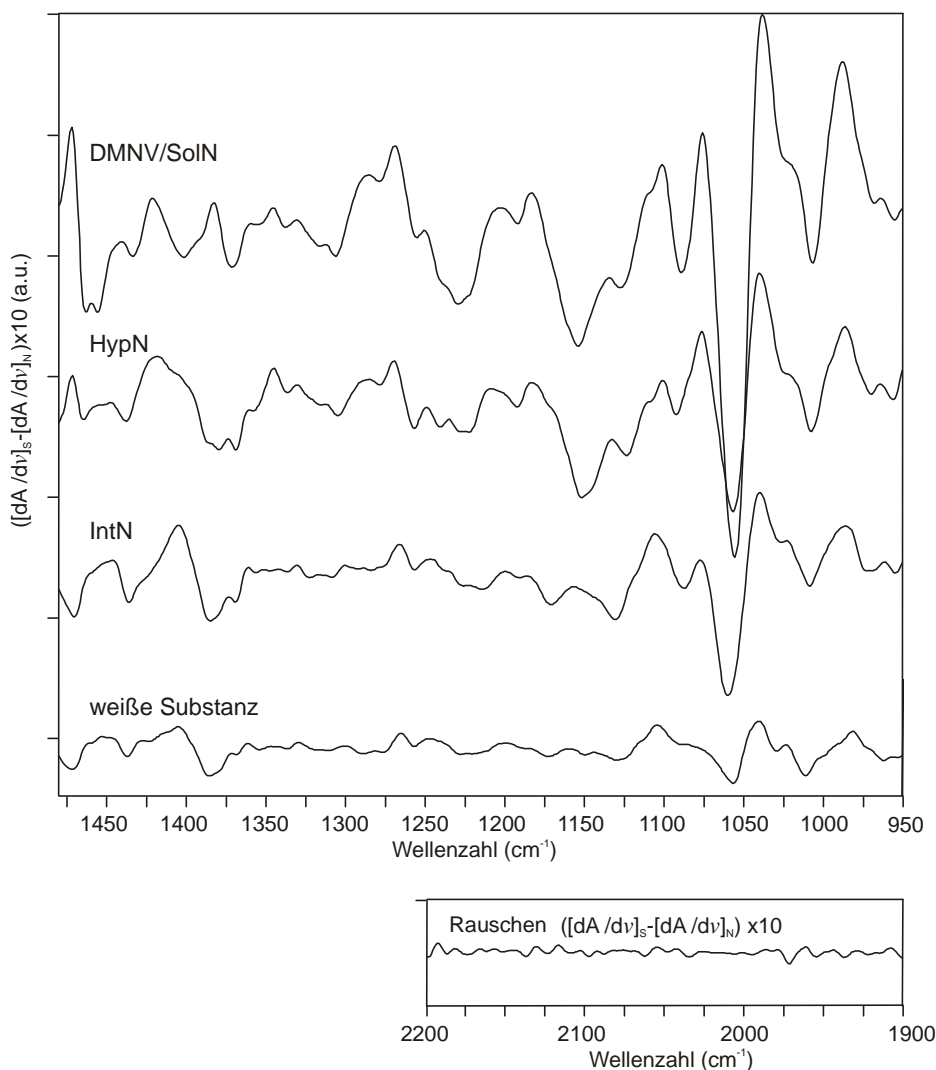


Abbildung 3.9: Differenzen der in Abb. 3.8 auf Seite 57 dargestellten Mittelwertsspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz. Es wurde für jede Struktur im terminalen Stadium die Differenz $[dA/dv]_S - [dA/dv]_N$ berechnet und skaliert. Unterhalb ist zur Abschätzung des Rauschbeitrags der Wellenzahlbereich 2200 cm^{-1} bis 1900 cm^{-1} für eine der Differenzen dargestellt.

war das Ausmaß der spektralen Änderungen im Bereich 1480 cm^{-1} - 950 cm^{-1} gering. Sie beschränkten sich auf die bereits erwähnte Absorptionsbande der symmetrischen C–O–C-Streckschwingung (1050 cm^{-1}) und den Bereich der CH-Biegeschwingungen.

Um abschätzen zu können, inwiefern sich die Veränderungen der zu bestimmten Gewebestrukturen zugehörigen Spektren qualitativ unterscheiden, wurden die Differenzen der Mittelwerte aus Abb. 3.8 gebildet. Sie sind in Abb. 3.9 dargestellt. Zum Vergleich ist von einem der Differenzspektren der Spektralbereich zwischen 2200 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} gezeigt. Dieser Bereich des Spektrums enthält keine Absorptionsbanden und diente daher bei gleicher Skalierung wie der Bereich zwischen 1480 cm^{-1} und

3 Ergebnisse

950 cm^{-1} der Abschätzung des Rauschens im ausgewerteten Spektralbereich. Die Unterschiede zwischen Spektren von infiziertem und normalem Gewebe im terminalen Stadium waren zwischen 1100 cm^{-1} und 950 cm^{-1} in allen untersuchten histologischen Strukturen sehr ähnlich und unterschieden sich hauptsächlich im Ausmaß. In den Spektren der weißen Substanz waren sie am geringsten. Der Bereich von 1300 cm^{-1} bis 1100 cm^{-1} , der die asymmetrische P=O-Streckschwingung und die asymmetrische C–O–C-Streckschwingung enthält, wies die deutlichsten Unterschiede auf, die im DMNV/SolN und im HypN sehr ähnlich waren. In der weißen Substanz war die Differenz in diesem Bereich kaum vom Rauschen zu trennen, allerdings deuten Ähnlichkeiten zum Differenzspektrum von IntN das Erkennen auf einige sehr kleine Unterschiede im Bereich der asymmetrischen P=O-Streckschwingung (ca. 1240 cm^{-1}) hin. In der Region, in der die CH-Biegeschwingungen lokalisiert sind, besonders im Bereich der asymmetrischen CH₂-Biegeschwingung (1466 cm^{-1}), ähnelten sich die spektralen Veränderungen im HypN, IntN und in der weißen Substanz, während im DMNV/SolN andere Unterschiede zwischen den Spektren der infizierten und der Kontrolltiere bestanden. Aus Abb. 3.9 wird ersichtlich, daß der DMNV/SolN von den untersuchten vier Gewebestrukturen die gravierendsten Veränderungen im terminalen Stadium von Scrapie aufwies.

Bisher wurden Spektren aus Tieren im terminalen Stadium von Scrapie-263K und Kontrollen miteinander verglichen. Ein Vergleich von Mittelwerten aus infizierten und Kontrolltieren in den Stadien 120 d. p. i. und 90 d. p. i. zeigte, daß auch zu diesen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf Unterschiede zwischen den Spektren vorhanden waren. Diese befanden sich fast ausschließlich im Spektralbereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} . In Abb. 3.10 auf der nächsten Seite sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von Spektren aus dem DMNV/SolN für die drei untersuchten Zeitpunkte nach Inokulation dargestellt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen (durchgezogene Spektren mit grauer Standardabweichung) sind für alle Stadien fast identisch. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Mittelwertspektren der infizierten Tiere (gestrichelte Linien mit roter Standardabweichung) erheblich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Die Veränderungen der DMNV/SolN-Spektren waren im terminalen Stadium besonders auffällig. Die Unterschiede zwischen 1100 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} weisen auf Veränderungen in der Zusammensetzung an Zuckermolekülen und von Nukleinsäuren hin. Sie waren um 90 d. p. i. nur relativ schwach ausgeprägt (siehe vergrößerter Ausschnitt in Abb. 3.10), aber die charakteristische Änderung der Bandenform verstärkte sich im Zeitverlauf bis zum terminalen Stadium (siehe auch Abb. 3.10).

In den beiden anderen untersuchten Kernen (HypN und IntN) waren Veränderungen der Mittelwertspektren in den infizierten Tieren nur bis zum Zeitpunkt 120 d. p. i. zurückverfolgbar (siehe Abb. 3.11). Auch hier waren sie im Bereich 1100 cm^{-1} –1000 cm^{-1} und dem der asymmetrischen P=O-Streckschwingung (ca. 1240 cm^{-1}) lokalisiert. Bei 90 d. p. i. waren keine Unterschiede in den Mittelwerten der Spektren aus HypN und IntN von infizierten und Kontrolltieren zu erkennen. In der weißen Substanz waren im Rahmen dieser Untersuchung keine Unterschiede in den Spektren in früheren Stadien als dem terminalen zu finden. In Abb. 3.11 auf Seite 62 sind Differenzen der ersten Ableitungen von Mittelwertspektren aus DMNV/SolN, HypN und IntN

3.4 Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren

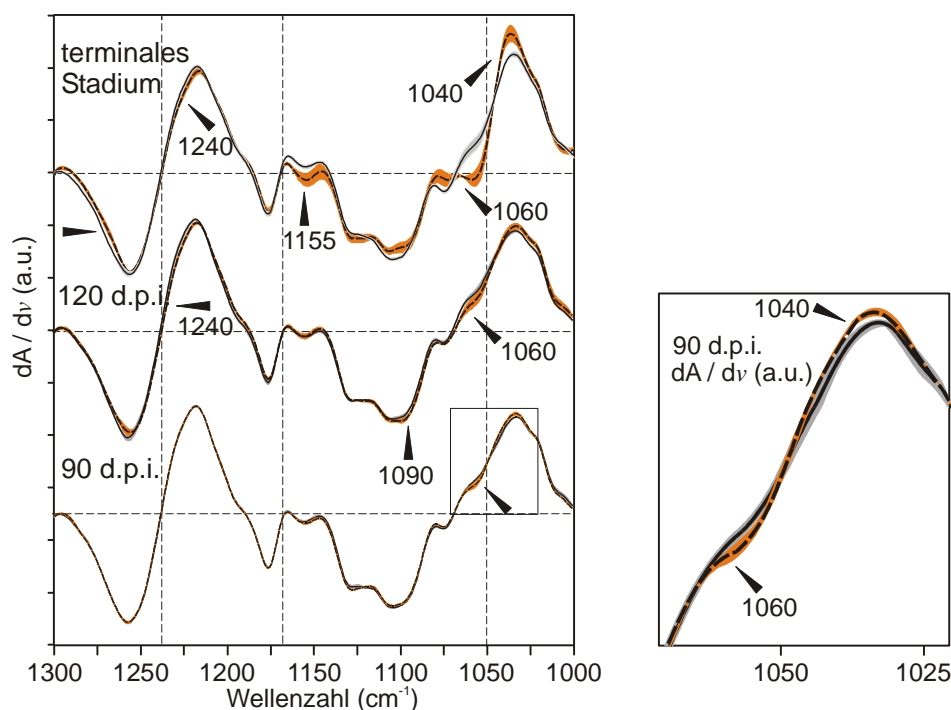


Abbildung 3.10: Mittelwertspektren von DMNV/SolN aus Kontrolltieren (durchgezogen) und kranken Tieren (gestrichelt) für die drei untersuchten Zeitpunkte nach Inokulation. Es sind die normierten 1. Ableitungen der Mittelwerte aus jeweils 4 Tieren mit ihren Standardabweichungen (rot: Scrapie-infiziert, grau: Kontrollen) dargestellt. Die Anzahl der für die Berechnung der Mittelwerte verwendeten Spektren geht aus der Spalte „DMNV/SolN“ in Tab. 3.1 auf Seite 51 hervor. Nulllinien und Positionen markanter Absorptionsmaxima sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Die Pfeile zeigen besonders auffällige Unterschiede zwischen den Spektren an.

zum Zeitpunkt 120 d.p.i. sowie aus dem DMNV/SolN bei 90 d.p.i. gezeigt. Vergleicht man die Änderungen bei 120 d.p.i. in den drei Kernen untereinander und mit dem Rauschniveau, so ist wieder (analog Abb. 3.9 auf Seite 59) festzustellen, daß diese im DMNV/SolN am ausgeprägtesten sind. Im IntN waren die Unterschiede am schwächsten vorhanden. Beim Vergleichen der Differenzen für 90 d.p.i. und 120 d.p.i. im DMNV/SolN ließen sich außerdem qualitative Unterschiede zwischen den Differenzspektren feststellen. So waren z. B. die leichte Verschiebung der asymmetrischen P=O-Streckschwingung (ca. 1240 cm^{-1}) und eine Veränderung bei 1080 cm^{-1} (der symmetrischen P=O-Streckschwingung zuzuordnen) erst 120 d.p.i. erkennbar, während sich die bereits erwähnten Unterschiede um ca. 1050 cm^{-1} , welche vermutlich auf C–O–C-Streckschwingungen von Kohlenhydraten zurückführbar sind, schon um 90 d.p.i. manifestierten.

3 Ergebnisse

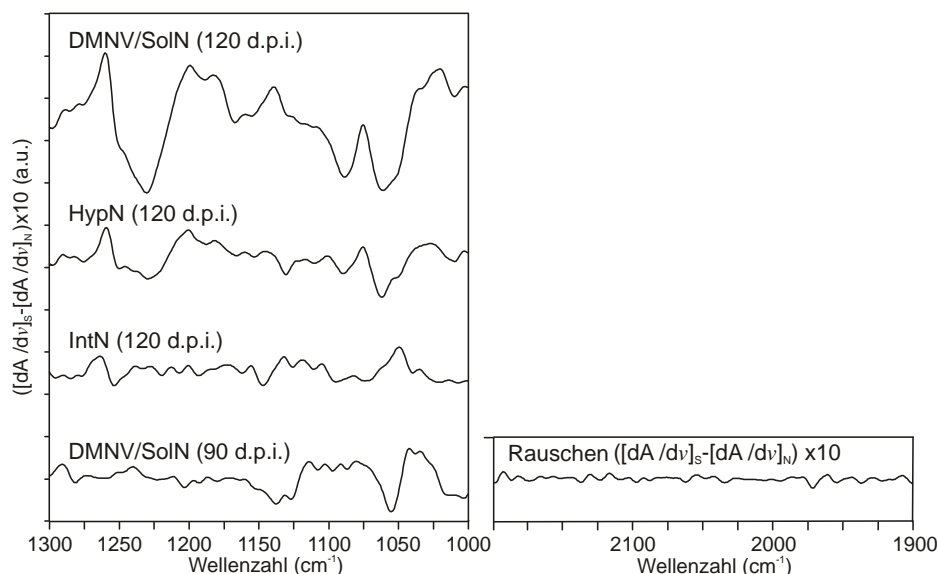


Abbildung 3.11: Differenzen von Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN und IntN 120 d. p. i. und von DMNV/SolN zum Zeitpunkt 90 d. p. i. Es wurde für jede Struktur die Differenz $[dA/dv]_S - [dA/dv]_N$ berechnet und skaliert. Zur Abschätzung des Rauschens ist der Wellenzahlbereich 2200 cm^{-1} bis 1900 cm^{-1} für die Differenz aus IntN dargestellt.

3.4.3 Der Bereich $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$

Neben Unterschieden in der Region der CH-Biegeschwingungen und im sogenannten Fingerprint-Bereich wurden auch zwischen 1800 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} einige Veränderungen in den Spektren beobachtet. Diese beschränkten sich auf das terminale Krankheitsstadium und traten nicht in allen Strukturen gleichermaßen auf. Um eine bessere Auflösung der Absorptionen der verschiedenen Protein-Sekundärstrukturen im Amid I-Bereich (1700 cm^{-1} - 1600 cm^{-1}) zu erzielen, sind in Abb. 3.12 auf der nächsten Seite zweite Ableitungen der Mittelwertspektren gezeigt. Beim Vergleich der Spektren der unterschiedlichen histologischen Strukturen aus der Kontrollgruppe fielen besonders die Unterschiede zwischen weißer Substanz und den drei anderen morphologischen Strukturen auf. Sie befanden sich hauptsächlich an den Positionen der C=O-Streckschwingung von Estern (1742 cm^{-1}) und des Amid I-Bereiches. Die Intensität der Bande bei 1742 cm^{-1} war in der weißen Substanz deutlich gegenüber der in den Strukturen der grauen Substanz erhöht. Im Amid I-Bereich war die Intensität der niederfrequenten β -Faltblatt-Bande bei 1638 cm^{-1} in der weißen Substanz deutlich geringer als in den Hirnnervenkernen und im IntN. Gleichzeitig war hier in den zweiten Ableitungen eine sehr intensitätsschwache niederfrequente β -Faltblatt Bande bei 1629 cm^{-1} auszumachen, die in der grauen Substanz jedoch kaum erkennbar war.

Die in Abb. 3.12 erkennbaren Intensitätsänderungen der C=O-Streckschwingungsbande im DMNV/SolN der Scrapie-kranken Tiere war auch im Mittelwertspektrum von HypN, jedoch nicht in den Spektren von IntN oder der weißen Substanz zu beob-

3.4 Vergleiche von Spektren Scrapie-infizierter Hamster mit denen von Kontrolltieren

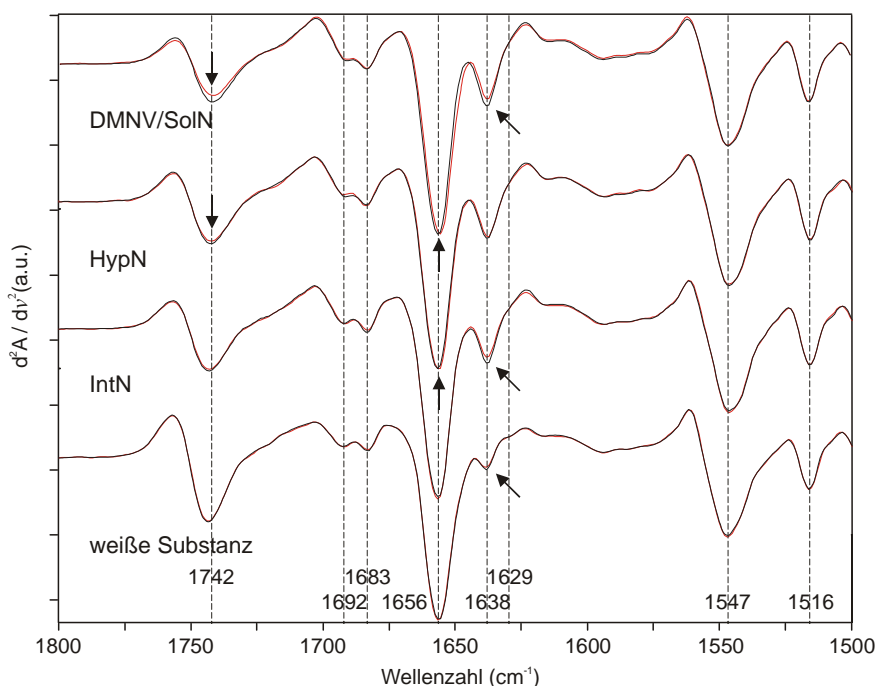


Abbildung 3.12: Normierte zweite Ableitungen von Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz im Bereich 1800 cm^{-1} – 1500 cm^{-1} . Die Mittelwerte wurden aus 4 Kontrolltieren (schwarz) und 4 Scrapie-infizierten Tieren im terminalen Stadium von Scrapie-263K (rot) gebildet. Die Positionen der typischen Absorptionsbanden für graue Substanz in diesem Bereich des Spektrums sind markiert. Die Pfeile weisen auf Unterschiede zwischen Spektren aus infiziertem und nicht infiziertem Gewebe hin.

achten. Das Maximum der Absorptionsbande der α -helikalen Strukturen bei 1656 cm^{-1} war im Spektrum von DMNV/SolN der kranken Hamster zu niedrigeren Wellenzahlen hin verschoben ($\bar{\nu}_S=1655,7\text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_N=1656,6\text{ cm}^{-1}$) und von einer leichten Vergrößerung der Halbwertsbreite der Bande begleitet. Eine leichte Verschiebung des Maximums war auch bei den Spektren aus dem HypN festzustellen ($\bar{\nu}_S=1656,2\text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_N=1656,6\text{ cm}^{-1}$). In den Spektren aus DMNV/SolN, IntN und weißer Substanz der infizierten Tiere trat eine Abnahme der Intensität der niederfrequenten β -Bande bei 1638 cm^{-1} auf, was auf einen geringeren Anteil an Proteinen mit parallelen β -Faltblatt-Strukturen im Gewebe hinweist.

3.4.4 Der Bereich 3050 – 2800 cm^{-1}

Im kurzwelligen Bereich des Spektrums, in dem mit den Banden der CH-Streckschwingungen hauptsächlich die Absorptionsbeiträge von Lipiden lokalisiert sind, wurden in den Spektren im terminalen Stadium ebenfalls Unterschiede im Vergleich zum Kontrollgewebe festgestellt. Diese waren jedoch deutlich schwächer als beispielsweise die für den Bereich 1480 – 950 cm^{-1} beschriebenen. Abbildung 3.13

3 Ergebnisse

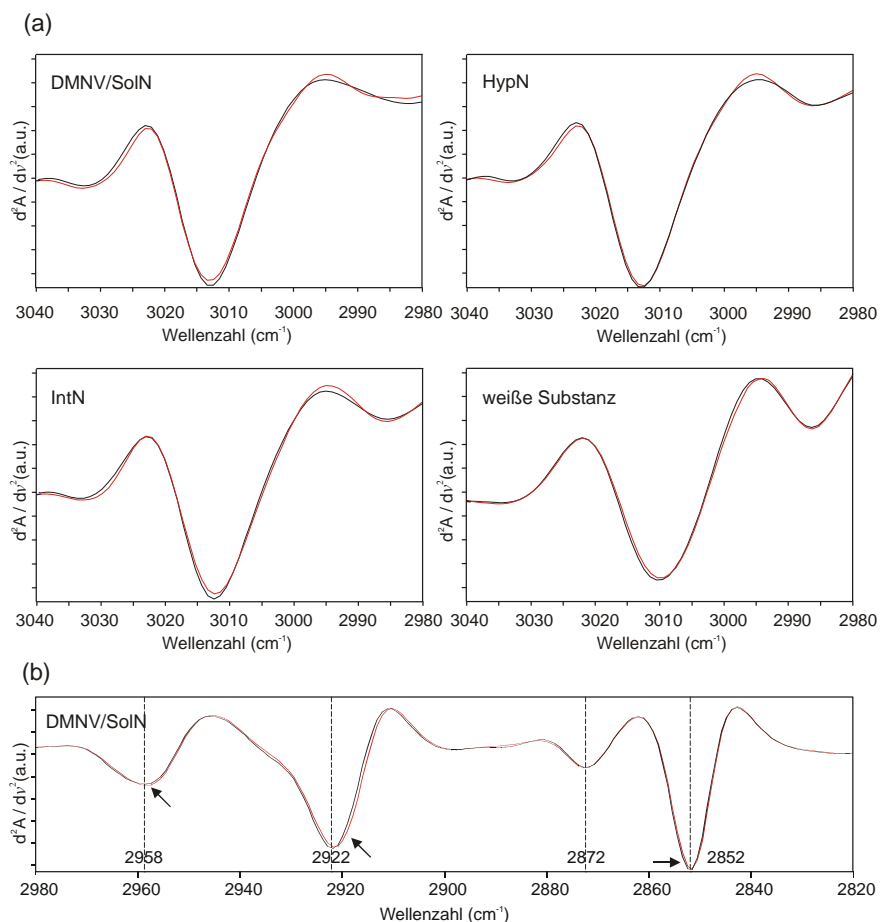


Abbildung 3.13: Zweite Ableitungen der Mittelwerte aus 4 Kontrolltieren (durchgezogen) und 4 Scrapie-infizierten Tieren im terminalen Stadium von Scrapie-263K (gestrichelt), normiert über den Bereich 3050 cm⁻¹–2800 cm⁻¹. (a) DMNV/SolN, HypN, IntN und weiße Substanz im Bereich der CH-Streckschwingung von =C–H-Gruppen. (b) DMNV/SolN im Bereich der CH-Streckschwingungen von CH₃- und CH₂-Gruppen. Die Absorptionsmaxima der typischen Banden für DMNV/SolN in diesem Bereich des Spektrums sind markiert. Die Pfeile weisen auf Unterschiede zwischen den Spektren hin.

zeigt zweite Ableitungen von Mittelwertspektren aus dieser Region des Spektrums. In Abb. 3.13a ist die Absorptionsbande der CH-Streckschwingung von =C–H-Gruppen der ungesättigten Fettsäuren für die vier untersuchten Strukturen in den Scrapie-infizierten Hirnen und den Kontrollen gezeigt. Insgesamt fiel auf, daß die Position dieser Bande sich für graue und weiße Substanz stark unterschied ($\bar{\nu}_{\text{grau}} \approx 3013 \text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_{\text{weiss}} \approx 3010 \text{ cm}^{-1}$) und ihre Intensität in der weißen Substanz geringer war. In DMNV/SolN und IntN der infizierten Tiere war die Intensität dieser Bande gegenüber den Kontrollen etwas verringert. Der Intensitätsunterschied war nur gering, allerdings gingen damit leichte Änderungen der Bandenkontur zwischen 3030 cm⁻¹ und 3020 cm⁻¹ sowie zwischen 3000 cm⁻¹ und 2990 cm⁻¹ in DMNV/SolN, HypN, und IntN

einher. In der weißen Substanz war eine leichte Verschiebung der Bande um ca. 1 cm^{-1} zu niedrigeren Energien zu beobachten (siehe Abb. 3.13(a)). Unterschiede im Bereich aller anderen „Lipidbanden“ konnten nur für die Spektren des DMNV/SolN im terminalen Stadium gefunden werden (siehe Abb. 3.13b). Es kam zu einer Verschiebung der Bande der asymmetrischen CH-Streckschwingung der CH_2 -Gruppen ($\bar{\nu}_S=2921,4\text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_N=2921,9\text{ cm}^{-1}$). Zudem war das Absorptionsmaximum der asymmetrischen CH-Streckschwingung der CH_3 -Gruppen (2958 cm^{-1}) leicht verschoben.

3.5 Ergebnisse der Clusteranalysen

3.5.1 Clusteranalysen von Spektren jeweils einer histologischen Struktur

Für den Vergleich von Einzelspektren wurden zunächst Clusteranalysen mit der Methode *Scaling to first range* und dem Ward's-Algorithmus durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.3). Wie bereits erwähnt, ist die Clusteranalyse eine multivariate Methode, bei der Spektren aufgrund ihrer Ähnlichkeit in bestimmten Spektralbereichen zu Gruppen zusammengefaßt werden. Für jedes Stadium nach Inokulation (90 d. p. i. 120 d. p. i. und terminal) wurden alle Spektren jeder der vier untersuchten Hirnstrukturen aus Scrapie-infizierten und Kontrolltieren einer solchen Clusteranalyse unterzogen (für Spektrenzahlen vgl. Tab. 3.1 auf Seite 51). Nach Vergleichen von Mittelwertspektren und Einzelspektren aus den verschiedenen histologischen Strukturen wurden die Clusteranalysen für das terminale Stadium zunächst im Bereich 1480 cm^{-1} – 950 cm^{-1} durchgeführt, wobei es zu einer klaren Trennung der Spektren aus kranken und gesunden Hamstern kam. Nach zusätzlichen Tests und verschiedenen Kombinationen anderer Bereiche des Spektrums in den Clusteranalysen stellte sich heraus, daß mit der im Bereich 1300 cm^{-1} – 1000 cm^{-1} enthaltenen Information die deutlichste Trennung von Spektren aus infizierten (S) von denen aus uninfizierten (N) Tieren auch im Stadium von 120 d. p. i. erreicht werden konnte. Die Klassifizierungsergebnisse für diesen Spektralbereich sind in Tab. 3.2 auf der nächsten Seite zusammengefaßt. Die Bildung zweier getrennter Spektren-Cluster, einer aus fast allen Spektren infizierten, der andere aus denen uninfizierten Gewebes bestehend, wurde für DMNV/SolN, HypN und IntN im terminalen Stadium von Scrapie beobachtet. Ein deutlich schlechteres Ergebnis zeigten die Clusteranalysen mit Spektren aus der weißen Substanz im terminalen Stadium. Mehr als ein Drittel davon wurden mit Spektren der jeweils entgegengesetzten Klasse (S mit N und umgekehrt) in einen Cluster eingeordnet. Dies weist auf eine sehr geringe spektrale Distanz zwischen den Spektren hin. Durch die große Ähnlichkeit der Spektren beider Kategorien (S und N) kam es zu Überlappungen der Klassen und daher zur „Fehlklassifizierung“ von Spektren. 120 d. p. i. war die Trennung zwischen Scrapie-infiziertem und Kontrollgewebe am genauesten für die Spektren von DMNV/SolN. Die Trenngenaugigkeit für die Spektren aus dem HypN war in etwa gleich derer der Spektren der weißen Substanz im terminalen Stadium (ca. ein Drittel falsch klassifiziert). Für die Strukturen IntN und weiße Substanz wurde bei 120 d. p. i.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Clusteranalysen mit Spektren von scheininfizierten und Scrapie-infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation und für vier histologische Strukturen für den Bereich 1300 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} . Es wurden jeweils zwei spektrale Klassen gebildet, eine enthielt Spektren des normalen (N), die andere diejenigen des infizierten Gewebes (S). Angegeben sind die Klassifizierungsgenauigkeiten (Anteil der Spektren, die die Mehrheit in jeder der Klassen bildeten) in %.

Hirnstruktur	DMNV/SolN		HypN		IntN		weiße Substanz	
	N	S	N	S	N	S	N	S
terminales Stadium	98,9 %	100 %	100 %	98,6 %	99,5 %	98,6 %	72,3 %	60,0 %
120 d. p. i.	91,6 %	85,7 %	65,7 %	68,6 %	keine Trennung		keine Trennung	
90 d. p. i.	keine Trennung		keine Trennung		keine Trennung		keine Trennung	

lediglich eine Aufspaltung in mehrere Klassen, in denen S- und N-Spektren zufällig verteilt waren, beobachtet. 90 d. p. i. wurde weder für den Bereich $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ noch für einen begrenzteren Bereich ($1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) für irgendeine der vier histologischen Strukturen eine Trennung von Spektren aus infizierten und Kontrolltieren erreicht.

3.5.2 Clusteranalysen von Spektren aus mehreren histologischen Strukturen

Für den Vergleich von Unterschieden zwischen den Spektren aus Scrapie-kranken und gesunden Tieren mit Unterschieden zwischen den untersuchten histologischen Strukturen wurden Clusteranalysen mit Spektren aus verschiedenen Strukturen von infizierten und Kontrolltieren durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit bei der Auswertung, und da die Anzahl der Spektren in einigen Fällen die für die Clusteranalyse mit OPUS (OS/2) vorgegebene Höchstzahl von 1000 Spektren überschritt, wurden die Spektren jeweils einer histologischen Struktur für jedes der 24 Individuen gemittelt (siehe auch 3.4.1).

Der Spektralbereich 1480 cm^{-1} – 950 cm^{-1} kann, wie in den Abschnitten 3.2.2 und 3.3.2 gezeigt wurde, für die Klassifizierung von Spektren entsprechend unterschiedlichen anatomischen Strukturen im Hirngewebe der einzelnen Individuen angewendet werden. Seine Verwendung für eine Clusteranalyse von Mittelwerten von Spektren verschiedener Strukturen aus mehreren Hamstern (infizierte im terminalen Stadium und zugehörige Kontrollen) bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 3.14 auf der nächsten Seite). Hier kam es zunächst zur Gruppierung in Spektren aus der weißen und der grauen Substanz, und in der Klasse der grauen Substanz zu einer Trennung der Spektren von DMNV/SolN, HypN und IntN (siehe Abb. 3.14a). Obwohl es sich bei Abb. 3.8 auf Seite 57 und Abb. 3.9 auf Seite 59 um Darstellungen von Gruppenmittelwerten der Strukturen in infizierten Tieren und Kontrollen handelt, in denen die einzelnen Individuen nicht weiter berücksichtigt wurden, ist das in (Abb. 3.14a) gezeigte Ergebnis

3.5 Ergebnisse der Clusteranalysen

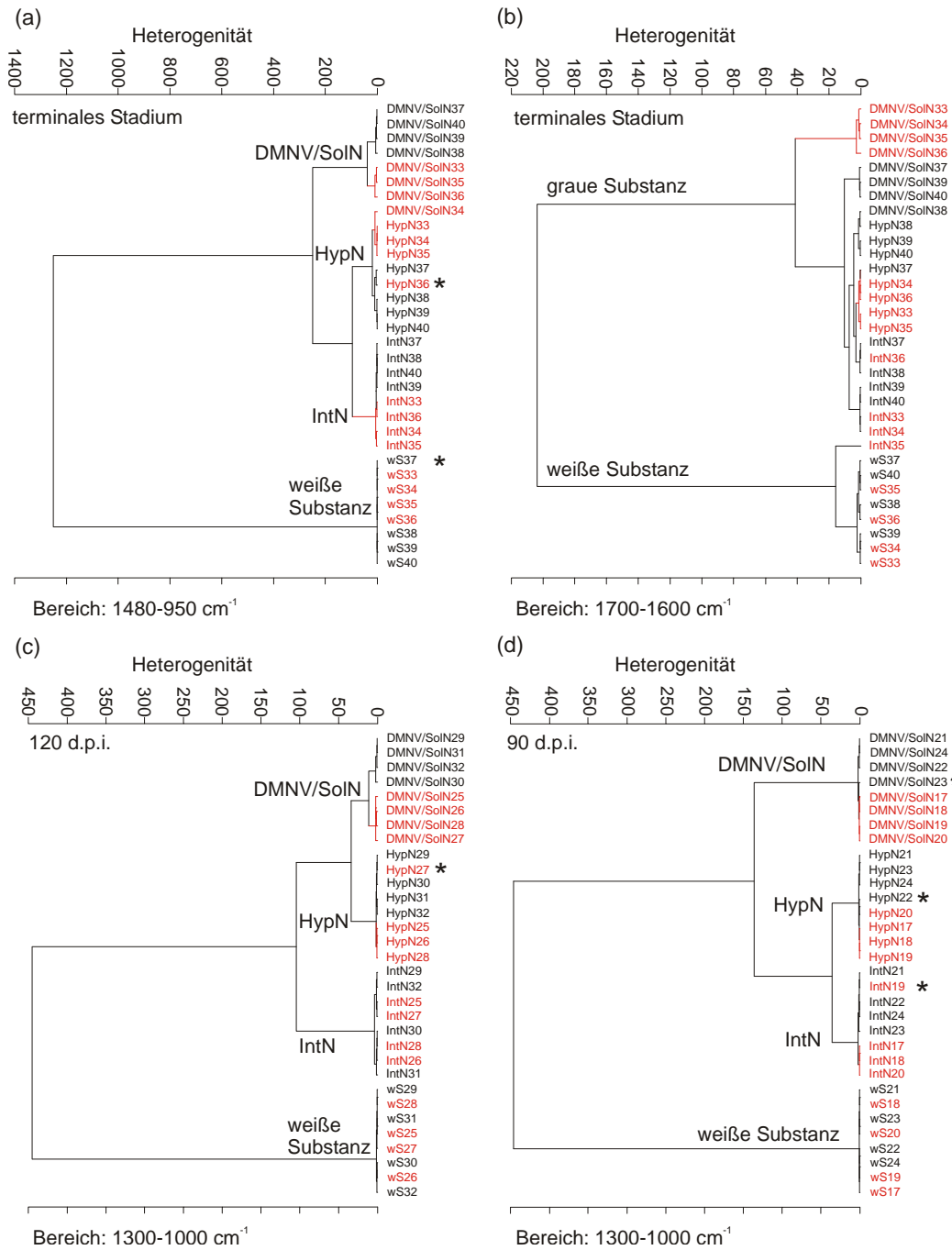


Abbildung 3.14: Ergebnisse der Clusteranalysen von Spektren verschiedener histologischer Strukturen aus Kontrollhirnen und Scrapie-infizierten Hirnen (Mittelwertspektren der Strukturen in den einzelnen Individuen). Die Distanzberechnung erfolgte mit der Methode *Scaling to first range*, die Clusteranalyse mit dem Ward's-Algorithmus. Die Nummern der Proben für die infizierten Tiere (rot) und für die Kontrollen (schwarz) sind in Tab. 2.1 auf Seite 26 aufgeführt. (a) Terminales Stadium 1480 cm⁻¹–950 cm⁻¹. (b) Terminales Stadium 1700 cm⁻¹–1600 cm⁻¹. (c) 120 d. p. i. 1300 cm⁻¹–1000 cm⁻¹. (d) 90 d. p. i. 1300 cm⁻¹–1000 cm⁻¹.

3 Ergebnisse

der Clusteranalyse beim Vergleichen mit diesen beiden Abbildungen sehr gut nachvollziehbar. Die Auftrennung in Spektren aus infizierten und Kontrolltieren innerhalb der anatomischen Strukturen entsprechenden spektralen Klassen fand in der grauen und auch in der weißen Substanz statt. Die unterschiedliche Heterogenität der Gruppen „infiziert“ und „nicht-infiziert“ innerhalb der Klassen DMNV/SolN, HypN, IntN und weiße Substanz (siehe Abb. 3.14a) reflektiert das von der anatomischen Struktur abhängige Ausmaß der pathologischen Veränderung der Spektren (vgl. Abb. 3.9). Es kam zu je einer Fehlklassifizierung (in Abb. 3.14a markiert mit „*“) in der weißen Substanz und im HypN. Bei einem der infizierten Hamster (o34) wurde das Spektrum von DMNV/SolN in die Gruppe der HypN-Spektren aus den infizierten Tieren eingeordnet.

Auch als die Clusteranalyse mit der zwischen 1700 cm^{-1} – 1600 cm^{-1} vorhandenen Information durchgeführt wurde (Abb. 3.14b), fand zunächst eine Auftrennung in graue und weiße Substanz statt. Ursache hierfür sind die bereits für die Gruppenmittelwerte beobachteten Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz im Bereich der Amid I-Bande (vgl. Abb. 3.12 auf Seite 63). Die Spektren aus Scrapie-infizierten und Kontrollhirnen waren innerhalb der Klasse der weißen Substanz zufällig verteilt, d. h. es trat keine Trennung zwischen beiden Kategorien auf. Innerhalb der Klasse der grauen Substanz kam es zur Aufspaltung in einen Cluster, der alle DMNV/SolN-Spektren aus den infizierten Tieren enthielt und einen zweiten, in dem die übrigen Spektren von DMNV/SolN aus gesunden sowie die von HypN und IntN aus allen Tieren enthalten waren. Bei den Spektren von HypN und IntN war weder eine klare Trennung zwischen beiden Kernen noch zwischen den Spektren infizierter Hamster und Kontrollen zu verzeichnen. Die spektrale Distanz zwischen infiziertem DMNV/SolN und den anderen Kernen waren also im Bereich 1700 cm^{-1} – 1600 cm^{-1} größer als die Unterschiede innerhalb der verschiedenen Strukturen der grauen Substanz. Hierzu trug wahrscheinlich die Verschiebung des Maximums der α -Helix-Bande, die nur im Gruppenmittelwert für DMNV/SolN auftrat, maßgeblich bei (vgl. Abb. 3.12).

Auch für die Scrapie-Stadien 120 d. p. i. und 90 d. p. i. wurden Clusteranalysen mit den Mittelwerten der histologischen Strukturen aus jedem Individuum durchgeführt (siehe Abbildungen 3.14c und d). Unter Verwendung des Bereiches 1300 cm^{-1} – 1000 cm^{-1} kam es wie in Abb. 3.14a zu einer Gruppierung der Spektren entsprechend den histologischen Strukturen. Die Spektren von HypN befanden sich (bezogen auf die spektrale Distanz) zwischen denjenigen von DMNV/SolN und IntN. Im terminalen Stadium und 90 d. p. i. bildete diese Klasse eine Gruppe mit den Spektren von IntN, während 120 d. p. i. die Ähnlichkeit zur Gruppe DMNV/SolN am größten war.

Die Spektren in den Gruppen DMNV/SolN und HypN gliederten sich im Stadium 120 d. p. i. jeweils wieder in zwei Klassen, welche jeweils diejenigen aus infizierten bzw. schein-infizierten Hamstern enthielten (siehe Abb. 3.14c). Aufgrund des Spektrums von HypN wurde ein infizierter Hamster (o27) 120 d. p. i. in die Gruppe der nicht-infizierten Tiere eingeordnet, während sein DMNV/SolN-Spektrum den DMNV/SolN-Spektren der übrigen infizierten Individuen zugeordnet wurde. In den Spektrenklassen von IntN und weißer Substanz war zum Zeitpunkt 120 d. p. i. keine Trennung von Spektren aus infizierten und schein-infizierten Tieren erkennbar. Zum Zeitpunkt 90 d. p. i.

waren die Unterschiede zwischen den Spektren aus infizierten und Kontrollhamstern noch sehr gering, so daß in den Klassen DMNV/SolN und HypN jeweils ein Spektrum (aus den Kontrolltieren o23 und o22) mit denen der infizierten Tiere eingeordnet wurde. Die Verteilung der Spektren aus der weißen Substanz war, wie die bei 120 d. p. i. zufällig. Im Gegensatz zu 120 d. p. i. war jedoch eine Abspaltung von drei der infizierten Tiere aufgrund ihrer IntN-Spektren zu bemerken.

3.6 Identifizierung von Spektren mit Hilfe künstlicher neuronaler Netze

3.6.1 Konstruktion von Datensätzen

Neben den bisher beschriebenen Clusteranalysen wurde für die Auswertung der Daten eine weiteren Mustererkennungsmethode, die Klassifizierung mit Hilfe künstlicher neuronaler Netze (ANNs), angewendet. Ziel war es, Spektren aus infiziertem und gesundem Gewebe einer jeweiligen histologischen Struktur innerhalb der verschiedenen Stadien von Scrapie korrekt als „Scrapie-infiziert“ bzw. „nicht infiziert“ mit einem ANN zu identifizieren. Für das Training der Netze wurden Spektren derselben histologischen Struktur und desselben Zeitpunktes nach Inokulation wie denjenigen der Testspektren verwendet. Die Anzahl der Spektren aus der weißen Substanz war für eine sinnvolle Aufteilung für Training und Validierung eines ANNs zu gering (siehe Tab. 3.1 auf Seite 51), so daß nur die Spektren von DMNV/SolN, HypN und IntN dieser Auswertung unterzogen wurden. Mit drei Zeitpunkten nach Infektion und drei histologischen Strukturen standen insgesamt neun Datensätze für die Identifizierung mit ANNs zur Verfügung. Die Konstruktion der Trainings-, Validierungs- und Testdatensätze, welche zu gleichen Teilen aus Spektren von Scrapie-infiziertem und Kontrollgewebe bestanden, ist bereits ausführlich im Abschnitt 2.6.6.2 beschrieben worden. Alle Spektren aus jedem der neun Datensätze wurden unter Anwendung des Rotationsprinzips getestet, wobei jeweils der nicht getestete Großteil der Spektren eines Datensatzes für das Training bzw. die Validierung des entsprechenden Netzes verwendet wurde (siehe 2.6.6.2 für eine genaue Ausführung über die Aufteilung der Spektren).

3.6.2 Ergebnisse der Varianzanalysen zur Merkmalsselektion

Die Merkmalsselektion wurde auf die spektralen Fenster 3050 cm^{-1} – 2800 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} – 950 cm^{-1} begrenzt. Die Auswahl dieser beiden Spektralbereiche wurde aufgrund von in den Mittelwertspektren und Einzelspektren sichtbaren Unterschieden getroffen. In den für das Training verwendeten normierten ersten Ableitungen der Einzelspektren wurde jeweils über zwei benachbarte Datenpunkte gemittelt, so daß die Gesamtzahl an Datenpunkten 415 betrug. Daraus wurden die für das Training zu verwendenden Datenpunkte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewählt (siehe Abschnitt 2.6.6.3). Tab. 3.3 auf der nächsten Seite zeigt die Zahl der Datenpunkte, die sich für verschiedene kritische F -Werte signifikant unterschieden und für

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Anzahl der mit der einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewählten Datenpunkte, die F -Werte oberhalb der kritischen Werte 0,99, 0,95 bzw. 0,90 besaßen.

Hirnstruktur	DMNV/SolN			HypN			IntN		
	0,99	0,95	0,90	0,99	0,95	0,90	0,99	0,95	0,90
terminales Stadium	323	382	391	256	323	363	246	345	368
120 d. p. i.	301	397	402	237	379	398	51	91	143
90 d. p. i.	22	37	54	16	25	45	50	137	234

das ANN-Training in Frage kamen. Im terminalen Stadium besaß die Mehrheit aller Datenpunkte F -Werte $\geq 0,99$, und das Kriterium $F \geq 0,90$ erfüllten fast alle Datenpunkte der für die Merkmalsselektion gewählten Bereiche. Für DMNV/SolN und HypN traf dies auch bei 120 d. p. i. zu, während die Anzahl im IntN bei 120 d. p. i. deutlich abnahm. Zum Zeitpunkt 90 d. p. i. war F in allen Strukturen nur für einen kleinen Teil Datenpunkte größer als 0,99. Aus Tab. 3.3 wird ersichtlich, daß die Zahl der signifikant unterschiedlichen Datenpunkte insbesondere im terminalen Stadium, aber auch bei 120 d. p. i. für $F \geq 0,99$ deutlich über der Zahl der für das Training verfügbaren Spektren lag (vgl. mit Tab. 3.1 auf Seite 51). Da dies zu einer eingeschränkten Trainierbarkeit der Netze geführt hätte, wurde die maximale Anzahl an Datenpunkten auf 100 beschränkt, d. h. aus der Menge der ausgewählten Datenpunkte wurden nur die 100 signifikantesten verwendet. Bei 90 d. p. i. lag die Zahl weit unterhalb der Anzahl der Spektren, so daß sie hier nicht weiter begrenzt werden mußte.

3.6.3 Klassifizierung der Spektren

Die Anzahlen der mit den ANNs korrekt identifizierten Spektren wurden für jedes Infektionsstadium und jede Hirnstruktur aufsummiert und daraus die Identifizierungsgenauigkeit bestimmt (Tab. 3.4 auf der nächsten Seite). Der Prozentsatz korrekt identifizierter Spektren von DMNV/SolN, HypN und IntN im terminalen Stadium und von DMNV/SolN bei 120 d. p. i. war ähnlich den Ergebnissen der Clusteranalyse (vgl. Tab. 3.2). Im Unterschied zur Clusteranalyse konnten jedoch mit den ANNs bei 90 d. p. i. mit einer stark reduzierten Anzahl für das Training verfügbarer Datenpunkte noch die Mehrzahl der Spektren in allen drei Strukturen korrekt als „Scrapie-infiziert“ bzw. „nicht infiziert“ erkannt werden (siehe Tab. 3.4).

3.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen des Hirngewebes

Wie in den Abschnitten 2.1.1 und 2.2.3 beschrieben, wurden an die IR-spektroskopisch untersuchten Schnitte angrenzende Dünnschnitte mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 angefärbt. Ein weiterer angrenzender Schnitt wurde jeweils als Kontrolle mit

3.8 Ergebnisse der Synchrotron-Messungen an Spinalganglien

Tabelle 3.4: Identifizierungsgenauigkeit (in %) künstlicher neuronaler Netze für Spektren von drei anatomischen Strukturen und drei Zeitpunkten nach Inokulation. Die Ergebnisse sind separat für die Spektren von Kontrollen (N) und Scrapie-infizierten Tieren (S) aufgeführt. Die eckigen Klammern enthalten jeweils die Anzahl der Datenpunkte, für die $F \geq 0,99$ betrug, und die für das Training der jeweiligen ANNs verwendet wurden.

Hirnstruktur	DMNV/SolN		HypN		IntN	
	N	S	N	S	N	S
terminales Stadium	100 %	100 %	100 %	99,0 %	98,3 %	98,6 %
		[100]		[100]		[100]
120 d. p. i.	91,6 %	94,1 %	79,5 %	90,2 %	88,6 %	85,6 %
		[100]		[100]		[50]
90 d. p. i.	79,8 %	83,6 %	80,3 %	79,3 %	85,4 %	88,1 %
		[22]		[16]		[50]

normalem Mausserum inkubiert. Der monoklonale Antikörper 3F4 kann wie alle bislang für die Immunhistochemie tauglichen Antikörper nicht zwischen dem zellulären Prion-Protein PrP^C und der pathologischen Form PrP^{Sc} unterscheiden. PrP^{Sc} läßt sich von PrP^C jedoch durch Unterschiede in der morphologischen Erscheinung und Verteilung im Gewebe unterscheiden (Beekes et al., 1998; McBride und Beekes, 1999). Mit Sicherheit konnte mit dieser Methode nur das in größeren granulären Ablagerungen auftretende PrP^{Sc} identifiziert werden, winzigste mikrodisperse Formen ließen sich nur schwer vom Hintergrund unterscheiden. Die PrP^{Sc}-Ablagerungen zu den einzelnen Zeitpunkten variierten zwischen den Individuen. Die kräftigsten Anfärbungen wurden im DMNV beobachtet. DMNV und SolN waren immer stärker angefärbt als HypN. Im terminalen Stadium waren massive Ablagerungen in allen untersuchten Strukturen zu beobachten (siehe Abb. 3.15 auf der nächsten Seite). In den normalen Kontrollen und in den mit normalem Mausserum angefärbten Negativkontrollen war keine PrP^{Sc}-Anfärbung feststellbar (Abb. 3.15b). 120 d. p. i. waren die PrP^{Sc}-Ansammlungen schwächer als im terminalen Stadium und konnten als einzelne Körnchen im IntN (Abb. 3.15c) und im HypN (Abb. 3.15d) erkannt werden. 90 d. p. i. waren nur sehr schwache Färbungen kleinerer Aggregate im DMNV erkennbar (Abb. 3.15e).

3.8 Ergebnisse der Synchrotron-Messungen an Spinalganglien

Wie in Abschnitt 1.3.3.1 diskutiert wurde, lassen sich bei IR-Messungen mit Synchrotronstrahlung Ortsauflösungen in der Größe der Abbé-Grenze realisieren. Unter Verwendung der Synchrotron-Strahlungsquelle wurden thorakale Spinalganglien von einem Scrapie 263K-infizierten und einem scheininfizierten Hamster mit *mapping*-Messungen untersucht. Jede Messung erstreckte sich über ein einzelnes bzw. einige

3 Ergebnisse

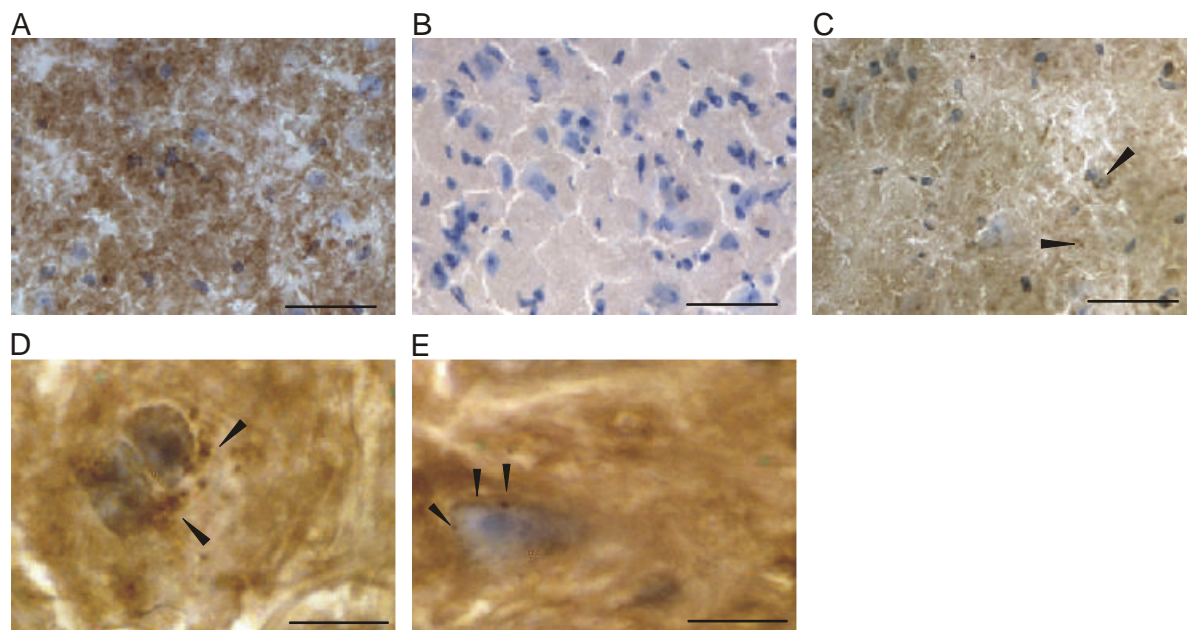


Abbildung 3.15: Immunfärbungen mit dem Antikörper mAb3F4. Ein Teil des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc} ist in Form von granulären Ablagerungen verschiedener Größe erkennbar. a) Massive PrP^{Sc}-Ansammlungen im DMNV im terminalen Stadium (40×), Maßstab: 40 μ m. b) DMNV, normale Kontrolle (40×), Maßstab: 40 μ m. c) IntN, 120 d. p. i. (40×), Maßstab: 40 μ m. d) HypN, 120 d. p. i. (100×), Maßstab: 10 μ m. e) DMNV, 90 d. p. i. (100×), Maßstab: 10 μ m. Pfeile weisen auf die granulären Ablagerungen hin.

wenige Neuronen in den Dünnschnitten der Ganglien. Die Immunfärbungen mit dem Antikörper 3F4 in einem direkt an den mit IR-Spektroskopie untersuchten angrenzenden Schnitt zeigten, daß im terminal infizierten Tier nicht alle Neuronen eines Spinalganglions PrP^{Sc}-Ablagerungen aufwiesen (siehe z. B. Abb. 3.16 auf der nächsten Seite). Deshalb waren gezielt Neuronen ohne Ablagerungen (Abb. 3.16b) und solche, in denen PrP^{Sc} besonders kräftig angefärbt war (Abb. 3.16a), untersucht worden. Im ungefärbten Präparat waren die einzelnen Ganglienzellen sehr gut unterscheidbar.

Das Verhältnis Signal/Rauschen betrug für die mit einer Blendengröße von 10 μ m und 256 *scans* aufgenommenen Absorptionsspektren im Amid I-Bereich ungefähr 600 (bestimmt aus den 1. Ableitungen). Die Auswertungen konzentrierten sich hauptsächlich auf den Amid I-Bereich, da die verschiedenen Komponenten der Amid I-Bande Aussagen über die Protein-Sekundärstruktur gestatten. Aus allen Originalspektren jedes Datensatzes wurde mit einem Makro unter OPUS (OS/2) die exakte Position des Absorptionsmaximums der Amid I-Bande ausgelesen und als Funktion des Ortes aufgetragen. Insgesamt liegen 14 Messungen von Zellen aus dem Ganglion des infizierten Tieres vor, aus Platzgründen sollen nur einige der Karten dargestellt werden. Abbildung 3.17 auf der nächsten Seite zeigt diese Karten für zwei Messungen in einem

3.8 Ergebnisse der Synchrotron-Messungen an Spinalganglien

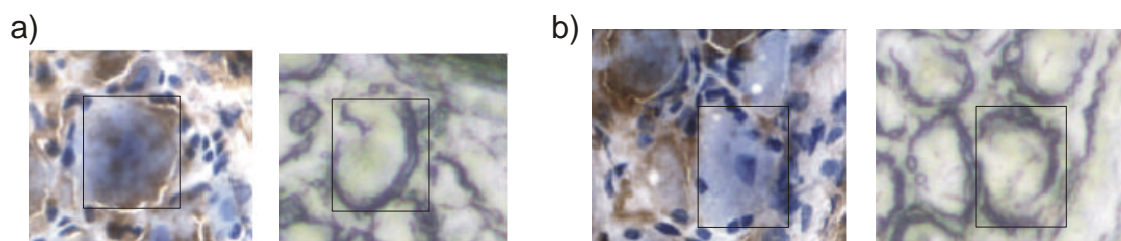


Abbildung 3.16: Mit dem Antikörper 3F4 angefärbter Dünnschnitt eines Spinalganglions aus einem Hamster im terminalen Stadium von Scrapie 263K und sequentieller, für die IR-Messungen am Synchrotron verwendeter Dünnschnitt. PrP^{Sc} erscheint braun gefärbt. Die in der *mapping*-Messung untersuchte Fläche ist durch ein Rechteck gekennzeichnet. a) Ganglienzelle mit PrP^{Sc}-Ablagerungen. b) Ganglienzelle ohne erkennbare PrP^{Sc}-Ablagerungen.

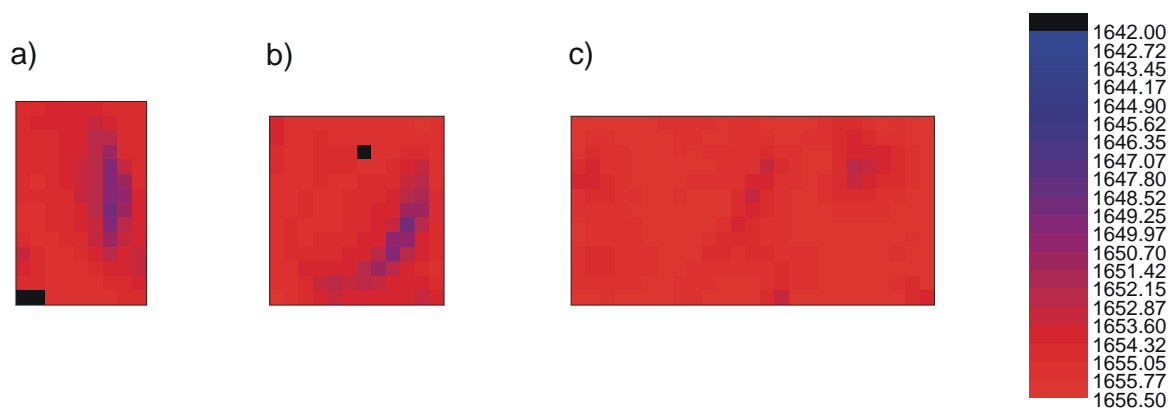


Abbildung 3.17: Position des Maximums der Amid I-Bande als Funktion des Ortes für drei der an Ganglion-Dünnschnitten durchgeführten Messungen. a) und b) zeigen Messungen jeweils einer Zelle aus einem Ganglion des infizierten Tieres, c) eine Messung über zwei Ganglienzellen eines gesunden Tieres. Die schwarzen Pixel in den Karten gehören zu Spektren, die die Qualitätskriterien nicht erfüllten und daher nicht weiter ausgewertet wurden.

Ganglion des infizierten Tieres und eine Messung aus einem gesunden Ganglion. Die Position des Absorptionsmaximums der Amid I-Bande ist nicht an allen Stellen in einer Ganglienzelle gleich. In den Messungen der gesunden Ganglien befand sich das Maximum der Amid I-Bande zwischen 1652 cm^{-1} und $1656,5\text{ cm}^{-1}$. Bei den Spektren der Ganglienzellen des infizierten Tieres lag das Absorptionsmaximum dieser Bande zwischen 1645 cm^{-1} und $1656,5\text{ cm}^{-1}$. Die Zellen, für die in den Messungen eine starke Erniedrigung der Frequenz beobachtet wurde, waren zuvor in einem parallelen Gefrierschnitt als Zellen mit PrP^{Sc}-Ablagerungen identifiziert worden. Umgekehrt war jedoch die Frequenzverschiebung nicht an allen Spektren aus 5 der 11 Messungen an „PrP^{Sc}-positiven“ Ganglienzellen zu finden. Abbildung 3.18 auf der nächsten Seite zeigt den Amidbereich für verschiedene Spektren aus dem infizierten Ganglion und aus gesun-

3 Ergebnisse

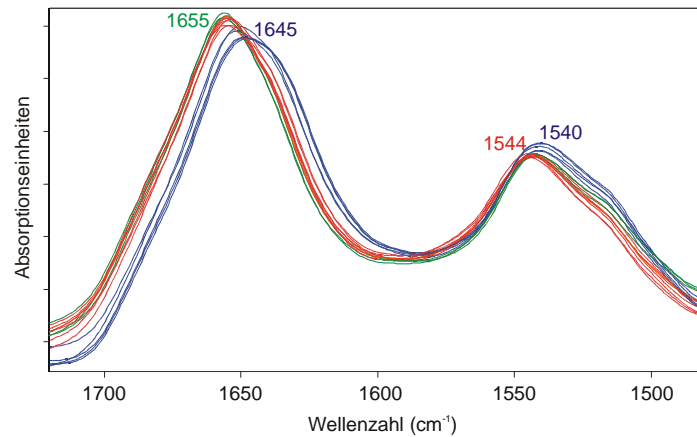


Abbildung 3.18: Originalspektren (vektornormiert zwischen 1500–1700 cm⁻¹) aus verschiedenen Bereichen von Zellen eines infizierten Ganglions (blaue und rote Spektren) und eines gesunden Ganglions (grüne Spektren).

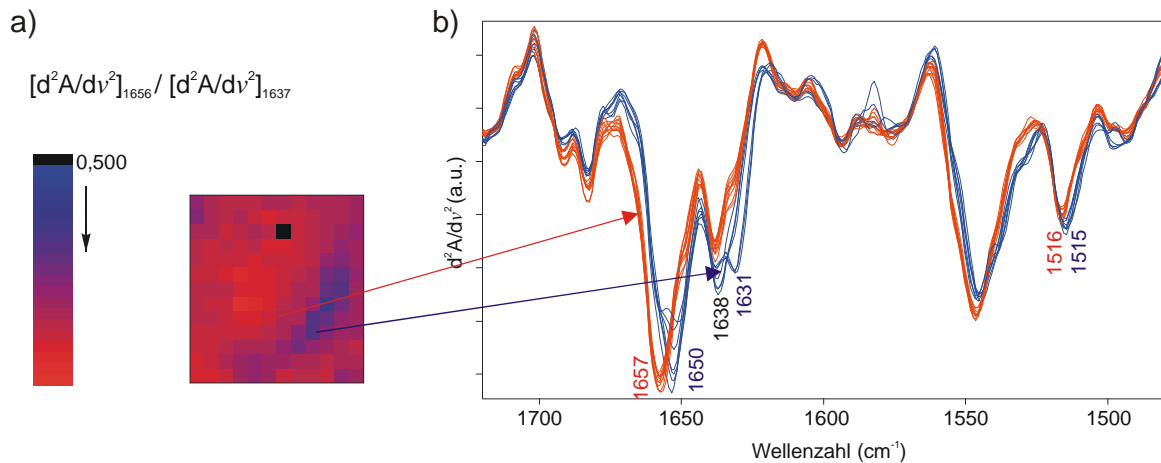


Abbildung 3.19: a) Verhältnis der zweiten Ableitungen an den Positionen 1655 cm⁻¹ und 1637 cm⁻¹ als Funktion des Ortes. Es ist das Ergebnis für einen Datensatz aus einem infizierten Ganglion dargestellt (vgl. Abb. 3.17b). b) Zweite Ableitungen einzelner Spektren aus den verschiedenen Bereichen der in a) dargestellten Ganglionzelle. Die Farben der Spektren entsprechen denen des in a) dargestellten Intensitätsverhältnisses.

den Ganglien, wobei die blauen Spektren an den „blauen“ Orten in Abb. 3.17a und b gemessen wurden und eine niedrige Frequenz der Amid I-Bande aufweisen. Die roten Spektren sind eine zufällige Auswahl aus allen anderen Regionen im infizierten Ganglion, von denen Spektren aufgenommen wurden. Es handelt sich hierbei sowohl um Spektren von Zellen, die im parallelen Schnitt PrP^{Sc}-Anfärbungen zeigten, als auch Zellen ohne PrP^{Sc}-Ablagerungen. Die grünen Spektren sind zufällig aus verschiedenen Messungen an den Kontrollganglien ausgewählt. Die Frequenzverschiebung der blau gezeichneten Spektren von ungefähr 10 cm⁻¹ ist sehr deutlich zu erkennen. Sie geht mit

einem Intensitätsverlust und einer Verbreiterung des Maximums der Bande einher (siehe Abb. 3.18). Außerdem ist eine Verschiebung des Maximums der Amid II-Bande von ca. 1544 cm^{-1} nach 1540 cm^{-1} in den blauen Spektren erkennbar. Für weitere Untersuchungen der Proteinbanden wurden zweite Ableitungen der Originalspektren gebildet. Beim Betrachten der zweiten Ableitungen einzelner Spektren fielen zunächst Intensitätsveränderungen der β -Faltblatt-Bande (bei ca. 1638 cm^{-1}) in einigen Spektren auf. Deshalb wurde nochmals eine Kartierung in allen Datensätzen vorgenommen, diesmal wurde das Verhältnis der zweiten Ableitungen an den Positionen 1655 cm^{-1} und 1637 cm^{-1} systematisch für alle Datensätze untersucht. In Abb. 3.19 auf der vorherigen Seite ist es für eine Messung als Funktion des Ortes aufgetragen. Wie ein Vergleich von Abb. 3.19 und Abb. 3.17 zeigt, war dieses Verhältnis an denjenigen Orten besonders niedrig, die auch die oben beschriebene Verschiebung der Amid I-Bande zu niedrigeren Energien zeigten (siehe Abb. 3.17). Die Untersuchungen der zweiten Ableitungen dieser Spektren verdeutlichen so, daß die beobachtete Verschiebung des Maximums der Amid I-Bande in den Originalspektren durch eine Erhöhung der Intensität der β -Faltblatt-Bande bei 1638 cm^{-1} und eine weitere Bande bei 1631 cm^{-1} , bedingt ist (siehe Abb. 3.19b). Außerdem trat eine Verschiebung der Bande bei 1656 cm^{-1} zu 1650 cm^{-1} auf, was auf eine erhöhte Absorption durch ungeordnete Strukturen hindeutet. Das erhöhte Signal der β -Faltblatt-Strukturen im Amid I-Bereich war mit Unterschieden im Amid II-Bereich korreliert (siehe in Abb. 3.19b blau dargestellte Spektren).

3.9 Ergebnisse der Messungen an Gewebestückchen

Für Vergleichszwecke waren neben den bisher beschriebenen mikrospektroskopischen Messungen, auf denen das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag, auch einige Messungen an hydratisierten Gewebestückchen in Küvetten durchgeführt worden. Neben den O–H-Streckschwingungen oberhalb von 3000 cm^{-1} wurden die Spektren der hydratisierten Proben vom Absorptionsmaximum der O–H-Biegeschwingungen im Amid I-Bereich dominiert. Das S/N der Spektren im Bereich $1450\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ betrug ca. 100. Die Vergleiche von Einzelspektren ergaben, daß spektrale Unterschiede zwischen dem Gewebe aus den kranken Tieren und den Kontrolltieren ausschließlich im Fingerprint-Bereich beobachtet wurden. In Abb. 3.20 sind die ersten Ableitungen von Spektren der Tiere im terminalen Stadium von Scrapie im Bereich $1480\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ dargestellt, dabei wurde jeweils über die Messungen aller Präparationen aus jedem Hirn gemittelt. Auffällige Unterschiede befanden sich zwischen 1100 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} . Die Bandenform des Absorptionsmaximums bei 1050 cm^{-1} war in den Spektren aus den kranken Tieren verändert, wie aus den dargestellten ersten Ableitungen deutlich hervorgeht. Diese Veränderung trug wahrscheinlich maßgeblich zur Trennung der Einzelspektren in der Clusteranalyse bei. Hierfür wurde analog den Clusteranalysen der Spektren aus den Mikroskopmessungen wieder der Bereich $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ verwendet (siehe Abb. 3.21 auf Seite 77). Die Spektren eines terminal kranken Hamsters (p33) wurden dabei mit

3 Ergebnisse

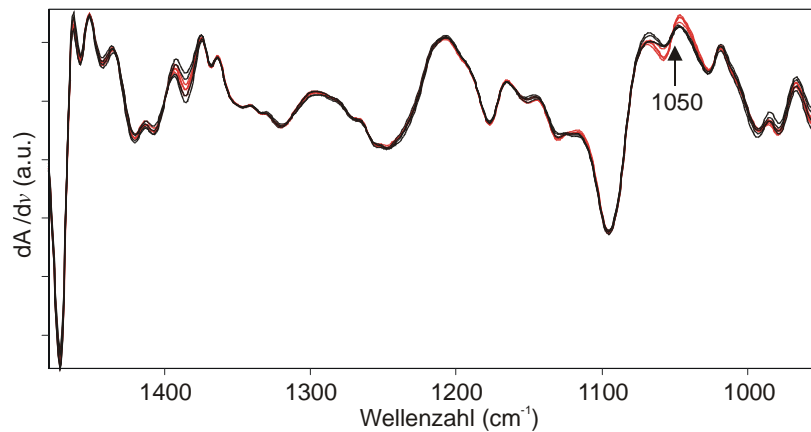


Abbildung 3.20: Erste Ableitungen von Spektren hydratisierter Proben von Medullagewebe aus vier Hamstern im terminalen Stadium von Scrapie (rot) und vier Kontrolltieren (schwarz). Vor der Ableitung wurden Mittelwerte aus mindestens 3 Spektren gebildet (vgl. auch Tab. 2.2 auf Seite 28).

denen der Kontrollhamster eingruppiert (Abb. 3.21(a)). Wurde nur die Information im Bereich 1100–1000 cm⁻¹ für die Clusteranalyse verwendet, kam es zu keinen Fehlklassifizierungen der Spektren im terminalen Stadium (Dendrogramm nicht gezeigt). 102 d. p. i. kam es auch zur Trennung der beiden Klassen, allerdings wurden insgesamt 7 von 34 Spektren falsch eingeordnet (siehe Abb. 3.21(b)). Auch die Eingrenzung des verwendeten Spektralbereiches auf 1100–1000 cm⁻¹ verbesserte die Trenngenauigkeit nicht. Die deutlich reduzierte Heterogenität zwischen beiden Klassen zu diesem Zeitpunkt nach Inokulation bei fast gleicher Anzahl Spektren weist auf die große Ähnlichkeit zwischen den Spektren hin. Die falsch klassifizierten Spektren gehören zu jeweils zwei Individuen (N: p28 und p32, S: p29 und p31), von denen jedoch mindestens die Hälfte der aufgenommenen Spektren in den korrekten Cluster einsortiert wurde.

3.9 Ergebnisse der Messungen an Gewebestückchen

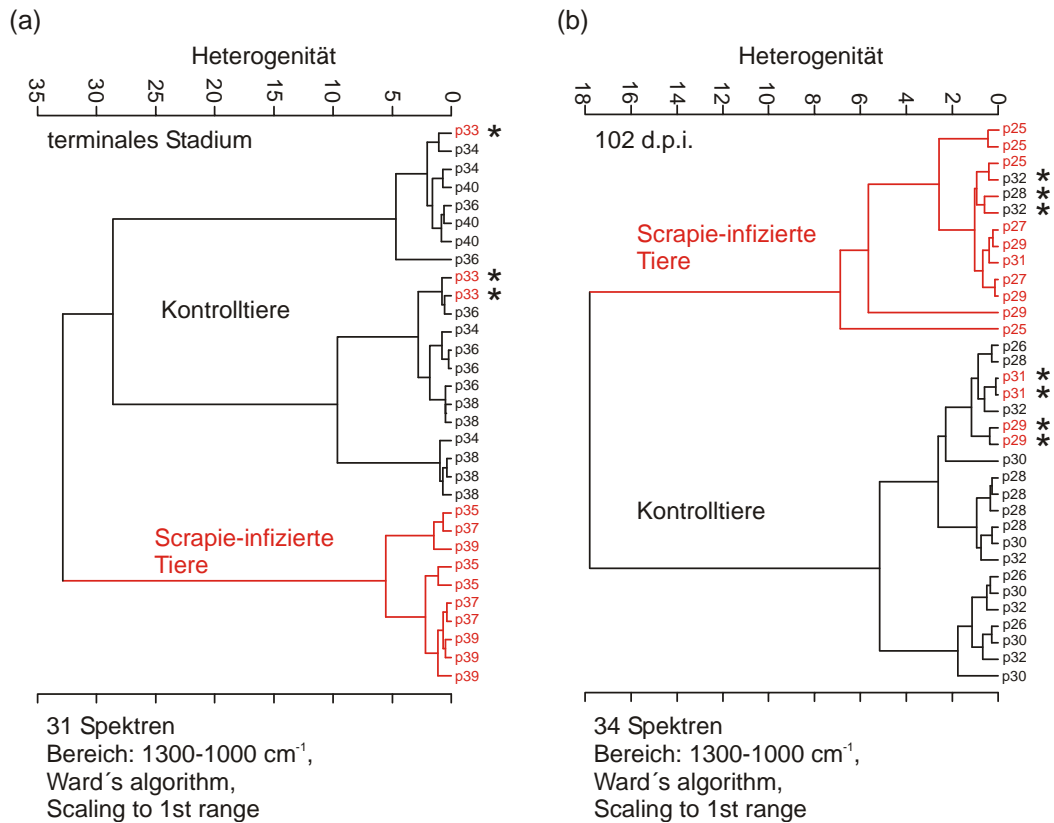


Abbildung 3.21: Ergebnisse von Clusteranalysen mit den Spektren des hydratisierten Medullagewebes von Scrapie-infizierten und Kontrollhamstern nach i. p.-Infektion. Die falsch eingeordneten Spektren sind mit „*“ gekennzeichnet. Jeder Probenname weist auf eine Präparation hin. Da von jedem Hirn mehrere Präparationen und somit Messungen durchgeführt wurden, tauchen alle Probenamen mehrmals auf.

3 Ergebnisse

4 Diskussion

4.1 Zuordnung der Spektren zu histologischen Strukturen

Der Vergleich zwischen Scrapie-infizierten und Kontrolltieren mußte mit Spektren identischer anatomischer Strukturen durchgeführt werden. Deshalb erforderte die für die mikrospektroskopischen Daten verwendete Auswertungsprozedur die Identifizierung der Spektren spezifischer Kerne aus dem Hirnstamm und Bereichen des Kleinhirnes. Zur Identifizierung dienten bildgebende Verfahren und Clusteranalysen. Mittels der Clusteranalysen wurden die Spektren entsprechend ihrer Ähnlichkeit in spektrale Klassen eingeordnet. Die spektralen Klassen entsprachen unterschiedlichen anatomischen Strukturen. Nach dem Vergleich mit sequentiellen Nissl-gefärbten Schnitten konnten dann die Spektren spezifischer Strukturen aus den Datensätzen, welche sich aus Spektren mehrerer verschiedener Strukturen zusammensetzten, isoliert und für die Vergleiche zwischen Scrapie-infizierten und Kontrolltieren herangezogen werden.

Für jedes Spektrum wurde zunächst das Protein/Lipid-Verhältnis (PLV) bestimmt (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.3.1) und dann für die Bildgebung im Hirngewebe verwendet. Diese IR-Übersichtsbilder waren in jeder der beiden untersuchten coronalen Schnittebenen sehr gut mit den angefärbten sequentiellen Schnitten vergleichbar. Im Bereich des Kleinhirnes wiesen die Kleinhirnerkerne und besonders der cerebelläre Cortex einen relativ hohen Proteingehalt auf, während in der weißen Substanz der Marklamelle der Lipidanteil überwog. Die weiße Substanz besteht zu einem Großteil aus Myelin. Myelin entsteht dadurch, daß sich Oligodendrogliazellen spiralg um die Axone der Nervenzellen winden. Dabei verschmelzen die benachbarten Zellmembranen zu einem geschlossenen Membrankomplex alternierender Protein- und Lipidlagen. Die Zellmembranen, aus denen diese Myelinscheiden aufgebaut sind, besitzen ein höheres PLV (1:4) als alle anderen Zellmembranen (Wehner und Gehring, 1990) und bestehen hauptsächlich aus Cerebrosiden, die langkettige Fettsäuren enthalten, aus Galactolipiden und aus Sulfatiden. Der Wert für das PLV, der aus den IR-Spektren ermittelt wurde, betrug für einige der Proben 0,22 und ist damit mit dem oben genannten Wert aus der Literatur vergleichbar. In Bereichen, in denen hauptsächlich neuronale Perikaryen und fast keine myelinisierten Axone liegen, wie z. B. in den Kleinhirnerkernen und in der Kleinhirnrinde, überwiegt der Proteinanteil. In der Medulla oblongata betrug das PLV überall mindestens 1 und variierte im Bereich der Kerne zwischen 1,5 und 4. Der DMNV und der SolN waren aufgrund eines sehr hohen PLV besonders leicht zu

erkennen.

Neben dem anhand eines spektralen Parameters durchgeführten *chemical mapping* wurden auch multivariate Mustererkennungsverfahren für die Identifizierung hirnstруктурspezifischer Spektren angewendet. Die klare Trennung der Spektren aus den verschiedenen Strukturen durch Clusteranalyse und die Unterschiede zwischen Mittelwertspektren von DMNV/SolN, HypN, IntN und weißer Substanz aus den Kontrollgruppen zeigen, daß der spektrale Bereich 1480 cm^{-1} - 950 cm^{-1} sich zur Unterscheidung der untersuchten histologischen Strukturen der grauen Substanz (DMNV/SolN, HypN und IntN) untereinander und von der weißen Substanz sehr gut eignet. Er enthält Absorptionsbeiträge verschiedener Molekülgruppen, welche ähnlich einem Fingerabdruck einzigartig für die verschiedenen Gewebestrukturen sind. In einer früheren Studie wurde dieser Spektralbereich bereits zur Unterscheidung von cerebellären Substrukturen verwendet (Kneipp et al., 2000). In den Clusteranalysen der Messungen in Ebene II (Cerebellum) waren jeweils deutlich die Spektren aus dem Bereich der Marklamelle (weiße Substanz) von denen des IntN (graue Substanz) separiert (siehe Abschnitt 3.3.2). Auch wenn die Datensätze zusätzlich Spektren aus anderen Strukturen der grauen Substanz, wie z. B. aus dem cerebellären Cortex oder aus Bereichen der angrenzenden Medulla oblongata enthielten, war innerhalb der Klasse der grauen Substanz noch eine Trennung der Spektren des IntN von diesen übrigen Spektren zu beobachten.

Das verlängerte Rückenmark (Medulla oblongata) besteht hauptsächlich aus Regionen, in denen sich Kerne (Verbände von neuronalen Zellkörpern und Gliazellen mit relativ wenig myelinisierten Nervenfasern) lokalisieren lassen und Gebieten, in denen sich neben den Perikaryen mehr Nervenfasern (weiße Substanz) befinden. In einem coronalen Schnitt wirkt die Medulla oblongata an vielen Stellen relativ homogen, und die verschiedenen Kerne lassen sich aufgrund ihres ähnlichen histologischen Aufbaus nicht ohne weiteres voneinander unterscheiden. Am Beispiel der Spektren des HypN in der Medulla oblongata wurde die Notwendigkeit einer topologischen Zuordnung der Spektren, d. h. die Anwendung von bildgebenden Verfahren im Zusammenhang mit vergleichenden histologischen Färbungen und der Vergleich mit anatomischen Karten besonders deutlich. Im Abschnitt 3.2.2 wurde beschrieben, wie sich mit Hilfe der Muster-basierten Kartierung (räumlich aufgelöste Darstellung des Ergebnisses einer Clusteranalyse) diejenigen Spektren identifizieren ließen, die aus an den SolN angrenzenden Bereichen anderer Kerne stammten und den Spektren von HypN sehr ähnlich waren. Durch die Verknüpfung von Klassifizierung mittels Clusteranalyse und dem bildgebenden Verfahren konnten alle Spektren aus anderen, für die Vergleiche nicht relevanten Strukturen aus den Datensätzen ausgeschlossen werden.

Es ließen sich in der Medulla oblongata allerdings nicht alle Substrukturen mit Hilfe der Clusteranalyse-basierten Karten anhand ihrer Spektren eindeutig voneinander trennen, wie insbesondere für die beiden Kerne DMNV und SolN gezeigt wurde. Die Spektren beider Strukturen waren jedoch gut von denen des HypN unterscheidbar. Auch das eben erwähnte Beispiel der fälschlich in der Gruppe HypN eingeordneten Spektren eines anderen Kerns zeigt, daß zwei unterschiedliche Kerne in der Medulla sich im Aufbau (z. B. in der Dichte der Anordnung der in ihnen enthaltenen neurona-

4.2 Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster

len Perikaryen) sehr ähnlich sein und eine ähnliche biochemische Zusammensetzung besitzen können, so daß man sie anhand ihrer Spektren nicht unbedingt voneinander unterscheiden kann. Bei näherer Betrachtung der Nissl-gefärbten Schnitte war erkennbar, daß DMNV und SolN eine sehr ähnliche, relativ hohe Dichte an Neuronen besitzen, während im HypN große Neuronen, die zum Teil stärker vereinzelt vorliegen als in DMNV und SolN, und zwischen denen teilweise myelinisierte Fasern liegen, vorherrschen. Es ist anzunehmen, daß diese Ähnlichkeiten bezüglich des histologischen Aufbaus von DMNV und SolN verantwortlich dafür zeichnen, daß die IR-Spektren der beiden Strukturen so schwer unterscheidbar sind. Beim DMNV und Teilen des SolN bestand weiterhin das Problem des genauen Lokalisierens beider Kerne im gefärbten Präparat. Sie liegen dicht beieinander, so daß eine fehlerhafte Zuordnung der Spektren aufgrund von Clusteranalyse-basierten Karten nicht auszuschließen war. Aufgrund der Einordnung in eine gemeinsame spektrale Klasse durch die Clusteranalysen und wegen der schwierigen räumlichen Trennbarkeit beider Kerne voneinander lag es deshalb nahe, die Spektren beider histologischen Strukturen bei allen Vergleichen als eine gemeinsame Gruppe (DMNV/SolN) zu betrachten. Wie später noch diskutiert wird, gibt es während des Verlaufs von Scrapie Unterschiede zwischen beiden Kernen. Bei Untersuchungen der Abfolge pathogenetischer Prozesse konnte jedoch auch gezeigt werden, daß der SolN unmittelbar nach dem DMNV hiervon betroffen ist (siehe Abschnitt 4.6).

4.2 Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster

4.2.1 Unterschiede in Lipiden

Da die Unterschiede zwischen den Spektren aus Scrapie-infizierten und gesunden Tieren in mehreren Absorptionsbanden auftraten, und sich die Absorption an einer bestimmten Position im Spektrum aus allen Beiträgen von Molekülen einer bestimmten Klasse zusammensetzt, kann man davon ausgehen, daß die krankheitsspezifischen Merkmale im Spektrum eine Überlagerung von Veränderungen mehrerer Arten von Molekülen reflektieren. Die phänotypischen Veränderungen, die bei Untersuchungen der Ultrastruktur mit anderen Methoden gefunden wurden, spiegeln wahrscheinlich diese beobachteten Veränderungen auf molekularem Niveau wider. In den Spektren der Scrapie-infizierten Tiere im terminalen Stadium sind in den untersuchten Strukturen HypN, IntN und der weißen Substanz, vor allem aber in der Gruppe DMNV/SolN Unterschiede im Bereich der Lipidabsorption zu finden. Dies gibt Hinweise auf bereits im Elektronenmikroskop beobachtete Prozesse wie z. B. die Bildung von Mikrovakuolen und intrazytoplasmatischen proliferierenden Membranlamellen, welche z. T. Mitochondrien und Vesikel einschließen (Liberski et al., 1989). Auch die erhöhte Anzahl Lysosomen, in denen Membranmaterial abgebaut wird (Choi et al., 1998) und neuronale Autophagie (Jeffrey et al., 1995) nehmen Einfluß auf die Zusammensetzung von Membransystemen und den Lipidstoffwechsel. Die leichte Abnahme der Intensität der Absorptionsbande der =C–H-Streckschwingung deutet auf Veränderungen

4 Diskussion

an Fettsäuren hin. Im Zusammenhang mit den Abbauprozessen wurde insbesondere für das Scrapie 263K-Hamster-Modell auch über Schädigungen der Struktur (Verlust von Cristae und Matrix) und Abnahme der Aktivität von Mitochondrien in Neuronen und damit verbundene Peroxidationsprozesse von Lipiden berichtet (Choi et al., 1998). Indizien für Oxidationsprozesse, die sich auf ungesättigte Fettsäuren auswirken, sind auch die erhöhten Konzentrationen der fettlöslichen Antioxidantien Ubichinon und α -Tocopherol in einem Scrapie-Maus-Modell (Guan et al., 1996) und der Enzyme Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase im Scrapie-infizierten Hamster (Choi et al., 1998), von denen vermutet wird, daß die Neuronen sie verstärkt synthetisieren, um sich bei einer erhöhten Produktion freier Radikale vor der damit verbundenen Peroxidation von Lipiden zu schützen (Guan et al., 1996; Choi et al., 1998).

Für das bereits erwähnte Scrapie-Maus-Modell wurde andererseits berichtet, daß, bis auf den Gehalt an Dolichol, welcher dramatisch sinkt, der Großteil der Membranlipide im infizierten Hirn unverändert bleibt (Guan et al., 1996). Leider existieren bisher keine analogen Untersuchungen für Scrapie 263K im Hamster. Dolichol hat in Modellmembranen einen destabilisierenden Effekt und erhöht sowohl die Membranfluidität als auch die Permeabilität. Die beschriebene Verringerung des Dolichol-Gehalts (im Maus-Modell) müßte daher zu einer erniedrigten Fluidität der Membranen führen, ein Vorgang, auf welchen auch die Verschiebungen der C–H-Streckschwingungsbanden der Spektren von DMNV/SolN im Hamster Hinweise sein könnten (vgl. Abschnitt 3.4.4). Eine Verringerung der Membranfluidität kann auch durch den bei der oben erwähnten Lipid-Peroxidation entstehenden, im Scrapie-Hamster um 40% erhöhten Vermittler Malondialdehyd (Choi et al., 1998), der direkt mit Membranlipiden interagiert (Chen und Yu, 1994), bedingt sein. Zellmembranen sind Protein-Lipid-Gemische, und eine Veränderung der Proteinabsorption wurde in den Scrapie-infizierten Hamstern im terminalen Stadium, insbesondere auch im DMNV/SolN, beobachtet (siehe Abschnitt 3.4.3). Deshalb erscheint es ebenso plausibel, daß sich eine veränderte Proteinzusammensetzung oder -konzentration der Membranen auf deren Ordnungszustand auswirkt. Die Verschiebung der α -Helix-Absorptionsbande könnte ein Hinweis auf Änderungen in Membranproteinen, deren membranständige Domänen ja zudem aus α -helikalen Strukturen bestehen, sein. Veränderungen in der Zusammensetzung von Membranproteinen und/oder eine Zunahme des relativen Proteinanteils können zu einem geänderten Ordnungszustand der Membranen und zu Veränderungen in der Absorption der darin enthaltenen Lipide führen.

Molekulare Veränderungen an den Fettsäureketten der Membranlipide bewirkten auch die Unterschiede zwischen den Spektren im Bereich der C–H-Biegeschwingungen (ungefähr zwischen 1480 cm^{-1} – 1350 cm^{-1} , vgl. Abb. 3.8 auf Seite 57 und Abb. 3.9 auf Seite 59). Auch an Schwingungsmoden der Kopfgruppen, z. B. denen, die von den Estergruppen der Lipide herrühren, konnten Veränderungen in den Spektren aus den infizierten Tieren im terminalen Stadium festgestellt werden. Im DMNV/SolN und im HypN wurde eine leichte Abnahme der Intensität der C=O-Streckschwingung der Estergruppen (bei 1742 cm^{-1}) bemerkt (vgl. Abb. 3.12 auf Seite 63). Dies ist sicher auf die bereits erwähnten massiven Abbauprozesse in Membransystemen der Zellen

4.2 Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster

zurückführbar. Unterhalb von 1300 cm^{-1} in den Spektren waren die an den PO_2^- -Gruppen der Phospholipide und an den Kohlenhydraten in Glykolipiden aufgetretenen Unterschiede lokalisierbar. Sie werden im Abschnitt 4.2.3 mit erörtert.

4.2.2 Veränderungen an Proteinen, Detektierbarkeit von PrP^{Sc}

Der Bereich der Amid I- und der Amid II-Banden wird durch Schwingungen im Peptidrückgrat von Proteinen dominiert. Die exakte Position der Amid I-Bande ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) wird von der Protein-Sekundärstruktur bestimmt. Bei Betrachtung der Intensitätsverteilungen in diesem Spektralbereich ließ sich feststellen, daß die Proteine im Hirngewebe hauptsächlich α -helikale Strukturen besitzen: die typischen Banden für β -Faltblatt-Strukturen (1638 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} , 1683 cm^{-1} , 1692 cm^{-1}) waren nur relativ schwach ausgeprägt, während sich das Maximum der Absorption im Amid I-Bereich bei 1656 cm^{-1} befand (siehe Abb. 3.12 auf Seite 63). In den Spektren der weißen Substanz war der Intensitätsunterschied zwischen der Bande bei 1656 cm^{-1} und den β -Faltblatt-Banden besonders groß (Abb. 3.12). Aufgrund des hohen Membrananteils im Myelin liegt ein großer Teil der Proteine der weißen Substanz eingebettet in Lipidmembranen vor. Wie z. B. bei in vitro-Untersuchungen des *myelin basic protein*, das zusammen mit dem sog. *proteolipid protein* ungefähr 50% des Proteinanteils in der weißen Substanz ausmacht (LeVine und Wetzell, 1993), gezeigt wurde, besteht dieses Protein in Lösung überwiegend aus ungeordneten Strukturen, in einer Myelin-Umgebung nimmt es hauptsächlich α -helikale Strukturen an (siehe z. B. Stuart, 1997). Daß die spektrale Information der Amid I-Region auch für eine Differenzierung zwischen Strukturen grauer und weißer Substanz verwendet werden kann, zeigte eine Clusteranalyse in diesem Spektralbereich (siehe (b) in Abb. 3.14 auf Seite 67).

Beim Vergleich der Spektren aus Scrapie-kranken Hamstern und Kontrolltieren zeigte sich, daß Unterschiede in der Proteinabsorption nicht in allen untersuchten histologischen Strukturen gleichermaßen auftraten. Sie waren besonders in Regionen, in denen viele Perikaryen lokalisiert sind, also in den untersuchten Hirnnervenkernen und im IntN, zu finden (vgl. Abb. 3.12 auf Seite 63). Eine Verschiebung der Bande bei 1656 cm^{-1} zu niedrigeren Energien trat in den beiden Kernen in der Medulla oblongata auf, wobei sie am deutlichsten im DMNV/SolN ausgeprägt war. Im Amid II-Bereich hingegen waren die Spektren aus den Scrapie-infizierten Tieren und den Kontrolltieren nahezu identisch in allen untersuchten histologischen Strukturen.

Eines der auffälligsten molekularen Merkmale aller TSE ist die Ablagerung des pathologischen Prion-Proteins (PrP^{Sc}), welches einen höheren Gehalt an β -Faltblatt-Strukturen aufweist als sein zellulärer Vorläufer PrP^C (Pan et al., 1993). Im Fall der Alzheimer-Krankheit konnten die sich bildenden Amyloid-Plaques des Proteins A β im Hirngewebe mittels IR-Mikrospektroskopie auf Grundlage einer Verschiebung des Maximums der Amid I-Bande von ca. 1653 cm^{-1} (α -helikale und/oder ungeordnete Strukturen) nach 1631 cm^{-1} (β -Faltblatt-Strukturen) erkannt werden (Choo et al., 1996). In den Spektren der Scrapie-infizierten Tiere waren nur im terminalen

4 Diskussion

Stadium der Krankheit Veränderungen der für β -Faltblatt-Strukturen charakteristischen Banden zu beobachten. Dort konnte eine leichte Erniedrigung der Intensität bei 1638 cm^{-1} in den Strukturen DMNV/SolN und IntN sowie in der weißen Substanz festgestellt werden, was allerdings auf eine Verringerung des β -Faltblatt-Anteils an Protein-Sekundärstrukturen hindeutet. Die niederfrequente β -Faltblatt-Bande bei 1629 cm^{-1} ist in den meisten Gewebespektren nur extrem schwach ausgeprägt (vgl. z. B. auch Lasch, 1999) und war nur in den Spektren der weißen Substanz auflösbar (siehe Abb. 3.12 auf Seite 63). Zwischen Scrapie-infizierten und Kontrolltieren waren bei dieser Frequenz jedoch keine Unterschiede feststellbar. Zunächst scheint insbesondere die leichte Abnahme des β -Faltblatt-Anteils überraschend, zumal PrP^{Sc}-Ablagerungen mittels Immunhistochemie eindeutig nachweisbar waren (siehe Abschnitt 3.7) und in anderen Studien in vitro der erhöhte Anteil an β -Faltblatt-Strukturen in PrP^{Sc} mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Pan et al., 1993). Berücksichtigt man jedoch den geringen Anteil von PrP im Gewebe ($\sim 0,1\%$ des Gesamt-Proteinanteils), so erscheint das Ergebnis nicht verwunderlich: charakteristische Veränderungen der Amid I-Bande aufgrund eines erhöhten β -Faltblatt-Anteils im PrP werden wahrscheinlich durch viel drastischere Veränderungen in Gehalt und Sekundärstruktur anderer Proteine im Gewebe überlagert und sind deshalb im Spektrum nicht mehr detektierbar. Bei den PrP^{Sc}-Ablagerungen in 263K Scrapie-infizierten Hamstern handelt es sich eher um diffuse und granuläre Strukturen, deren Größe schätzungsweise $\leq 1\text{--}2\ \mu\text{m}$ beträgt, und weniger um die relativ großen „klassischen“ kongophilen Plaques von mehreren $10\ \mu\text{m}$ Größe, wie man sie bei anderen TSE oder bei der Alzheimer-Krankheit findet. In der Studie von Choo et al. konnten beispielsweise von einem $A\beta$ -Aggregat mehrere Spektren von jeweils einer Fläche von $12\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$, die sich ausschließlich innerhalb der Proteinansammlung befanden, aufgenommen werden, denn die $A\beta$ -Plaques hatten Durchmesser von $40\text{--}50\ \mu\text{m}$ (Choo et al., 1996). Diese Art des gezielten *map-pings* von großen Plaques ist bei den durch Scrapie 263K verursachten fein-dispersen PrP^{Sc}-Ablagerungen nicht möglich.

Ein erster Versuch, relativ große PrP^{Sc}-Aggregate eventuell doch mit IR-Mikrospektroskopie im Nervengewebe detektieren zu können, wurde mit den Ganglienuntersuchungen an einer Synchrotronquelle unternommen. Hierbei sollten Spektren von einer kleinstmöglichen Gewebefläche aufgenommen und so eventuell winzige Bereiche, in denen die PrP^{Sc}-Konzentration lokal erhöht ist, gefunden werden. Spinalganglien gehören zum peripheren Nervensystem und sind Strukturen, welche die Perikaryen dorsaler Fasern enthalten, die afferente Informationen von sensorischen Rezeptoren aus der Peripherie zum zentralen Nervensystem weiterleiten. Im Verlauf von Scrapie sammeln sich in und um diese Neuronen PrP^{Sc}-Aggregate (z. B. McBride et al., 2001). Immunfärbungen zeigten, daß einige der Nervenzellen jedoch auch im terminalen Krankheitsstadium frei von den Ablagerungen bleiben (siehe Abb. 3.16 auf Seite 73). Die einzelnen Neuronen der Spinalganglien sind relativ groß ($30\text{--}50\ \mu\text{m}$) und auch in einem ungefärbten Dünnschnitt leicht zu erkennen, so daß man definiert einzelne große Zellen orts aufgelöst untersuchen kann. Wie in Abschnitt 1.3.3.1 diskutiert wurde, läßt sich unter Verwendung einer Synchrotron-Lichtquelle die maximale Ortsauflösung bei Wellenlängen im IR um $10\ \mu\text{m}$ ausnutzen. Hiermit konnten im sequenti-

4.2 Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster

ellen Schnitt Spektren einzelner Zellen mit und ohne erkennbare PrP^{Sc}-Ablagerungen selektiv gemessen werden. Die Spektren wurden zunächst gezielt auf Veränderungen in der Sekundärstruktur-sensitiven Amid I-Region untersucht. Eine Auftragung der Position des Amid I-Absorptionsmaximums zeigte, daß das Maximum der Bande örtlich innerhalb der Zellen variierte, und in einigen Spektren aus Zellen des infizierten Ganglions um ca. 10 cm^{-1} zu niedrigeren Energien verschoben war (Abb. 3.18 auf Seite 74). In den zuletzt genannten Spektren war auch das Maximum der Amid II-Bande von ca. 1544 cm^{-1} nach 1540 cm^{-1} verschoben. Die Verschiebung der Amid I-Bande deutet auf die Anwesenheit von Proteinen mit veränderter Sekundärstruktur an diesen Stellen im Gewebe hin. Wie aus den zweiten Ableitungen ersichtlich wurde, kam diese Veränderung durch eine Verschiebung der α -Helix-Bande zu niedrigen Wellenzahlen, eine Zunahme der Intensität bei 1638 cm^{-1} und eine nur in diesen Spektren sichtbare Bande bei 1631 cm^{-1} zustande. Die beiden letzteren Banden werden β -Faltblatt-Strukturen zugeordnet, wobei insbesondere die niederfrequente Bande bei 1631 cm^{-1} auf Peptidstränge mit starken intermolekularen Wasserstoffbrücken hindeutet. Auch in den bereits erwähnten Untersuchungen an Alzheimer-A β -Amyloidablagerungen (Choo et al., 1996) wurde für den Kernbereich einer plaqueförmigen Ablagerung, in welchem fast ausschließlich A β -Protein vorliegt, eine Verschiebung der Amid I-Bande nach 1631 cm^{-1} beschrieben. Zudem war dort ebenfalls eine Verschiebung der Amid II-Bande von 1542 cm^{-1} nach 1540 cm^{-1} beobachtet worden (vgl. Choo et al., 1996).

Das Auftreten der Bande bei 1631 cm^{-1} und die Verschiebung des Amid II-Maximums in einigen der Spektren von Neuronen, bei denen zuvor deutliche PrP^{Sc}-Ablagerungen im sequentiellen Schnitt sichtbar waren (siehe Abb. 3.19 auf Seite 74), sowie ihre Abwesenheit in sämtlichen an Ganglien von Kontrolltieren durchgeführten Messungen sind möglicherweise ein Hinweis darauf, daß an den Orten, von denen diese Spektren stammen, PrP^{Sc} in erhöhter Konzentration vorliegt. Da der Durchmesser der Aggregate wahrscheinlich maximal der Schnittdicke entspricht, können die Immunfärbungen am jeweiligen sequentiellen Schnitt jedoch lediglich Anhaltspunkte für Vergleiche bieten. Die beschriebenen Veränderungen der Amid I-Bande wurden häufig an den Randbereichen der Neuronen beobachtet. Dort waren z. T. auch die Anfärbungen besonders intensiv (vgl. z. B. a) in Abb. 3.16 auf Seite 73 mit b) in Abb. 3.17 auf Seite 73). Andererseits ist eine Quantifizierung bei einer konventionellen Immunfärbung nur sehr grob möglich, d. h. es sind nur Unterschiede zwischen einer leichten Anfärbung und einer besonders deutlichen Darstellung der Ablagerungen eindeutig voneinander abgrenzbar. Um endgültig zeigen zu können, daß es sich bei den Ablagerungen tatsächlich um PrP^{Sc} handelt, müßten identische, mikrospektrometrisch untersuchte Schnitte nachträglich immunhistochemisch gefärbt werden, was aufgrund der langen, trockenen Lagerung der Schnitte bei Raumtemperatur technisch extrem anspruchsvoll ist. Ein passendes Protokoll hierfür konnte bisher noch nicht etabliert werden.

4.2.3 Veränderungen an Phospholipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren

Interpretationen der spektralen Veränderungen im Sinne einer expliziten Nennung einzelner spezifischer Moleküle sind in der Region unterhalb 1300 cm^{-1} nur eingeschränkt möglich. Die Schwingungsmoden unterschiedlichster Molekülgruppen überlagern sich hier und liefern eine fingerabdruckartige, hochspezifische Information über die biochemische Zusammensetzung des Gewebes. Ausgehend von den Kenntnissen über den biochemischen Aufbau von Hirngewebe können jedoch bestimmte Molekülgruppen eingegrenzt werden, an denen Veränderungen zu veränderten IR-Spektren der Hirne Scrapie-infizierter Hamster führen.

Lipidmoleküle besitzen in dem hier diskutierten Spektralbereich ebenfalls Absorptionsbanden. Die Absorptionsmaxima der P=O-Streckschwingungen der PO_2^- -Kopfgruppen liegen bei 1240 cm^{-1} (asymmetrische Streckschwingung) und bei 1080 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung). An diesen Banden sind Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und Kontrollhamster bereits um 120 d. p. i. im DMNV/SolN und im HypN erkennbar (vgl. Abb. 3.11 auf Seite 62). Eine Untersuchung zum Lipidgehalt nach einer Lipidextraktion aus den Gehirnen von Scrapie-infizierten Mäusen ergab allerdings keine Veränderungen im Gehalt an Phospholipiden (Guan et al., 1996). Über eventuelle Veränderungen des Phospholipidgehaltes in Scrapie-Hamstern sind aus der Literatur keine Erkenntnisse zu gewinnen. Ein Beitrag durch den von Guan et al. berichteten erhöhten Gehalt an Dolichylphosphat (Guan et al., 1996) zur beobachteten veränderten Absorption von Lipiden im Fingerprint-Bereich ist ebenfalls denkbar. Bei dieser Verbindung müßten Streckschwingungen der PO_3^{2-} -Gruppe bei 1070 cm^{-1} und 970 cm^{-1} zu beobachten sein (Stuart, 1997). Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Absorptionsbeiträgen im Bereich zwischen 1080 cm^{-1} und 1060 cm^{-1} kann diese Frage jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Bei der Erörterung der Frage nach den veränderten Absorptionsintensitäten der PO_2^- -Gruppen müssen neben den Lipiden jedoch auch Veränderungen an Nukleinsäuren in Erwägung gezogen werden. Möglicherweise machen diese sogar einen großen Anteil an den Unterschieden der Banden in der Phosphodiester-Region aus. Um dies abzuschätzen, wurde ein Spektrum des Phospholipids Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), bei dem auf die Ester-Carbonylbande (1739 cm^{-1}) normiert wurde, mit Spektren aus grauer und weißer Substanz verglichen. Dabei besaß das DMPC-Spektrum an der symmetrischen und asymmetrischen PO_2^- -Streckschwingung ungefähr ein Drittel der Bandenintensität der Gewebespektren. Geht man davon aus, daß die C=O-Bande bei 1739 cm^{-1} nicht ausschließlich von Phospholipiden, sondern auch noch von anderen Estern hervorgerufen wird, verringert sich der Anteil der Phospholipide am Absorptionsbeitrag der PO_2^- -Gruppen noch entsprechend. Experimente, bei denen die PO_2^- -Banden vor und nach Ethanolbehandlung in einzelnen Zellen untersucht wurden, zeigten jedoch, daß der Beitrag der Phospholipide an der Absorption in dieser Region des Spektrums nicht vernachlässigbar ist (Peter Lasch, persönliche Mitteilung). Die Zellkerne der Nervenzellen enthalten reichlich DNA in Form von locker gelagertem Chromatin. Weiterhin lassen die deutlich ausgeprägten Nucleoli in den Zellkernen auf eine

4.2 Unterschiede zwischen den Spektren Scrapie-infizierter und gesunder Hamster

intensive RNA-Synthese schließen. Die Unterschiede an den PO_2^- -Streckschwingungen waren auch hauptsächlich in Bereichen mit vielen Perikaryen (DMNV/SolN, HypN) und weniger in der weißen Substanz feststellbar. In den Perikaryen sind die Zellkerne, andererseits aber auch die von allen Abbauprozessen betroffenen Zellorganellen enthalten. Die Absorptionsbeiträge von DNA und RNA in Spektren von Geweben und einzelnen Zellen sind bisher in mehreren Arbeiten ausführlich untersucht und diskutiert worden (siehe z. B. Wood, 1998; Diem et al., 1999). In Abb. 3.8 auf Seite 57 sind bei $980\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ deutliche Unterschiede zwischen den Spektren sichtbar. In diesem Bereich liegen Streck- und Biegeschwingungen der Uracil-Ringe und Schwingungen des Ribose-Phosphat-Rückgrats von RNA (z. B. Wood, 1998). Auch zwischen 1100 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} sind die Unterschiede zwischen den Spektren wahrscheinlich auf Veränderungen an RNA-Molekülen zurückführbar, hier befindet sich eine durch C-O-Streckschwingungen der Ribose zustandekommende Absorptionsbande, die in der DNA fast nicht vorhanden ist (Wood, 1998). Zwischen 1095 cm^{-1} und 1070 cm^{-1} wird die PO_2^- -Streckschwingungsbanden sowohl von DNA als auch von RNA lokalisiert (Diem et al., 1999). Spektrale Unterschiede in diesem Bereich sind auf eine Änderung des DNA/RNA-Verhältnisses zurückführbar. Aus mehreren Studien ist bekannt, daß es im Verlauf von TSEs zur Apoptose und einem damit verbundenen gezielten Abbau von DNA kommt (Fairbairn et al., 1994; Lucassen et al., 1995), und daß sich die Zusammensetzung von mRNAs verändert, indem bestimmte Gene hoch- oder herunterreguliert werden (Diedrich et al., 1993; Riemer et al., 2000).

Wie an dieser Stelle bereits deutlich wird, waren viele Unterschiede im Bereich unterhalb 1200 cm^{-1} an Banden, die Schwingungsmoden von Kohlenhydraten zugeordnet werden können, zu finden. Im terminalen Stadium waren zwischen 1100 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} die auffälligsten spektralen Veränderungen festzustellen (vgl. Abb. 3.8 auf Seite 57). Die ersten Unterschiede, die in den Mittelwertspektren der infizierten Tiere im DMNV/SolN 90 d. p. i. sichtbar wurden, befanden sich bei 1050 cm^{-1} (vgl. Abb. 3.10 auf Seite 61). Diese Bande kann wahrscheinlich einer Ringschwingung von Zuckern zugeordnet werden (vgl. z. B. Parker, 1983). Neben der bereits erwähnten Funktion in Form von Ribose bzw. Desoxyribose als Bestandteile von Nukleinsäuren und Nucleotiden spielen Kohlenhydrate auch eine wichtige Rolle in den Glykolipiden des Hirngewebes. Im Gehirn treten Cerebroside (z. B. Galactosylsphingosin) und Ganglioside, deren Zuckerrest noch weitere glykosidische Bindungen und eine terminale Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) enthält, als wichtige Membranbildner auf. Auch viele Proteine in den Membranen sind glykosyliert. Aus Untersuchungen von intracerebral infizierten Hamstern und einer vererbaren TSE im Menschen, der Fatalen Familiären Insomnie ist bekannt, daß sich der Glukosemetabolismus in den betroffenen Gehirnen drastisch verändert (Gregoire et al., 1983; Cortelli et al., 1997). Die beobachteten Veränderungen in der Absorption von Kohlenhydraten können daher sowohl durch einen veränderten Gehalt an metabolischem Zucker als auch durch geänderte Konzentrationen von Glykolipiden und Nukleinsäuren, z. B. aufgrund der bereits erwähnten Änderungen im DNA- bzw. RNA-Gehalt, bedingt sein. Über das Ausmaß der einzelnen Effekte und darüber, welcher dabei vorherrscht, ist wenig bekannt. Ursachen für Veränderungen sind höchstwahrscheinlich in allen aufgezählten Prozessen

zu suchen, mit Sicherheit werden sie auch noch von anderen Veränderungen begleitet.

4.3 Unterscheidung von Spektren mit Mustererkennungsverfahren

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den Scrapie-bedingten Veränderungen der Hirngewebsspektren nicht um Veränderungen einzelner definierter Absorptionsbanden, sondern um ein komplexes Muster an Änderungen, das zwischen den verschiedenen Stadien der Krankheit und den unterschiedlichen Hirnstrukturen variiert. Für die Unterscheidung von Einzelspektren aus den Datensätzen der Hirnnervenkerne und des Kleinhirnes Scrapie-infizierter und gesunder Hamster wurden deshalb Mustererkennungsverfahren angewendet.

Die Clusteranalyse ist ein unüberwachtes Klassifizierungsverfahren, bei dem ähnliche Spektren zu Gruppen zusammengefaßt werden. Der Begriff „unüberwacht“ bedeutet dabei, daß keine vorherige Zuordnung der Spektren zu bestimmten Klassen notwendig ist, sondern daß eine Gruppierung aller Spektren auf Grundlage der spektralen Distanzen als Maß für ihre Ähnlichkeit untereinander stattfindet. Im terminalen Krankheitsstadium wurden in allen untersuchten histologischen Strukturen die Spektren aus den kranken Tieren von denen aus den Kontrolltieren getrennt. Dies war sowohl unter Verwendung des Bereiches $1480\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, als auch bei Eingrenzung der Information auf die Spektralbereiche $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ oder $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ fast ohne Ausnahmen möglich. In den früheren Krankheitsstadien gestaltete sich die Auswahl eines geeigneten Bereiches, in dem die Unterschiede zwischen den Spektren zur Trennung zwischen beiden Klassen mit möglichst wenigen falschen Einordnungen führten, jedoch schwieriger. Als optimal ergab sich der Bereich $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. Aufgrund der in ihm enthaltenen Information konnten im Stadium von 120 d. p. i. die Spektren von krankem und gesundem DMNV/SolN und HypN voneinander unterschieden werden (vgl. Tab. 3.2 auf Seite 66). Eine Verkleinerung des Bereiches auf die Region $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, auf die sich in den Mittelwertspektren die ersten Veränderungen in den infizierten Hirnen reduzierten, führte nicht zu einer deutlicheren Trennung, und im präklinischen Stadium (90 d. p. i.) war eine Unterscheidung der einzelnen Pixelspektren nicht möglich.

Die Mittelwertspektren aus DMNV/SolN waren hingegen zum Zeitpunkt 90 d. p. i. bereits voneinander unterscheidbar (vgl. Abb. 3.10 auf Seite 61 oder Abb. 3.14 auf Seite 67). Dies lag wahrscheinlich daran, daß sich das Verhältnis Signal/Rauschen durch das Mitteln über viele Spektren extrem verbesserte. In die Clusteranalysen mit den Einzelspektren ging hingegen viel irrelevante Information ein, so daß die Unterschiede zwischen „infiziert“ und „nicht-infiziert“ nicht genügend ins Gewicht fielen und demzufolge die Überlappung der beiden spektralen Klassen zu groß war.

Die Klassifizierung mit künstlichen neuronalen Netzen (ANNs) ist im Gegensatz zur Clusteranalyse eine überwachte Methode, bei der jedes Spektrum eines Trainingssatzes und eines Validierungssatzes entweder der Klasse „infiziert“ bzw. „nicht-infiziert“

4.4 Anmerkungen zu den vergleichenden Immunfärbungen

zugewiesen wurde. Bei der für die Merkmalsselektion für das Training der neuronalen Netze verwendeten einfaktoriellen Varianzanalyse wurde für jeweils zwei benachbarte Datenpunkte überprüft, ob sie sich zwischen den beiden Spektrenklassen signifikant unterschieden. Auf diese Weise wurde versucht, alle spektrale Information auszuschließen, die für die Unterscheidung zwischen beiden Klassen nicht relevant war. Gleichzeitig konnten Bereiche des Spektrums, deren Kombination das Ergebnis der Clusteranalysen nicht verbessert hatte, in denen jedoch Unterschiede zwischen den Spektren beobachtet worden waren, wie z. B. der Bereich der Lipidabsorption (vgl. Abb. 3.13 auf Seite 64) mit für die Unterscheidung durch die ANNs verwendet werden. Die Anwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse ist ein einfaches Selektionsverfahren, welches die Eigenschaft besitzt, daß benachbarte Datenpunkte in den Spektren, die ja zum Teil derselben Absorptionsbande entstammen und deshalb korreliert sind, gleichzeitig selektiert werden, so daß häufig breitere Frequenzbänder ausgewählt werden. Die Methode der einfaktoriellen Varianzanalyse wurde in dieser Arbeit der multiplen Kovarianzanalyse, welche die beschriebene Korrelation berücksichtigt, vorgezogen, da mit ihr gleichzeitig Aussagen zur statistischen Signifikanz der Datenpunktauswahl getroffen werden konnten (siehe Abschnitt 2.6.6.3). Die Zahl der auf diese Weise ausgewählten Datenpunkte in den Spektren ist 90 d. p. i. in den Datensätzen von DMNV/SolN und HypN noch relativ gering (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 70). Die Auswahl einer vergleichsweise großen Anzahl Datenpunkte aus den IntN-Spektren hängt damit zusammen, daß von dieser Struktur viel mehr Spektren zur Verfügung standen als für DMNV und HypN (siehe Tab. 3.1 auf Seite 51) und die Anzahl der Spektren bei der Berechnung der Varianz innerhalb der Gruppen berücksichtigt wird (Gl. 2.8 auf Seite 42). Es wurde beobachtet, daß die Zahl der ausgewählten signifikanten Datenpunkte mit Fortschreiten des Krankheitsprozesses drastisch zunahm.

Beim Training der künstlichen neuronalen Netze auf Grundlage der Information über die Klassenzugehörigkeit der Trainings- und Validierungsspektren und der ausgewählten Datenpunkte verringerte sich die Anzahl der Trainingszyklen mit Zunahme der Datenpunkte, die für das Training zur Verfügung standen. Diese Beobachtung wurde auch für andere Systeme gemacht (vgl. Udelhoven et al., 2000). Mit der Anzahl der sich signifikant unterscheidenden Datenpunkte erhöhte sich die Identifizierungsgenauigkeit der ANNs deutlich (vgl. Tab. 3.4 auf Seite 71).

4.4 Anmerkungen zu den vergleichenden Immunfärbungen

Bei den Immunfärbungen, die in dieser Arbeit für Vergleichszwecke an direkt auf die IR-Proben folgenden Gefrierschnitten durchgeführt wurden, konnten Ablagerungen des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc} markiert werden. Hierfür wurde der aus einer Zellkultur gewonnene monoklonale Antikörper 3F4 (Kascsak et al., 1987) verwendet. Wie unter Abschnitt 2.2.3 bereits erwähnt wurde, bindet dieser Antikörper wie alle derzeit für die Immunhistochemie zu Verfügung stehenden Antikörper sowohl

an PrP^C als auch an PrP^{Sc}. Bei der Anwendung von Verfahren, bei denen durch einen Proteinase K-Verdau zunächst der Anteil an PrP^C entfernt wird und anschließend PrP^{Sc} nachgewiesen wird, wie z. B. dem Histoblot (Taraboulos et al., 1992) oder dem PET-Blot (Schultz-Schaeffer et al., 2000), stellt die Bindung von mAb3F4 an beide PrP-Formen kein Problem dar. Wie aus zahlreichen Arbeiten an Paraffinschnitten deutlich wurde, kann mAb3F4 auch erfolgreich für die Anfärbung von Gewebeschnitten verwendet werden, da sich die Verteilung und das morphologische Erscheinungsbild von PrP^{Sc} deutlich vom PrP^C unterscheiden (Beekes et al., 1998; McBride und Beekes, 1999). Kürzlich wurde auch mit der PET-Blot-Technik bewiesen, daß es sich bei den in Paraffinschnitten nachgewiesenen granulären PrP^{Sc}-Aggregaten tatsächlich um die PK-resistente Form handelt (McBride et al., 2001). Trotz der prinzipiellen Verwendbarkeit von Gefrierschnitten für den immunhistochemischen Nachweis von PrP^{Sc}, beispielsweise mit Kaninchen-Antiseren gegen PrP(27–30) (Taraboulos et al., 1992), wurde über Anfärbungen von PrP^{Sc} in Gefrierschnitten unter Verwendung von mAb3F4 bislang nicht berichtet. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, daß das Epitop für mAb3F4 erst über eine teilweise Denaturierung der PrP^{Sc}-Aggregate zugänglich gemacht werden muß (Tricia McBride, persönliche Mitteilung). Paraffinschnitte werden zu diesem Zweck vor der Inkubation mit mAb3F4 10 min in Ameisensäure behandelt (siehe z. B. McBride et al., 2001). Dieser Schritt ist an den Gefrierschnitten nicht durchführbar. Um einen denaturierenden Schritt durchführen zu können, wurde deshalb in dieser Arbeit ein von Taraboulos et al. vorgeschlagenes Protokoll (Taraboulos et al., 1992), bei dem es nach einer Ethanolfixierung möglich wurde, eine Denaturierung mit Guanidiniumthiocyanat durchzuführen, modifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.3). An dieser Stelle muß jedoch erwähnt werden, daß diese Färbung gegenüber der Verwendung von mAb3F4 in Paraffinschnitten in Gefrierschnitten zu deutlichen Limitierungen bezüglich Qualität und Sensitivität bei der Detektion der PrP^{Sc}-Aggregate führte. Da die IR-Spektroskopie an unfixiertem Gewebe durchgeführt wurde, und die PrP^{Sc}-immunhistochemischen Untersuchungen an sequentiellen Schnitten derselben Hirne stattfinden sollten, konnte auf die sensitivere Färbemethode in Paraffinschnitten nicht zurückgegriffen werden. Insbesondere die Verwendung von Detergenzien an den Ethanol-fixierten Gefrierschnitten führte dazu, daß die zellulären Strukturen z. T. zerstört wurden. Im frühen Stadium von 90 d. p. i. war es deshalb sehr schwierig, PrP^{Sc}-Aggregate enthaltende Nervenzellen im DMNV überhaupt aufzufinden. In den beiden späteren Stadien war es dagegen weniger problematisch, die zu diesem Zeitpunkt bereits um die Zellen herum im Neuropil verteilten Ablagerungen zu sehen.

4.5 Ortsauflösung und Detektierbarkeit pathologischer Merkmale

Der Vergleich von Mittelwertspektren aus infizierten und Kontrolltieren zeigte, daß die Größenordnungen der krankheitsspezifischen Unterschiede innerhalb einer histolo-

4.5 Ortsauflösung und Detektierbarkeit pathologischer Merkmale

gischen Struktur vergleichbar bzw. kleiner als diejenigen zwischen den Strukturen sind (vgl. Abb. 3.8 auf Seite 57 und Abb. 3.14 auf Seite 67). Daran wird deutlich, daß auf der Suche nach spektralen Unterschieden zwischen dem Hirngewebe der Scrapie-infizierten Tiere und dem der Kontrolltiere identische histologische Strukturen verglichen werden müssen. Aus diesem Grund besitzen ortsaufgelöste Messungen ein deutlich größeres Potential, krankheitsspezifische spektrale Änderungen klar zu detektieren. So waren z. B. viele Unterschiede, die in den Mikrospektren sichtbar waren (vgl. Abb. 3.9 auf Seite 59), besonders aber die in den Kernen der grauen Substanz, in den Spektren der Gewebestückchen nicht auffindbar. Hier bedingten nur die Genauigkeit der Probenahme und die Präparation die „Ortsauflösung“. Jedes Spektrum einer solchen Probe beinhaltet die Information aller in dem Gewebestückchen vorhandenen histologischen Strukturen, und wesentliche spektrale Informationen wurden im Mittelwert überdeckt. Dementsprechend waren diese Spektren von den Absorptionsbeiträgen der in der Medulla oblongata reichlich vorhandenen Strukturen der weißen Substanz dominiert. Die Veränderungen zwischen 1100 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} (Abb. 3.20 auf Seite 76) waren jedoch so deutlich, daß sie selbst in den Gewebestückchen noch zur Trennung der Spektren in der Clusteranalyse führten (siehe Abb. 3.21 auf Seite 77). Auch zum Zeitpunkt 102 d. p. i., zu dem in i. p. infizierten Hamstern allerdings auch bereits klinische Symptome beobachtet wurden (vgl. z. B. Czub et al., 1986), war noch eine Trennung der Spektren möglich, allerdings wiesen bei der Hälfte der untersuchten Individuen mehrere Gewebepräparationen keine krankheitsspezifischen Merkmale auf. Dies ist einerseits ein Hinweis darauf, daß eine hinreichende Anzahl solcher Gewebestückchen untersucht werden muß, um feststellen zu können, ob das Gewebe im IR-Spektrum detektierbare pathologische Veränderungen zeigt. Andererseits ist die Präzisierung einer solchen Aussage bereits durch die Verwendung der mikrospektroskopischen Methode, bei der z. B. Spektrenmittelwerte spezifischer Strukturen gebildet werden können, möglich. Die Anwendung von IR-Mikrospektroskopie bei den peroral infizierten Tieren erlaubte beispielsweise eine korrekte Trennung der Mittelwerte von DMNV/SolN für jeden Hamster und von HypN für 7 von 8 Individuen im präklinischen Stadium von 90 d. p. i. (siehe (d) in Abb. 3.14 auf Seite 67). Im terminalen Stadium war in allen Strukturen eine Trennung der individuellen Mittelwerte aus den Mikrospektroskopie-Messungen möglich. Keiner der Hamster wurde dort aufgrund einer Fehlklassifizierung der Spektren aller untersuchten Strukturen falsch eingeordnet, während unter Verwendung eines ähnlich großen Spektralbereiches für die Messungen an Gewebestückchen ($1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, siehe (a) in Abb. 3.21 auf Seite 77) alle Gewebepräparationen eines infizierten Individuums mit denen der Kontrollgruppe eingeordnet wurden und nur mit der in $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ enthaltenen Information eine korrekte Klassifizierung möglich war. Daran wird deutlich, daß sich die spektralen Unterschiede bei der Mittelwertbildung über ein größeres Gewebestück nur auf die besonders markanten reduzieren.

Ausgehend von der Annahme, daß biochemische Veränderungen im Gewebe zunächst in den IR-Spektren eines ganz bestimmten Zelltyps sichtbar werden (ähnlich den PrP^{Sc}-Ablagerungen, die in Neuronen beginnen (Jeffrey et al., 1992a), oder den Proliferationsprozessen in Astrozyten (Eklund et al., 1963)), wäre es interessant herauszufinden, welche histologische Sub-Struktur oder welcher Zelltyp dies dann wäre.

Für das Cerebellum konnte gezeigt werden, daß innerhalb der Schichten des cerebellären Cortex verschiedene spektrale Sub-Klassen existieren, welche im wesentlichen dem schichtartigen Aufbau folgen und dadurch histologische Rückschlüsse zulassen (Kneipp et al., 2000). Der histologische Aufbau der Kerne in der Medulla oblongata erscheint dagegen diffuser. Die Bildrekonstruktion auf Grundlage der Clusteranalysen ergab sich eine gleichmäßige Verteilung der Spektren aus den Sub-Clustern innerhalb von DMNV/SolN und HypN. Die einzelnen kleinen Flächen, jeweils bestehend aus nur wenigen Pixelspektren, waren relativ gleichmäßig innerhalb des jeweiligen Kerns verteilt und ließen nicht auf eine größere, zusammenhängende Struktur schließen (vgl. Abb. 3.4 auf Seite 50). Eine wichtige nächste Frage, die geklärt werden muß, ist damit die nach der histologischen Grundlage dieser Sub-Cluster. Daß es sich dabei um verschiedene Zelltypen handelt, ist z. B. für den Fall des HypN nicht unwahrscheinlich. Dort liegen die Perikaryen häufig in Gruppen beieinander. Dazwischen durchsetzen Axonbündel und Gebiete mit Glia-Ansammlungen diesen Kern. In zukünftigen Untersuchungen müssen systematische Vergleiche der IR-Spektren auf der Ebene von Zellpopulationen innerhalb der Kerne, die dies belegen und die Detektierbarkeit Scrapie-spezifischer Merkmale sehr früh in der Pathogenese ermöglichen könnten, durchgeführt werden.

Bislang kann der Scrapie-Befall einzelner Neuronen nur mit Antikörpermarkierung festgestellt werden. Der Vergleich spektraler Sub-Klassen eröffnet die Möglichkeit einer frühen in situ Detektion ohne Immunhistochemie. Wie die ersten Messungen an Spinalganglien unter Zuhilfenahme einer Synchrotron-Strahlungsquelle in dieser Arbeit belegen, kann die spektrale Charakterisierung und Identifizierung von histologischen Sub-Strukturen durch eine erhöhte Ortsauflösung deutlich verbessert werden. Die in Abschnitt 4.2.2 diskutierten Ergebnisse der Messungen am Synchrotron zeigen zudem, daß die Anwendung einer Ortsauflösung von $10\ \mu\text{m}$ ausreicht, Spektren von Proteinkomplexen einer bestimmten Konformation, die nur an sehr eng begrenzten Orten in einer für ihre Detektierbarkeit ausreichenden Konzentration vorliegen, zu messen. Die IR-Absorptionscharakteristik dieser Moleküle wird bei einer schlechteren Ortsauflösung ähnlich einem Verdünnungseffekt komplett durch die Banden anderer Gewebekomponenten überlagert. Abb. 4.1 auf der nächsten Seite illustriert den Effekt, den die Auswahl einer größeren Blende hat. Hier wurden Mittelwerte aus jeweils 9 Pixelspektren, die mit einer Blende von $10\ \mu\text{m}$ am Synchrotron aufgenommen wurden, gebildet. Dies entspricht einer Messung mit einer Blendengröße von $30\ \mu\text{m}$. In keinem der durch Mittelwerte über die größere Fläche entstandenen Spektren sind deutlich die durch Proteinaggregate hervorgerufenen Verschiebungen der Amid I- und Amid II-Bande zu erkennen (violette Spektren in Abb. 4.1), während mehrere der mit kleiner Blende aufgenommenen Spektren die typischen Merkmale für β -Faltblatt-Aggregate enthalten (blaue Spektren in Abb. 4.1). Das Beispiel zeigt, daß die Möglichkeit, sehr kleine Proteinaggregate, wie z. B. granuläres PrP^{Sc}, aber auch andere, lokal in erhöhter Konzentration auftretende Moleküle mit IR-Spektroskopie in situ zu detektieren, durch die Verwendung einer Ortsauflösung von $5\text{--}10\ \mu\text{m}$ gegeben ist. Die Masse PrP^{Sc} in einem von einer solchen Blende eingeschlossenen Bereich beträgt wenige Nanogramm. Bei dieser groben Abschätzung wurde von der Annahme ausgegangen, daß sich in dem von der Blende eingeschlossenen Bereich, fast ausschließlich PrP^{Sc} befindet.

4.6 Betrachtung der spektralen Änderungen im Zusammenhang mit der Pathogenese



Abbildung 4.1: Position des Maximums der Amid I-Bande für mit 10 μm Blendengröße aufgenommene Spektren eines Ganglion-Dünnschnitts und für daraus berechnete Mittelwerte über Flächen von 30 μm Kantenlänge. Das schwarze Pixel gehört zu einem Spektrum mit unzureichender Qualität. Daneben sind die Spektren mit der niedrigsten Frequenz der Amid I-Bande aus beiden Datensätzen (blau: Spektren aus der Messung mit 10 μm Blendengröße, die eine deutliche Verschiebung aufweisen, violett: Spektren aus dem gemittelten Datensatz) sowie ein die Mehrzahl der Spektren im Datensatz repräsentierendes Spektrum (schwarz) dargestellt.

4.6 Betrachtung der spektralen Änderungen im Zusammenhang mit der Pathogenese

Im Zusammenhang mit den IR-spektroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Pathogenesestadien von Scrapie können mehrere wesentliche Fakten bezüglich der krankheitsspezifischen Veränderungen in den Spektren zusammengefaßt werden: (i) Während der Pathogenese bildeten sich bestimmte spektrale Unterschiede zwischen Mittelwertspektren heraus. (ii) Die spektralen Veränderungen in den verschiedenen Infektionsstadien traten z. T. an verschiedenen Absorptionsbanden auf und waren in manchen Strukturen bzw. Stadien nicht vorhanden. (iii) Die Identifizierungsgenauigkeit von Spektren mittels hierarchischer Clusteranalyse und mit neuronalen Netzen verbesserte sich mit zunehmender Inkubationszeit. (iv) Die Genauigkeit der Identifizierung unterschied sich zudem für unterschiedliche histologische Strukturen.

All dies deutet darauf hin, daß sich in den Datensätzen der Tiere aus frühen Infektionsstadien Pixelspektren befanden, die bestimmte spektrale Merkmale, welche sie von den Spektren aus Kontrolltieren unterscheidbar machen könnten, nicht besaßen. Diese Pixelspektren wurden fehlerkassifiziert. Die „Verbreitung“ bestimmter spektraler Merkmale im Gewebe ähnelt damit der bekannten Ausbreitung histopathologischer Merkmale im Verlauf von Scrapie, so z. B. der von PrP^{Sc} . In frühen Pathogenesestadien beschränkt sich die Ablagerung der pathologischen Form des Prion-Proteins auf einzelne Neuronen, während im terminalen Krankheitsstadium Ablagerungen an den meisten Neuronen eines Kerns gefunden werden (siehe z. B. Beekes et al., 1998). Die krankheitsspezifischen Merkmale in den IR-Spektren waren im terminalen Stadium besonders ausgeprägt, so daß fast jedes Pixelspektrum aus einem Kern, d. h. jeder Punkt einer Fläche, in der eine *mapping*-Messung stattfand, korrekt als Scrapie-infiziert klas-

sifiziert wurde. Eine Ausnahme bildeten hierbei nur die Spektren der weißen Substanz bei der Clusteranalyse (siehe Tab. 3.2 auf Seite 66), mit denen Identifizierungen durch ANNs allerdings aufgrund der geringen Anzahl Spektren nicht durchgeführt werden konnten. Die meisten Spektren aus DMNV/SolN, HypN und IntN wiesen bereits bei 90 d. p. i. krankheitsspezifische Merkmale auf (siehe Tab. 3.4 auf Seite 71) und wurden folglich korrekt identifiziert, wie die Untersuchungen der Datensätze mit Hilfe neuronaler Netze zeigten.

Bei der Berechnung von Mittelwertspektren für die unterschiedlichen Strukturen und Infektionsstadien in den infizierten Tieren und auch in den Kontrollgruppen fiel auf, daß die Standardabweichungen in den Gruppen der infizierten Tiere häufig größer waren als in der Kontrollgruppe (siehe z. B. Abb. 3.8 auf Seite 57 und Abb. 3.10 auf Seite 61). Dies impliziert, daß individuelle Parameter für die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Verbreitung molekularer Veränderungen im Gewebe der infizierten Tiere zu einem festgelegten Zeitpunkt nach Inokulation verantwortlich sind. Entsprechend dieser individuellen Unterschiede variierte auch der Zeitpunkt, an dem sich jedes Tier im terminalen Krankheitsstadium befand (siehe Abschnitt 2.1). Dieses war per se als Zustand des Tieres und nicht als festgelegter Zeitpunkt wie die übrigen Entnahmezeitpunkte definiert.

Wie in Abschnitt 1.1.5 bereits beschrieben wurde, ist aus histologischen Studien an Scrapie 263K im Hamster bekannt, daß der DMNV die erste Region im Gehirn ist, in der eine oral induzierte Scrapie-Infektion mittels PrP^{Sc}-Immunfärbung in Paraffinschnitten nachgewiesen werden kann (Beekes et al., 1998). Kurz darauf sind die Ablagerungen dieses Proteins auch im SolN zu finden. Erst sehr viel später im Krankheitsprozeß sind andere Kerne, unter ihnen HypN und IntN von den PrP^{Sc}-Ablagerungen betroffen (Beekes et al., 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen gut mit diesen Erkenntnissen überein: Ein Vergleich der Mittelwertspektren von DMNV/SolN zeigte bereits 90 d. p. i. Veränderungen in den Spektren, während diese im HypN und im IntN erst 120 d. p. i. sichtbar wurden (siehe Abschnitt 3.4.2). Die Unterschiede zwischen den Mittelwertspektren waren im DMNV/SolN weitaus deutlicher ausgeprägt als im HypN und im IntN (vgl. Abb. 3.9 auf Seite 59), und die Clusteranalysen lieferten 120 d. p. i. eine wesentlich schlechtere Trennung für die Datensätze des HypN als für die von DMNV/SolN (siehe Tab. 3.2 auf Seite 66). Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 3F4-Immunfärbungen dieser Arbeit, bei denen festgestellt wurde, daß die Anfärbungen der PrP^{Sc}-Ablagerungen im DMNV und im SolN viel kräftiger waren als im HypN (vgl. Abschnitt 3.7). Ähnliche Beobachtungen sind auch in anderen histologischen Studien an frühen Scrapie-Stadien gemacht worden (McBride et al., 2001). Sequenz und lokales Auftreten der IR-spektralen Veränderungen scheinen insgesamt der Sequenz und dem Ausmaß der PrP^{Sc}-Ablagerungen zu entsprechen. Mit den durch IR-Spektroskopie feststellbaren molekularen Veränderungen wurde daher ein weiterer unabhängiger Marker gefunden, anhand dessen sich die bisher beschriebenen, auf PrP^{Sc}-Immunhistochemie begründeten Ergebnisse über die Ausbreitung der Scrapie-Pathologie im Gehirn ausgehend vom DMNV und SolN (Beekes et al., 1998; McBride und Beekes, 1999; McBride et al., 2001) nachvollziehen lassen. Die Frage, ob das Auftreten der Veränderungen in den

Spektren und die PrP^{Sc}-Ablagerungen wirklich synchron stattfinden, kann mit diesen Ergebnissen noch nicht genau beantwortet werden. Um die konkreten spektralen Veränderungen im Zusammenhang mit den Ablagerungen der Proteinaggregate untersuchen zu können, welche in frühen Krankheitsstadien nur an einzelnen Neuronen im DMNV zu beobachten sind (McBride et al., 2001), müssen sich künftige spektroskopische Untersuchungen früher Pathogenesestadien hauptsächlich auf die histologischen Substrukturen konzentrieren. Für einige histologische Strukturen, wie z. B. den HypN und den IntN wurden für den Zeitpunkt 90 d. p. i. noch keine PrP^{Sc}-Ablagerungen berichtet (Beekes et al., 1998), während sich in dieser Studie für beide Strukturen zu diesem Zeitpunkt mehrere Datenpunkte fanden, anhand derer sich die Spektren gesunder und infizierter Hamster mittels einfaktorieller Varianzanalyse signifikant voneinander trennen ließen (vgl. Tab. 3.3 auf Seite 70). Man darf an dieser Stelle nicht außer Acht lassen, daß sich die krankhaften Veränderungen im Gewebe nicht nur auf PrP-Ebene abspielen. Die Detektion von molekularen Veränderungen mittels IR-Spektroskopie ist nicht unmittelbar, jedoch wahrscheinlich indirekt an die Existenz des pathologischen Prion-Proteins gebunden. Vielmehr wird damit gezeigt, daß bereits früh in der Pathogenese krankheitsspezifische, fingerabdruckähnliche Veränderungen an Kohlenhydraten, Membranbestandteilen und Nukleinsäuren stattfinden müssen. Veränderungen im Zytoplasma, wie z. B. das Auftreten von tubovesikulären Strukturen an prä- und postsynaptischen Prozessen, finden bereits in sehr frühen präklinischen Stadien von Scrapie 263K statt und konnten mittels Elektronenmikroskopie im Dach des Hirnstammes von intracerebral infizierten Hamstern 21 d. p. i. nachgewiesen werden (Liberski et al., 1989). Dies ist ein sehr früher Zeitpunkt im Krankheitsverlauf, geht man davon aus, daß das terminale Krankheitsstadium von Scrapie 263K bei einer i. c.-Infektion nach ungefähr 80–90 Tagen erreicht ist (Kimberlin und Walker, 1977, 1986; Czub et al., 1988). Obwohl man nach einer oralen Infektion ähnlich wie nach einer i. p.-Infektion mit einer deutlichen Verzögerung bis zum Einsetzen von pathologischen Merkmalen (Czub et al., 1988) rechnen muß, befinden sich die oral infizierten Tiere 90 d. p. i. mit Sicherheit in einem ähnlich frühen, wahrscheinlich aber in einem fortgeschritteneren Stadium der Krankheit als i. c.-infizierte Tiere 21 d. p. i., so daß angenommen werden kann, daß die für die i. c.-infizierten Hamster beschriebenen ultrastrukturellen Veränderungen im Gewebe hier bereits im Gange sind. Auch die im Abschnitt 4.2.3 erwähnten Verringerungen im Glukose-Metabolismus wurden lange vor Einsetzen der klinischen Symptome beobachtet, und es wurde angenommen, daß sie sich gleichgerichtet mit dem infektiösen Agens im Hirn ausbreiten (Gregoire et al., 1983).

4.7 Diagnostisches Potential der Methode

Seit dem Auftreten der BSE-Epidemie in Großbritannien, welche 1996 von den ersten Fällen der vCJD gefolgt wurde, wächst das Bedürfnis nach verlässlichen, schnellen Tests, mit deren Hilfe sich Fälle von BSE möglichst frühzeitig erkennen lassen. Hierfür stellt bislang der Nachweis mit Antikörpern post mortem die einzige Möglichkeit

4 Diskussion

dar (vgl. Abschnitt 1.1.4.2). Als potentielle spektroskopische Methode für die Detektion von TSEs *in vivo* wurde die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie, mit Hilfe derer PrP^{Sc}-Aggregate im Liquor cerebrospinalis einer kleinen Gruppe von CJD-Patienten nachgewiesen werden konnten, vorgeschlagen (Bieschke et al., 2000). In keiner der zu dieser Methode bisher publizierten Arbeiten wurden jedoch Anwendungsmöglichkeiten eines solchen *in vivo*-Tests für die Erkennung von BSE und Scrapie vorgeschlagen. Die hier vorliegende Arbeit wurde primär mit dem Ziel durchgeführt, herauszufinden, ob bestimmte Aspekte der Scrapie-Pathogenese mit Hilfe der FTIR-Mikrospektroskopie untersucht werden können, welcher Art die molekularen Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Tieren sind, und ab wann und in welchen Hirnstrukturen sie detektierbar sind. Diese Erkenntnisse können für die Entwicklung neuartiger diagnostischer Methoden auf Grundlage der Schwingungsspektroskopie nutzbar gemacht werden. Dafür müssen jedoch einige entscheidende Fragen geklärt werden, zu denen im folgenden kritische Anmerkungen gemacht werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde aus jedem Hirn von vornherein nur ein Schnitt untersucht und in diesem dann überprüft, ob sich die Mehrzahl bzw. der Mittelwert aller untersuchten Flächenelemente in einem Kern in mehreren infizierten Individuen signifikant von denen aus Kontrolltieren unterschied. Wegen der relativ geringen Zahlen an Individuen kann man die üblicherweise für die Evaluierung von diagnostischen Test verwendeten Parameter Sensitivität und Spezifität nicht ohne weiteres heranziehen: zum einen wurden nur relativ kleine Gruppen von Individuen getestet, zum anderen sind die Kriterien, ab wann ein Befund für ein Individuum nach Untersuchung eines Gewebeschnittes mit IR-Spektroskopie positiv oder negativ genannt wird, nicht einfach zu definieren. Ein direkter Vergleich mit den Identifizierungsgenauigkeiten von immunhistochemischen Untersuchungen ist ebenfalls nicht möglich. Ginge man von den Kriterien aus, die die Histologie verwendet (und die mikrospektrometrischen Untersuchungen wurden an histologischen Schnitten nach Klärung der Zugehörigkeit von Spektren zu definierten histologischen Strukturen durchgeführt), könnte man behaupten, daß die richtige Identifizierung einiger weniger Spektren als positiv für einen positiven Befund ausreicht. In den immunhistochemischen Untersuchungen von Paraffinschnitten bzw. PET-Blots rechtfertigt bereits ein Nachweis minimaler PrP^{Sc}-Ablagerungen an einzelnen Neuronen in einzelnen Individuen einen positiven Scrapie-Befund. Der früheste Zeitpunkt, an dem PrP^{Sc} an einzelnen Neuronen in einzelnen von vielen sequentiellen Paraffinschnitten und mittels PET-Blot in zwei von vier Hirnen gefunden wurde, war 62 d. p. i. (McBride et al., 2001).

Die Ausbreitung von Scrapie 263K im Hirn des syrischen Hamsters über den DMNV und SolN ist der Ausbreitung des BSE-Erregers im Rind (Schulz-Schaeffer et al., 2000) und von Scrapie in Schafen (Andreoletti et al., 2000; van Keulen et al., 2000) sehr ähnlich. Dieses Tiermodell erscheint daher sehr gut geeignet für die Aufklärung der Krankheitsmechanismen und zur Evaluierung möglicher Tests. In zukünftigen Untersuchungen muß geprüft werden, inwiefern sich die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen im syrischen Hamster auch auf Kühe und Schafe übertragen lassen. Derartige Untersuchungen sollten zunächst mikrospektroskopisch ablaufen, um die histologische und spektrale Heterogenität innerhalb der Strukturen auch in den großen

Tieren zu untersuchen. Die Messungen von hydratisierten Medulla-Stückchen in Küvetten in dieser Arbeit und Messungen an angetrockneten Homogenaten von Medulla und Pons in einer früheren Studie (Kneipp et al., 2000) haben gezeigt, daß sich im terminalen Stadium Gewebe aus dem Hirnstamm von Scrapie-infizierten Tieren unabhängig von spezifischen histologischen Strukturen IR-spektroskopisch unterscheiden läßt. Histologische Detektionsverfahren besitzen unter anderem deshalb eine sehr hohe Empfindlichkeit, weil man damit gezielt spezifische morphologische und funktionelle Einheiten untersucht. Wie die mikrospektroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit beweisen, führt eine Erhöhung der Ortsempfindlichkeit bei den Messungen und die daraus resultierenden Möglichkeiten eines hirnstruktur-spezifischen Vergleichs von Spektren zur Detektierbarkeit pathologischer molekularer Veränderungen auch in früheren Stadien und zur Unterscheidbarkeit der Spektren bereits in der präklinischen Krankheitsphase. Da die Hirnnervenkerne in Kühen und Schafen größere Ausmaße haben als in kleinen Nagern, ist es wahrscheinlich, daß nach gezielter Nekropsie an einzelnen Hirnregionen (d. h. direkt am DMNV) konventionelle IR-Messungen in Küvetten oder an angetrockneten Gewebekomogenaten auch in früheren Infektionsstadien erfolgreich durchgeführt werden können. Ein derartiges Meßverfahren kann mittels entsprechender Küvetten weitgehend automatisiert werden, so daß innerhalb weniger Minuten viele Proben untersucht werden können. Ähnlich wie bereits existierende IR-basierte Verfahren in der Lebens- und Futtermittel- und in der chemischen Industrie könnte ein IR-spektroskopischer post mortem-Test dann kostengünstig und schneller als mit Antikörpertests vor Ort z. B. in Form eines *pre-screening* im Schlachthof, auf welches in den Verdachtsfällen dann eine Verifizierung durch den gängigen Immunoblot im Labor folgen könnte, durchgeführt werden. Voraussetzung ist eine spektrale Datenbank, mit Hilfe derer unüberwachte und überwachte Mustererkennungsverfahren ein objektives Untersuchungsergebnis liefern. Daß solche Methoden verwendet werden können, wurde unter anderem mit der Verwendung neuronaler Netze in dieser Arbeit gezeigt.

Der mikrospektroskopische Ansatz selbst erscheint mit dem derzeitigen Stand der Technik als direkte diagnostische Methode im Fall der TSEs nicht zweckmäßig. Hauptgrund hierfür ist der Zeitaufwand für die *mapping*-Messungen: trotz schneller, rechnergestützter Auswertemöglichkeiten erfordert das Aufnehmen eines Datensatzes von 100 IR-Spektren entsprechend hoher Qualität momentan 5 Stunden. Diese Dauer ist beispielsweise mit der für einen Immunoblot-Test aufzuwendenden (12 Stunden), bei dem zudem mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden können, nicht vergleichbar. Allerdings ist der *Prionics*-Test mit Hilfe der bereits erwähnten Messungen in Küvetten zeitlich durchaus zu unterbieten. Eine Möglichkeit, in Zukunft mit hoher Ortsauflösung viele Spektren in kurzer Zeit aufzunehmen und so die Vorteile der Mikrospektroskopie zu nutzen, ist die Verwendung moderner *array*-Detektorsysteme, mit denen innerhalb weniger Minuten ein Gewebeareal mit guter Ortsauflösung untersucht werden kann. Erste Untersuchungen an den Dünnschnitten der Hamsterhirne aus dieser Arbeit, welche freundlicherweise durch die Firma Bruker (einen Hersteller solcher *array*-Detektoren) ermöglicht wurden, ergaben zwar, daß die Qualität der Spektren, die man damit in akzeptabler Zeit aufnehmen kann, noch nicht ausreicht, um die spektralen Unterschiede zwischen TSE-infiziertem und Kontrollgewebe zu erkennen, anderer-

seits wurden andere *array*-Systeme mit zufriedenstellendem Signal/Rausch-Verhältnis bereits für die Anwendung musterbasierter bildgebender Verfahren verwendet (Lasch, 1999).

4.8 Ausblick

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten deutlich wurde, eröffnet die Anwendung der FTIR-mikrospektroskopischen Methode eine Vielzahl interessanter Möglichkeiten für weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit der Pathogenese von TSE. Hierbei sind neben der Verwendung konventioneller IR-Strahlungsquellen Methoden, die eine Ortsauflösung unterhalb der Größe einzelner Zellen ermöglichen, von außerordentlichem Interesse. Die Durchführung IR-mikrospektroskopischer Messungen unter Einsatz einer Synchrotronstrahlungsquelle hat gezeigt, daß kleine Proteinaggregate, wie z. B. granuläres PrP^{Sc}, in der Größenordnung weniger Nanogramm im Gewebe detektiert werden können (vgl. 4.5). Auf diese Weise könnten auch andere Moleküle, welche lokal in höherer Konzentration im Gewebe auftreten, in situ IR-spektroskopisch untersucht werden. Im Zusammenhang mit der PrP^{Sc}-Detektion wäre es interessant, Ablagerungen in verschiedenen TSE-Erregerstämmen zu untersuchen.

Neben weiteren IR-spektroskopischen Strukturuntersuchungen mit Hilfe einer Synchrotronstrahlungsquelle sollten auch andere schwingungsspektroskopische Methoden, mit denen eine sehr hohe Ortsauflösung realisierbar ist, wie z. B. Ramanspektroskopie oder IR-Spektroskopie unter Ausnutzung von Feldverstärkungseffekten in der Nähe von Metall-Nanostrukturen (*scanning near-field infrared microscopy*, Knoll und Keilmann, 1999) in Erwägung gezogen werden. Eine verbesserte Ortsauflösung bei den IR-Messungen wird nicht nur die Identifizierung von PrP^{Sc}-Aggregaten, sondern auch eine feinere Differenzierung von histologischen Substrukturen (beispielsweise einzelnen Zellen) innerhalb spezifischer morphologischer Strukturen gestatten. Auf Grundlage einer solchen Differenzierungsmöglichkeit können dann neben PrP^{Sc} auch andere pathologische molekulare Veränderungen auf der Ebene einzelner Zellen sowie bestimmte Zellpopulationen als Ausgangspunkte für derartige Veränderungen innerhalb einer anatomischen Struktur bzw. funktionellen Einheit gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Krankheiten vom TSE-Typ mit Hilfe einer schwingungsspektroskopischen Methode zu untersuchen, wobei es insbesondere darum ging, weitere Informationen über den molekularen Hintergrund derartiger Erkrankungen zu gewinnen und möglicherweise Ansätze für die Erkennung der Krankheit bzw. Testverfahren in relativ frühen Stadien zu finden. Da die Infrarotspektroskopie einen direkten Zugang zur Untersuchung molekularer Strukturen eröffnet und darüber hinaus eine in situ-Untersuchung biologischer Proben zuläßt, wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit angewendet. Damit wurde erstmalig die IR-mikrospektroskopische Untersuchung von Nervengewebe TSE-infizierter Tiere realisiert. Die Messungen konzentrierten sich auf verschiedene anatomische Strukturen im Hirnstamm und im Kleinhirn oral mit dem Scrapie-Erreger 263K infizierter Individuen eines Laborstammes von *Mesocricetus auratus* sowie auf die Untersuchung von Spinalganglien.

Eine wesentliche Voraussetzung für die spektroskopische Identifizierung von pathologischen Gewebeveränderungen war die Entwicklung und Optimierung entsprechender Datenauswertungsalgorithmen für die anfallende große Anzahl ortsabhängig aufgenommener IR-Spektren. Diese Auswertungsalgorithmen bildeten die Grundlage für einen gezielten Vergleich von Spektren spezifischer anatomischer Strukturen. *Mapping*-Experimente, bei denen orts aufgelöst Infrarotspektren von Dünnschnitten des Hirngewebes aufgenommen wurden, dienten der groben Kartierung histologischer Strukturen in einer coronalen Ebene der Medulla oblongata und einer zweiten Schnittebene im Kleinhirn. Zur Eingrenzung der zu untersuchenden Strukturen wurde zunächst ein größeres Areal mit den Messungen erfaßt und anhand des Protein/Lipid-Verhältnisses kartiert. Dieser Parameter erwies sich für die Bildgebung im Hirngewebe als besonders geeignet. Für Vergleichszwecke wurden parallel immunhistochemisch und konventionell gefärbte sequentielle Schnitte der IR-Proben herangezogen. Ausgehend von den Übersichtskarten konnten gezielt die Bereiche des Nucleus nervi hypoglossi, des Nucleus dorsalis nervi vagi und des Nucleus tracti solitarii aus der Medulla oblongata, sowie ein Areal aus dem Nucleus interpositus cerebelli eingegrenzt werden. In diesen Gebieten wurden dann detaillierte Messungen durchgeführt. Mit Hilfe der Clusteranalyse und einem darauf beruhenden Bildgebungsverfahren wurden alle für diese Strukturen spezifischen Spektren aus den Datensätzen extrahiert und für systematische Vergleiche zwischen infizierten und Kontrollhirnen verwendet.

Der Vergleich von hirnstrukturspezifischen Spektren zwischen infizierten und Kontrolltieren einer kinetischen Studie an drei Zeitpunkten im Krankheitsverlauf (90 d. p. i., 120 d. p. i. und terminales Krankheitsstadium) bildete einen wesentlichen

Bestandteil der Arbeit. Beim Vergleich von Spektren aus mehreren Individuen wurden im terminalen Stadium von Scrapie 263K für alle untersuchten anatomischen Strukturen in mehreren Bereichen der Spektren charakteristische Unterschiede zwischen den infizierten Hamstern und den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt. Besonders deutlich waren diese im Spektralbereich zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} ausgeprägt. Zu den beiden Zeitpunkten 120 d. p. i. und 90 d. p. i. waren die Unterschiede zwischen den Mittelwerten auf diesen Bereich begrenzt. Die Unterschiede zwischen den Spektren belegten komplexe, fingerabdruckähnliche Veränderungen von Membrankomponenten, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren und Proteinen. Diese unterschieden sich qualitativ zwischen den verschiedenen untersuchten anatomischen Strukturen und für die verschiedenen Infektionsstadien. Unterschiede, die in allen Strukturen zu finden waren, waren nicht überall mit gleicher Deutlichkeit ausgeprägt. Es konnte eine gute Übereinstimmung der IR-spektroskopischen Daten aus dieser Arbeit mit anderen Pathogenese-Untersuchungen auf Grundlage der PrP^{Sc}-Markierung festgestellt werden. Diese betrifft insbesondere das Ausmaß und die Detektierbarkeit der spektralen Änderungen im Krankheitsverlauf ausgehend vom Nucleus dorsalis nervi vagi und vom Nucleus tracti solitarii. Mittels Mustererkennungsmethoden wie der hierarchischen Clusteranalyse konnten die Einzelspektren aller untersuchten Hirnstrukturen der terminal kranken Hamster von denen der Kontrollgruppe klar getrennt werden. Eine solche Trennung erfolgte 120 d. p. i. für die Spektren aus den Kernen im verlängerten Rückenmark. Die Anwendung von künstlichen neuronalen Netzen für die Spektrenidentifizierung, basierend auf einer Merkmalsselektion mittels Varianzanalyse, gestattete auch 90 d. p. i. eine Unterscheidung der Spektren aus infiziertem und nicht-infiziertem Gewebe mit einer Genauigkeit von ca. 80 % in allen untersuchten Strukturen. Damit konnte gezeigt werden, daß sich Scrapie-infiziertes Hirngewebe bereits im präklinischen Stadium anhand von IR-spektroskopisch detektierbaren molekularen Änderungen identifizieren läßt.

Da strukturelle Veränderungen im infizierten Gewebe zumeist in sehr kleinen Bezirken auftreten oder dort ihren Ausgangspunkt haben, ist die Entwicklung einer IR-spektroskopischen Methode mit möglichst hoher Ortsauflösung eine wesentliche Voraussetzung zur Realisierung einer frühen Detektion kleinster Veränderungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal IR-mikrospektroskopische Messungen an einzelnen Nervenzellen in Spinalganglien durchgeführt. Insbesondere gelang es, durch Ausnutzung von Synchrotronstrahlung eine Ortsauflösung im Bereich der Abbé'schen Beugungsgrenze zu realisieren. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen geht hervor, daß innerhalb von Ganglien infizierter Hamster lokal auf sehr kleine Flächen begrenzt Proteinaggregate mit erhöhtem Anteil an β -Faltblatt-Struktur nachweisbar sind, und daß es sich hierbei möglicherweise um PrP^{Sc} handelt. Damit konnte gezeigt werden, daß ein direkter in situ-Nachweis von PrP^{Sc}-Aggregaten in IR-Spektren bei genügend hoher Ortsauflösung prinzipiell möglich ist.

In dieser Arbeit wurde erstmals erfolgreich die IR-Mikrospektroskopie für die Untersuchung molekularer Aspekte der Scrapie-Pathogenese eingesetzt. Die Veränderungen in chemischer Zusammensetzung und Struktur des Gewebes, die mit dieser Methode festgestellt werden konnten, traten an verschiedenen Arten von Biomolekülen auf.

Bereits in den frühen Krankheitsstadien waren durch Scrapie hervorgerufene Veränderungen an Kohlenhydraten, Nukleinsäuren und Membrankomponenten in den IR-Spektren Scrapie-infizierter Tiere nachweisbar. Der mikrospektroskopische Ansatz bietet die Möglichkeit der gezielten und selektiven Untersuchung einzelner Strukturen oder Sub-Strukturen im Gewebe. Hierdurch wird es möglich, sehr lokalisierte und kleine spektrale Änderungen zu detektieren, die bei „normaler“ IR-Spektroskopie aus größeren Probenvolumina durch die Mittelwertbildung überdeckt werden. Ein wesentlicher Vorteil der IR-spektroskopischen Methodik ist, daß gleichzeitig viele molekulare Parameter ohne vorherige Fixierung oder Färbung des Gewebes untersucht und mit schnellen, objektiven Verfahren ausgewertet werden können. Die aus den spektroskopischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über Scrapie-spezifische molekulare Veränderungen eröffnen Möglichkeiten für die Entwicklung neuartiger Testverfahren zur post mortem-Identifizierung infektiösen Gewebes. Die hier diskutierte IR-mikroskopische Methodik könnte mit einer verbesserten Ortsauflösung wesentlich an Potential gewinnen. In diesem Sinne sind Verfahren, die mit Hilfe lokalisierter Felder die beugungsbedingte Begrenzung der Ortsauflösung überwinden könnten, von außerordentlichem Interesse.

5 Zusammenfassung

6 Abstract

In this thesis, Scrapie-infected tissue was investigated by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, a vibrational spectroscopic method. The aim of the work was to gain more information on molecular aspects of TSE pathogenesis. The study concentrated on important anatomical structures of the brain stem and cerebellum, as well as on the investigation of dorsal root ganglia of 263K scrapie-infected Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). IR spectra were acquired from cryotomized tissue sections by IR microspectroscopic mapping. Adjacent tissue sections were stained for comparison using immunohistochemical and standard histological procedures. To compare identical anatomical structures in scrapie-infected and control brains, new methods suited for the analysis of large amounts of data and for the identification of specific anatomical structures were developed and optimized. Anatomical structures were identified by applying a combination of univariate and multivariate imaging methods. It was shown that the peak ratio of the major protein and lipid absorption bands is well suited for chemical mapping. Based on overview maps which were acquired using a spectral resolution of $100\ \mu\text{m}$ and constructed using the protein/lipid ratio, areas containing the hypoglossal nucleus (HypN), the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNV) and parts of the solitary tract nucleus (SolN) in the medulla oblongata, as well as an area containing the interposed cerebellar nucleus (IntN) were identified and examined in depth in detailed measurements applying a resolution of $50\ \mu\text{m}$. Spectral classification according to the known histological structures was achieved by employing the spectral information over the fingerprint spectral region of $1480\text{--}950\ \text{cm}^{-1}$ in hierarchical cluster analyses and pattern-based image reconstruction. Based on the results of these cluster analyses, spectra of DMNV/SolN, HypN and IntN were extracted from the data sets and used for systematic comparison between identical structures in scrapie-infected and control tissue.

The spectra obtained from these structures in infected and control animals were compared at three stages of scrapie (90 d. p. i., 120 d. p. i., and at the terminal stage). At terminal stage, differences between spectra were found for all investigated structures throughout the whole spectral range. They were very pronounced between $1300\text{--}1000\ \text{cm}^{-1}$. At 120 d. p. i. and 90 d. p. i. changes were confined to this spectral region. The spectral alterations reflected complex, fingerprint-like changes of membrane components, carbohydrates, nucleic acids, and proteins. They differed qualitatively and quantitatively between the different stages of infection and brain structures. It could be shown that the data were in good agreement with results from immunocytochemical investigations of scrapie pathogenesis. The majority of spectra from diseased

and control tissue could be clearly separated by cluster analysis in the terminal stage and at 120 d. p. i. Application of artificial neural networks based on feature selection by variance analysis yielded an identification accuracy of 80% at 90 d. p. i., indicating that based on molecular changes scrapie-infected brain tissue can be identified even in the pre-clinical stage. In a pilot study, high quality IR spectra could be collected from single neurons of dorsal root ganglia. The spatial resolution could be increased to the diffraction limit by using a synchrotron source. Very small, localized areas with a high concentration of β -sheet secondary structures were detected in the scrapie-affected dorsal root ganglia by this method, hinting at the presence of PrP^{Sc} aggregates.

In this work, for the first time infrared (IR) microspectroscopy was successfully applied to the investigation of molecular aspects of transmissible spongiform encephalopathies. The microspectroscopic approach opens up the opportunity of direct and selective investigation of specific structures or substructures in the tissue. The knowledge about scrapie-specific molecular alterations obtained from the spectroscopic studies could provide a basis for the development of new methods for the rapid post mortem identification of infectious tissue.

Literaturverzeichnis

- O. Andreoletti, P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Gosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J.-M. Elsen und F. Lantier. Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock. *Journal of General Virology*, 81:3115–3126, 2000.
- E. Baldauf, M. Beekes und H. Diringer. Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal chord. *Journal of General Virology*, 78:1187 – 1197, 1997.
- M. A. Baldwin, K. M. Pan, J. Nguyen, Z. Huang, D. Groth, A. Serban, M. Gasset, I. Mehlhorn, R. J. Fletterick, F. E. Cohen und S. B. Prusiner. Spectroscopic characterization of conformational differences between PrPC and PrPSc: an alpha-helix to beta-sheet transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 343(1306):435–41, 1994.
- M. Beekes, E. Baldauf, S. Caßens, H. Diringer, P. Keyes, A. C. Scott, G. A. H. Wells, P. Brown, C. J. Gibbs Jr und D. C. Gajdusek. Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with TSEs using a high-yield purification method. *Journal of General Virology*, 76:2567–2576, 1995.
- M. Beekes, E. Baldauf und H. Diringer. Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Journal of General Virology*, 77:1925 – 1934, 1996.
- M. Beekes, P. A. McBride und E. Baldauf. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal of General Virology*, 79:601 – 607, 1998.
- M. Beekes, M. Otto, J. Wiltfang, E. Bahn, S. Poser und M. Baier. Late increase of serum S-100 beta protein levels in hamsters after oral or intraperitoneal infection with scrapie. *Journal of Infectious Diseases*, 180:518–520, 1999.
- R. A. Bessen, D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury und B. Caughey. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion. *Nature*, 375:698 – 700, 1995.

Literaturverzeichnis

- J. Bieschke, A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen und H. Kretzschmar. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97:5468–5473, 2000.
- N. Bons, N. Mestre-Frances, P. Belli, F. Cathala, D. C. Gajdusek und P. Brown. Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96:4046–4051, 1999.
- P. Brown, F. Cathala, R. F. Raubertas, D. C. Gajdusek und P. Castaigne. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: Conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology*, 37:895–904, 1987.
- P. Brown, P. P. Liberski, A. Wolff und D. C. Gajdusek. Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360°C: Practical and theoretical implications. *Journal of Infectious Diseases*, 161:467–472, 1990.
- M. Bruce, A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson und H. Fraser. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 343:405–411, 1994.
- M. E. Bruce, R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser und C. J. Bostock. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389:498–501, 1997.
- G. L. Carr. Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation. *Review of Scientific Instruments*, 72:1613–1619, 2001.
- B. W. Caughey, A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes und W. S. Caughey. Secondary Structure Analysis of the Scrapie-Associated Protein PrP 27-30 in Water by Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 30:7672–7680, 1991.
- M. Ceroni, J. Safar, P. Piccardo, P. P. Liberski, P. Pergami und J. Clarence J. Gibbs. Cellular and scrapie prion protein immunolocalization and in vitro amyloid formation. In *Sixth International Workshop on Bovine Spongiform Encephalopathy: The BSE Dilemma*, Hrsg.: J. Clarence J. Gibbs, Proceedings in the Serono Symposia USA Series, S 338–356, Williamsburg, Virginia, 1995. Springer-Verlag New York, Inc.
- J. J. Chen und B. P. Yu. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 17(5):411–418, 1994.

- S.-I. Choi, W.-K. Ju, E.-K. Choi, J. Kim, H.-Z. Lea, R. I. Carp, H. M. Wisniewski und Y.-S. Kim. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263K scrapie agent. *Acta Neuropathologica*, 96:279–286, 1998.
- L.-P. Choo, M. Jackson, W. C. Halliday und H. H. Mantsch. Infrared spectroscopic characterization of multiple sclerosis plaques in the human central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1182:333–337, 1993.
- L.-P. Choo, D. L. B. Wetzel, W. C. Halliday, M. Jackson, S. M. LeVine und H. H. Mantsch. In situ characterization of β -amyloid in Alzheimer's diseased tissue by Synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biophysical Journal*, 71 (10):1672–1679, 1996.
- J. G. Collee und R. Bradley. BSE: a decade on - part I. *The Lancet*, 349:636 – 641, 1997.
- J. Collinge, K. C.L.Sidle, J. Meads, J. Ironside und A. F. Hill. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383:685 – 690, 1996.
- S. C. Collis und R. H. Kimberlin. Further studies on changes in immunoglobulin G in the sera and CSF of Herdwick sheep with natural and experimental scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 93:331–338, 1983.
- P. Cortelli, D. Perani, P. Parchi, F. Grassi, P. Montagna, M. DeMartin, R. Castellani, P. Tinuper, P. Gambetti, E. Lugaresi und F. Fazio. Cerebral metabolism in fatal familial insomnia. *Neurology*, 49:126–133, 1997.
- H. G. Creutzfeldt. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (vorläufige Mitteilung). *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 57:1–18, 1920.
- R. C. Cutlip, J. M. Miller, R. E. Race, A. L. Jenny, J. B. Katz, H. D. Lehmkuhl, B. M. deBey und M. M. Robinson. Intracerebral Transmission of scrapie to cattle. *Journal of Infectious Diseases*, 169:814–820, 1994.
- M. Czub, H. R. Braig und H. Diringer. Pathogenesis of scrapie: Study of the temporal development of clinical symptoms, of infectivity titres and scrapie-associated fibrils in brains of hamsters infected intraperitoneally. *Journal of General Virology*, 67: 2005 – 2009, 1986.
- M. Czub, H. R. Braig und H. Diringer. Replication of the scrapie agent in hamsters infected intracerebrally confirms the pathogenesis of an amyloid-inducing virosis. *Journal of General Virology*, 69:1753 – 1756, 1988.

- N. Daude, S. Lehmann und D. A. Harris. Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17):11604 – 11612, 1997.
- S. J. DeArmond, K. Jendroska, S.-L. Yang, A. Taraboulos, R. Hecker, K. Hsiao, L. Stowring, M. Scott und S. B. Prusiner. Scrapie prion protein accumulation correlates with neuropathology and incubation times in hamsters and transgenic mice. In *Prion diseases of humans and animals*, Hrsg.: S. Prusiner, J. Collinge, J. Powell und B. Anderton, Ellis Horwood Series in Neuroscience, S 483–496. Ellis Horwood Limited, New York London Toronto Sydney Tokyo Singapore, 1992.
- S. K. DebBurman, G. J. Raymond, B. Caughey und S. Lindquist. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94:13938–13943, 1997.
- A. G. Dickinson und G. W. Outram. The scrapie replication-site hypothesis and its implication for pathogenesis. In *Slow transmissible diseases of the nervous system*, Hrsg.: S. B. Prusiner und W. J. Hadlow, Band 2, S 13–31. Academic Press, New York, 1979.
- A. G. Dickinson, J. T. Stamp und C. C. Renwick. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 84:19–25, 1974.
- J. F. Diedrich, P. E. Bendheim, Y. S. Kim, R. I. Carp und A. T. Haase. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88(1):371 – 379, 1991a.
- J. F. Diedrich, R. I. Carp und A. T. Haase. Increased expression of heat shock protein, transferrin, and β -microglobulin in astrocytes during scrapie. *Microbial Pathogenesis*, 15:1–6, 1993.
- J. F. Diedrich, H. Minnigan, R. L. Carp, J. N. Whitaker, R. Race, W. F. II und A. T. Haase. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *Journal of Virology*, 65:4759–4768, 1991b.
- M. Diem, S. Boydston-White und L. Chiriboga. Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject. *Applied Spectroscopy*, 53(4):148A–161A, 1999.
- H. Diringer. Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) virus-induced amyloidosis of the central nervous system (CNS). *European Journal of Epidemiology*, 7: 562–566, 1991.
- H. Diringer. Proposed link between transmissible spongiform encephalopathies of man and animals. *The Lancet*, 346:1208 – 1210, 1995.

- H. Diringer, M. Beekes und U. Oberdieck. The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 724:246–258, 1994.
- H. Diringer, M. Beekes, M. Özel, D. Simon, I. Queck, F. Cardone, M. Pocchiari und J. W. Ironside. Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology*, 40:238–246, 1998a.
- H. Diringer, H. Gelderblohm, M. Özel, C. Edelbluth und R.H.Kimberlin. Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature*, 306:476 – 478, 1983.
- H. Diringer, J. Roehmel und M. Beekes. Effect of repeated oral infection of hamsters with scrapie. *Journal of General Virology*, 79:609 – 612, 1998b.
- M. Eigen. Prionics or The kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry*, 63: A1–A18, 1996.
- C. M. Eklund, W. J. Hadlow und R. C. Kennedy. Some properties of the scrapie agent and its behaviour in mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 112:974–979, 1963.
- D. W. Fairbairn, K. G. Carnahan, R. N. Thwaites, R. V. Grigsby, G. R. Holyoak und K. L. O'Neill. Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiology Letters*, 115:341–346, 1994.
- K. B. Franklin und G. Paxinos. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, 1997.
- H. Fraser, M. E. Bruce, A. Chree, I. McConnell und G. A. H. Wells. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *Journal of General Virology*, 73:1891–1897, 1992.
- H. Fraser und A. G. Dickinson. The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, 78:301–311, 1968.
- D. C. Gajdusek. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 197:943–960, 1977.
- P. Gambetti, P. Parchi, R. B. Petersen, S. G. Chen und E. Lugaresi. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathology*, 5:43–51, 1995.
- C. J. Gibbs, J. Safar, M. Ceroni, A. DiMartino, W. W. Clark und J. L. Hourigan. Experimental transmission of scrapie to cattle. *Lancet*, 335:1275, 1990.
- A. Giese, D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist und H. A. Kretzschmar. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathology*, 8:449–457, 1998.

Literaturverzeichnis

- A. Giese, M. H. Groschup, B. Hess und H. A. Kretzschmar. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology*, 5:213–221, 1995.
- R. Goodacre. Applications of artificial neural networks to the analysis of multivariate data. In *Intelligent data analysis in Science*, Hrsg.: H. Cartwright, Oxford chemistry masters 4, S 123–152. Oxford University Press, Oxford, 2000.
- K.-U. D. Grathwohl, M. Horiuchi, N. Ishiguro und M. Shinagawa. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrPSc in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *Journal of Virological Methods*, 64:205 – 216, 1997.
- N. Gregoire, J. Gorde-Durand, C. Bouras, G. Salamon und J. Bert. Cerebral glucose utilization: local changes after microinoculation of scrapie agent in hamster. *Neuroscience Letters*, 36:181–187, 1983.
- Z. Guan, M. Soderberg, P. Sindelar, S. Prusiner, K. Kristensson und G. Dallner. Lipid composition in scrapie-infected mouse brain: Prion infection increases the levels of dolichyl phosphate and ubiquinone. *Journal of Neurochemistry*, 66:277–285, 1996.
- H. Haken und H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie : Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer Verlag, Berlin, 1992.
- I. Harvey und E. Coyle. Creutzfeldt-Jakob disease after non-commercial dura mater graft. *The Lancet*, 340:614–615, 1992.
- D. Helm, H. Labischinski und D. Naumann. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods*, 14:127–142, 1991a.
- D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn und D. Naumann. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*, 137:69–79, 1991b.
- A. F. Hill, M. Antoniou und J. Collinge. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology*, 80:11–14, 1999a.
- A. F. Hill, R. Butterworth, S. Joiner, G. Jackson, M. N. Rossor, D. J. Thomas, A. Frosh, N. Tolley, J. E. Bell, M. Spencer, A. King, S. Al-Sarraj, J. W. Ironside, P. L. Lantos und J. Collinge. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *The Lancet*, 353:183–189, 1999b.
- A. F. Hill, M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. L. Sidle, I. Gowland und J. Collinge. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389:448–450, 1997.
- A. F. Hill, S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos und J. Collinge. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97:10248–10253, 2000.

- M. Horiuchi und B. Caughey. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *The EMBO Journal*, 18:3193–3203, 1999.
- S. Hornemann, C. Korth, B. Oesch, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich und R. Glockshuber. Recombinant full-length murine prion protein, mPrP (23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Letters*, 413:277–281, 1997.
- G. Hsich, K. Kenney, J. Clarence J. Gibbs, K. H. Lee und M. G. Harrington. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *New England Journal of Medicine*, 335:924–931, 1996.
- Z. Huang, S. B. Prusiner und F. E. Cohen. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding and Design*, 1:13–19, 1996.
- M. Jackson, C. Lin-P'ing, P. H. Watson, W. C. Halliday und H. H. Mantsch. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1270:1–6, 1995.
- M. Jackson und H. H. Mantsch. Biomedical Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Hrsg.: H. H. Mantsch und D. Chapman. Wiley-Liss, Inc., 1996.
- M. Jackson und H. H. Mantsch. The medical challenge to infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 408/409:105–111, 1997.
- A. Jakob. Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Centralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Medizinische Klinik*, 17:372–376, 1921.
- N. Jamin, P. Dumas, J. Moncuit, W.-H. Fridman, J.-L. Teillaud, G. L. Carr und G. P. Williams. Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95:4837–4840, 1998.
- M. Jeffrey, I. A. Goodbrand und C. M. Goodsir. Pathology of transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructures. *Micron*, 26(3):277 – 298, 1995.
- M. Jeffrey, C. M. Goodsir, M. E. Bruce, P. A. McBride, N. Fowler und J. R. Scott. Murine scrapie-infected neurons in vivo release excess prion protein into the extracellular space. *Neuroscience Letters*, 174:39–42, 1994.
- M. Jeffrey, C. M. Goodsir, M. E. Bruce, P. A. McBride, J. R. Scott und W. G. Halliday. Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neuroscience Letters*, 147:106–109, 1992a.

Literaturverzeichnis

- M. Jeffrey, J. R. Scott und H. Fraser. Scrapie inoculation of mice: light and electron microscopy of the superior colliculi. *Acta Neuropathologica*, 81:562–571, 1991.
- M. Jeffrey, J. R. Scott, A. Williams und H. Fraser. Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathologica*, 84:559–569, 1992b.
- R. J. Kascsak, R. Rubenstein, P. A. Merz, M. Tonna-DeMasi, R. Fersko, R. I. Carp, H. M. Wisniewski und H. Diringer. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *Journal of Virology*, 61:3688–3693, 1987.
- R. H. Kimberlin und C. A. Walker. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *Journal of General Virology*, 34:295–304, 1977.
- R. H. Kimberlin und C. A. Walker. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *Journal of General Virology*, 67:255 – 263, 1986.
- J. Kneipp. *Charakterisierung von Dünnschnitten des Hirns von Mesocricetus auratus mittels Fourier Transform-Infrarot (FT-IR)-Mikrospektrometrie*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, 1998.
- J. Kneipp, P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes und D. Naumann. Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1501:189–199, 2000.
- H. Knoche. *Lehrbuch der Histologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1979a.
- H. Knoche. *Leitfaden der histologischen Technik in der Licht- und Elektronenmikroskopie für medizinisch-technische Assistenten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1979b.
- B. Knoll und F. Keilmann. Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy. *Nature*, 399:134, 1999.
- D. A. Kocisko, J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury und B. Caughey. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, 370:471–474, 1994.
- D. A. Kocisko, S. A. Priola, G. J. Raymond, B. Chesebro, P. T. Lansbury Jr. und B. Caughey. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: A model for the scrapie species barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92:3923–3927, 1995.
- C. Korth, B. Stierli und P. Streit. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 390:74 – 77, 1997.

- C. Kurschner und J. I. Morgan. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Molecular Brain Research*, 30:165–168, 1995.
- P. Lasch. *Computergestützte Bildrekonstruktion auf Basis FT-IR-mikrospektrometrischer Daten humaner Tumoren*. Dissertation, Freie Universität Berlin, 1999.
- P. Lasch und D. Naumann. FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cellular and Molecular Biology*, 44:189–202, 1998.
- P. Lasch, W. Wäsche, W. J. McCarthy, G. Müller und D. Naumann. Imaging of human colon carcinoma thin sections by FT-IR microspectrometry. In *Infrared Spectroscopy: New Tool in Medicine*, Hrsg.: H. H. Mantsch und M. Jackson, Band 3257 aus *Progress in Biomedical Optics*, S 187–198, San José, 1998. SPIE.
- C. I. Lasmézas, J.-P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury und D. Dormont. BSE transmission to macaques. *Nature*, 381:743–744, 1996.
- C. I. Lasmézas, J.-P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Berlingue, J.-M. Peyrin, J.-G. Fournier, J.-J. Hauw, J. Rossier und D. Dormont. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 275:402 – 405, 1997.
- D. S. Lester, L. H. Kidder, I. W. Levin und E. N. Lewis. Infrared microspectroscopic imaging of the cerebellum of normal and cytarabine treated rats. *Cellular and Molecular Biology*, 44(1):29–38, 1998.
- S. M. LeVine und D. L. B. Wetzel. Analysis of brain tissue by FT-IR microspectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 28(4):385–412, 1993.
- E. N. Lewis, A. M. Gorbach, C. Marcott und I. W. Levin. High-fidelity Fourier transform infrared spectroscopic imaging of primate brain tissue. *Applied Spectroscopy*, 50(2):263 – 269, 1996.
- P. P. Liberski, D. M. Asher, R. Yanagihara, C. J. Gibbs Jr. und D. C. Gajdusek. Serial ultrastructural studies of scrapie in hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, 101:429–442, 1989.
- P. Lucassen, A. Williams, W. C. J. Chung und H. Fraser. Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neuroscience Letters*, 198:185–188, 1995.
- L. Manuelidis, T. Sklaviadis, A. Akovitz und W. Fritch. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92:5124–5128, 1995.
- M. C. Martin, N. M. Tsvetkova, J. H. Crowe und W. R. McKinney. Negligible sample heating from synchrotron infrared beam. *Applied Spectroscopy*, 55:111–113, 2001.

- P. A. McBride und M. Beekes. Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neuroscience Letters*, 265:135–138, 1999.
- P. A. McBride, W. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. E. Bruce, H. Diringer, H. Kretzschmar und M. Beekes. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibres of the splanchnic and vagus nerves. *Journal of Virology*, 75:9320–9327, 2001.
- M. P. McKinley, D. C. Bolton und S. B. Prusiner. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35:57–62, 1983.
- R. K. Meyer, M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry und S. B. Prusiner. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83:2310–2314, 1986.
- H. Narang. The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 184:375 – 388, 1996.
- D. Naumann. Infrared spectroscopy in microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Hrsg.: R. A. Meyers, S 102–131. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2000.
- D. Naumann, D. Helm und H. Labischinski. Microbiological characterizations by FT-IR-spectroscopy. *Nature*, 351:81–82, 1991.
- M. Otto, M. Beekes, J. Wiltfang, E. Bahn, S. Poser und H. Diringer. Elevated levels of serum S100 beta protein in scrapie hamsters. *Journal of Neurovirology*, 4:572–573, 1998a.
- M. Otto, J. Wiltfang, E. Schütz, I. Zerr, A. Otto, A. Pfahlberg, O. Gefeller, M. Uhr, A. Giese, T. Weber, H. A. Kretzschmar und S. Poser. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *British Medical Journal*, 316:577–582, 1998b.
- M. Otto, J. Wiltfang, H. Tumani, I. Zerr, M. Lantsch, J. Kornhuber, T. Weber, H. A. Kretzschmar und S. Poser. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters*, 225:210–211, 1997.
- K. M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen und S. B. Prusiner. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90:10962–10966, 1993.
- S.-K. Park, S.-I. Choi, J.-K. Jin, E.-K. Choi, J.-I. Kim, R. I. Carp und Y.-S. Kim. Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Molecular Neuroscience*, 11(8):1677–1682, 2000.

- F. S. Parker. *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum Press, New York and London, 1983.
- S. B. Prusiner. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216: 136–144, 1982.
- S. B. Prusiner. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278:245–251, 1997.
- S. B. Prusiner, M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth und G. G. Glenner. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35:349–358, 1983.
- G. J. Raymond, J. Hope, D. A. Kocisko, S. A. Priola, L. D. Raymond, A. Bossers, R. B. Petersen, P. Gambetti, R. Rubenstein, M. A. Smits, P. T. Lansbury Jr und B. Caughey. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature*, 388:285 – 288, 1997.
- M. Riedmiller und H. Braun. A direct adaptive method for faster backpropagation learning: The RPROP algorithm. In *IEEE International Conference on Neural Networks (ICNN) 1993*, S 586–591, 1993.
- C. Riemer, I. Queck, D. Simon, R. Kurth und M. Baier. Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *Journal of Virology*, 74:10245–10248, 2000.
- R. Rubenstein, H. Deng, R. Race, W. Ju, C. Scalici, M. Papini, A. Rubenstein, R. Kascsak und R. Carp. Scrapie strain infection in vitro induces changes in neuronal cells. *Molecular Neurobiology*, 8:129–138, 1994.
- J. Safar, H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen und S. B. Prusiner. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nature Medicine*, 4(10):1157–1165, 1998.
- H. Scheffé. A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika*, 40:87–104, 1953.
- C. P. Schultz, K.-Z. Liu, J. B. Johnston und H. H. Mantsch. Study of chronic lymphocytic leukemia cells by FT-IR spectroscopy and cluster analysis. *Leukemia Research*, 20:649 – 655, 1996.
- W. J. Schultz-Schaeffer, S. Tschöke, N. Kranefuss, W. Dröse, D. Hause-Reitner, A. Giese, M. H. Groschup und H. A. Kretzschmar. The paraffin-embedded tissue tissue blot detects PrP^{Sc} early in the incubation time in prion diseases. *American Journal of Pathology*, 156:51–56, 2000.
- W. Schulz-Schaeffer, R. Fatzer, M. Vandeveldde und H. Kretzschmar. Detection of PrP^{Sc} in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Archives of Virology (Suppl.)*, 16:173–180, 2000.

- M. R. Scott, R. Will, J. Ironside, H.-O. B. Nguyen, P. Tremblay, S. J. DeArmond und S. B. Prusiner. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96:15137–15142, 1999.
- D. Serban, A. Taraboulos, S. J. DeArmond und S. B. Prusiner. Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology*, 40:110–117, 1990.
- M. C. Silvestrini, F. Cardone, B. Maras, P. Pucci, D. Barra, M. Brunori und M. Pochiari. Identification of the prion protein allotypes which accumulate in the brain of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Nature Medicine*, 3: 521–525, 1997.
- B. Stuart. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1997.
- A. Taraboulos, K. Jendroska, D. Serban, S.-L. Yang, S. J. DeArmond und S. B. Prusiner. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89:7620–7624, 1992.
- T. Udelhoven, D. Naumann und J. Schmitt. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Applied Spectroscopy*, 54(10):1471–1479, 2000.
- L. van Keulen, B. E. C. Schreuder, M. E. W. Vromans, J. P. M. Langeveldt und M. A. Smits. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology (Suppl.)*, 16: 57–71, 2000.
- J. D. F. Wadsworth, G. S. Jackson, A. F. Hill und J. Collinge. Molecular biology of prion propagation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9:338–345, 1999.
- J. Wang, M. Sowa, H. H. Mantsch, A. Bittner und H. M. Heise. Comparison of different infrared measurement techniques in the clinical analysis of biofluids. *Trends in Analytical Chemistry*, 15:286–295, 1996.
- R. Wehner und W. Gehring. *Zoologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- C. Weissmann. A 'unified theory' of prion propagation. *Nature*, 352:679–683, 1991.
- G. A. H. Wells, A. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson und R. Bradley. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record*, 121:419–420, 1987.
- D. L. Wetzel, D. N. Slatkin und S. M. Levine. FT-IR microspectroscopic detection of metabolically deuterated compounds in the rat cerebellum: a novel approach for the study of brain metabolism. *Cellular and Molecular Biology*, 44(1):15–27, 1998.

- R. G. Will, J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari und A. Hofman. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, 347(921-925), 1996.
- A. Williams, P. J. Lucassen, D. Ritchie und M. Bruce. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Experimental Neurology*, 144: 433–438, 1997.
- A. E. Williams, L. J. Lawson, V. H. Pery und H. Fraser. Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 20:47–55, 1994.
- B. C. Wood. *Biomedical Applications of Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy*. Phd, Monash University, 1998.
- I. Zerr, M. Bodemer, S. Racker, S. Grosche, S. Poser, H. A. Kretzschmar und T. Weber. Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 345:1609–1610, 1995.
- E. Zobeley, E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari und C. Weissmann. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Molecular Medicine*, 5:240–243, 1999.

Literaturverzeichnis

Abkürzungen

ANN:	<i>artificial neural network</i> , künstliches neuronales Netz
BSE:	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CC:	Zentralkanal
CFV:	<i>crystal fast violet</i> , Kresylechtviolett
CJD:	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD:	<i>chronic wasting disease</i>
DMNV:	Nucleus dorsalis nervi vagi, <i>dorsal motor nucleus of the vagus</i> [nerve]
DMNV/SolN:	spektrale Klasse, enthält sowohl Spektren aus dem →DMNV als auch aus Teilen des →SolN
d. p. i.:	dies post infectionem (Tage nach Infektion)
DTGS:	deuteriertes Triglycerinsulfat (Detektormaterial)
EEG:	Elektroencephalogramm
FCS:	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FFI:	Fatale Familiäre Insomnie
FFT:	Fast Fourier-Transform (Algorithmus zur Berechnung der Fourier-Transformierten)
FSE:	Feline Spongiforme Enzephalopathie
FT:	Fourier-Transformation(s)
FTIR:	Fourier-transform Infrarot
GFAP:	<i>glial fibrillar acidic protein</i>
GSS:	Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom
HypN:	Nucleus nervi hypoglossi

Abkürzungen

IntN:	Nucleus interpositus cerebelli
IR:	Infrarot
mAb:	monoklonaler Antikörper
MCT:	<i>mercury-cadmium-telluride</i> , Hg-Cd-Te (Detektormaterial)
MLP:	<i>multilayer perceptron</i> , Bauweise für ein \rightarrow ANN
PBS:	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PK:	Proteinase K
PLV:	Protein/Lipid-Verhältnis
PNS:	peripheres Nervensystem
PrP:	Prion-Protein
PrP ^C :	Prion-Protein, zelluläre Form
PrP ^{Sc} :	Prion-Protein, pathologische (umgefaltete) Form
S/N:	<i>signal to noise</i> , (Signal/Rausch-Verhältnis)
SolN:	Nucleus tracti solitarii
TBST:	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TSE:	transmissible spongiforme Enzephalopathie(n)
vCJD:	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ZNS:	zentrales Nervensystem

Verwendete Software

Die im Kapitel 2 beschriebenen Auswertungen der Daten wurden mit folgender Software durchgeführt:

OPUS 3.0.2 für OS/2 (Bruker Optik): Aufnahme der Spektren, Aufbereitung der Rohdaten, Modul IDENT für Clusteranalyse und Faktoranalyse

OPUS-NT 3.0 für Windows NT (Bruker Optik, 2000): Aufbereitung der Rohdaten, Clusteranalyse, *chemical mapping*

ORIGIN 6.1 (OriginLab Corporation, 1991–2000): Darstellung von Funktionen und 3D-Diagrammen für *chemical maps*

CytoSpec-program for FTIR imaging (CytoSpec 2000–2001): Erstellung der auf Clusteranalyse basierenden Karten

MATRIX (P. Lasch, RKI, 1997): Anordnen der ausgelesenen spektralen Parameter in Matrizen für die Erstellung von 3D-Diagrammen in Origin

KOPIER (J. Kneipp, RKI, 2000): Extraktion und Sortieren von Spektren entsprechend Ergebnissen von Clusteranalysen

Verwendete Software

Publikationsliste

- J. Kneipp, P. Lasch, M. Beekes und D. Naumann. Characterization of cerebellar sections using FT-IR microspectroscopy. In: *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions*, Hrsg.: J. Greve, G. J. Puppels und C. Otto, S 505–506 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
- P. Lasch, J. Kneipp und D. Naumann. Infrared imaging: An emerging tool for tissue diagnostics? In: *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions*, Hrsg.: J. Greve, G. J. Puppels und C. Otto, S 509–510 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
- J. Kneipp, P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes und D. Naumann. Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1501:189–199, 2000.
- D. Naumann, P. Lasch und J. Kneipp. FT-IR microspectroscopic imaging of tissues. *European Biophysics Journal*, 29: 363, 2000.
- J. Kneipp, M. Beekes, P. Lasch und D. Naumann. Molecular changes of pre-clinical scrapie can be detected by infrared spectroscopy. *Journal of Neuroscience* (im Druck).
- J. Kneipp, M. Beekes, P. Lasch und D. Naumann. In situ spectroscopic investigation of transmissible spongiform encephalopathies: Application of Fourier-transform infrared spectroscopy to a scrapie-hamster model. (im Druck)
- Patent:** D. Naumann, J. Kneipp, E. Baldauf, P. Lasch und M. Beekes. Verfahren zur Diagnose TSE-induzierter Veränderungen in Geweben mittels Infrarotspektroskopie (Patent DE 199 23 811), 2000.

Publikationsliste

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen, die mir während der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben, bedanken. Herrn Prof. Dieter Naumann als dem Betreuer der Arbeit danke ich für sein großes Interesse, besonders für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und seinen persönlichen Einsatz hinsichtlich der Durchführung des gesamten Projektes.

Herrn Prof. Pflüger danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Die experimentellen Arbeiten wären ohne eine enge Kooperation zwischen den Gruppen „Biophysikalische Strukturanalysen“ (P34) und „Transmissible spongiforme Enzephalopathien“ (P31/P35) am RKI nicht möglich gewesen. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Beekes für die sorgfältige Planung und Durchführung der Tierexperimente, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung die TSE-Aspekte betreffend, sowie für das Korrekturlesen des TSE-Kapitels der vorliegenden Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich auch recht herzlich bei Marion Joncic für ihre Hilfe bei den vielen Präparationen und bei technischen Problemen bedanken. Herrn Dr. Hans Huser danke ich für den Antikörper 3F4, den er mir freundlich zur Verfügung gestellt hat, sowie für interessante Diskussionen.

Bei Peter Lasch bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit und die vielen anregenden Diskussionen, aus denen ich viel gelernt habe, sowie dafür, daß er mir seine tolle Software zur Verfügung gestellt hat! Für die Hilfe bei Problemen aller Art, die nette Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit am RKI möchte ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe P34 bedanken: Maren Stämmeler, Caro Kirschner, Anh NgoThi, Angelika Brauer, Ralf Moritz, Fabian Sokolowski und Sashko Spassov.

Tricia McBride, Anne Suttie und Maura Donaldson (Institute for Animal Health, Edinburgh) danke ich für die Möglichkeit, bei ihnen über TSE-Histopathologie und Immunhistochemie zu lernen. Ganz besonders bedanke ich mich bei Lisa Miller und den technischen Mitarbeitern von der NSLS in Brookhaven, ohne die das interessante Ganglienprojekt nicht hätte stattfinden können.

Für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit danke ich Robbe und Martin ganz herzlich.