

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Professor Dr. med. Hans Kretzschmar

Etablierung eines standardisierten Vorgehens zur Evaluation
der Wirksamkeit von Dekontaminationsverfahren für
oberflächengebundenen Prionen und dessen Anwendung zur
Überprüfung neu entwickelter Reinigungsverfahren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Schmitt
aus
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar

.....

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Reinhard Zeidler

Priv. Doz. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ingo Westner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2009

1	Einleitung	1
1.1	Prionerkrankungen im Tierreich	1
1.2	Prionerkrankungen des Menschen	3
1.2.1	Sporadische Prionerkrankungen	3
1.2.2	Vererbte Prionerkrankungen	4
1.2.3	Übertragene Prionerkrankungen	5
1.3	Die Prion-Hypothese	8
1.4	Das zelluläre Prion-Protein PrP ^C und sein Gen Prnp	10
1.5	PrP ^{Sc} als pathologische Isoform von PrP ^C	13
1.6	Die Konversion von PrP ^C zu PrP ^{Sc}	14
1.7	Pathophysiologie der Zellschädigung im Verlauf der TSEs	16
1.8	Faktoren, die die Empfänglichkeit gegenüber TSEs und den Krankheitsverlauf beeinflussen	18
1.8.1	Speziesbarriere	18
1.8.2	Prionstämme	19
1.8.3	Polymorphismus an Codon 129 des Prnp-Gens	20
1.9	Übertragungswege	21
1.10	Empfehlung des Robert-Koch-Instituts zur Instrumentenaufbereitung	24
1.11	Entwicklung neuer Verfahren zur Priondekontamination	27
1.12	Aufgabenstellung	30
2	Material	31
2.1	Chemikalien	31
2.2	Enzyme, Enzyminhibitoren, Antikörper, Proteingrößenstandards und Kits	32
2.3	Lösungen für Zellkultur	32
2.4	Medikamente und Nahrung für die Arbeit mit Versuchstieren	32
2.5	Reinigungsmittel zum Betrieb des Reinigungs- und Desinfektionsgerätes (RDG)	33
2.6	Verbrauchsmaterialien	33
2.7	Geräte	34
2.8	Zellen und Versuchstiere	34
2.9	Verwendeter Prionstamm	34
2.10	Lösungen und Puffer	35

3	Methoden	37
3.1	Arbeit mit eukaryontischen Zellen	37
3.1.1	Kultivierung der Zellen	37
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen	38
3.1.2.1	Einfrieren von Zellen	38
3.1.2.2	Auftauen von Zellen	38
3.1.3	Einzelzellklonierung mittels Endpunkttitration	38
3.1.4	Infektion von Zellen	39
3.1.4.1	Infektion von Zellen mittels Hirnhomogenat	39
3.1.4.2	Infektion von Zellen über metallgebundene Prionen	39
3.2	Arbeit mit Versuchstieren	40
3.2.1	Haltung der Versuchstiere	40
3.2.2	Infektion von Mäusen mit Prionen	41
3.2.2.1	Infektion mittels intrazerebraler Inokulation von Hirnhomogenat	41
3.2.2.2	Infektion durch intrazerebrale Implantation prionkontaminierter Metalldrähte	41
3.2.3	Monitoring der Versuchstiere	42
3.2.4	Präparation der Versuchstiere	42
3.2.4.1	Tötung der Tiere und Organentnahme	42
3.2.4.2	Histologische Aufarbeitung der Organe	42
3.2.4.3	Herstellung von 10%igem Hirnhomogenat	44
3.3	Methoden zur Proteinanalyse	44
3.3.1	Präparation der zu untersuchenden Zellen und Gewebe	44
3.3.1.1	Herstellung von Zellysat zur Proteinanalyse	44
3.3.1.2	Präparation von Milz- und Gehirngewebe zur Proteinanalyse	44
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat	45
3.3.3	Konzentrierung der Proteine durch Fällung der Lysate	45
3.3.3.1	Methanolfällung	45
3.3.3.2	Trichlorazetatfällung	45
3.3.4	Methoden zur Präparation von PrP ^{Sc} im Lysat	46
3.3.4.1	Trennung von PrP ^C und PrP ^{Sc} über deren Löslichkeit	46
3.3.4.2	Trennung von PrP ^C und PrP ^{Sc} über deren unterschiedliche Proteaseresistenz	46
3.3.5	Elektrophoretische Proteinauftrennung im SDS-Gel (SDS-PAGE)	47
3.3.6	Westernblot-Analyse	47
3.4	Direkter PrP-Nachweis auf Metalloberflächen mittels Chemolumineszenz	49
3.4.1	Immun- und Chemolumineszenzreaktion	49

3.4.2	Detektion des Chemolumineszenzsignals und Quantifizierung der Signalstärke	50
3.5	Evaluierung der Prionwirksamkeit von Dekontaminationsverfahren	51
3.5.1	Dekontaminationsverfahren	51
3.5.1.1	Verfahren A	51
3.5.1.2	Verfahren B	51
3.5.1.3	Verfahren C	52
3.5.2	Evaluierung der Prionwirksamkeit mit Hilfe verschiedener Tests für oberflächengebundene Prionen	55
3.5.2.1	Art und Kontamination der Prüfkörper	55
3.5.2.2	Behandlung der Prüfkörper im Reinigungs- und Desinfektions-Gerät (RDG)	56
3.5.2.3	Testung der Prüfkörper auf Prionen	56
4	Ergebnisse	57
<hr/>		
4.1	Etablierung verschiedener Nachweisverfahren für metallgebundene Prionen	57
4.1.1	Qualitativer Test für metallgebundenes PrP auf Basis einer Chemolumineszenzreaktion	57
4.1.1.1	Darstellbarkeit von PrP mit Hilfe des gewählten Verfahrens	57
4.1.1.2	Wahl der Prüfkörper und der Reaktionsgefäße	58
4.1.1.3	Spezifität des Chemolumineszenztests für PrP	59
4.1.1.4	Quantifizierbarkeit des PrP-Nachweises	61
4.1.1.5	Unterscheidbarkeit von PrP ^C und PrP ^{Sc} mit Hilfe des Chemolumineszenztests	62
4.1.2	Zellkulturtest für metallgebundene Prionen	64
4.1.2.1	Herstellung von Einzelzellklonen mittels Endpunkttitration	64
4.1.2.2	Infizierbarkeit der Einzelzellklone über Hirnhomogenat und metallgebundene Prionen	64
4.1.2.3	Zeitverlauf der Infektion einzelner Klone	66
4.1.2.4	Subklonierung des Einzelzellklons „I13“	69
4.1.2.5	Selektion eines I13-Subklons mit früher Bildung von proteaseresistentem PrP ^{Sc}	70
4.1.2.6	Sensitivität des Indikatorklons	71
4.1.3	Tierversuchstest für metallgebundene Prionen	72
4.1.3.1	Wahl der Indikatortiere und Etablierung der stereotaktischen Operation zur Implantation der Prüfkörper	72
4.1.3.2	Infektion von Tga 20-Mäusen über metallgebundene Prionen	73

4.1.3.3	Sensitivität der Indikatortiere für metallgebundene Prionen und Beziehung von Infektionsdosis und Inkubationszeit	77
4.2	Evaluierung der Prionwirksamkeit der Dekontaminationsverfahren mit Hilfe der etablierten Nachweisverfahren für metallgebundene Prionen	79
4.2.1	Chemolumineszenztest	79
4.2.2	Zellkulturtest	83
4.2.3	Tierversuch	85
5	<u>Diskussion</u>	92
5.1	Detektionsverfahren für oberflächengebundene Prionen	92
5.1.1	Direkte Detektion des Prion-Proteins	92
5.1.2	Indirekter Nachweis von Prionen durch Detektion der Infektiosität	97
5.1.2.1	Nachweis von oberflächengebundener Prioninfektiosität <i>in vitro</i>	97
5.1.2.2	Nachweis von Infektiosität im Tierversuch	100
5.2	Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination	103
5.3	Die Dekontaminationsverfahren	108
6	<u>Zusammenfassung</u>	113
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	115
8	<u>Anhang</u>	141
8.1	Verwendete Abkürzungen	141
8.2	Danksagung	144
8.3	Eigene Veröffentlichungen	145
8.4	Lebenslauf	146
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	148

1 Einleitung

Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien (transmissible spongiform encephalopathies; TSEs) sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die beim Menschen und einer Reihe von Säugetieren vorkommen. Der Name TSE ist vom histopathologischen Erscheinungsbild hergeleitet. In der mikroskopischen Untersuchung erscheint das Hirngewebe als „schwammartig“ vakuolisiert, es tritt ein Verlust an Nervenzellen auf und es zeigt sich eine Astrogliose. Bemerkenswert ist, dass eine Entzündungsreaktion fehlt. Teilweise tritt eine Ablagerung von Amyloid-Plaques auf.

Einzigartig an den TSEs ist, dass sie sowohl sporadisch, vererbt als auch übertragen auftreten können. Im Laufe einer TSE-Erkrankung entwickeln sich nach meist langer Inkubationszeit Symptome einer Neurodegeneration, wie Ataxie und Demenz. Die Erkrankungen verlaufen progredient und führen nach dem Auftreten erster Symptome immer relativ bald zum Tod des betroffenen Organismus. Als gemeinsames Merkmal der TSEs lässt sich bei erkrankten Individuen ein proteaseresistentes Protein, das Prion-Protein (PrP^{Sc}) nachweisen. Dieses hat den Erkrankungen auch den Namen „Prionerkrankungen“ gegeben.

1.1 Prionerkrankungen im Tierreich

Seit etwa 250 Jahren ist die Traberkrankheit bei Schafen bekannt. Im englischen Sprachraum hat die Erkrankung den Namen Scrapie, da bei erkrankten Tieren ein Pruritus eines der ersten auftretenden Symptome ist. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln die Tiere Koordinationsstörungen und eine Gangataxie. Die Erkrankung endet wie bei allen TSEs immer tödlich. Lange erkannte man nicht, dass der Scrapieerkrankung eine Infektion der Tiere zugrunde liegt. Dies lag unter anderem daran, dass auch in infizierten Herden nur unter 5% der Tiere erkranken. Der Verdacht auf die Übertragbarkeit von Scrapie bestätigte sich erst 1936, durch einen mit dem Scrapieerreger kontaminierten Impfstoff. Damals erkrankten mehrere hundert Schafe an Scrapie nachdem sie eine Impfung gegen „louping ill“, einer viralen Enzephalitis, erhalten hatten (Bessen 1996). Dies geschah, obwohl das der Vakzine zugrunde liegende ovine lymphatische Gewebe zuvor formalinbehandelt wurde. Die natürliche Übertragung des Scrapie-Erregers zwischen den Schafen wird vertikal und horizontal beobachtet. Man geht davon aus, dass bei der horizontalen Übertragung die Plazenta, die nach einer Geburt teilweise von anderen Schafen verzehrt wird, eine Rolle spielt (Pattison 1961; Pattison 1964; Pattison *et al.* 1972; Onodera *et al.* 1993).

Ebenfalls durch orale Übertragung des Krankheitserregers ist die 1986 erstmals in Großbritannien aufgetretene Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern

bedingt (Wells *et al.* 1987). Durch epidemiologische Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der sich ausbreitenden Tierseuche und der praktizierten Verfütterung von Tiermehl an die Rinder hergestellt werden. Man geht heute davon aus, dass dieses Tiermehl ungenügend inaktivierte TSE-Erreger von verwerteten Schaf- oder Rinderkörpern enthielt (Wilesmith *et al.* 1988; Wilesmith und Wells 1991). 1988 wurde die Verfütterung von Tiermehl in Großbritannien verboten. Die Zahl der jährlich an BSE erkrankten Rinder stieg dort noch bis zum Jahr 1992 an, als sie mit etwa 36700 Fällen pro Jahr ihren Höhepunkt erreichte. Seit dieser Zeit sinkt die Zahl der Neuerkrankungen (Abbildung 1).

Die BSE-Epidemie blieb nicht auf Großbritannien beschränkt. Seit 1990 traten immer wieder Fälle in anderen europäischen Ländern auf, wobei Portugal und Frankreich besonders stark betroffen sind. Auch in Deutschland wurden mit der Einführung von flächendeckenden BSE-Tests im Jahr 2000 die ersten Fälle von BSE diagnostiziert. Bisher wurden für das Bundesgebiet 410 Fälle von BSE bestätigt (Stand 31.01.2008; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz). Besondere Bedeutung hat die BSE-Epidemie erlangt, seit im Jahr 1995 eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) beim Menschen aufgetreten ist (Will *et al.* 1996) (Abbildung 1). Diese wird auf Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen zurückgeführt (Collinge *et al.* 1996).

Ebenfalls durch die Verfütterung von prionkontaminiertem Futter sind die TME (Transmissible Mink Encephalopathie) der Nerze, die FSE (Feline Spongiforme Encephalopathie) der Katzen und Prionerkrankungen exotischer Zootiere bedingt.

Bei der CWD (Cronic Wasting Disease) einiger frei lebender Hirscharten in Nordamerika ist der Übertragungsweg zwischen den Tieren unklar. Eine horizontale Übertragung über prionkontaminierten Speichel oder Fäces wird diskutiert.

Experimentell gelang die Übertragung von Prioninfektionen außerdem auf eine Reihe von Versuchstiere, wie Mäuse, Hamster und Primaten.

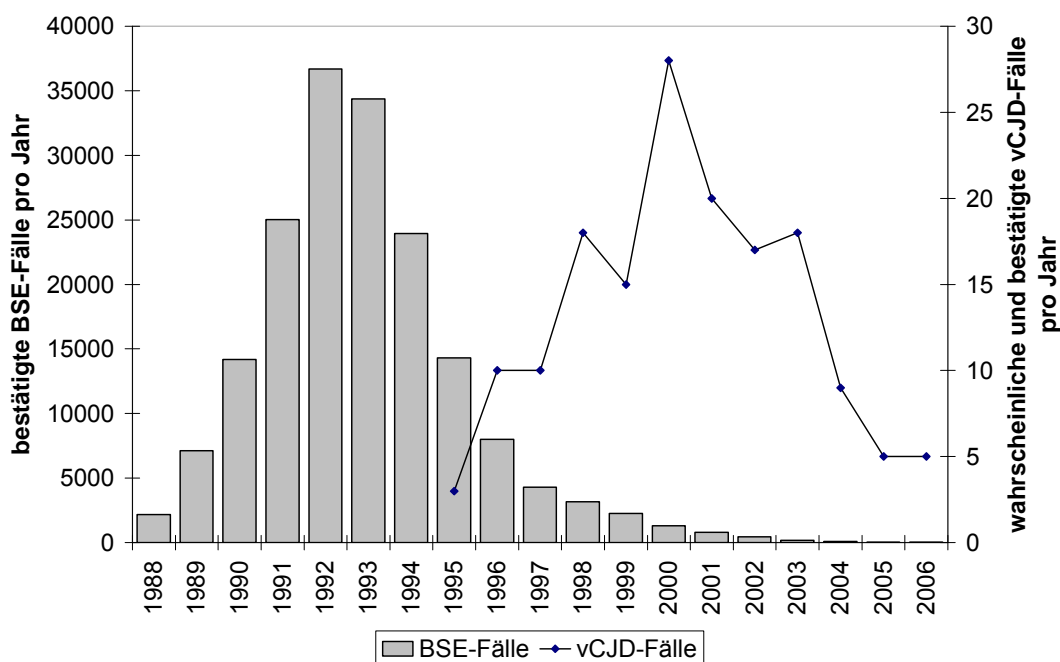


Abbildung 1: Entwicklung der BSE- und vCJD-Fälle in Großbritannien von 1988 bis 2006. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung! (Quellen: Department of Environment, Food and Rural Affairs (<http://www.defra.gov.uk/>); National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (<http://www.cjd.ed.ac.uk/>))

1.2 Prionerkrankungen des Menschen

Die TSEs des Menschen lassen sich in sporadische (sCJD), übertragene (vCJD, Kuru und iatrogene CJD) und familiäre (fCJD, GSS und FFI) Prionerkrankungen unterteilen.

1.2.1 Sporadische Prionerkrankungen

Die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (sCJD) wurde erstmals 1920 und 1921 von Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob beschrieben (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921a; Jakob 1921b). Die Inzidenz der Erkrankung ist mit etwa 1:1.000.000 sehr gering und weltweit relativ konstant. Sie macht mit fast 90% den größten Teil der humanen TSEs aus und zeigt einen Altersgipfel im siebten Lebensjahrzehnt. Die Krankheit äußert sich bei den Patienten durch eine rasch fortschreitende Demenz. Diese wird im weiteren Krankheitsverlauf oftmals von visuellen Störungen, Ataxie, Myoklonien, pyramidalen und extrapyramidalen Störungen und akinetischem Mutismus begleitet. Die Erkrankung ist rasch progredient und endet wenige Monate nach Auftreten erster Symptome mit dem Tod des Patienten. Die Verdachtsdiagnose der CJD wird durch den klinischen Befund und über zusätzliche apparative Diagnostik gestellt. So treten im EEG bei etwa 60% der Patienten typische triphasische periodische Komplexe auf (Weber 1994; Steinhoff *et al.* 1996), in der Liquoranalyse können erhöhte Spiegel der Proteine 14-3-3 (bei 95% der sCJD-Patienten positiv) und Neuronen-spezifische Enolase die Verdachtsdiagnose

erhärten (Hsich *et al.* 1996; Zerr *et al.* 2000). Neuroradiologisch zeigen sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) bei etwa zwei Drittel der Patienten hyperdense Signale im Bereich der Basalganglien, des Nucleus Caudatus und des Putamens (Finkenstaedt *et al.* 1996; Zerr *et al.* 2000). In manchen Fällen lassen sich auch vorübergehende kortikale Hyperintensitäten nachweisen. Eine sichere Diagnose der sCJD ist bisher nur durch eine postmortale neuropathologische Untersuchung des Gehirns möglich (Kretzschmar *et al.* 1996).

Dabei kann die sCJD über den biochemischen Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} im Hirngewebe mittels Westernblot-Analyse bestätigt werden. Des Weiteren finden sich lichtmikroskopisch die typischen Veränderungen der TSEs im Gehirn. So zeigen sich in den Routinefärbungen (HE und PAS) spongiöse Veränderungen, astrozytäre Gliose und Nervenzellverlust. In bis zu 15% der Patienten lassen sich homogene, eosinophile Amyloidablagerungen, sogenannte Kuru-Plaques nachweisen. In der immunhistochemischen Färbung auf PrP^{Sc} reagieren diese Plaques positiv. Aber auch in Fällen ohne Kuru-Plaques lassen sich in der PrP^{Sc}-Färbung häufig plaqueartige und/oder feingranuläre PrP-Ablagerungen feststellen. Diese sind kleiner als die Kuru-Plaques weshalb sie in den Routinefärbungen verborgen bleiben (Kretzschmar und Feiden 2002). Mit Hilfe des Molekulargewichts des abgelagerten PrP^{Sc} (PrP^{Sc} Typ 1: 21kDa; PrP^{Sc} Typ 2: 19kDa), der Genotypisierung am Codon 129 des Prnp-Gens (Polymorphismus mit den möglichen Allel-Kombinationen: Methionin/Methionin, Methionin/Valin oder Valin/Valin) und Unterscheidung von überwiegend corticalem oder thalamischem Befall bei Methionin-homozygoten Fällen an Codon 129, lassen sich die sCJD-Fälle in sechs Subtypen einteilen. Diese Einteilung korreliert mit Klinik und neuropathologischem Befund der Patienten (Parchi *et al.* 1999).

1.2.2 Vererbte Prionerkrankungen

Etwa 10% der menschlichen Prionerkrankungen treten familiär gehäuft auf. Zu diesen gehören die familiäre CJD (fCJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Tödliche Familiäre Insomnie (FFI). Sie werden mit nahezu vollständiger Penetranz autosomal-dominant vererbt. Für die genetisch bedingten humanen Prionerkrankungen sind eine Reihe von Mutationen bekannt, die bestimmten Erkrankungen zugeordnet werden können und eine Diagnostik auch vor Krankheitsbeginn erlauben. Je nach Mutation zeigen die Patienten dabei teils deutliche Unterschiede in Klinik, Progredienz der Krankheit und Erkrankungsalter (Windl und Kretzschmar 2000). Während sich fCJD und FFI histologisch oftmals nicht von der sCJD unterscheiden lassen, sind die beim GSS auftretenden, großen, multizentrischen Plaques (Kokardenplaques) für dieses pathognomonisch (Kretzschmar und Feiden 2002).

1.2.3 Übertragene Prionerkrankungen

Die Fälle von übertragenen Prionerkrankungen sind selten. Sie sind meist durch orale Aufnahme von TSE-kontaminierter Nahrung oder iatrogen bedingt. Bekannt geworden ist die 1957 von Carleton Gajdusek und Vincent Zigas beschriebene Kuru-Erkrankung des Fore-Stamms aus Papua-Neuguinea (Gajdusek und Zigas 1957). Bis in die 60er Jahre des letzten Jahrhunderts war diese Prionerkrankung dort die häufigste Todesursache. Sie konnte sich unter den Fore durch den von diesen praktizierten rituellen Kannibalismus ausbreiten. Dabei wurden Teile der Verstorbenen durch die Stammesangehörigen verzehrt. Seit dem Verbot dieser Praxis nahm die Inzidenz der Erkrankung stetig ab. Allerdings treten noch bis heute vereinzelt Fälle von Kuru auf, was zeigt, dass die Inkubationszeit von humanen Prionerkrankung mehr als 40 Jahre betragen kann (Collinge *et al.* 2006). Die Kuru-Erkrankung äußerte sich bei den Betroffenen vor allem durch Auftreten von zerebellärer Ataxie und eines Tremors.

Ebenfalls auf die orale Aufnahme von prionkontaminierter Nahrung wird die neue Variante der CJD (vCJD) zurückgeführt. Diese wurde erstmals 1996 in Großbritannien beschrieben (Will *et al.* 1996). Aufgrund des zeitlichen und örtlichen Zusammenhangs des Auftretens der ersten vCJD-Fälle und der BSE Epidemie wurde sehr schnell der Verdacht geäußert, dass es sich bei der vCJD um eine alimentär verursachte humane Infektion mit dem BSE-Erreger handelt (Collinge *et al.* 1995; Ridley und Baker 1996; Will *et al.* 1996). Mit Hilfe von Infektionsstudien an Mäusen und Primaten fanden sich Hinweise, die diese Theorie stützen (Lasmézas *et al.* 1996; Bruce *et al.* 1997). Heute wird allgemein davon ausgegangen, dass es sich bei der vCJD um eine Infektion des Menschen mit dem BSE-Erreger handelt (Collinge *et al.* 1996; Priola 1996; Bruce *et al.* 1997; Hill *et al.* 1997a; Scott *et al.* 1999).

Die vCJD unterscheidet sich von der sCJD hinsichtlich Klinik, Erkrankungsalter, Erkrankungsverlauf und histopathologischem Befund. Die Erkrankung wurde bisher bei Patienten im Alter von 16 bis 75 Jahren nachgewiesen, wobei das mittlere Erkrankungsalter mit 29 Jahren deutlich niedriger liegt als bei der sCJD mit 60-65 Jahren (Lorains *et al.* 2001). Die Patienten fallen häufig durch psychiatrische Symptome und Verhaltensauffälligkeiten auf (u.a. Depressionen, Halluzinationen, Angststörungen) (Zeidler *et al.* 1997a). Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung tritt meist eine ausgeprägte zerebelläre Ataxie hinzu (Zeidler *et al.* 1997b). Diese ist teilweise begleitet von Myoklonien und Dysästhesien. Im Gegensatz zur sCJD, bei der die Demenz oft das führende Symptom ist, tritt diese bei der vCJD erst sehr spät auf. Auch in der apparativen Diagnostik zeigen sich einige Unterschiede der vCJD im Gegensatz zur sCJD. So fehlen meist die für die sCJD typischen EEG Veränderungen und der Nachweis eines erhöhten 14-3-3-Proteins im Liquor gelingt nur bei 45% der Patienten (95% der sCJD-Patienten).

Im MRT sind bei der vCJD die stärksten hyperdensen Areale im Bereich des posterioren Thalamus zu detektieren („pulvinar sign“). Der Krankheitsverlauf der vCJD ist durchschnittlich 14 Monaten deutlich länger als bei der sCJD (6 Monate).

In der neuropathologischen Untersuchung des Gehirns betroffener Patienten lassen sich neben den TSE-typischen Veränderungen auch sogenannte floride Plaques nachweisen. Diese bestehen aus einer zentralen PrP-Ablagerung, die von Vakuolen umgeben ist. Das Auftreten von floriden Plaques ist pathognomonisch für die vCJD. Darüber hinaus zeigt das PrP^{Sc} bei der vCJD ein charakteristisches Bandenmuster im Westernblot, welches bei keiner anderen humanen TSE auftritt (Will *et al.* 1996; Kretzschmar und Feiden 2002) (Tabelle 1).

	Variante der CJD (vCJD)	Sporadische CJD (sCJD)
Mittleres Erkrankungsalter	< 30 Jahre	60-65 Jahre
Mediane Krankheitsdauer	14 Monate	6 Monate
Klinik bei Erkrankungsbeginn	Dysästhesien, psychiatrische Symptome	Gedächtnisstörungen, Ataxie
EEG	unspezifische Veränderungen	60% typische triphasische, periodische Komplexe
14-3-3 Protein im Liquor	45%	95%
Kernspintomographie	Hyperintensitäten im Thalamus, „pulvinar sign“	Hyperintensitäten in den Basalganglien
Neuropathologische Charakteristika	Floride Plaques, sonst wie sCJD	Spongiforme Veränderungen, Gliose, Nervenzellverlust, PrP ^{Sc} -Ablagerungen

Tabelle 1: Die Variante der CJD im Vergleich mit der sporadischen CJD

Im Gegensatz zu den anderen TSEs des Menschen lassen sich bei der vCJD sehr viel größere Mengen von PrP^{Sc} außerhalb des ZNS nachweisen (Herzog *et al.* 2005), wo es schon vor dem Auftreten neurologischer Symptome im lymphatischen Gewebe akkumuliert (Hilton *et al.* 1998; Hill *et al.* 1999; Wadsworth *et al.* 2001; Hilton *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004; Herzog *et al.* 2005). Dort ist es bei chirurgischen Eingriffen leicht zugänglich, wodurch die Gefahr besteht, dass im Rahmen von Operationen übertragen wird (Brown *et al.* 2006; Garske *et al.* 2006; Sutton *et al.* 2006). Außerdem hat sich gezeigt, dass eine Übertragung der vCJD auch über Blut und Blutprodukte möglich ist (Houston *et al.* 2000; Llewelyn *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004).

Zwar sind bis heute in Großbritannien nur 163 Personen an der vCJD verstorben, aufgrund der möglicherweise sehr langen Inkubationszeit der Erkrankung ist aber unbekannt, wie viele Menschen infiziert sind und bisher noch keine Symptome zeigen (Stand 04.02.2008; <http://www.cjd.ed.ac.uk/>) (Abbildung 1). Studien an Appendektomie resektaten sprechen für eine nicht unerhebliche Prävalenz von asymptomatischen vCJD-Trägern in Großbritannien (Hilton *et al.* 2004).

Eine iatrogene Übertragung kann auch durch sCJD-kontaminierte Gewebe erfolgen. Die meisten Fälle von iatrogener CJD (iCJD) sind durch die Transplantation von Dura mater oder den Einsatz von Wachstumshormon bedingt. Das Ausgangsmaterial stammte in beiden Fällen von Verstorbenen. Diese Übertragungswege sind heute beseitigt, da die Dura mater priondekontaminierend aufbereitet wird und das Wachstumshormon gentechnisch hergestellt werden kann. Weitere Fälle von iCJD sind durch Corneatransplantationen, Einsatz von intracerebralen EEG-Elektroden und neurochirurgische Eingriffe bedingt (Duffy *et al.* 1974; Bernoulli *et al.* 1977; Masters und Richardson 1978; Will und Matthews 1982; Davanipour *et al.* 1984).

Bemerkenswert ist, dass die iatrogenen Übertragungen bei neurochirurgischen Operationen trotz üblicher Aufbereitung der verwendeten Instrumente stattfinden konnte, da sich der Erreger der Prionerkrankung mit den standardmäßig eingesetzten Sterilisationsverfahren (z.B. Autoklavieren bei 121°C für 20 min, Formalinbedampfung) nicht ausreichend sicher inaktivieren lässt. (Taylor 2003).

Histopathologisch ist die iCJD meist nicht von der sCJD zu unterscheiden. Lediglich in vier Fällen nach Dura-Mater-Transplantation wurde der Nachweis von, eigentlich vCJD-typischen, floriden Plaques in geringer Dichte beschrieben (Kretzschmar und Feiden 2002).

Je nach Infektionsweg variieren die Inkubationszeiten beträchtlich. Sie betrug nach der direkten intrazerebralen Infektion mittels EEG-Elektroden nur 16 bzw. 40 Monate, während sie nach Infektion durch periphere Injektion von kontaminiertem Wachstumshormon bei durchschnittlich 12 Jahren lag (Tabelle 2) (Brown *et al.* 2000).

Infektionsweg	Anzahl an Patienten	Erregereintritt	mittlere Inkubationszeit	Klinische Symptomatik
<u>Chirurgische Instrumente</u>				
Neurochirurgie	5	intrazerebral	17 (12-28) Monate	visuell, dementiell, zerebellär
Stereotaktisches EEG	2	intrazerebral	16,20 Monate	dementiell, zerebellär
<u>Gewebetransplantationen</u>				
Cornea	3	Auge	16, 18, 320 Monate	dementiell, zerebellär
Dura mater	114	Hirnoberfläche	6 (1,5-18) Jahre	zerebellär (visuell, dementiell)
<u>Gewebeextrakte</u>				
hGH	139	intramuskulär	12 (5-30) Jahre	zerebellär
Gonadotropin	4	intramuskulär	13 (12-16) Jahre	zerebellär

Tabelle 2: Zusammenfassung der Fälle von iCJD (Quelle: (Brown *et al.* 2000); Stand Juli 2000)

1.3 Die Prion-Hypothese

Als man erkannt hatte, dass es sich bei Scrapie um eine Infektionskrankheit handelt (Bessen 1996), begann die Suche nach dem infektiösauslösenden Agens. Wilson konnte 1950 zeigen, dass es sich dabei um einen filtrierbaren Erreger handelt (Wilson *et al.* 1950), den Sigurdsson als „slow virus“ beschrieb (Sigurdsson 1954).

Bald fielen die histopathologische Ähnlichkeit der humanen Krankheiten CJD und Kuru mit der Scrapieerkrankung der Schafe auf, woraufhin der Verdacht geäußert wurde, dass auch diese durch einen „slow virus“ bedingt sein (Hadlow 1959; Klatzo *et al.* 1959). Ein paar Jahre später gelang es, die Infektiosität der beiden menschlichen Erkrankungen experimentell nachzuweisen, indem zuerst die Kuru- und etwas später die CJD-Erkrankung auf einen Schimpansen übertragen wurden (Gajdusek *et al.* 1966; Gibbs *et al.* 1968).

Tikvah Alper beschäftigte sich in den 60er Jahren mit der Natur des Scrapieerregers. Sie wies nach, dass der Erreger extrem resistent gegenüber UV- und radioaktiver Bestrahlung

ist (Alper *et al.* 1966; Alper *et al.* 1967), woraus sie schloss, dass er wohl kein Nukleinsäuregenom enthalten könne.

Auf Grund dieser Daten erschien es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem Scrapieerreger um ein neurotropes „slow virus“ handelt. Anstatt dessen entstanden eine Vielzahl von Hypothesen über die Natur eines möglichen nukleinsäuregenomfreien Erregers. So wurde vorgeschlagen, es könne sich bei dem infektiösauslösenden Agens um ein Membranfragment, ein selbstreplizierendes Polysaccharid oder ein Nucleohiston-Protein handeln (Gibbons und Hunter 1967).

Der Mathematiker Griffith stellte 1967 drei Modelle für einen nukleinsäurefreien, nur aus Protein bestehenden Erreger vor, die mit den Regeln der Biologie vereinbar waren. So erläuterte er, dass der Scrapieerreger als Inducer für die Expression eines bisher inaktiven Gens der Wirtszelle wirken könnte, er könnte für seine Vermehrung einen schon in der Wirtszelle vorhandenen Replikationsmechanismus benutzen, oder das Protein selbst könnte als „Kondensationskeim“ andere Proteine binden und sie dadurch verändern (Griffith 1967).

Anfang der 80er Jahre gelang es Prusiner ein proteaseresistentes Proteinfragment von 27-30kDa nachzuweisen, das nur in scrapieinfiziertem Gewebe vorkommt. In Aufreinigungen des Proteins zeigten sich elektronenmikroskopisch makromolekulare Strukturen, die als „prion rods“ oder „Scrapie-assoziierte Fibrillen“ (SAF) beschrieben wurden (Merz *et al.* 1981; Bolton *et al.* 1982; Merz *et al.* 1983). Es stellte sich heraus, dass eine Anreicherung des Proteinfragmentes mit einer Erhöhung der Infektiosität der Präparation verbunden ist (Diringer *et al.* 1983; Prusiner *et al.* 1983). Andererseits führten Verfahren, die zur Hydrolyse von Proteinen führen, zu einer Reduktion der Infektiosität der Proben. Aufgrund der Überzeugung, dass es sich bei dem gefundenen Protein um den alleinigen Erreger der Scrapieerkrankung handelt, gab ihm Prusiner den Namen „*proteinaceous infectious agent*“, oder kurz „*Prion*“ (Prusiner 1982).

Nach Sequenzierung der N-terminalen Nukleinsäuresequenz des Prionproteins gelang der Nachweis, dass die mRNA Konzentrationen bei gesunden, sowie scrapieerkrankten Tieren gleich sind (Chesebro *et al.* 1985), es sich also um ein körpereigenes Protein des „Wirtes“ handelt. Bald hatte man den gesamten *open reading frame* (ORF) des Prionproteins (PrP) bei Hamster und Maus sequenziert (Basler *et al.* 1986; Lochter *et al.* 1986). Bei dessen Genprodukt handelt es sich um ein 33-35 kDa großes Protein, welches als zelluläres Prionprotein (PrP^C) bezeichnet wird (Oesch *et al.* 1985; Basler *et al.* 1986). PrP^C ist im Gegensatz zur proteaseresistenten Form des Prionproteins in scrapieinfiziertem Gewebe (PrP^{Sc}) proteasesensitiv und in nichtdenaturierenden Detergenzien löslich (Meyer *et al.* 1986).

Prusiner beschreibt das Prion (PrP^{Sc}) in seiner erstmals 1982 postulierten Prionhypothese als völlig neuartigen Erreger. Dieser überträgt seine krankmachende Information, anders als Bakterien, Viren und Viroide, nicht mit Hilfe von Nukleinsäuren, sondern durch die autokatalytische, sterische Umfaltung des körpereigenen Eiweißes PrP^{C} (Prusiner 1998). Im Jahr 2004 konnte Legname aus der Arbeitsgruppe von Prusiner experimentell bestätigen, dass es sich bei PrP^{Sc} um das alleinige infektiösauslösende Agens handelt. Zu diesem Zweck wurde PrP mit einer N-terminalen Deletion rekombinant hergestellt und *in vitro* einem Puffer mit niedrigem pH-Wert und hoher Harnstoffkonzentration ausgesetzt. Dies führt zur Ausbildung einer β -Faltblattstruktur und einer Aggregation der Proteine. Die dadurch entstandenen PrP^{Sc} -ähnlichen Fibrillen wurden dann in 16-fach PrP -überexprimierende Mäuse, deren PrP die gleiche N-terminale Deletion aufwies, intracerebral inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von 380-660 Tagen zeigten die Tiere Symptome der Prionerkrankung. In ihren Gehirnen ließ sich histopathologisch und mittels Westernblot eine Prioninfektion bestätigen. Außerdem gelang es mit dem Hirnhomogenat der verstorbenen Tiere Wildtyp-Mäuse zu infizieren (Legname *et al.* 2004). Aufgrund der geringen, bei dieser Arbeit erreichten, infektiösen Titer müssen die Ergebnisse noch in weiteren Versuchen bestätigt werden, um eine eventuelle Kontamination auszuschließen. Wenn sich die Ergebnisse mit Wildtyp-Tieren und rekombinant hergestelltem Vollängen- PrP reproduzieren lassen, so kann damit die Richtigkeit der Prionhypothese bewiesen werden.

1.4 Das zelluläre Prion-Protein PrP^{C} und sein Gen *Prnp*

Das zelluläre Prion-Protein PrP^{C} ist das Produkt des *Prnp*-Gens, welches beim Menschen auf Chromosom 20 liegt (Sparkes *et al.* 1986). Das *Prnp*-Gen kommt bei vielen Wirbeltieren vor und ist innerhalb der Säugetiere hochkonserviert. Es besteht bei den meisten Säugetierarten aus mehreren Exons, wobei die Information, die das PrP^{C} -Protein kodiert, bei allen untersuchten Säugetieren und Vögeln auf einem einzelnen Exon lokalisiert ist (Basler *et al.* 1986; Westaway *et al.* 1987; Hsiao *et al.* 1989; Gabriel *et al.* 1992). Dadurch kann ein alternatives Splicing als Ursache für die PrP^{Sc} -Entstehung ausgeschlossen werden (Basler *et al.* 1986; Westaway *et al.* 1987; Westaway *et al.* 1991).

PrP^{C} wird in adulten Organismen in nahezu allen Geweben des Körpers exprimiert, jedoch in stark unterschiedlichen Mengen (Bendheim *et al.* 1992; Manson *et al.* 1992b). Besonders hoch sind die Expressionslevel in Neuronen und Gliazellen des ZNS und in Leukozyten (Kretschmar *et al.* 1986; Cashman *et al.* 1990; Moser *et al.* 1995; Dodelet und Cashman 1998). Untersuchungen an Mäusen und Hühnern zeigten, dass PrP^{C} in der frühen Embryogenese zuerst im Gehirn gebildet wird. Im Laufe der weiteren Entwicklung

nimmt die Expression im Gehirn zu und PrP^C wird zusätzlich auch in peripheren Geweben nachweisbar (Manson *et al.* 1992a; Harris *et al.* 1993).

Die Translation des beim Mensch aus 253 und bei Maus und Hamster aus 254 Aminosäuren bestehenden primären PrP erfolgt ins Endoplasmatische Retikulum. Nach Abspaltung der 22 Aminosäuren langen Signalsequenz folgt eine posttranslationale Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat. Dort wird eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cystinen an Position 179 und 214 ausgebildet, die Asparaginreste an Position 181 und 197 werden glykosyliert und ein GPI-Anker wird an die C-terminale Aminosäure 231 gebunden. Nach der Prozessierung wird das PrP^C an die Zelloberfläche transportiert, wo es mit seinem GPI-Anker gebunden ist (Stahl *et al.* 1987). PrP^C ist ein Sialoglycoprotein, welches in einer nicht-, einer mono- und einer diglycosylierten Form vorkommt (Bolton *et al.* 1985; Endo *et al.* 1989).

Das 33-35 kDa schwere PrP^C befindet sich auf der Zellmembran bevorzugt in sogenannten „lipid rafts“, die detergenten-unlösliche cholesterin- und glycosphingolipidreiche Mikrodomänen darstellen (Shyng *et al.* 1993; Naslavsky *et al.* 1997). PrP^C kann diese „rafts“ nach Bindung von Kupfer an eine spezielle N-terminale Oktapeptid-Wiederholungssequenz verlassen, um über Clathrin-coated Pits endocytiert zu werden (Taylor und Hooper 2006). Das endocytierte PrP^C kann, wie andere GPI-verankerte Proteine rezirkulieren, oder es wird proteolytisch abgebaut.

Die Struktur des C-terminalen Teils ab Aminosäure 121 konnte mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Sie weist drei α -Helices und zwei kurze antiparallel verlaufende β -Faltblattstrukturen auf. Der N-terminale Abschnitt ist aufgrund seiner hohen Flexibilität einer Strukturbestimmung nicht zugänglich (Donne *et al.* 1997; Riek *et al.* 1997; Zahn *et al.* 2000) (Abbildung 2). Dieser Bereich enthält zwischen Aminosäure 23 und 108 fünf histidinreiche Oktarepeatmuster. Diese Wiederholungssequenzen binden Cu²⁺-Ionen mit hoher Affinität, wodurch es zu einer Konformationsänderung in diesem Abschnitt kommt (Hornshaw *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997; Viles *et al.* 1999; Morante *et al.* 2004).

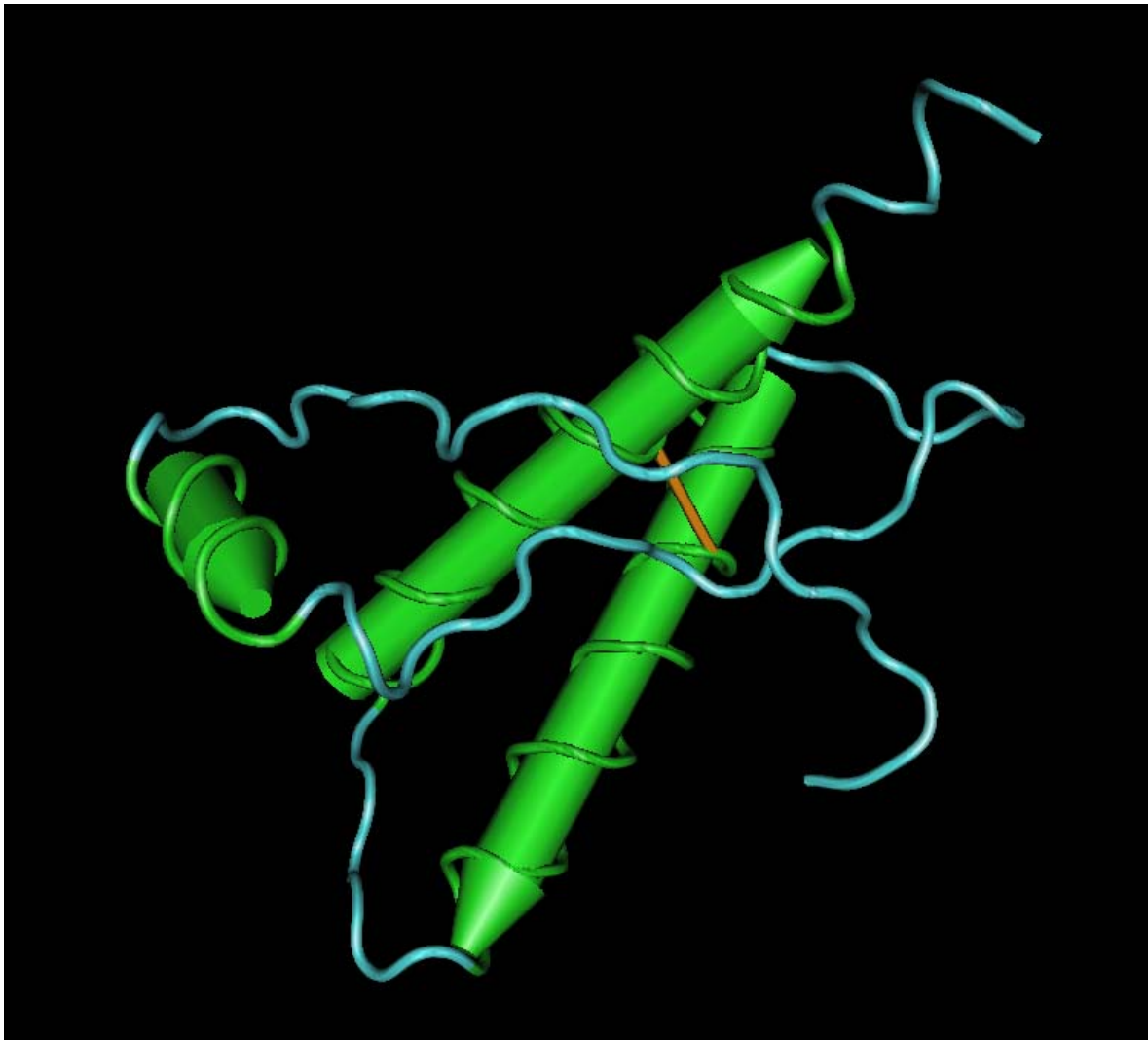


Abbildung 2: NMR-Struktur des humanen PrP^C, (Zahn *et al.* 2000) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=19138), generiert mit Cn3D; die Zylinder markieren die helikalen Domänen

Über die physiologische Funktion von PrP^C ist bis heute sehr wenig bekannt. Als es 1993 erstmals gelang Prnp-Knockout- (Prnp^{0/0}-) Mäuse zu generieren, war man über den ausbleibenden Phänotyp der Tiere überrascht. Man hatte einen deutlichen Phänotyp erwartet, da das PrP^C innerhalb der Säugetiere so hoch konserviert ist, was auf eine wichtige Funktion des Proteins schließen lässt. Die Prnp^{0/0}-Tiere waren weder in Entwicklung, noch im Verhalten beeinträchtigt (Bueler *et al.* 1992; Manson *et al.* 1994) und hatten eine normale Lebensdauer von mehr als zwei Jahren. Auch wenn das Prnp-Gen erst nach der Geburt inaktiviert wurde, wiesen die Tiere keine Auffälligkeiten auf (Mallucci *et al.* 2002).

Die einzige Besonderheit, die die Prnp^{0/0}-Tiere zeigten, ist deren Resistenz gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc}. Diese Resistenz unterstreicht die Rolle des Prionproteins in der Pathogenese der TSEs (Bueler *et al.* 1993; Prusiner *et al.* 1993a; Sailer *et al.* 1994).

Weitere Untersuchungen an Prnp^{0/0}-Tieren führten zu teilweise widersprüchlichen Daten über Auffälligkeiten der Tiere. So beschrieb Collinge elektrophysiologische Veränderungen bei Prnp^{0/0}-Tieren, die für eine Beteiligung von PrP^C bei der synaptischen Funktion sprechen (Collinge *et al.* 1994). Diese Daten konnten in anderen Untersuchungen allerdings nicht bestätigt werden (Herms *et al.* 1995; Lledo *et al.* 1996). Weiter wurden Besonderheiten der Regulation des zirkardialen Rhythmus bei Prnp^{0/0}-Mäusen beschrieben (Tobler *et al.* 1996; Tobler *et al.* 1997). Trotz struktureller Ähnlichkeiten von PrP^C zu membrangebundenen Signalpeptidasen (Glockshuber *et al.* 1998) gelang es bisher nicht, eine spezifische Funktion von PrP^C bei der Signaltransduktion nachzuweisen. Ballerini *et al.* fanden Hinweise für eine Beteiligung von PrP^C an Antigen-vermittelten Interaktionen zwischen Immunzellen (Ballerini *et al.* 2006). Des Weiteren wird PrP^C eine zellprotektive Aktivität zugeschrieben. So ergaben sich Anhaltspunkte für eine Beteiligung von PrP^C am Oxidationsschutz von neuronalen Zellen und an der Regulation der synaptischen Kupferhomöostase (Brown *et al.* 1997; Brown *et al.* 1999; Kretzschmar *et al.* 2000; Kramer *et al.* 2001; Vassallo und Herms 2003; Rachidi *et al.* 2005).

1.5 PrP^{Sc} als pathologische Isoform von PrP^C

PrP^{Sc} ist die pathologische Isoform des zellulären PrP^C. Es unterscheidet sich von PrP^C durch einige grundlegende biochemische Eigenschaften. So ist PrP^{Sc} resistenter gegenüber der Einwirkung von Chemikalien (Prusiner *et al.* 1993b), Hitze (Safar *et al.* 1993b) und dem Verdau durch Proteasen (McKinley *et al.* 1983). Außerdem ist PrP^{Sc} unlöslich und neigt zur Aggregation (Prusiner *et al.* 1983).

Für diese Unterschiede wird eine veränderte Sekundär- und Tertiärstruktur verantwortlich gemacht, da PrP^C und PrP^{Sc} die gleiche Primärstruktur besitzen (Oesch *et al.* 1985; Basler *et al.* 1986) und kein Anhalt für eine chemische, posttranslationale Modifikation von PrP^{Sc} im Gegensatz zu PrP^C nachgewiesen werden konnte (Stahl *et al.* 1993).

Dass sich PrP^C und PrP^{Sc} in der Sekundärstruktur unterscheiden, konnte Pan 1993 mittels Strukturanalyse durch Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie belegen (Pan *et al.* 1993). Er zeigte, dass PrP^{Sc} mit ca. 50% zu großen Teilen aus β -Faltblatt und nur zu ca. 20% aus α -helikalen Anteilen besteht, während PrP^C zum Großteil (ca. 40%) aus α -Helix besteht und nur sehr geringe Anteile von β -Faltblatt aufweist (Caughey *et al.* 1991; Pan *et al.* 1993; Safar *et al.* 1993a).

Eine weitere Aufklärung der Struktur von PrP^{Sc} mittels NMR oder Röntgenbeugung scheiterte an dessen Unlöslichkeit in detergenzienfreien Lösungen. Aus diesem Grund musste man sich mit computergestützten Modellen zur Struktur von PrP^{Sc} behelfen. Ein

lange etabliertes Modell für PrP^{Sc} wurde durch Huang berechnet (Huang *et al.* 1994; Huang *et al.* 1995).

Erst durch die Arbeiten von Wille, der eine Elektronenkristallographie von Proteinase K-verdauten, aufgereinigten PrP^{Sc}-Präparationen (PrP 27-30) durchführte, konnte dieses Modell abgelöst werden. Wille beschreibt PrP^{Sc} als Molekül, welches zu großen Teilen aus einer parallelen, linksgewundenen β -Helix besteht (Wille *et al.* 2002). In weiteren Untersuchungen mit verbesserter Auflösung konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen Bilddaten der Prionaggregate am ehesten mit übereinander gestapelten Trimeren von PrP^{Sc}-Molekülen mit linksgewundenen β -Helices korrelieren (Govaerts *et al.* 2004) (Abbildung 3). Auch in Computersimulationen konnte die Hypothese einer parallelen, linksgewundenen β -Helix als stabile Konformation von PrP^{Sc} untermauert werden (Stork *et al.* 2005).

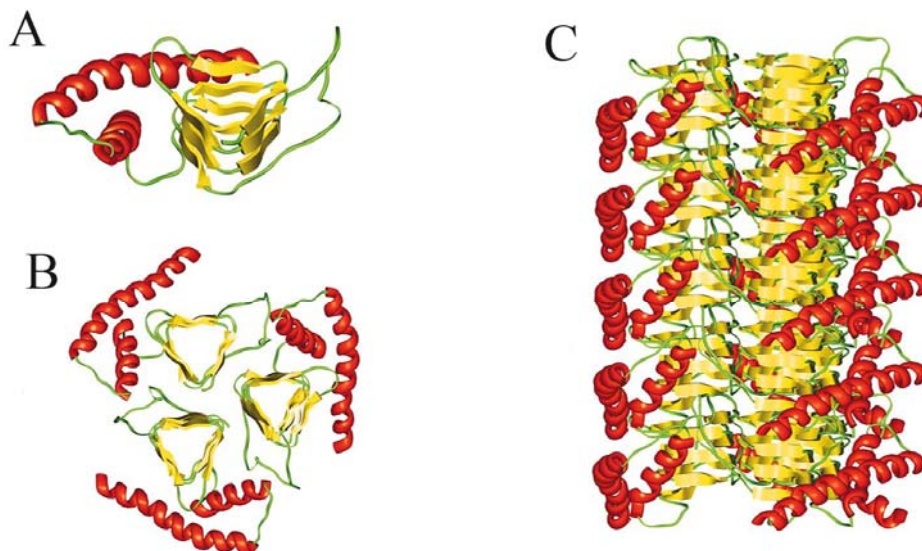


Abbildung 3: Strukturmodell von PrP^{Sc} anhand von elektronenkristallographischer Daten: (A) PrP^{Sc} 27-30-Molekül mit linksgewundenen β -Helices; (B) planares PrP^{Sc} 27-30-trimer (C) PrP^{Sc}-Fibrille bestehend aus übereinander gestapelten Trimeren von PrP^{Sc}-Molekülen (Govaerts *et al.* 2004)

1.6 Die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass für die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} eine direkte Interaktion der beiden Isoformen nötig ist (Prusiner *et al.* 1990; Raeber *et al.* 1992; Priola und Chesebro 1995).

Es existieren zwei unterschiedliche Modelle die diese Konversion beschreiben, das „refolding“-Modell nach Prusiner und das „seeding“-Modell nach Lansbury. Nach

kinetischen Gesichtspunkten erscheinen beide Theorien als gleich wahrscheinlich (Eigen 1996).

Prusiner geht bei seinem Modell von einer Entfaltung von PrP^{C} und einer daraufhin folgenden Neufaltung zu PrP^{Sc} aus, welche durch vorhandenes PrP^{Sc} katalysiert wird (Prusiner 1991). Das „refolding“-Modell wurde noch verfeinert, indem ein metastabiles Zwischenprodukt bei der PrP^{Sc} -Entstehung angenommen wird, welches an einen bisher noch nicht identifizierten Wirtsfaktor („Protein X“) bindet. Dieses „Protein X“ könnte als Chaperon wirken und für die Speziesbarriere bei der Krankheitsübertragung mitverantwortlich sein (Telling *et al.* 1995) (Abbildung 4).

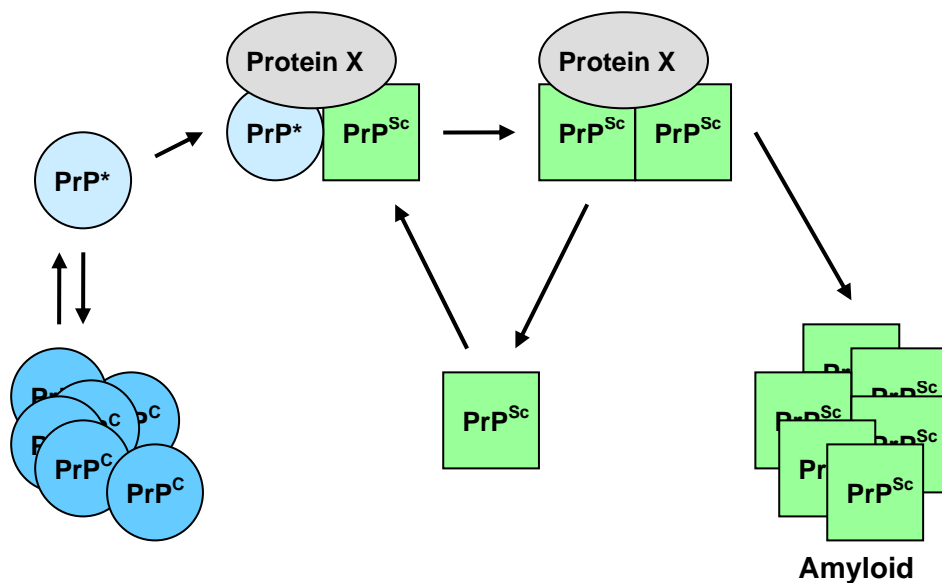


Abbildung 4: „refolding“-Modell nach Prusiner; PrP^* entspricht einem metastabilen Zwischenprodukt

Beim Modell von Lansbury befinden sich PrP^{C} und PrP^{Sc} in einem Fließgleichgewicht, welches auf der Seite des PrP^{C} liegt. Das entstehende PrP^{Sc} kann dabei aggregieren, wodurch es stabilisiert wird. Ab einer gewissen Größe des Aggregates („seed“) verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten von PrP^{Sc} . Die initiale Aggregation erfolgt dabei als langsamer, kinetisch kontrollierter Vorgang. Erst nach Überschreitung einer gewissen Größe des Aggregates erfolgt eine schnelle, autokatalytische PrP^{Sc} -Addition mit einer Vermehrung des infektiösen Agens (Come *et al.* 1993; Jarrett und Lansbury 1993) (Abbildung 5).

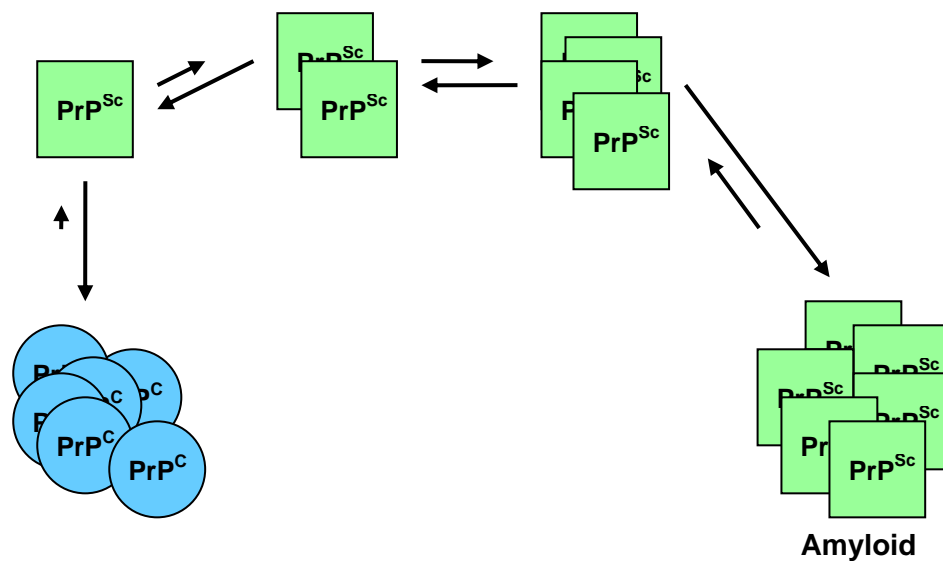


Abbildung 5: „seeding“-Modell nach Landsbury;

Der Ort der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Durch Versuche mit Funktionshemmung einzelner Zellkompartimente konnte der Zellort, an dem die Interaktion stattfindet, auf die Zelloberfläche oder den Weg von dort zu den Lysosomen eingegrenzt werden (Borchelt *et al.* 1992; Laszlo *et al.* 1992; Taraboulos *et al.* 1992; Caughey 1993; Caughey und Raymond 1993; Arnold *et al.* 1995). Dass für die Konversion eine Intaktheit der Lipid-Rafts auf der Zelloberfläche nötig ist, kann als Indiz gewertet werden, dass die Konversion auf der Zellmembran oder einem von dort aus zugänglichem Kompartiment, wie Caveolae oder frühen Endosomen stattfindet (Taraboulos *et al.* 1995).

Das entstehende PrP^{Sc} akkumuliert dann in den späten Endosomen oder sekundären Lysosomen, wo es nur sehr langsam abgebaut wird (Caughey 1993; Caughey und Raymond 1993; Weissmann 1996).

1.7 Pathophysiologie der Zellschädigung im Verlauf der TSEs

Wodurch es im Gehirn TSE-infizierter Organismen zu Gliose, Nervenzelluntergang und spongiosen Veränderungen kommt, ist bisher nicht geklärt.

Der Nervenzellverlust scheint durch Apoptose bedingt zu sein. Giese *et al.* fanden Hinweise dafür, dass die im Rahmen von Prionerkrankungen verursachte Aktivierung der Mikroglia eine Voraussetzung für den Untergang der Neuronen ist. Die PrP^{Sc}-Ablagerungen sind möglicherweise die Ursache für diese Aktivierung. Die aktivierte Mikroglia setzt Sauerstoffradikale und proinflammatorische Enzyme frei. Dabei wird insbesondere dem mikrogliavermittelten oxidativen Stress eine wichtige Rolle in der

Induktion des neuronalen Zelltodes zugesprochen (Giese *et al.* 1995; Williams *et al.* 1997; Giese *et al.* 1998; Giese und Kretzschmar 2001).

Über eine direkte Auswirkung von PrP^{Sc} auf die Nervenzellen gibt es unterschiedliche Daten. Einige Autoren gehen davon aus, dass der Verlust von PrP^C zum Untergang der Neuronen führt, andere schreiben PrP^{Sc} eine neurotoxische Wirkung zu.

Eine Störung des zellulären Kupferstoffwechsels und des Oxidationsschutzes bei Verlust der normalen PrP^C-Funktion, werden als mögliche Mechanismen der Zellschädigung angeführt (Giese und Kretzschmar 2001; Brown 2005). Kurschner und Morgan gehen von einer Beteiligung von PrP^C bei der Regulation der Apoptose aus. Sie argumentieren, dass bei dessen Konversion zu PrP^{Sc} die beobachtete Apoptose der Nervenzellen ausgelöst wird (Kurschner und Morgan 1995; Kurschner und Morgan 1996). Allerdings zeigen PrP^{0/0}-Mäuse keine Schädigung der Neuronen (Bueler *et al.* 1992; Manson *et al.* 1994). Dies ist auch nicht der Fall, wenn das Prnp-Gen erst nach Abschluss der Entwicklung inaktiviert wird (Mallucci *et al.* 2002).

In anderen Arbeiten wird von einer neurotoxischen Wirkung von PrP^{Sc} ausgegangen. Tatsächlich konnte eine zellschädigende Wirkung von PrP-Fragmenten nachgewiesen werden. Durch ein aus den Aminosäuren 106 bis 126 des Prionproteins bestehendes Peptid konnte Apoptose in kultivierten Hippocampuszellen ausgelöst werden (Forloni *et al.* 1993; Tagliavini *et al.* 1993; Brown *et al.* 1996). Lin *et al.* fanden in *in vitro*-Untersuchungen Hinweise dafür, dass dieses PrP-Fragment Ionenkanäle in Lipiddoppelmembranen ausbilden kann. Diese könnten durch Änderung des Ionenhaushalts der Zelle die Apoptose auslösen (Lin *et al.* 1997). Gegen eine direkte neurotoxische Wirkung von PrP^{Sc} sprechen die Ergebnisse von Brandner *et al.*. Diese implantierten Hirngewebe von PrP-überexprimierenden Mäusen in das Gehirn von PrP^{0/0}-Mäusen. Nach Infektion der transplantierten Mäuse mittels intrazerebraler Inokulation von scrapiehaltigem Hirnhomogenat entwickelten diese keine scrapietypischen Symptome. In der histologischen Untersuchung der Gehirne zeigten die transplantierten Gewebe die für Scrapie typischen pathologischen Veränderungen mit starker PrP^{Sc}-Anreicherung. Obwohl das PrP^{Sc} vom Spendergewebe in das Wirtsgewebe diffundiert war, wo es immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, entwickelten die Tiere dort keine pathologischen Veränderungen (Brandner *et al.* 1996; Brandner *et al.* 1998).

Eine weitere Hypothese zur direkten Schädigung der Neuronen durch Prionen wurde von Weissmann diskutiert. Er beschreibt die Möglichkeit der Existenz einer zweiten pathologischen Isoform von PrP neben PrP^{Sc}. Diese PrP-Isoform, die er PrP* nennt, könnte die Pathologie während der TSE-Infektion verursachen (Weissmann 1991).

1.8 Faktoren, die die Empfänglichkeit gegenüber TSEs und den Krankheitsverlauf beeinflussen

1.8.1 Speziesbarriere

Versucht man experimentell eine Prionerkrankung von einer Art auf eine andere zu übertragen, so erfolgt dies häufig sehr viel ineffektiver als innerhalb einer Art. Diese sogenannte Speziesbarriere äußert sich in einer geringeren Zahl erfolgreich infizierter Individuen und einer verlängerten, stärker variierenden Inkubationszeit (Pattison 1965). Die Speziesbarriere zeigt sich nur bei der Erstinfektion einer Art. Bei weiterer Passagierung innerhalb der neuen Spezies verkürzt sich die Inkubationszeit auf ein relativ konstantes Niveau und die Zahl der erfolgreich infizierten Tiere steigt. Sind Tiere einer Art nicht mit einem Priontyp einer anderen zu infizieren, so wird die Empfängerart als „resistent“ gegenüber des Priontyps der Spenderart bezeichnet.

Der Hauptfaktor von dem die Speziesbarriere abhängt, ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im PrP von Überträger- und Empfängerspezies (Scott *et al.* 1989; Prusiner *et al.* 1990; Scott *et al.* 1993b). So sind Mäuse resistent gegenüber der Infektion mit einigen Hamsterprionstämmen. Transgene Mäuse, die anstelle des Maus Prnp-Gens das des Hamsters exprimieren sind aber gut empfänglich für Hamsterprionen (Weissmann *et al.* 1994).

Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die neben dem Maus-Prnp-Gen auch ein Hamster-Prnp-Gen exprimierten, konnten Prusiner *et al.* zeigen, dass PrP^{Sc} bevorzugt mit homologem PrP^C interagiert. Die Tiere waren sowohl empfänglich für Hamster- als auch für Maus-PrP^{Sc}, zeigten dabei aber eine unterschiedliche Pathologie. Bei Infektion mit Maus-PrP^{Sc} zeigten sie die maustypischen neuropathologischen Veränderungen mit Ablagerungen von Maus-PrP^{Sc} und bei Infektion mit Hamster PrP^{Sc} die hamstertypischen mit Produktion von Hamster-PrP^{Sc} (Prusiner *et al.* 1990).

Allerdings ist die Homologie der Aminosäuresequenz nicht alleine verantwortlich für die Speziesbarriere. Transgene Mäuse, die zusätzlich zum murinen auch das humane Prnp-Gen exprimieren, sind nicht empfänglicher als Wildtypmäuse gegenüber einer Infektion mit humanem PrP^{Sc} (Telling *et al.* 1994). Allerdings sind Mäuse, die nur das humane Prnp-Gen exprimieren, empfindlicher für humanes PrP^{Sc}, als Mäuse, die zusätzlich das murine Gen exprimieren. Noch effektiver ist die Übertragung von humanen Prionen bei Tieren, die ein chimäres PrP-Konstrukt exprimieren, welches aus dem zentralen Teil des humanen PrP und den beiden Enden des Maus-PrP besteht (Telling *et al.* 1995).

Auf Grund dieser Daten wurde die Existenz eines zusätzlichen, für die Speziesbarriere verantwortlichen, Faktors postuliert. Es soll sich dabei um ein Wirtsprotein handeln, welches möglicherweise als Chaperon fungiert und die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} ermöglicht. Da dieses bisher nicht identifiziert werden konnte, wird es als „Protein X“

bezeichnet (Telling *et al.* 1995; Kaneko *et al.* 1997). Das „Protein X“ könnte eine höhere Affinität zum artspezifischen PrP besitzen, und dadurch die geringere Effektivität bei der Infektion mit artfremdem PrP^{Sc} erklären. Dadurch ließe sich auch erklären, weshalb transgene Mäuse, welche sowohl humanes, wie auch murines PrP exprimieren, weniger empfänglich für humanes PrP^{Sc} sind, als Tiere, die nur humanes PrP^C exprimieren. Bei ersteren Tieren könnte das Maus-„Protein X“ dank seiner höheren Affinität für das Maus-PrP^C an dieses gebunden sein, weswegen es dann nur noch eingeschränkt für die Umwandlung des humanen PrP^C zur Verfügung steht (Telling *et al.* 1995).

Durch Substitution verschiedener Aminosäuren von PrP, konnte eine Bindungsstelle für ein hypothetisches „Protein X“ ermittelt werden. Sie besteht aus den Aminosäuren 168, 172, 215 und 219 des Prionproteins. Interessanterweise liegen diese Aminosäuren im NMR-Modell von PrP^C eng beisammen, wodurch sie möglicherweise ein Epitop bilden (Kaneko *et al.* 1997; Scott *et al.* 1997; Zulianello *et al.* 2000).

Bisher ist es nicht gelungen, die Existenz von „Protein X“ nachzuweisen. Dies kann auch daran liegen, dass es sich bei dem Wirtsfaktor nicht um ein einzelnes, sondern um das Zusammenwirken mehrerer Wirtsproteine handelt (Fischer *et al.* 2000; Maissen *et al.* 2001). Außerdem könnte es sich bei einem für die Umfaltung nötigen Wirtsfaktor auch um ein anderes Makromolekül als ein Protein handeln. Cordeiro und Silva schlagen ein aus Nukleinsäure bestehendes Chaperon vor (Cordeiro und Silva 2005).

1.8.2 Prionstämme

Eine Besonderheit der Prionerkrankungen besteht in der Existenz von verschiedenen Prionstämmen (Pattison und Millson 1960; Pattison und Millson 1961; Bessen und Marsh 1992a; Bessen und Marsh 1992b; Bessen und Marsh 1994). Diese äußern sich im Auftreten von unterschiedlichen Krankheitsverläufen und neuropathologischen Befunden in einer Art, also bei gleicher Primärstruktur des PrP^C. Prionen eines Stammes führen bei Weiterpassagierung jeweils wieder zu den stammspezifischen Merkmalen im Empfängerorganismus. Zu diesen stammspezifischen Merkmalen gehören unter anderem die ausgelöste klinische Symptomatik, das Läsionsmuster im infizierten und erkrankten Gehirn, die Resistenz des entstehenden PrP^{Sc} gegenüber Proteinase K und dessen Glykosylierungsmuster. Außerdem zeigt PrP^{Sc} verschiedener Stämme teils erhebliche Unterschiede im Hinblick auf seine Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und seine Inaktivierbarkeit. Bei Übertragung auf andere Arten haben die Stämme Einfluss auf die Speziesbarriere. (Dickinson und Meikle 1971; Kimberlin *et al.* 1983; Kimberlin *et al.* 1986; Bruce und Dickinson 1987; Kimberlin *et al.* 1989; Kitamoto *et al.* 1990; Bruce und Fraser 1991; DeArmond *et al.* 1993; Collinge *et al.* 1996; Peretz *et al.* 2002).

Es wird angenommen, dass es sich bei den verschiedenen Stämmen um Konformationsisomere von PrP^{Sc} handelt (Bessen und Marsh 1994; Bessen *et al.* 1995). Diese Isomere wandeln PrP^C autokatalytisch in die stammspezifische PrP^{Sc}-Konformation um, wodurch die Stamminformation übertragen wird. Die unterschiedliche Effektivität der PrP^{Sc}-Konformationsisomere bei der Umwandlung von PrP^C bedingt dabei die stammspezifischen Unterschiede in der Inkubationszeit, des Befallsmusters im Gehirn und des Glykosylierungsmusters. Auch die verschiedenen biochemischen Eigenschaften der PrP^{Sc}-Moleküle lassen sich über deren unterschiedliche Konformation erklären. Safar *et al.* konnten mit Hilfe eines konformationsabhängigen Immunoassays zeigen, dass es sich bei den verschiedenen Stämmen tatsächlich um Konformationsisomere handelt. Dabei gelang es ihnen acht Stämme anhand ihrer PrP^{Sc}-Konformation zu unterscheiden (Safar *et al.* 1998).

Durch PK-Resistenz und Glykosylierungsmuster lassen sich auch bei humanen Prionerkrankungen verschiedene Stämme unterscheiden. Beim Menschen gehen diese ebenfalls mit spezifischem neuropathologischem Befund und typischer Klinik einher (Collinge *et al.* 1996; Parchi *et al.* 1996; Parchi *et al.* 1997; Parchi *et al.* 1999; Wadsworth *et al.* 1999). Es zeigte sich, dass es sich bei der vCJD um einen neuen Prionstamm beim Menschen handelt. Bei Passagierung in Mäusen zeigte er ein anderes Befallsmuster im Gehirn der Tiere, als die anderen humanen Prionerkrankungen. Allerdings glichen sich das Befallsmuster des Mausgehirns bei Infektion mit vCJD und BSE. Die Übereinstimmung der beiden Stämme wird als Indiz für die Entstehung von vCJD aus der Übertragung von BSE auf den Menschen gesehen (Collinge *et al.* 1996).

1.8.3 Polymorphismus an Codon 129 des Prnp-Gens

Im Prnp-Gen des Menschen ist ein Polymorphismus am Codon 129 bekannt. Dieses Codon kann entweder für die Aminosäure Methionin oder für Valin codieren (Owen *et al.* 1990). Untersuchungen zur Prävalenz der einzelnen Genotypen in der Normalbevölkerung Europas und Nordamerikas ergaben, dass etwa die Hälfte der Menschen heterozygot (Methionin/Valin) an Codon 129 sind (Collinge *et al.* 1991). Die andere Hälfte ist homozygot für Valin oder Methionin. Interessanterweise sieht die Häufigkeitsverteilung bei Patienten mit sCJD anders aus. In dieser Population sind fast 90% der Individuen homozygot für Methionin oder Valin an Codon 129. Diese Verteilung spricht dafür, dass Individuen, die homozygot an Codon 129 des Prnp-Gens sind, anfälliger sind, eine sCJD zu entwickeln (Palmer *et al.* 1991; Parchi *et al.* 1999).

Dies scheint auch für die iCJD zuzutreffen. In Untersuchungen an 51 Patienten mit iCJD konnte ebenfalls ein Anteil von fast 90% homozygoten an Codon 129 ermittelt werden. Es scheinen also homozygote Menschen ebenfalls empfänglicher für die Infektion mit iCJD

zu sein, als heterozygote (Collinge *et al.* 1991; Brown *et al.* 1994; Deslys *et al.* 1994). Außerdem fanden sich Hinweise dafür, dass heterozygote Individuen bei iatrogener CJD-Infektion eine längere Inkubationszeit als homozygote besitzen (Huillard d'Aignaux *et al.* 1999).

Besonders ausgeprägt scheint der Einfluss des Genotyps auf die Empfänglichkeit des Menschen für die vCJD zu sein. Alle bisher an der vCJD verstorbenen Patienten waren homozygot für Methionin an Codon 129. Allerdings konnte 2004 ein iatrogen mit vCJD infizierter Patient identifiziert werden, der heterozygot an Codon 129 war. Der Patient ist bis zu seinem Tod neurologisch gesund gewesen und verstarb an einer nicht neurologischen Ursache. Man wurde auf ihn aufmerksam, da er 5 Jahre vor seinem Tod eine Bluttransfusion von einem wenig später an der vCJD erkrankten Spender erhalten hatte. Bei der pathologischen Untersuchung ließ sich PrP^{Sc} in Milz und Lymphknoten, aber nicht im ZNS nachweisen (Peden *et al.* 2004). In einer britischen Prävalenzstudie zur vCJD in Appendektomieresektaten konnten jüngst auch drei Fälle von mit vCJD infizierten Patienten nachgewiesen werden, die homozygot für Valin an Codon 129 sind. Die untersuchten Resektate stammen aus den Jahren 1996 bis 1999 von Patienten im Alter zwischen 20 und 29 Jahren (Ironsides *et al.* 2006).

Da bis heute nur Methionin homozygote Menschen an der vCJD erkrankt sind, ist unklar, ob infizierte Patienten mit den anderen Genotypen erkranken, oder ob sie asymptotische Träger der Infektion bleiben. Es gibt auch Hinweise dafür, dass sie bei Ausbruch der Erkrankung einen anderen Phänotyp entwickeln können, als den der vCJD. Dabei könnte es sich um einen bisher unbekanntem Phänotyp, oder einen der sCJD ähnlichen, handeln (Wadsworth *et al.* 2004).

Während Menschen mit dem Genotyp Methionin/Methionin deutlich empfindlicher auf eine Infektion mit BSE sind, als die anderen, bei denen sie eventuell gar nicht stattfinden kann, scheinen alle Genotypen gleichermaßen anfällig für eine Infektion mit der vCJD zu sein. Dadurch erscheint die Gefahr einer iatrogenen Übertragung der vCJD bei allen Menschen, unabhängig ihres Genotyps an Codon 129, als gegeben (Peden *et al.* 2004; Wadsworth *et al.* 2004; Asano *et al.* 2006; Bishop *et al.* 2006; Ironsides *et al.* 2006).

1.9 Übertragungswege

Zur Übertragung von Prionerkrankungen kommt es, wenn prionkontaminiertes Gewebe in einen anderen Organismus gelangt. Die Aufnahme des infektiösen Materials kann dabei oral, über Konjunktiven und Auge, über die verletzte Haut oder iatrogen ins periphere Gewebe oder direkt ins ZNS erfolgen (Scott *et al.* 1993a; Taylor *et al.* 1996b; Brown *et al.* 2000; Mohan *et al.* 2004; Lasmezas *et al.* 2005).

Experimentell hat sich dabei die intrazerebrale Infektion als effektivster Weg und die orale Infektion als ineffektivster Weg der Prionübertragung herausgestellt (Kimberlin und Walker 1978; Dormont 2002). Dies spiegelt sich auch in den teilweise gut dokumentierten Inkubationszeiten der iatrogen übertragenen CJD-Fälle wieder. Sie lag bei der direkten Einbringung des Erregers in das ZNS, wie bei neurochirurgischen Operationen, oder intrazerebralen EEG-Elektroden, bei durchschnittlich nur etwa 17 Monaten. Dagegen zeigten Patienten, die kontaminiertes Wachstumshormon intramuskulär injiziert bekommen hatten, also außerhalb des ZNS mit Prionen in Kontakt kamen, durchschnittlich eine Inkubationszeit von 12 Jahren (Brown *et al.* 2000) (Tabelle 2). Durch Untersuchung der Kuru-Erkrankung beim Fore-Stamm in Papua-Neuguinea gibt es auch Daten zur Inkubationszeit bei oraler Prioninfektion. Es zeigte sich, dass diese im Fall von Kuru mehr als 40 Jahre betragen kann (Collinge *et al.* 2006).

Wie die Prionen bei Infektion außerhalb des ZNS in dieses gelangen, ist noch nicht abschließend geklärt. Bisherige Daten sprechen dafür, dass das lymphoretikuläre System (LRS) und periphere Nerven daran beteiligt sind.

Nach bisherigen Erkenntnissen verlässt oral aufgenommenes PrP^{Sc} das Darmlumen über die M-Zellen in die Payer'schen Plaques (Maignien *et al.* 1999). Von dort aus breitet sich das PrP^{Sc} im LRS aus, wo es unter anderem in Milz, Appendix, Tonsillen und Lymphknoten akkumuliert (Hill *et al.* 1997b; Prinz *et al.* 2002). Für den Transport innerhalb des LRS scheinen Follikulär Dendritische Zellen verantwortlich zu sein, die große Mengen PrP^{Sc} akkumulieren (Mabbott *et al.* 2000; Montrasio *et al.* 2000). Die Verbreitung kann aber zusätzlich auch über andere Zelltypen erfolgen (Oldstone *et al.* 2002; Prinz *et al.* 2002). Vom LRS, oder direkt von kontaminierten Körperregionen aus, erfolgt dann ein Befall von peripheren Nerven und über diese eine Invasion des Gehirns durch PrP^{Sc} (Beekes *et al.* 1998; Bencsik *et al.* 2001).

Dass die Invasion des ZNS einen Befall der peripheren Nerven voraussetzt und diese nicht hämatogen durch Zellen des LRS erfolgen kann, konnte im Tierversuch gezeigt werden. Dazu wurde PrP^{0/0}-Mäusen Knochenmark und Gehirngewebe von PrP exprimierenden Tieren transplantiert. Bei peripherer Infektion mit Prionen gelang es dabei nicht, das PrP-exprimierende Transplantat im Gehirn über die PrP exprimierenden Zellen des LRS zu infizieren. Damit konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass periphere Nerven PrP exprimieren müssen, um die Ausbreitung der Prioninfektion in das ZNS zu ermöglichen (Blattler *et al.* 1997).

Verschiedene humane Prionstämme unterscheiden sich erheblich in ihrem Lymphotropismus. Dieser beschreibt die Neigung von PrP^{Sc} eines bestimmten Prionstammes im LRS zu akkumulieren. Die Kenntnis des Lymphotropismus ist wichtig,

um die Gefahr einer Übertragung der Prioninfektion durch periphere Gewebe abschätzen zu können.

Herzog et al. konnten mit Hilfe eines Primatenmodells das Auftreten von PrP^{Sc} im Körper nach Infektion mit verschiedenen humanen Prionstämmen (vCJD/BSE, iCJD und sCJD) dokumentieren. Die höchste Menge an PrP^{Sc} ließ sich bei terminal erkrankten Tieren im ZNS nachweisen. Darüber hinaus unterschieden sich die Muster der PrP^{Sc}-Ablagerungen im restlichen Körper aber erheblich zwischen den verschiedenen Prionstämmen. Die ausgeprägtesten PrP^{Sc}-Ablagerungen außerhalb des ZNS wiesen vCJD und BSE infizierte Tiere auf. Sie akkumulierten bis zu 10% der PrP^{Sc}-Konzentration des Gehirns im lymphatischen Gewebe. Überraschenderweise gelang auch bei Infektion mit sCJD und iCJD der Nachweis von PrP^{Sc} in der Milz und zusätzlich bei iCJD in den Tonsillen. Die Menge des akkumulierten PrP^{Sc} war allerdings mit einer 20000-fach niedrigeren Konzentration, im Vergleich zu der im Gehirn, sehr viel geringer als bei vCJD und BSE. Darüber hinaus konnten ähnlich geringe PrP^{Sc}-Ablagerungen unabhängig vom Prionstamm auch in stark innervierten Geweben wie Muskeln und Nebennieren nachgewiesen werden (Herzog *et al.* 2005).

Auf Grund dieser Befunde müssen alle Gewebe von an TSE erkrankten Menschen als potentiell infektiös angesehen werden, wenngleich eine Infektion durch Gewebe mit sehr geringer PrP^{Sc}-Konzentration als unwahrscheinlich erscheint. Demgegenüber geht allerdings eine besondere Gefahr von den stark PrP^{Sc}-akkumulierenden Geweben aus. Bei diesen handelt es sich bei allen humanen TSEs um das ZNS und zusätzlich um das lymphatische Gewebe bei Patienten mit vCJD (Herzog *et al.* 2005). Der ausgeprägte Lymphtropismus bei der vCJD führt auch zu deren Übertragbarkeit über Blut, die bereits dokumentiert ist (Brown *et al.* 1998; Houston *et al.* 2000; Hunter *et al.* 2002; Llewelyn *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004).

Das bei Infektion mit vCJD schon lange vor Ausbildung der ersten Symptome im LRS akkumulierende PrP^{Sc} (Peden *et al.* 2004; Ironside *et al.* 2006) ist bei einer Vielzahl von operativen Eingriffen zugänglich. Gerade bei den häufig durchgeführten Operationen, wie Append- und Tonsillektomien besteht direkter Kontakt mit den am stärksten PrP^{Sc} akkumulierenden Organen. PrP^{Sc} kann dabei über chirurgische Instrumente übertragen werden, da es an Metall- und Kunststoffoberflächen haftet (Weissmann *et al.* 2002) und durch die gebräuchlichen Sterilisationsverfahren nicht sicher inaktiviert werden kann (Taylor 2003).

1.10 Empfehlung des Robert-Koch-Instituts zur Instrumentenaufbereitung

Um eine iatrogene Übertragung von Prionen während diagnostischen oder therapeutischen Eingriffen zu verhindern, muss bei der Aufbereitung von wieder verwendbaren Instrumenten anhaftendes PrP^{Sc} effektiv entfernt oder inaktiviert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass die gebräuchlichen Verfahren zur Sterilisation, wie Autoklavieren bei 121°C für 20 Minuten oder Bedampfung mit Formalin, nicht ausreichend sind, um Prionen sicher zu inaktivieren (Brown *et al.* 1990; Gibbs *et al.* 1994; Taylor *et al.* 1994; Taylor *et al.* 1996a; Taylor 1999; Appel *et al.* 2001; Rutala und Weber 2001; Taylor 2003; Department of Health 2005). Aus diesem Grund hat das Robert-Koch-Institut (RKI) im Jahr 2002 die Richtlinien von RKI und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte von 2001 zur Instrumentenaufbereitung (Robert-Koch-Institut und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2001) unter Berücksichtigung der besonderen Gefährdung durch humane TSEs erweitert (Robert-Koch-Institut 2002).

Dabei empfiehlt das RKI je nach Risiko der Kontamination der Instrumente mit PrP^{Sc} ein gestuftes Vorgehen. Es wird unterschieden, ob die aufzubereitenden Instrumente mit einem Patienten in Kontakt waren, bei dem Hinweise für das Vorliegen einer TSE bestehen, oder ob der Patient keinen Anhalt für eine Prionerkrankung bietet.

Bei Patienten, die klinisch wahrscheinlich an einer vCJD leiden, empfiehlt das RKI die Verbrennung aller Medizinprodukte, die mit Schleimhäuten, krankhaft veränderter Haut, Wunden, Blut, inneren Geweben und Organen in Berührung gekommen sind. Instrumente, die aufgrund ihres hohen Preises nicht primär entsorgt werden können, sollten nach besonderer Aufbereitung nur noch für Patienten mit vCJD eingesetzt werden. Dafür wurde zum Beispiel für Endoskope ein Gerätepool an der Universität Göttingen eingerichtet, von dem zur Behandlung von vCJD-Patienten nötige Instrumente geliehen werden können. Diese werden dann nach Benutzung zentral nach speziellen Vorgaben aufbereitet oder gegebenenfalls entsorgt.

Liegen bei einem Patient mögliche Anzeichen einer vCJD vor, so sollten bei diagnostischen und therapeutischen Eingriffen bevorzugt Einwegprodukte benutzt werden, die anschließend der Verbrennung zugeführt werden können. Instrumente, die wieder aufbereitet werden können, sollten asserviert werden. Kann bei dem Patienten eine vCJD ausgeschlossen werden, so können die aufbewahrten Instrumente normal aufbereitet und wiederverwendet werden. Andernfalls sollte wie bei Patienten mit klinisch wahrscheinlicher vCJD vorgegangen werden (Tabelle 3).

Bei Patienten, die an einer sCJD leiden, kann aufgrund der geringeren Infektiosität der Gewebe außerhalb von ZNS und Auge von einer primären Entsorgung aller Instrumente

durch Verbrennung abgesehen werden. Produkte, die ausschließlich mit Gewebe außerhalb von ZNS und Auge in Kontakt gekommen sind, können aufbereitet werden. Dazu soll nach Gebrauch eine chemische Dekontamination mittels 1-2 M NaOH, 2,5-5% NaOCl oder 4 M GdnSCN für jeweils 2×30 min erfolgen. Es ist darauf zu achten, dass die Instrumente davor keinen Alkoholen oder Aldehyden ausgesetzt werden, da diese PrP^{Sc} fixieren und damit die erfolgreiche Dekontamination verhindern können. Der erste Dekontaminationsschritt sollte von einem üblichen Aufbereitungszyklus in einem Desinfektions- und Reinigungsapparat bei 93°C gefolgt sein. Abschließend folgt eine Dampfsterilisation bei 134°C für 1 h. Ist dieses Vorgehen bei thermolabilen Instrumenten nicht möglich, so kann nach der beschriebenen chemischen Dekontamination mittels NaOH, NaOCl oder GdnSCN eine Behandlung mit einem aldehydhaltigen Desinfektionsmittel folgen. Abschließend sollten die thermolabilen Produkte dann mittels Gassterilisationsverfahren sterilisiert werden.

Auch bei Patienten, die kein Anzeichen für das Vorliegen einer TSE zeigen, empfiehlt das RKI ein verändertes Vorgehen, im Gegensatz zu den Richtlinien zur Instrumentenaufbereitung von 2001 (Robert-Koch-Institut und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2001). Damit soll den auch in Deutschland aufgetretenen BSE-Fällen und der damit verbundenen möglichen Exposition der Bevölkerung mit kontaminierter Nahrung Rechnung getragen werden. Durch die lange Inkubationszeit der vCJD ist nicht klar, wie viele Menschen in Deutschland mit dem BSE-Erreger infiziert wurden und nun eine Gefahr für eine weitere Übertragung darstellen. Auf Grund der Vielzahl von Eingriffen bei denen es zu Kontakt mit Risikogewebe kommt, wird vom RKI aus Präventionsgründen ein generelles, partiell priondekontaminierendes Vorgehen bei der Instrumentenaufbereitung empfohlen (Tabelle 3).

Dabei soll grundsätzlich weiter nach der Empfehlung von RKI und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte von 2001 vorgegangen werden (Robert-Koch-Institut und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2001). Allerdings sollen jetzt dabei wenigstens zwei zumindest partiell prionwirksame Verfahren kombiniert werden (Tabelle 4). Grundsätzlich sollte bei kritisch aufzubereitenden Produkten, wie Skalpellklingen, Nadeln, Kanülen, Implantaten und ähnlichem von einer Wiederverwendung abgesehen werden.

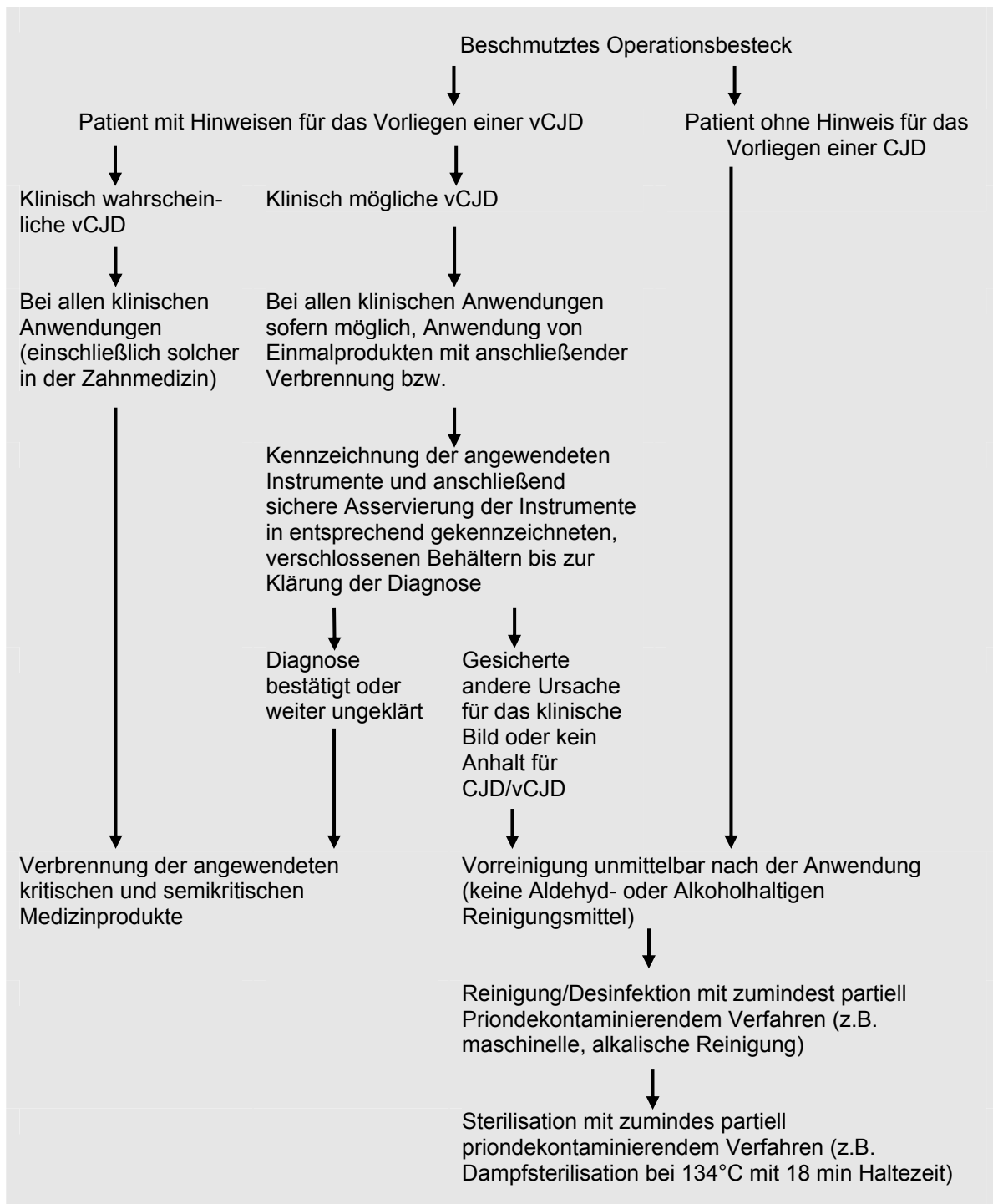


Tabelle 3: Vorgehen bei der Instrumentenaufbereitung nach den Empfehlungen des Robert-Koch-Institutes (Robert-Koch-Institut 2002)

Mindestens partiell wirksame Verfahren/Mittel	Unwirksame Verfahren/Mittel
Sorgfältige (insbesondere alkalische) Reinigung*	Alkohol
1 M NaOH* mindestens 1h; 20°C	Aldehyde; Formaldehyd-Gas
2,5-5% NaOCl* mindestens 1h; 20°C (mindestens 20000 ppm Chlorgehalt)	Ethylenoxid-Gas
≥ 4M GdnSCN* mindestens 30 min; 20°C	H ₂ O ₂
Dampfsterilisation	Phenole
	Iodophore
	HCl
	Trockene Hitze
	UV-Strahlung
	Ionisierende Strahlung

*Auf die Notwendigkeit einer sorgfältigen Nachspülung zur Entfernung schädlicher Rückstände wird ausdrücklich hingewiesen

Tabelle 4: Wirksamkeit verschiedener bei der Aufbereitung von Medizinprodukten eingesetzter Verfahren zur Dekontamination von Instrumenten bzw. Inaktivierung von Prionen (Robert-Koch-Institut 2002)

1.11 Entwicklung neuer Verfahren zur Priondekontamination

In den letzten Jahren wurden eine ganze Reihe von Verfahren zur Priondekontamination entwickelt und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht (Baier *et al.* 2004; Fichet *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2004; McLeod *et al.* 2004; Race und Raymond 2004; Whittaker *et al.* 2004; Baxter *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2005; Paspaltsis *et al.* 2006; Riemer *et al.* 2006; Solassol *et al.* 2006). Die Kontrolle der Prionwirksamkeit erfolgte dabei durch ganz unterschiedliche Verfahren, wie Mikroskopie, Westernblot oder Tierversuch. Die unterschiedliche Methodik macht dabei einen Vergleich der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Studien praktisch unmöglich. Außerdem sind viele der untersuchten Substanzen und Verfahren zwar prionwirksam, ihre Anwendung in der Aufbereitungsroutine aber nicht so einfach möglich, da dafür entweder neue, teure Geräte notwendig wären, der Arbeitsaufwand bei deren Einsatz zu hoch wäre, oder die Substanzen problematisch in Gebrauch und Entsorgung sind.

Deswegen hat das RKI 2004 Anforderungen an geeignete Aufbereitungsverfahren zur Prävention der Prionübertragung formuliert (Robert-Koch-Institut 2004). Demnach sollte

ein neues Verfahren möglichst maschinell ablaufen, um gleichbleibende Reinigungsergebnisse zu ermöglichen. Es sollte außerdem universell einsetzbar sein, eine gute Materialverträglichkeit aufweisen, wirtschaftlich sein, Kreuzkontaminationen vermeiden und ökologisch, sowie toxikologisch unbedenklich sein.

Außerdem schlägt das RKI ein einheitliches Vorgehen bei der Wirksamkeitsprüfung neuer Verfahren vor. Diese soll in einem zweistufigen Verfahren erfolgen. In der ersten Stufe erfolgt der Wirksamkeitsnachweis in Suspension, in der zweiten Stufe an Oberflächen (Robert-Koch-Institut 2004) (Tabelle 5).

Der Suspensionstest soll dabei in zwei Stufen erfolgen. Zuerst (Stufe 1a) soll die Wirksamkeit qualitativ *in vitro*, z.B. mittels Westernblot, bestätigt werden. Die Stufe 1a ist erfolgreich verlaufen, wenn sich nach Behandlung der Suspension mit dem zu testenden Verfahren kein PrP^{Sc} mehr mittels geeigneter Methode (z.B. Westernblot) nachweisen lässt. Die Austestung in der Stufe 1a kann alternativ auch mit geeignetem Testverfahren (z.B. Westernblot) auf Oberflächen von Prüfkörpern erfolgen. Im nächsten Schritt (Stufe 1b) erfolgt dann eine quantitative Auswertung der Priondekontamination in Suspension mittels geeigneten Indikatortieren. Diesen werden die mit dem zu testenden Verfahren behandelte Suspension intrazerebral verabreicht. Die Stufe 1b gilt als erfolgreich bestanden, wenn durch das getestete Verfahren eine Abreicherung der Prionen um mindestens 4 log-Stufen erreicht wurde. Außerdem müssen die Indikatortiere die doppelte Inkubationszeit einer Kontrollgruppe, die unbehandelte PrP^{Sc}-Suspension erhalten hat, symptomfrei bleiben. Nach Ablauf dieser Zeit darf im Gehirn der Tiere kein PrP^{Sc} nachweisbar sein. Verfahren, die die Stufe 1 des Wirksamkeitsnachweises bestanden haben werden als „Prion-inaktivierend“ bezeichnet.

In der Stufe 2 der Testung erfolgt der endgültige Wirksamkeitsnachweis an Oberflächen von geeigneten Prüfkörpern (z.B. von Metalldrähten). Zu diesem Zweck werden diese mit Prionen kontaminiert und dann dem zu testenden Verfahren zugeführt. Die so behandelten Oberflächen werden dann in geeignete Indikatortiere intrazerebral implantiert. Die Stufe 2 ist bestanden, wenn die Versuchstiere nach der doppelten Inkubationszeit einer Kontrollgruppe, weder Symptome einer Prionerkrankung zeigen, noch PrP^{Sc} in ihren Gehirnen nachweisbar ist. Die Kontrollgruppe besteht dabei aus Tieren, die prionkontaminierte Prüfkörper implantiert bekommen haben, die zuvor keinem Dekontaminationsverfahren zugeführt wurden. Verfahren, die zusätzlich zur Stufe 1 auch Stufe 2 bestanden haben, werden als „Prion-dekontaminierend“ bezeichnet.

Phase 1 –Prüfung der Wirksamkeit in Suspension		Phase 2 –Prüfung der Wirksamkeit auf Oberflächen
Phase 1a	Phase 1b	
Vorprüfung von Verfahren <i>in vitro</i> im qualitativen Suspensionstest	Quantitativer Suspensionstest	Quantitativer Carrier-Test
Auswertung z.B. mittels Westernblot	Auswertung im Tierversuch	Auswertung im Tierversuch
Basistest, keine Deklaration	Deklaration als „Prion-inaktivierend“	In Verbindung mit bestandener Phase 1 Deklaration als „Prion-dekontaminierend“

Tabelle 5: Phasen der Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination nach den Empfehlungen des RKI (Robert-Koch-Institut 2004)

1.12 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein standardisiertes Vorgehen zur Evaluierung maschineller Dekontaminationsverfahren für oberflächengebundene Prionen zu erarbeiten.

Im Gegensatz zu dem vom Robert-Koch-Institut empfohlenen Vorgehen soll dabei ausschließlich eine Überprüfung der Dekontaminationsleistung auf Oberflächen geeigneter Prüfkörper erfolgen, die dem gesamten Dekontaminationsprozess ausgesetzt werden können. Dadurch soll ermöglicht werden, bei der Bewertung der Wirksamkeit eines Prionedekontaminationsverfahrens von Beginn an den Gesamtprozess, der sich durch das Zusammenspiel der physikalischen Faktoren, wie mechanischer Reinigung und Temperatur, mit den eingesetzten Chemikalien auszeichnet, zu beurteilen.

Im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung soll zuerst eine *in vitro*-Testung durchgeführt werden, bevor die endgültige Bestätigung der Wirksamkeit der Prionedekontamination *in vivo* erfolgt. Zu diesem Zweck sollen verschiedene *in vitro*- und *in vivo*- Tests für oberflächengebundene Prionen erarbeitet und auf ihre Leistungsfähigkeit hin untersucht werden.

Mit Hilfe des erarbeiteten Vorgehens zur Evaluierung maschineller Dekontaminationsverfahren soll ein speziell zur Prioninaktivierung entwickeltes vollautomatisches Verfahren zur Prionedekontamination überprüft werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid 30%	Bio-Rad
Ameisensäure	Merck
Aceton	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Borsäure	Merck
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
BSA	SIGMA-Aldrich
Desoxycholol (DOC)	SIGMA-Aldrich
EDTA	SIGMA-Aldrich
Eosin	Chroma
Ethanol	Merck
Glycin	Roth
Hämalaun	Fluca
N-Laurylsarcosin-Na (Sarcosyl)	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SIGMA-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PBS	SIGMA-Aldrich
Saccharose	Roth, Karlsruhe
TEMED	SIGMA-Aldrich
Trichlorazetat (TCA)	Fluca
Tris	SIGMA-Aldrich
Triton-X-100	Roth
Tween 20	Roth

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), SIGMA-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Enzyme, Enzyminhibitoren, Antikörper, Proteingrößenstandards und Kits

4H11 monoklonaler Maus-Antikörper	Institut für Virologie der TU München, Prof. Dr. H. Schätzl
CDC1 Antikörper polyklonal	eigene Herstellung am ZNP
Antikörper Ziege-Anti-Mouse, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Amersham Biosciences
GFAP-Antikörper (polyklonal vom Kaninchen)	Dako
Antikörper Schwein-Anti-Kaninchen, biotinyliert	Dako
Mini-Complete-Proteaseinhibitor	Roche
PMSF Proteaseinhibitor	SIGMA-Aldrich
PefablocSC Proteaseinhibitor	Pentapharm
Magic-Mark Proteingrößenstandard	Invitrogen
PageRuler Proteingrößenstandard	Fermentas
Proteinase-K (PK)	Merck
Heparinisiertes Schafsblut und Protamin	ACILA
ECL-Kit, ECL-Plus-Kit	Amersham Biosciences
Mycoplasmendetektionskit	AppliChem
iVIEW DAB-Detektionskit	Ventana

2.3 Lösungen für Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose	Gibco
Penicillin, Streptomycin und Glutamat	Invitrogen
fötales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech
HANKS-Balanced Salts	Invitrogen
Trypsin	Pan Biotech

2.4 Medikamente und Nahrung für die Arbeit mit Versuchstieren

Diethylether	Merck
Sedaxylan	WDT
NaCl	WDT
Haltungsfutter V1536	Ssniff
Ketamin	WDT
Vetranquil	WDT

2.5 Reinigungsmittel zum Betrieb des Reinigungs- und Desinfektionsgerätes (RDG)

Reinigungsmittel	Hersteller	Inhaltsstoffe
Neodisher FM	Chemische Fabrik Dr. Weigert	Natriumhydroxid Nitrilotriacetat; Natriumsalz amphotherer Tenside
Neodisher D 20	Chemische Fabrik Dr. Weigert	Natriumhypochlorid (> 5%) Natrium- und Kaliummetasilicate Kaliumhydroxid
Sekumatic FR	Ecolab GmbH & Co.	Natriumphosphate Kaliumhydroxid Natrium- und Kaliumsilikate
Sekumatic FNZ	Ecolab GmbH & Co.	Zitronensäure
Sekumatic Oxivario	Ecolab GmbH & Co.	Wasserstoffperoxid (> 30%)

2.6 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen (2 ml) für Zellen	Nunc
Homogenisatorgefäße 2ml mit Keramikugeln	Preqlab
Kulturschalen für adhärent wachsende Zellen	Nunc
Luer Lock-Kanülen (0,5 x 4 mm)	HERO
Metallnetze, rostfreier Edelstahl (Dicke 0,05 mm, Maschenweite 0.9 x 0.9 mm, DIN 143-01)	Bückmann
Pipetten 2,5; 5; 10; 25 ml	Sarstedt
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Immobilon-P	
Transfer-Membran	Millipore
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 + 50 ml	Sarstedt
Röntgenfilme Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Stahldraht monofil, USP 4/0	Catgut GmbH
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schüll

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen VWR (Ismaning), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.7 Geräte

Autoklav	Holzner
Blot-Apparatur Semiphor Transphor	Amersham Biosciences
Brutschrank	Kendro/Heraeus
<i>Chemigenius² Bioimaging System</i>	Syngene
Einbettautomat Hypercenter XP	Shandon
Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte
Färbeautomat Benchmark	Ventana
Gelapparaturen	BioRad, Höfer
<i>GeneTools Software</i>	Syngene
Homogenisator Precellys24	Peqlab
Isopropanol-Gefriergefäß	Nunc
Mikroskop IX 50	Olympus
Mikrotom SM 2000R	Leica
Neubauer-Kammer	VWR
Reinigungs- und Desinfektionsgerät Typ G7835CD	Miele
Röntgenkassette	Kodak
Spectrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Biosciences
stereotaktischen Rahmen für Kleintiere	Narishige Stereotactic Instr.
Sterilwerkbank	Kendro/Heraeus
Stickstofftank	Air Liquide
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman

2.8 Zellen und Versuchstiere

Neuro-2A (N2a-) Zellen	American Type Culture Collection, Rockville, USA
Tga-20 Mäuse	eigene Zucht, Tiere ursprünglich von C. Weissmann erhalten (Fischer <i>et al.</i> 1996)
C57BL/6-Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld
PrP ^{0/0} -Mäuse	eigene Zucht, Tiere ursprünglich von C. Weissmann erhalten (Bueler <i>et al.</i> 1992)

2.9 Verwendeter Prionstamm

22L-Prionstamm	TSE Resource Centre Institute for Animal Health Compton, Newbury, Berkshire, RG20 7NN, England
----------------	--

2.10 Lösungen und Puffer

10 % APS

0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H₂O

Blocking-Puffer

1 x PBS; 5 % (w/v) Milchpulver; 0,1 % (v/v) Tween 20

Blotting-Puffer

25 mM Tris (pH 8,5) ; 192 mM Glycin ; 10 % (v/v) Methanol

Laufpuffer (SDS-PAGE)

25 mM Tris (pH 8,2) ; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

1x Lysispuffer (zur Proteinpräparation von Zellen)

10 mM Tris (pH 7,5); 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 0,5 % (w/v) DOC (Desoxycholat)

2x Lysispuffer (zur Proteinpräparation von Milz und Gehirn)

20 mM Tris (pH 7,5); 200 mM NaCl; 20 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) DOC (Desoxycholat)

PBS

171 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄

PBS-Tween

PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20

5 x Proteinprobenpuffer

50mM Tris (pH 6,8) ; 40 % (w/v) Saccarose; 20 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgel (SDS-PAGE)

5 % Acrylamid, 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8); 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 0,1 % (w/v) APS und 0,07 % (v/v) TEMED

1 x Stripping-Puffer für Nitrozellulose-Membranen

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7); 2,0 % (w/v) SDS; 0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol

TNE-Puffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA

Trenngel (SDS-PAGE)

12,5 % Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS),
0,05 % (w/v) APS, 0,035 % (v/v) TEMED

3 Methoden

3.1 Arbeit mit eukaryontischen Zellen

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Die adhärent wachsenden N2a-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die wasserdampfgesättigte Atmosphäre hatte einen CO₂-Gehalt von 5%. Es wurden Zellkulturschalen aus Kunststoff verwendet, deren Boden eine Beschichtung für adhärent wachsende Zellen aufwies. Je nach Verwendungszweck hatten die Schalen eine Grundfläche von ca. 0,33 cm² - 57 cm². Im Normalfall wurden die Zellen in 57cm²-Schalen kultiviert. Kleinere Schalen von 0,33 cm² beziehungsweise 1,9 cm² Grundfläche wurden zur Einzelzellklonierung und Infektion der Zellen benutzt.

Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose von Gibco. Diesem wurde 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt, welches zuvor für 1h bei 56°C inaktiviert wurde. Außerdem wurden 1% 200 mM Glutamin, 1% 100 mg/ml Streptomycin und 1% 100 U/ml Penicillin zugegeben.

Die Zellen wurden täglich mit Hilfe eines Mikroskops kontrolliert. Dabei wurde insbesondere auf den Allgemeinzustand der Zellen, die Dichte der Zellkultur und eventuelle mikrobiologische Kontaminationen geachtet. Das Nährmedium wurde bei Bedarf (Umschlag des enthaltenen Farbindikators) oder mindestens ein Mal pro Woche durch frisches ersetzt.

Wenn die Zellen den Boden der Schale vollständig bedeckten, wurden sie auf eine neue umgesetzt. Dazu wurde das Nährmedium von den Zellen abgenommen und diese mit HANKS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des HANKS-Puffers wurde 1 ml 1x-Trypsin auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken der Schale auf deren Boden verteilt. Nachdem die Zellen zusammen mit dem Trypsin für 3 Minuten bei 37°C inkubiert wurden, lösten sie sich vom Schalenboden und konnten vorsichtig in 9 ml Nährmedium suspendiert werden. Durch das im zugefügten Nährmedium enthaltene FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Von den so suspendierten Zellen wurden 10% auf der neuen Schale mit frischem Nährmedium ausgesät und die restlichen 90% verworfen.

Die Zellen wurden regelmäßig auf einen Befall mit Mycoplasmen getestet. Dies erfolgte mit Hilfe eines Mycoplasmen-Detektions-Kits nach Anweisung des Herstellers. Infizierte Zellpopulationen wurden entsorgt.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

3.1.2.1 Einfrieren von Zellen

Um bestimmte Zellpopulationen für spätere Versuche unverändert aufzubewahren, ist es möglich, diese einzufrieren und bei Bedarf wieder aufzutauen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen auf einer 57 cm²-Schale ausgesät und dort kultiviert, bis sie etwa 80% des Schalenbodens bedeckten. Dann wurden die Zellen mit Hilfe von 1 ml 1x-Trypsin vom Schalenboden abgelöst (siehe Kapitel 3.1.1) und in 9 ml eines zuvor angesetzten Kryomediums (40% FCS, 50% Nährmedium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel) suspendiert.

Die Zellsuspension wurde daraufhin auf sechs 2ml-Kryoröhrchen verteilt und langsam mit Hilfe eines Isopropanol-Gefriergefäßes auf -80°C abgekühlt. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

3.1.2.2 Auftauen von Zellen

Die aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Kryoröhrchen wurden zügig auf 37°C erwärmt. Um das DMSO aus dem Kryomedium von den Zellen zu entfernen, wurde ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Nährmedium gefüllt und mit der aufgetauten Zellsuspension überschichtet. Bei 150 x g wurden die Zellen abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit 10 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einer 57 cm²-Kulturschale ausgesät und in den Brutschrank überführt. Um möglichst alles DMSO aus der Kultur zu entfernen, wurde nach 24h das Nährmedium gewechselt.

Nach Kultivierung für die Dauer von mindestens einer Passage konnten die aufgetauten Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

3.1.3 Einzelzellklonierung mittels Endpunkttitration

Zur Herstellung von Kulturen aus einem Zellklon der verwendeten N2a-Zellen wurde das Verfahren der Endpunkttitration verwendet. Dabei werden die Zellen in einer Verdünnungsreihe ausgesät, bis eine Verdünnung erreicht ist, bei der nur eine einzelne Zelle in eine Kulturschale eingebracht wird. Die dort wachsende Zellpopulation entstammt der einen Zelle, ist also klonalen Ursprungs.

Die Zellen der Ausgangskultur wurden zu diesem Zweck mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Kulturschale abgelöst (siehe Kapitel 3.1.1) und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Konzentration der Zellen wurde auf 2×10^4 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 12x 100 µl (entspricht einer durchschnittlichen Menge von 2×10^3 Zellen) in die erste Lochreihe einer 96-Well-Zellkulturplatte (0,33 cm² Grundfläche

je Well) pipettiert. Die restlichen Löcher der Schale wurden mit jeweils 100 µl Nährmedium befüllt. Dann wurde die Suspension der ersten Lochreihe jeweils schrittweise um den Faktor 5 von Reihe zu Reihe hin verdünnt, so dass die einzelnen Lochreihen am Schluss absteigend mit jeweils durchschnittlich 2000, 400, 80, 16, 3,2, 0,64, 0,13 und 0,03 Zellen beschickt wurden.

Nach etwa 2-3 Wochen war es möglich, unter dem Mikroskop Zellkolonien zu erkennen, die jeweils einer ausgesäten Zelle entstammten. Daraufhin wurden die Löcher identifiziert, in denen nur eine einzelne Kolonie heranwuchs und der Inhalt der anderen Löcher verworfen. Die auf diese Weise erhaltenen Zellkolonien wurde weiter kultiviert und unter Zuhilfenahme immer größerer Kulturschalen expandiert, bis die Zellen nach etwa 4 bis 6 Wochen den Boden einer 57 cm²-Schale zu 80% bedeckten. Dann wurden die Zellen für spätere Versuche eingefroren.

3.1.4 Infektion von Zellen

3.1.4.1 Infektion von Zellen mittels Hirnhomogenat

Um N2a-Zellen mittels Hirnhomogenat terminal an Scrapie erkrankter Mäuse mit Prionen zu infizieren, wurden sie in Kulturschalen mit einer Bodenfläche von 1,9 cm² ausgesät und kultiviert, bis sie den Boden zu etwa 90% bedeckten. Zur Infektion wurde das Nährmedium abgenommen und durch Medium mit 1% Hirnhomogenat ersetzt. Dieses wurde zuvor angesetzt, indem 9 Teile Nährmedium mit 1 Teil 10% Hirnhomogenat vermischt wurden. Nach 24 Std. wurde das Nährmedium-/Hirnhomogenat-Gemisch von den Zellen abgenommen und durch normales Nährmedium ersetzt. Nachdem sich die Zellen erholt hatten und den Boden der 1,9 cm²-Schale vollständig bedeckten, wurden sie über eine 9,6 cm²- auf eine 57 cm²-Kulturschale expandiert. Auf diesen wurden die Zellen kultiviert, bis nach mehreren Passagen der Nachweis einer Scrapieinfektion mittels Westernblot durchgeführt werden konnte.

3.1.4.2 Infektion von Zellen über metallgebundene Prionen

Zur Infektion von Zellen mittels oberflächengebundenen Prionen wurden feine Metallnetze aus rostfreiem Normstahl (Dicke 0.05 mm, Maschenweite 0.9 x 0.9 mm, DIN 143-01) benutzt.

Die zugeschnittenen (10x11 Kästchen) Metallnetze wurden, bevor sie mit Hirnhomogenat in Kontakt gebracht wurden, für 5 min in 96% Ethanol gereinigt und dann bei Raumtemperatur unter der Sterilwerkbank getrocknet. Um die getrockneten Netze mit Prionen zu kontaminieren wurden sie für 10 min in 10% Hirnhomogenat terminal an Scrapie erkrankter Mäuse inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Netze mit einer

Pinzette bewegt, um eine gleichmäßige Benetzung zu gewährleisten. Um anhaftende Gewebeteile des Hirnhomogenats zu entfernen, wurden die Netze danach erst mehrfach in sterilem PBS gewaschen und dann drei Mal in einem jeweils neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml sterilem PBS für jeweils 3 min gevortext. Nach diesen Reinigungsschritten wurden die optisch, sowie mikroskopisch sauberen Netze jeweils auf den Boden einer 1,9 cm²-Kulturschale eingebracht und mit 1 ml Nährmedium überschichtet. Daraufhin wurden 200 µl einer Suspension der zu infizierenden Zellen (ca. 800000 Zellen/ml) in die jeweilige Schale einpipettiert und mit Hilfe der Pipette verteilt. Da nicht alle eingebrachten Zellen direkt auf dem Metallnetz, sondern oftmals auf dem Plattenboden zwischen den Maschen anwuchsen, wurden die Netze nach 2 Tagen mit Hilfe einer sterilen Pinzette in eine neue Kulturschale überführt. Auf diese Weise wurde sicher gestellt, dass überwiegend die Zellen weiterkultiviert wurden, die direkten Kontakt mit den Metallnetzen hatten. Sieben Tage nach Aussaat wuchsen die Zellen in dichten Kolonien an den Metallnetzen, woraufhin sie in einer neuen 1,9 cm²-Kulturschale, mit Hilfe von Trypsin, von den Netzen abgelöst wurden. Zu diesem Zweck wurden die Netze in die neue Schale, die mit 200 µl 1x Trypsin gefüllt war, eingebracht und im Brutschrank bei 37°C für 5 min inkubiert. Durch Schütteln der Kulturschale auf einem Vortexer wurden die Zellen von den Metallnetzen entfernt. Die Netze wurden daraufhin verworfen und die Schale mit 1,5 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Die Zellen wurden weiter kultiviert und über eine 9,6 cm²- auf eine 57 cm²-Kulturschale expandiert. Dort wurden die Zellen kultiviert, bis nach mehreren Passagen der Nachweis einer Infektion mittels Westernblot durchgeführt werden konnte.

3.2 Arbeit mit Versuchstieren

3.2.1 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF-Bedingungen), mit geschlossenem Barriersystem (Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Überdruckbelüftung), gehalten und gezüchtet. Die Käfige wurden einmal pro Woche mit 80°C heißem Wasser gewaschen und anschließend mit 134°C für 2h autoklaviert. Die Haltung der Mäuse erfolgte in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen (Typ M II, verlängert) mit max. 5 Tieren pro Käfig. Die Fütterung der Tiere erfolgt ad libitum mit Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536). Wasser (mit Phosphorsäure angesäuert und steril filtriert) stand den Tieren aus Tränkenflaschen unbegrenzt zur Verfügung.

3.2.2 Infektion von Mäusen mit Prionen

3.2.2.1 Infektion mittels intrazerebraler Inokulation von Hirnhomogenat

Die Infektion von Mäusen mit Prionen erfolgte durch direkte Einspritzung von Hirnhomogenat von terminal an Scrapie erkrankten Mäusen in das Gehirn der Tiere. Dazu wurden die Tiere mit Äther (Einleitkonzentration 15-20%) für die Dauer von etwa 2 Minuten narkotisiert. Daraufhin wurde eine Luer Lock-Kanüle (0,6 x 4 mm) im Bereich der Fontanellen auf Höhe des Frontalkortex durch die Schädeldecke eingeführt. Über die eingebrachte Kanüle wurden dann 30 µl eines 10% Hirnhomogenats eingespritzt.

3.2.2.2 Infektion durch intrazerebrale Implantation prionkontaminierter Metalldrähte

Die Infektion von Mäusen über oberflächengebundene Prionen erfolgte durch die Implantation von prionkontaminierten Metalldrähten in das Gehirn der 6-8 Wochen alten Tiere. Zu diesem Zweck wurden monofile Metalldrähte von 0,15 mm Durchmesser und 3 mm Länge für die Dauer von 14 Stunden in 10% Hirnhomogenat von terminal an Scrapie erkrankten Mäusen inkubiert. Dann wurden die kontaminierten Drähte gründlich gewaschen, indem sie drei Mal in jeweils frischem, sterilem PBS gevortext wurden. Nach dieser Behandlung wurden die Metalldrähte bei Raumtemperatur für 2 Stunden getrocknet.

Die stereotaktische Implantation der kontaminierten Drähte erfolgte in die Basalganglien der rechten Großhirnhemisphäre der Versuchstiere. Dazu wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Narkose für ca. 45 min anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen für Kleintiere in flacher Kopf-Position fixiert. Zur Narkose wurde eine Mischung aus 0,39 ml Sedaxylan (20 mg/ml), 0,39 ml Ketamin 10 % (115 mg /ml), 0,12 ml Vetranquil 1 % (13,56 mg/ml) und 2,10 ml NaCl 0,09% in einer Dosis von 0,15 ml/30g Maus verwendet.

Nach Narkoseeinleitung erfolgten die weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen. Durch eine mediane Inzision der Kopfhaut wurde zunächst die Schädeldecke freipräpariert. Auf dieser erfolgte die Lokalisation des Bregmas. 2 mm rechts-lateral und 1,5 mm rostral von diesem wurde dann eine Trepanation der Kalotte über dem stereotaktischen Zielgebiet mittels eines Feinbohrers (Durchmesser <1,5 mm) durchgeführt. Daraufhin wurde der kontaminierte Metalldraht mit Hilfe einer Pinzette senkrecht durch das Bohrloch ins Gehirn eingeführt und durch Druck mit der geschlossenen Pinzette auf das Drahtende vollständig in diesem versenkt. Nach der Implantation des Drahts wurden die Wundränder adaptiert

und mit Einzelknopfnähten wieder verschlossen. Die so eingebrachten Metalldrähte verblieben dauerhaft im Versuchstier.

3.2.3 Monitoring der Versuchstiere

Die infizierten Versuchstiere wurden täglich untersucht, wobei insbesondere auf das Auftreten von scrapiespezifischen Symptomen geachtet wurde.

Nach der Infektion, durch intrazerebrale Injektion von Hirnhomogenat oder Implantation von kontaminierten Metalldrähten, erholten sich die Tiere innerhalb von 1-2 Tagen und zeigten in der darauffolgenden Inkubationsperiode der Scrapieinfektion keine klinisch feststellbaren Belastungssymptome oder neurologische Auffälligkeiten.

Das terminale Stadium der Prionerkrankung der Mäuse ist klinisch durch das Auftreten von Ataxie, Tremor, Schwierigkeit beim Umdrehen aus der Rückenlagenlage und Rigor im Schwanz gekennzeichnet. Traten bei einem Tier zwei der vier genannten Symptome auf und blieben diese für drei Tage bestehen, so wurde das Tier als terminal erkrankt eingestuft und getötet.

3.2.4 Präparation der Versuchstiere

3.2.4.1 Tötung der Tiere und Organentnahme

Terminal an Scrapie erkrankte Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Dann erfolgte eine sofortige Entnahme des Gehirns und gegebenenfalls der Milz zur weiteren Untersuchung.

Zur Entnahme des Gehirns wurde der Kopf der getöteten Tiere vom Rumpf abgetrennt, die Schädelkalotte freipräpariert und der Schädel mit Hilfe einer feinen Schere eröffnet. Das freiliegende Gehirn wurde dann mit Hilfe einer feinen Pinzette stumpf mobilisiert und entnommen. Die Milz wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle mit Hilfe einer feinen Schere herauspräpariert.

Die entnommenen Organe wurden entweder für eine histologische Untersuchung sofort in 4% Paraformaldehyd (PFA) verbracht, oder für eine spätere Westernblot Analyse bei -80°C eingefroren.

3.2.4.2 Histologische Aufarbeitung der Organe

Nach Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 7 Tage wurden die Organe für 1h bei Raumtemperatur in konzentrierter Ameisensäure (96-98%) dekontaminiert. Danach wurden die Organe für 1h in Wasser gespült und für 3-4 Tage in 4% PFA nachfixiert.

Die Einbettung der fixierten und dekontaminierten Gewebe erfolgte in einem Einbettautomaten. In diesem wurden die Präparate zuerst in aufsteigender Ethanolreihe (50%, 12 Std. - 60%, 12 Std. - 70%, 24 Std. - 96%, 48 Std. -100%, 36 Std.) entwässert.

Nach anschließender Inkubation in Azeton für 9 Stunden wurden die Organe in flüssigem Paraphin getränkt. Die so behandelten Organe konnten dann in Paraphinblöcke eingegossen und mit einem Mikrotom in 3-4 µm dicke Schnitte geschnitten werden. Diese wurden über Nacht auf einem Objektträger bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

Um die Schnitte anzufärben wurden sie zuvor in Xylol entparaffiniert (2x 20 min) und in absteigender Ethanolreihe (100% – 96% - 70% - Aqua dest.; für jeweils 5 min) gewässert. Für jedes Organ wurde ein Schnitt HE-gefärbt, um eine morphologische Übersicht zu erhalten und einer immunhistochemisch für PrP^{Sc} angefärbt, um eventuelle Prionablagerungen nachweisen zu können. Gehirnschnitte wurden zusätzlich immunhistochemisch für GFAP angefärbt, welches ein Marker für die Gliose ist.

Um eine HE-Färbung durchzuführen, wurden die gewässerten Schnitte für 5 min in Hämalaun angefärbt. Vor der Gegenfärbung wurden sie für 10 min in warmem Wasser und dann kurz in 70% Ethanol inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte durch Eosin für die Dauer von 2 min.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in einem Benchmark Färbeautomaten von Ventana durchgeführt.

Die Detektion von GFAP erfolgte mit einem polyklonalen GFAP-Antikörper vom Kaninchen, welcher für 30 min in einer Verdünnung von 1:4000 auf den gewässerten Schnitt aufgebracht wurde. Nach Detektion des Erstantikörpers mit Hilfe eines biotinierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörpers vom Schwein in der Verdünnung von 1:150 für 30 min erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe des iVIEW DAB-Detektionskits. Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung erfolgte noch eine Gegenfärbung mit Hämalaun, um die Zellkerne darzustellen.

Zur Durchführung einer PrP^{Sc}-Färbung wurden die Schnitte vor Zugabe des Erstantikörpers für 30 min in 0,2 M Borsäure bei 61°C denaturiert. Dann erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun, welche durchgeführt wurde um die Zellkerne vor dem folgenden Verdau mit Proteinase K zu stabilisieren. Der Verdau mit 100 µg/ml Proteinase K erfolgte für 30 min bei 37°C. Erst nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Detektion von PrP^{Sc} durch Zugabe des polyklonalen CDC1 Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 für 30 min. Diese war gefolgt von einer Detektion des Erstantikörpers durch einen Zweitantikörper mit anschließender Farbreaktion und Gegenfärbung, wie bei der GFAP-Färbung beschrieben.

Nach Durchführung der Färbungen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol für jeweils 5 min, gefolgt von kurzer Inkubation in Xylol) entwässert und in Deckharz eingebettet.

3.2.4.3 Herstellung von 10%igem Hirnhomogenat

Die Herstellung des Hirnhomogenates aus den entnommenen Gehirnen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden. Um das Homogenat herzustellen, wurden die Gehirne gewogen und mit der 1,5-fachen Masse an sterilem PBS zusammen in ein Homogenisatorgefäß gegeben. Nachdem die Gehirne zusammen mit dem PBS ein gleichmäßiges, 40%iges Homogenat ergaben, wurde es in sterilem PBS verdünnt, um ein 10%iges Hirnhomogenat zu erhalten. Dieses wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C für spätere Versuche und Untersuchungen eingefroren.

3.3 Methoden zur Proteinanalyse

3.3.1 Präparation der zu untersuchenden Zellen und Gewebe

3.3.1.1 Herstellung von Zellysat zur Proteinanalyse

Zur Herstellung eines Lysates zur Proteinanalyse wurden die Zellen auf einer 57 cm²-Kulturschale kultiviert, bis sie deren Boden vollständig bedeckten. Dann wurden sie zwei Mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgenommen wurde, wurde 1 ml Lysispuffer zugegeben und durch leichtes Schwenken der Schale verteilt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis hatten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst und das Lysat konnte mit der Pipette in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt werden. Die enthaltenen unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 14000 U/min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde für die Proteinanalyse verwendet.

3.3.1.2 Präparation von Milz- und Gehirngewebe zur Proteinanalyse

Um eine Proteinanalyse von Milz- und Hirngewebe der Versuchstiere durchzuführen, wurden die zu untersuchenden Organe homogenisiert. Dazu wurden die Gewebeproben gewogen und mit der 1,5-fachen Masse an PBS zusammen in ein Homogenisatorröhrchen gegeben. Das entstehende 40%ige Homogenat wurde daraufhin mit der gleichen Menge PBS auf 20% verdünnt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an 2 x Lysispuffer wurde das 10%ige Lysat bei 14000 U/min in der Tischzentrifuge für 3 min zentrifugiert, um die unlöslichen Organbestandteile abzutrennen. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde für die folgende Proteinanalyse verwendet.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat

Die Proteinkonzentration der Zell- und Gewebelysate wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt. Dieser Methode liegt die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine im saurem Milieu zugrunde. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm ohne Protein nach 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford 1976).

Durchgeführt wurde der Test, indem 1 µl des zu analysierenden Lysates mit 200 µl Bradford-Reagenz und 799 µl H₂O vermischt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgte die photometrische Messung der Absorption gegen den Leerwert (1 µl Lösungsmittel + 200 µl Bradford-Reagenz + 799 µl H₂O) bei 595 nm in einem Spectrophotometer.

Die gemessenen Extinktionen wurden anschließend anhand einer Eichkurve aus definierten BSA-Konzentrationen auf die Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.3.3 Konzentrierung der Proteine durch Fällung der Lysate

3.3.3.1 Methanolfällung

Zur Konzentrierung der Proteine eines Lysates wurden diese ausgefällt und anschließend in einer geringeren Menge Puffer resuspendiert.

Zur Ausfällung der Proteine mittels Methanol wurde das zu fällende Lysat mit mindestens der vierfachen Menge eiskalten Methanols vermischt und für eine Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach Verdunstung des verbliebenen Methanolrestes wurde das Proteinpellet sorgfältig in der gewünschten Menge TNE-Puffer suspendiert.

3.3.3.2 Trichlorazetatfällung

Als weitere Möglichkeit der Proteinfällung wurden die Lysate mit 12-15% Trichlorazetat (TCA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Protein konnte daraufhin abzentrifugiert werden (30-45 min, 14.000 rpm in Kühlzentrifuge bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet vom TCA befreit, indem es zwei Mal in jeweils frischem Aceton suspendiert und dann wieder abzentrifugiert wurde (15 min; 14.000 rpm in Kühlzentrifuge bei 4°C). Nach Verwerfen des Azeton-Überstandes wurden die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet und dann in der gewünschten Menge TNE-Puffer suspendiert.

3.3.4 Methoden zur Präparation von PrP^{Sc} im Lysat

Da PrP^C und PrP^{Sc} einer Spezies die gleiche Primärstruktur besitzen, ist es nicht möglich beide Isoformen unter denaturierenden Bedingungen, wie etwa beim Westernblot, zu unterscheiden. Aus diesem Grund ist es nötig, beide Isoformen vor der Denaturierung über ihre physikalisch/chemischen Eigenschaften zu trennen.

3.3.4.1 Trennung von PrP^C und PrP^{Sc} über deren Löslichkeit

Zur Trennung von PrP^{Sc} von PrP^C im Lysat kann man sich der Unlöslichkeit von PrP^{Sc} in Anwesenheit von Detergenzien bedienen. Diese tritt sehr früh nach der Infektion von Organismen mit Prionen auf. Die Trennung von PrP^C und PrP^{Sc} über die Unlöslichkeit von PrP^{Sc} eignet sich deswegen zum früheren Nachweis einer Prioninfektion.

Dazu wurde das Lysat, mit 1% Sarcosyl und Proteaseinhibitoren (Dosierung nach Angaben des Herstellers) versetzt. Durch Ultrazentrifugation (1 Stunde zentrifugieren bei 100000 x g und 4°C) wurde PrP^{Sc} präzipitiert, während PrP^C in Lösung blieb. Nach Verwerfen des Überstandes, mit dem darin enthaltenen PrP^C, wurde das entstandene Pellet in TNE-Puffer resuspendiert und stand einer Untersuchung mittels Westernblot zur Verfügung.

3.3.4.2 Trennung von PrP^C und PrP^{Sc} über deren unterschiedliche Proteaseresistenz

Eine weitere Eigenschaft, mit deren Hilfe man PrP^{Sc} von PrP^C trennen kann, ist die unterschiedliche Resistenz beider Formen gegenüber einem limitierten Verdau durch Proteasen. Fügt man zu einer Präparation, die PrP^C und PrP^{Sc} enthält, Proteinase K zu, so wird PrP^C vollständig verdaut, während das partiell proteaseresistente PrP^{Sc} erhalten bleibt. Die Proteaseresistenz ist eine Eigenschaft, die PrP^{Sc} erst einige Zeit nach der Unlöslichkeit entwickelt. Der Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} eignet sich deshalb zum Nachweis einer fortgeschrittenen Prioninfektion.

Zur Durchführung eines Proteaseverdaus wurde dem Lysat Proteinase K in einer Konzentration von 10 µg/ml für den Infektionsnachweis von Zellen, bzw. 100 µg/ml für den PrP^{Sc}-Nachweis in Gewebe von Mäusen, zugefügt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min beim Verdau von Zellkulturpräparationen bzw. 1h bei Präparation von Mausgewebe, wurde der Verdau durch Zugabe eines Proteaseinhibitors (Dosierung nach Angaben des Herstellers) unterbrochen.

Gegebenenfalls wurden die so behandelten Lysate bei geringer Proteinkonzentration einer Proteinfällung (siehe Kapitel 3.3.3) unterzogen, um die Proteine danach in geringerer Menge TNE-Puffer zu resuspendieren. Das Lysat, bzw. das gefällte Lysat wurde dann mittels Westernblot auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} hin untersucht.

3.3.5 Elektrophoretische Proteinauftrennung im SDS-Gel (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht erfolgte durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Es wurde dabei ein diskontinuierliches Lämmli-System mit Tris-Puffern verwendet, bei dem ein Trenngel (Tris- Puffer pH 8,8, 5-20 % Acrylamid) mit einem Sammelgel (Tris-Puffer pH 6,8, 3-5 % Acrylamid) überschichtet wurde. Die Acrylamidkonzentration des verwendeten Trenngels hing dabei von der Größe der zu trennenden Proteine ab. Auf Grund des Molekulargewichts von PrP erwies sich eine Acrylamidkonzentration von 12,5-15% im Trenngel als optimal.

Je nach aufzutragender Proteinmenge wurden die verwendeten SDS-Gele in den Dicken 0,75 mm, 1 mm und 1,5 mm gegossen. Dabei wurde die Gussform zu ca. 5/6 mit Trenngel befüllt. Dieses wurde bis zur Auspolymeration (nach ca. 30 min) mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel bis zur Oberkante eingefüllt und der Kamm positioniert.

Nach erfolgter Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt. Daraufhin wurden die Anoden-, sowie die Kathodenkammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Bis zum Einbringen der Proben wurde 30 min gewartet, was der Äquilibration von Gel und Elektrophoresepuffer diente.

Die zu analysierende, in TNE oder Lysispuffer vorliegende, Proteinpräparation wurde mit 1/4 des Volumens an 5x Probenpuffer versetzt und bei 99°C für 10 min denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard in die Geltaschen eingebracht. Nicht beladene Geltaschen wurden mit 1x Probenpuffer gleicher Menge gefüllt, um eine gleichmäßige Ionenverteilung zu gewährleisten.

Nach der Beladung der Gele erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei Raumtemperatur. Der Einlauf der Proben durch das Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Diese wurde für die Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 140 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront der Proben die Unterkante des Gels erreicht hatte.

3.3.6 Westernblot-Analyse

Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunochemisch nachweisen zu können, wurden sie auf eine Membran übertragen. Dabei wurden Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen benutzt.

Die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran erfolgte im „semi-dry-Verfahren“ in einer Blot-Apparatur. Für den Transfer wurde eine

Membran in der Größe des zu blottenden Gels und vier etwas größere Stücke Whatman-Papier zugeschnitten. Die Membran und die Whatman-Papiere wurden vor Gebrauch für 30 min in Blotting-Puffer equilibriert. Aufgrund ihrer Hydrophobizität musste die Membran zuvor mit reinem Methanol befeuchtet werden.

Die Beladung der Blotting-Apparatur erfolgte, indem zwei Lagen befeuchtetes Whatman-Papier auf die Anodenplatte aufgelegt wurden. Auf diese wurden nacheinander die befeuchtete Membran, das zu blottende Gel und zwei weitere Lagen Whatman-Papier positioniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Lagen blasenfrei übereinander zu liegen kamen. Zum Schluss erfolgte der Verschluss der Blotting-Apparatur durch Auflegen der Kathodenplatte.

Das Blotten erfolgte in 100 min bei einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran.

Nach Abschluss des Blottens wurde die Membran sofort in ein Schälchen mit Blocking-Puffer überführt. Das Gel und die Whatman-Papiere wurden verworfen.

Das Blocken dient der Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran, die durch Bindung der Antikörper zu einer starken Anfärbung des Hintergrunds bei der Immunreaktion führen würden. Es erfolgte unter ständigem Schütteln für die Dauer von 1h bei Raumtemperatur und war gefolgt von fünfmaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBST.

Anschließend wurde die Membran auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C in einer Lösung des Erstantikörpers in PBST inkubiert. Zur Detektion von PrP wurde 4H11-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST benutzt. Der Inkubation mit dem Erstantikörper folgten drei fünfminütige Waschschrte in PBST, bevor die Membran für 1h im Zweitantikörper geschüttelt wurde. Als Zweitantikörper wurde Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Maus-Antikörper von der Ziege verwendet, der gegen das F_c -Fragment des Erstantikörpers gerichtet ist. Dieser wurde in der Verdünnung 1:5000 in PBST eingesetzt.

Nach weiterem fünfmaligem, jeweils fünfminütigem Waschen in PBST, folgte die Chemolumineszenzreaktion durch Zugabe von ECL- oder der ECLplus-Reagenz der Firma Amersham. Dabei wurde die feuchte, durch Whatman-Papier von PBST befreite, Membran gleichmäßig mit dem Reagenz inkubiert. Nach einer Dauer von fünf Minuten wurde das überschüssige ECL-/ECLplus-Reagenz mit Hilfe eines Whatman-Papiers abgenommen und die Membran in eine Frischhaltefolie eingeschlagen. So vorbereitet erfolgte die Detektion des Chemolumineszenzsignals mittels Röntgenfilm oder elektronisch über das *Chemigenius Bioimaging* System (Syngene, UK). Bei Detektion mittels Röntgenfilm wurde zuerst eine Belichtungszeit von 1 min gewählt. Nach der ersten

Belichtung erfolgte eine Anpassung der Belichtungszeit an die Chemolumineszenzstärke. Die belichteten Röntgenfilme wurden in einer Entwicklungsmaschine entwickelt und fixiert. In manchen Fällen war es nötig, auf einer Membran, die schon mittels Immunreaktion und Chemolumineszenz beprobt wurde, eine erneute Detektion durchzuführen. Dies war beispielsweise der Fall, wenn die Immunreaktion nicht ausreichend gut funktioniert hatte und keine Proben für eine erneute Gelelektrophorese zur Verfügung standen. Auch ist es manchmal nötig auf einer Membran eine zweite Immunreaktion mit einem anderen Erstantikörper durchzuführen. Zu diesem Zweck ist es möglich, die nach der vorangegangenen Immunreaktion vorhandenen Antikörper-Antigen-Komplexe zu lösen und die Immunglobuline von der Membran zu eluieren. Dieser Vorgang wird als „Stripping“ bezeichnet. Dabei wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30 min in PBST gewaschen und anschließend in PBST mit 5% entfettetem Milchpulver für 1h geblockt. So aufbereitet stand die Membran für eine erneute Immunodetektion zur Verfügung. Das „Stripping“ einer Membran wurde maximal drei Mal wiederholt, da mit jedem Mal ein beträchtlicher Teil der gebundenen Proteinmenge verloren geht.

3.4 Direkter PrP-Nachweis auf Metalloberflächen mittels Chemolumineszenz

3.4.1 Immun- und Chemolumineszenzreaktion

Um PrP direkt auf Metalloberflächen nachzuweisen, wurde dieses mittels eines PrP-spezifischen Antikörpers detektiert und über eine Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht (Flechsich *et al.* 2001).

Bei den Metallstücken, die in den vorliegenden Versuchen verwendet wurden, handelte es sich um Metallnetze aus rostfreiem Normstahl (Dicke 0.05 mm, Maschenweite 0.9 x 0.9 mm, DIN 143-01), die innerhalb jedes Versuchsansatzes mit identischer Größe zugeschnitten wurden (z.B. 5x6 Maschen).

Das zu beprobende Metallstück wurde zuerst auf einem Schüttler für 1 Std. bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer inkubiert. Das Blocken dient der Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Metalloberfläche, die durch Bindung der Antikörper zu einer starken Anfärbung des Hintergrunds bei der Immunreaktion führen würden. Das Blocken war gefolgt von fünfmaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBST.

Als Erstantikörper zur Detektion von PrP wurde 4H11-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST benutzt. In diesem wurde das Metallstück über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschsritten in PBST wurde das Metallstück für 1h in Zweitantikörper eingebracht.

Als Zweitantikörper wurde Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Maus-Antikörper von der Ziege verwendet, der gegen das F_c-Fragment des Erstantikörpers gerichtet ist. Dieser wurde in der Verdünnung 1:5000 in PBST eingesetzt.

Nach weiterem fünfmaligem, jeweils fünfminütigem, Waschen in PBST folgte die Chemolumineszenzreaktion. Das Metallstück wurde dazu in eine von der Größe passende Mikrotiterplatte überführt und mit einer passenden Menge ECLplus-Reagenz (z.B. 75 µl pro Well in einer 96-Well-Platte) überschichtet. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin für die Detektion des Chemolumineszenzsignals in eine dünne, durchsichtige Folie eingeschweißt.

3.4.2 Detektion des Chemolumineszenzsignals und Quantifizierung der Signalstärke

Die emittierte Chemolumineszenz wurde über das *Chemigenius Bioimaging* System (Syngene, UK) detektiert und mittels der *GeneTools* Software (Syngene, UK) quantifiziert. Zur Detektion wurde die eingeschweißte Kulturplatte auf den Objektisch im Inneren des *Chemigenius Bioimaging* Systems gelegt. Daraufhin wurden unter Oberlicht der zu fotografierende Ausschnitt gewählt und die Metallstücke scharf eingestellt. Bei verschlossenem Gehäuse und ausgeschalteter Innenbeleuchtung erfolgte dann die Belichtung. Belichtungszeit und Blende wurde je nach Chemolumineszenzstärke nach der ersten Probeaufnahme angepasst, um ein optimales Bild zu erhalten.

Die Quantifizierung des auf diese Weise erhaltenen Signals erfolgte über die *GeneTools* Software. Zu diesem Zweck wurde mittels der Software für jedes zu testende Metallstück der *mean pixel value* (MPV) bestimmt. Dazu wurde für jedes Metallstück ein Messausschnitt festgelegt, der dies gerade vollständig einschloss. Die Fläche der gewählten Messausschnitte wurde dabei innerhalb eines Versuchs für jedes zu messende Metallstück gleich groß gewählt. Außerdem wurden jeweils die MPVs vom Hintergrund und von verschiedenen Kontrollen bestimmt.

Als Positivkontrolle diente ein Metallnetz, das für 10 min in 10%igem Hirnhomogenat (10% Hirnhomogenat in PBS) einer terminal am 22L-Prionstamm erkrankten Maus inkubiert wurde. Während dieser Zeit wurde das Netz mit einer Pinzette bewegt, um eine gleichmäßige Kontamination zu gewährleisten. Um anhaftende Gewebeteile aus dem Hirnhomogenat vom Netz zu entfernen, wurde es danach erst grob in PBS gewaschen und dann drei Mal in einem jeweils neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml PBS für jeweils 3 min gevortext.

Als Negativkontrolle dienten zum einen ein unbehandeltes Metallnetz und zum anderen ein mit dem Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus beschmutztes Netz. Dabei wurde das Netz,

das in dem PrP^{0/0}-Hirnhomogenat behandelt wurde, analog zu dem beschmutzt, das mit dem 22L Hirnhomogenat inkubiert wurde.

Ausgewertet wurden die so erhaltenen Werte, indem der MPV der mit Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus behandelten Netze als Nullwert für den PrP Nachweis definiert wurde. Dieser Nullwert plus und minus der doppelten Standardabweichung der MPVs der PrP^{0/0}-behandelten Netze beschreibt einen Bereich, in dem keine sichere Aussage möglich ist, ob PrP auf der Metalloberfläche vorliegt, oder nicht. Erst MPVs, die über der doppelten Standardabweichung vom MPV der PrP^{0/0}-Netze lagen, galten als positiver PrP-Nachweis. MPVs, die unter der doppelten Standardabweichung des MPV der PrP^{0/0}-Netze lagen, galten als negativer PrP-Nachweis.

3.5 Evaluierung der Prionwirksamkeit von Dekontaminationsverfahren

3.5.1 Dekontaminationsverfahren

Die im Folgenden beschriebenen Verfahren wurden alle von der Firma Miele-Professional entwickelt und laufen vollautomatisch in einem handelsüblichen Reinigungs- und Desinfektionsgerät (RDG) ab. Bei dem Verfahren A handelt es sich um ein übliches Reinigungs- und Desinfektionsverfahren, wie es in der Instrumentenaufbereitung weit verbreitet ist. Dieses dient als Referenzverfahren. Bei den Verfahren B und C handelt es sich um zwei speziell zur Priondekontamination entwickelte Programme, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Prionwirksamkeit hin untersucht werden sollten.

3.5.1.1 Verfahren A

Der Reinigungsprozess beginnt bei Verfahren A mit einer einminütigen Vorwäsche in klarem Wasser. Diese wird vom eigentlichen Reinigungsschritt gefolgt. Dabei werden die Instrumente für 5 Minuten bei einer Temperatur von 55°C mit einem alkalischen Reiniger gewaschen. Nach Neutralisierung werden die gereinigten Instrumente in klarem Wasser gespült.

Der Reinigung ist eine thermische Desinfektion nachgeschaltet. Dabei werden die Instrumente bei 90°C für 5 Minuten in klarem Wasser gespült.

Das Verfahren A ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Die verwendeten Reiniger sind in Kapitel 2.5 beschrieben.

3.5.1.2 Verfahren B

Das Verfahren B unterscheidet sich vom Verfahren A durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt mit H₂O₂ in Kombination mit einem alkalischen Reiniger, der der Reinigung mit alkalischem Reiniger nachgeschaltet ist (Abbildung 6). Bei diesem Schritt

werden die zu dekontaminierenden Instrumente mit dem H₂O₂/alkalischer Reiniger-Gemisch für 10 min bei 60°C inkubiert. Der Reinigung folgt wie beim Verfahren A Neutralisation, Spülung und thermische Desinfektion.

Das Verfahren B ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Die verwendeten Reiniger sind in Kapitel 2.5 beschrieben.

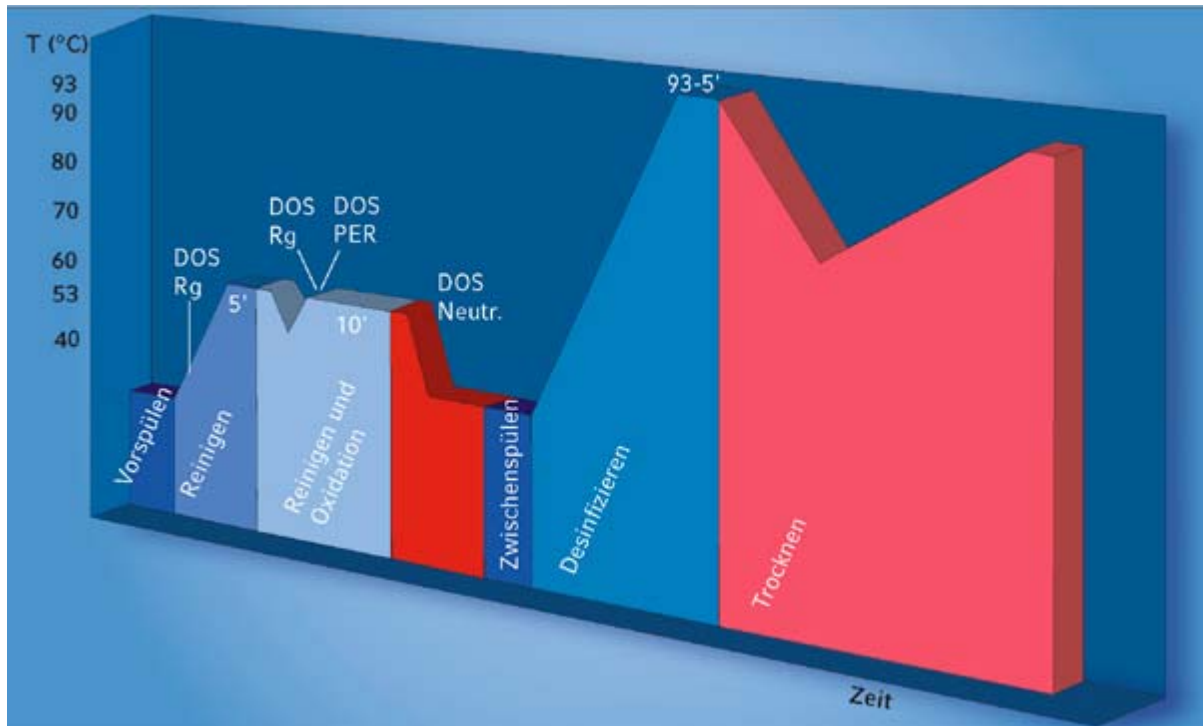


Abbildung 6: Schematische Darstellung des „Verfahrens B“.

„DOS Rg“: Dosieren von Sekumatic FR; „DOS PER“: Dosieren von Sekumatic Oxivario; „DOS Neutr.“: Dosieren von Sekumatic FNZ

3.5.1.3 Verfahren C

Das Verfahren C unterscheidet sich deutlich von den Verfahren A und B (Abbildung 7).

Nach gründlicher Vorwäsche folgt ein Reinigungsschritt mit einem hochalkalischen Reiniger bei pH 12 bis pH 13 für 10 min bei 93°C. Im nächsten Schritt werden die Instrumente für 10 min bei 60°C in einer hohen Konzentration Natriumhypochlorid (NaOCl) enthaltenden Lösung gereinigt.

Danach folgen eine gründliche Spülung der Instrumente in klarem Wasser und eine thermische Desinfektion bei 70°C für 3 Minuten.

Das Verfahren C ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Die verwendeten Reiniger sind in Kapitel 2.5 beschrieben.

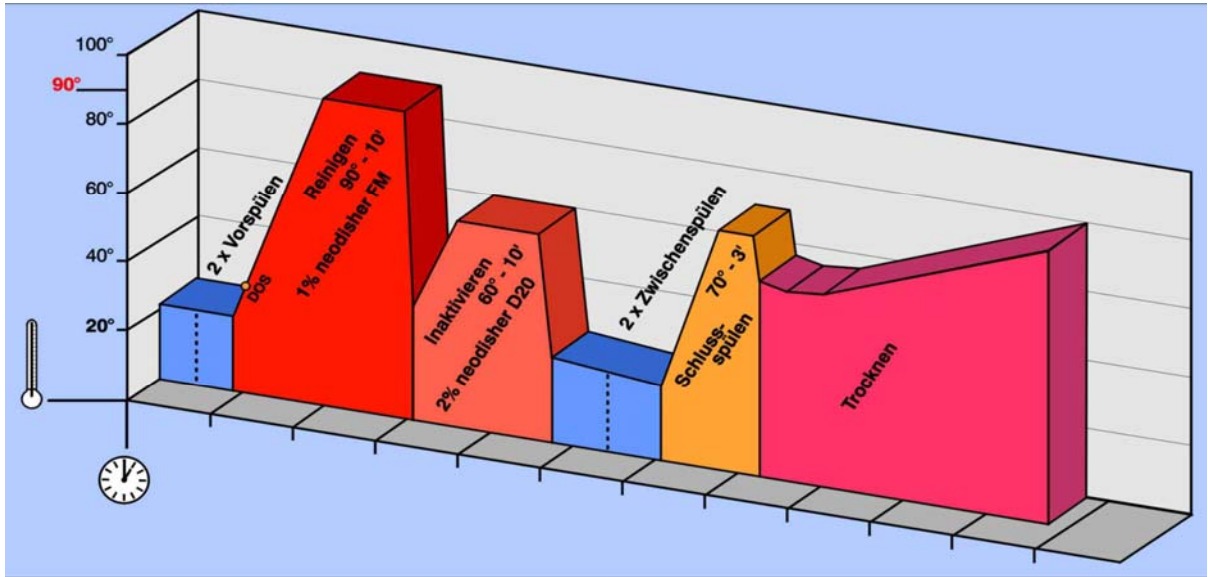


Abbildung 7: Schematische Darstellung des „Verfahrens C“

	Verfahren A	Verfahren B	Verfahren C
Vorreinigung	Wasserbefüllung, Reinigung 1 min, Abpumpen	Wasserbefüllung, Reinigung 1 min, Abpumpen	Wasserbefüllung, Reinigung 1 min, Abpumpen
Reinigung	Wasserbefüllung, Heizen auf 40 °C, Dosieren von Sekumatic FR (0,5 %), Heizen auf 55 °C, 5 min Haltezeit, Abpumpen	Wasserbefüllung, Heizen auf 40 °C, Dosieren von Sekumatic FR (0,5 %), Heizen auf 55 °C, 5 min Haltezeit, Abpumpen	Wasserbefüllung, Heizen auf 40 °C, Dosieren von Neodisher FM (1 %), Heizen auf 93 °C, 10 min Haltezeit, Abpumpen
oxidative Reinigung	-	Wasserbefüllung, Heizen auf 40 °C, Dosieren von Sekumatic FR (0,8 %), Heizen auf 55 °C, Dosieren von Sekumatic Oxivario (0,7 %), 10 min Haltezeit, Abpumpen	Wasserbefüllung, Heizen, Dosieren von Neodisher D 20 (2 %) Heizen auf 60 °C, 10 min Haltezeit, Abpumpen
Spülung/ Neutralisierung	Wasserbefüllung, Dosieren von Sekumatic FNZ (0,1 %), 1 min spülen, Abpumpen	Wasserbefüllung, Dosieren von Sekumatic FNZ (0,1 %), 1 min spülen, Abpumpen	Wasserbefüllung, 2 min spülen, Abpumpen
Spülung	Wasserbefüllung, 1 min spülen, Abpumpen	Wasserbefüllung, 1 min spülen, Abpumpen	Wasserbefüllung, 1 min spülen, Abpumpen
thermische Desinfektion	Wasserbefüllung, Heizen auf 90 °C (-0/+5 °C), 5 min Haltezeit, Abpumpen	Wasserbefüllung, Heizen auf 90 °C (-0/+5 °C), 5 min Haltezeit, Abpumpen	Wasserbefüllung, Heizen auf 70 °C, 3 min Haltezeit, Abpumpen

Tabelle 6: Ablauf der Reinigungsverfahren „A, B und C“

3.5.2 Evaluierung der Prionwirksamkeit mit Hilfe verschiedener Tests für oberflächengebundene Prionen

3.5.2.1 Art und Kontamination der Prüfkörper

Zur Evaluierung der Prionwirksamkeit der verschiedenen Reinigungsverfahren wurden Prüfkörper aus Metall benutzt. Diese wurden zuerst mit Prionen kontaminiert und dann mit dem zu testenden Reinigungsverfahren behandelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der so behandelten Prüfkörper auf darauf verbliebene Prionen mit Hilfe der verschiedenen etablierten Detektionsverfahren.

Je nach angewendetem Detektionsverfahren für oberflächengebundene Prionen unterschieden sich die verwendeten Prüfkörper. Zur Testung des Dekontaminationsergebnisses mittels Chemolumineszenz- und Zellkulturtest wurden feine Metallnetze aus rostfreiem Normstahl benutzt (Dicke 0.05 mm, Maschenweite 0.9 x 0.9 mm, DIN 143-01). Dagegen wurden zur Testung der Prionwirksamkeit mit Hilfe von Versuchstieren feine, monofile Metalldrähte aus chirurgischem Edelstahl (Durchmesser 0.15 mm) verwendet. Die Netze wurden vor der Kontamination auf eine Größe von 1 x 5 cm und die Drähte auf eine Länge von 5 cm zugeschnitten.

Die Kontamination der Prüfkörper erfolgte durch Inkubation in 10% Hirnhomogenat von terminal an Scrapie erkrankten Mäusen für 10 min bei Verwendung von Metallnetzen, beziehungsweise für 14 Stunden bei Metalldrähten. Nach Entfernung des Hirnhomogenats wurden die Prüfkörper kurz in PBS geschwenkt, um grobe Homogenatanteile zu entfernen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Die so präparierten Netze oder Drähte wurden dann dem zu testenden Dekontaminationsverfahren zugeführt.

Teilweise wurden die Prüfkörper nach Trocknen des Hirnhomogenats zusätzlich mit Schafsblut beschmutzt, um eine Ausgangsbeschmutzung zu erhalten, die die von Operationsinstrumenten noch besser imitiert.

Dazu wurden die mit dem Hirnhomogenat kontaminierten Metallnetze mit heparinisiertem Schafsblut überschichtet, dem zuvor Protaminsulfat beigemischt wurde. Durch das Protaminsulfat wurde die antikoagulatorische Wirkung des Heparins antagonisiert, wodurch es zur Gerinnung des Blutes auf den Metallnetzen kam. Die kontaminierten, mit dem geronnenen Schafsblut überzogenen Metallnetze wurden bei Raumtemperatur getrocknet und dann im Reinigungs- und Desinfektionsgerät (RDG) mit dem jeweiligen zu testenden Dekontaminationsverfahren behandelt.

3.5.2.2 Behandlung der Prüfkörper im Reinigungs- und Desinfektions-Gerät (RDG)

Damit die Prüfkörper während der Reinigungsvorgänge nicht weggespült wurden, mussten sie im RDG fixiert werden. Dazu wurde eine einfache Halterung benutzt, bei der die zu reinigenden Prüfkörper in einem Rahmen aufgehängt wurden und damit den Spülvorgängen voll zugänglich waren. Die Halterung war dabei so schwer, dass sie während der Reinigungsverfahren an der zuvor abgelegten Stelle im RDG verblieb und nicht umhergespült wurde.

Die in der Halterung fixierten Prüfkörper wurden bei jedem Versuch an der gleichen Stelle des oberen Korbes in das RDG eingebracht. Daraufhin wurde das jeweilige Dekontaminationsverfahren gestartet.

3.5.2.3 Testung der Prüfkörper auf Prionen

Nach Beendigung des Dekontaminationsverfahrens wurden die Netze und Drähte unter sterilen Bedingungen aus der Halterung herausgenommen. Dann wurden sie steril auf die für das jeweilige Nachweisverfahren für oberflächengebundene Prionen benötigte Größe zugeschnitten.

Um die Metallnetze mit Hilfe des Chemolumineszenztests auf vorhandenes PrP zu prüfen, wurden sie innerhalb jedes Versuchsansatzes auf die gleiche Größe zugeschnitten und in 24-Well- bzw. 96-Well-Mikrotiterplatten verbracht. Dort erfolgte der PrP Nachweis wie in Kapitel 3.4 ausgeführt.

Zur Testung mittels Zellkultur wurden die Metallnetze auf 11 x 10 Maschen zugeschnitten, damit sie gerade auf den Boden einer Zellkulturschale mit 1,9 cm² Grundfläche passten. Dort wurden sie zuerst mit 1 ml Nährmedium und dann mit 200 µl einer Indikatorzellsuspension (ca. 800000 Zellen/ml) überschichtet. Im Folgenden wurde wie in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben vorgegangen.

Bei Prüfung des Dekontaminationsergebnisses mit Hilfe von Indikatortieren wurden die Drähte auf 3 mm Länge zugeschnitten und dann den Tieren wie unter Kapitel 3.2.2.2 beschrieben implantiert.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung verschiedener Nachweisverfahren für metallgebundene Prionen

4.1.1 Qualitativer Test für metallgebundenes PrP auf Basis einer Chemolumineszenzreaktion

4.1.1.1 Darstellbarkeit von PrP mit Hilfe des gewählten Verfahrens

Um Prionen *in vitro* direkt auf Metalloberflächen nachzuweisen, wurde ein Test auf Chemolumineszenzbasis gewählt. Dieser sollte analog zu einem von Flechsig et al. publizierten Verfahren erfolgen. Dabei wurde auf der Oberfläche haftendes PrP mit Hilfe eines Anti-PrP-Antikörpers detektiert. Durch Bindung eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers an diesen Antikörper-Antigen-Komplex wurde eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, mit deren Hilfe PrP spezifisch dargestellt werden konnte (Flechsig *et al.* 2001).

Da viele der von Flechsig et al. benutzten Geräte, Antikörper und Reagenzien nicht vorhanden waren, wurde das Verfahren abgewandelt. Die Immunodetektion und Chemolumineszenz erfolgten analog zu der beim Westernblot mittels 4H11-Anti-PrP-Antikörper, Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper und ECLplus Chemolumineszenzreagenz der Firma Amersham. Auch die Detektion des Chemolumineszenzsignals erfolgte mit einem anderen System. Statt des von Flechsig et al. Verwendeten „single-photon-counters“ wurde ein digitalkamerabasierendes System der Firma Syngene benutzt.

In den ersten Versuchen wurde überprüft, ob mit Hilfe des gewählten Vorgehens überhaupt ein PrP-Nachweis möglich war. Zu diesem Zweck wurden in verschiedenen Ansätzen prionkontaminierte und unbehandelte Metalldrähte mit dem Chemolumineszenztest beprobt. Die Kontamination der Metalldrähte mit Prionen erfolgte dabei durch deren 10 minütige Inkubation in 10% Hirnhomogenat einer terminal am 22L-Scrapiestamm erkrankten Maus. Nachdem die kontaminierten Metalldrähte ausgiebig in PBS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die vergleichende Beprobung der kontaminierten, sowie der unbehandelten Metalldrähte mittels des Chemolumineszenztests. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung. Dabei sieht man drei Wells (A, B und C) einer Multiwellplatte. In Well A befindet sich ein unbehandelter Metalldraht, Well B ist leer und in Well C liegt ein prionkontaminiertes Drahtstück. Zuvor wurde in allen drei Wells eine Immunodetektion von PrP durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Detektion der Chemolumineszenzreaktion. Dabei fällt auf, dass vom ECLplus-Reagenz auch in Well B

ein schwaches Hintergrundsignal emittiert wird. Der unbehandelte Draht in Well A leuchtet schwach, während der prionkontaminierte Draht in Well C ein deutlich stärkeres Chemolumineszenzsignal aufweist.

Mit Hilfe des Chemolumineszenztests war es demnach möglich, auf einer prionkontaminierten Oberfläche ein Chemolumineszenzsignal zu erhalten, welches deutlich stärker war, als das von einer sauberen Metalloberfläche.

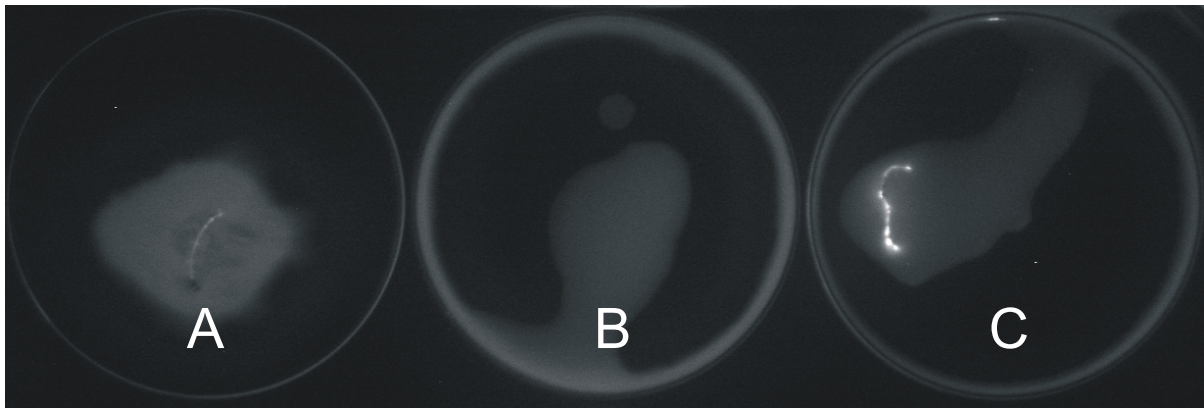


Abbildung 8: Chemolumineszenzsignal von verschiedenen Prüfkörpern; Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und meerrettichperoxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;
A: unbeschmutzter Metalldraht; B: kein Prüfkörper; C: 22L-prionkontaminierter Metalldraht

4.1.1.2 Wahl der Prüfkörper und der Reaktionsgefäße

Bald stellte sich heraus, dass die von Flechsig et al. verwendeten Drahtstücke als Prüfkörper nicht besonders gut für eine Detektion des Chemolumineszenzsignals mittels des *Chemigenius Bioimaging Systems* (Syngene, UK) geeignet waren. Dies war insbesondere dadurch bedingt, dass bei Benutzung von einfachen Metalldrähten die Testoberfläche sehr klein war und sich außerdem die Drähte bei der Präparation oftmals verbogen. Durch das Verbiegen gestaltete sich die Festlegung der Flächen für die Quantifizierung des Chemolumineszenzsignals schwierig. Die Detektionsflächen mussten für alle Messungen innerhalb eines Versuchs gleich groß gewählt werden und möglichst nur den Prüfkörper und wenig Hintergrund mit einschließen. Außerdem ragten die verbogenen Drähte bei der Detektion des Chemolumineszenzsignals teilweise aus der Bildebene heraus, was sich negativ auf die Messgenauigkeit auswirkte.

Deswegen wurden für die Durchführung des Chemolumineszenztests feine Metallnetze aus rostfreiem Normstahl (Dicke 0.05 mm, Maschenweite 0.9 x 0.9 mm, DIN 143-01) als Prüfkörper gewählt. Diese hatten den Vorteil, dass die Testoberfläche im Vergleich zu einfachen Metalldrähten um ein Vielfaches größer war und sie sich nicht so leicht verbogen. Zudem waren die Netze bei Orientierung anhand der Maschen gut auf die jeweils gleiche Größe zuzuschneiden.

Um den Einfluss der Oberfläche der Reaktionsgefäße auf die Stärke des Chemolumineszenzsignals beurteilen zu können, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der Teile des gleichen, mit Prionen kontaminierten, Metallnetzes jeweils in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen mit Hilfe des Chemolumineszenztests beprobt wurden. Auf diese Weise wurde der Test in einer Multiwellplatte mit Beschichtung für adhärent wachsende Zellen (A), einer Multiwellplatte aus Kunststoff ohne spezielle Oberflächenbeschichtung (B) und auf einer Glasplatte durchgeführt (C). Abbildung 9 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Die drei Säulen A, B und C zeigen die mit Hilfe der *GeneTools* Software quantifizierte Chemolumineszenzstärke der Netze in Form des ermittelten MPVs. Dieser ist proportional zur emittierten Chemolumineszenzstärke. Dabei zeigt das Netz, welches in der beschichteten Schale beprobt wurde, ein deutlich schwächeres Chemolumineszenzsignal als bei Durchführung von Immunodetektion und Chemolumineszenzreaktion auf der unbeschichteten Kunststoff- oder Glasoberfläche. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde der Chemolumineszenztest im Folgenden in unbeschichteten Multiwellplatten durchgeführt.

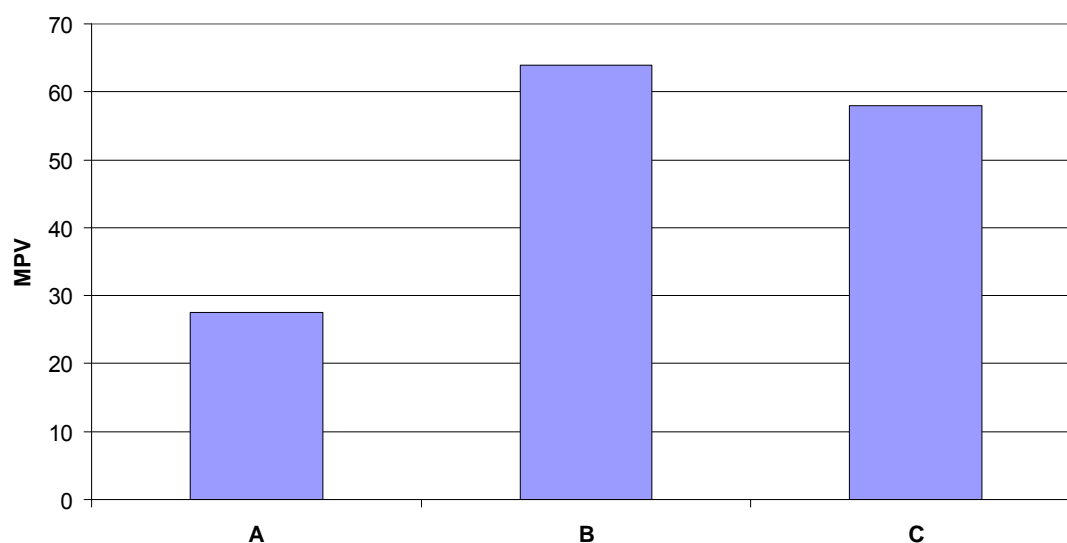


Abbildung 9: Chemolumineszenzsignal eines 22L-prionkontaminierten Metallnetzes auf verschiedenen Oberflächen; Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und merrettichperoxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;
 A: Chemolumineszenz in oberflächenbeschichteter Multiwellplatte für adhärent wachsende Zellen; B: Chemolumineszenz in unbeschichteter Multiwellplatte aus Kunststoff; C: Chemolumineszenz auf Glasplatte

4.1.1.3 Spezifität des Chemolumineszenztests für PrP

Zum Nachweis der Spezifität des Chemolumineszenztests für PrP, wurden Metallnetze in jeweils 10% Hirnhomogenat von entweder terminal an Scrapie erkrankten Mäusen („22L“), von nicht mit Scrapie infizierten Tieren („Mock“) oder von PrP-Knockout-Mäusen („PrP^{0/0}“) inkubiert. Nach Reinigung der Netze durch dreimaliges Vortexen in jeweils

frischem PBS („22L“ und „PrP^{0/0}“) beziehungsweise Reinigung im Reinigungs- und Desinfektionsgerät mit Verfahren A („Mock“), wurden sie zusammen mit einem unbehandelten Netz („unbehandelt“) mit dem Chemolumineszenztest beprobt.

In Abbildung 10 sind die mit Hilfe der *GeneTools* Software quantifizierten Chemolumineszenzstärken in Form der ermittelten MPVs aufgetragen. Die Säulen zeigen den Mittelwert der gemessenen MPVs für die jeweilige Beschmutzung der Netze. Dieser wurde aus einer parallelen Testung von vier verschiedenen Metallnetzen pro Gruppe ermittelt. Die Standardabweichung der einzelnen Gruppen ist durch einen T-förmigen Strich über der jeweiligen Säule eingezeichnet.

Der durchschnittliche MPV der mit dem Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus kontaminierten Netze („PrP^{0/0}“) liegt dabei nahe dem mittleren MPV der unbehandelten Netze („unbehandelt“). Eine Beschmutzung der Metallnetze mit Hirnhomogenat führt ohne Anwesenheit von PrP also zu keinem verstärkten Chemolumineszenzsignal. Dem gegenüber zeigen sowohl die mit Scrapiehomogenat („22L“) wie auch die mit Hirnhomogenat uninfizierter Kontrollmäuse („Mock“) kontaminierten Metallnetze ein im Vergleich zu den PrP^{0/0}-Hirnhomogenat behandelten Netzen erhöhtes Chemolumineszenzsignal. Die ermittelten, durchschnittlichen MPVs beider Gruppen liegen jeweils über der doppelten Standardabweichung der MPVs der mit PrP^{0/0}-behandelten Netze. Der Test weist demnach PrP durch ein spezifisches Chemolumineszenzsignal nach, welches deutlich über dem unspezifischen Signal durch das Hirnhomogenat und das Metallnetz liegt.

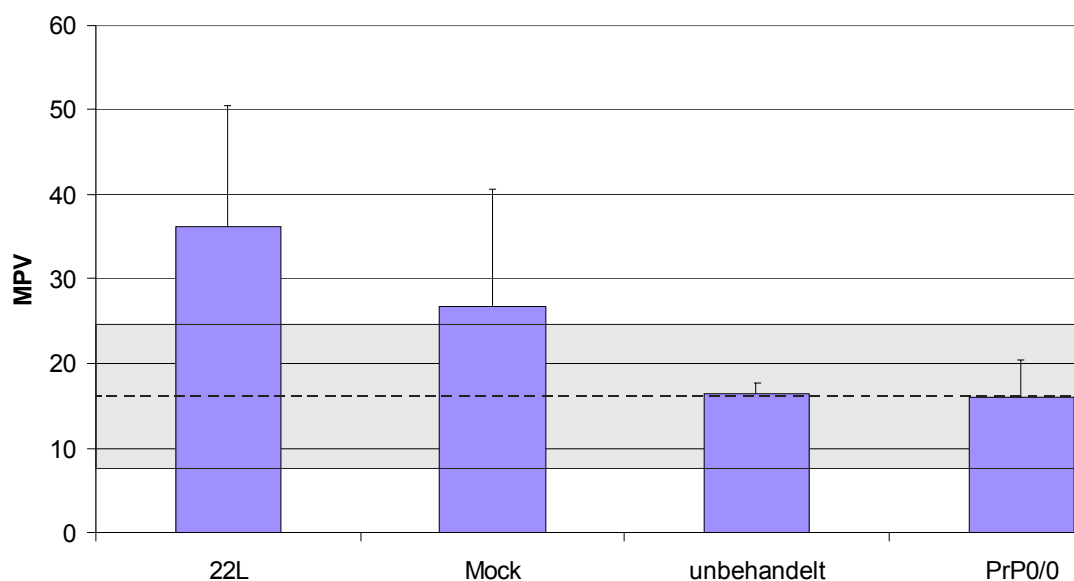


Abbildung 10: Chemolumineszenzsignal von Metallnetzen mit unterschiedlichen Anschmutzungen;

„22L“: Metallnetz mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert; „Mock“: Metallnetz mit Hirnhomogenat einer uninfizierten Maus kontaminiert; „unbehandelt“: unbehandeltes Metallnetz; PrP^{0/0}: Metallnetz mit Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus kontaminiert

Die Säulen zeigen den durchschnittlichen MPV der jeweiligen Gruppe. Pro Gruppe wurden 4 verschiedene Metallnetze beprobt. Der T-förmige Strich über den Säulen gibt die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe wieder.

Die gestrichelte Linie zeigt den durchschnittlichen MPV der „PrP^{0/0}“-Netze. Der graue Balken zeigt den durchschnittlichen MPV der „PrP^{0/0}“-Netze plus und minus der doppelten Standardabweichung dieser Gruppe. MPV-Werte im Bereich des grauen Balkens erlauben keine sichere Aussage über das Vorhandensein von PrP. Werte unterhalb des grauen Balkens sprechen für einen negativen und Werte über dem grauen Balken für einen positiven PrP-Nachweis.

Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und meerrettichperoxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;

4.1.1.4 Quantifizierbarkeit des PrP-Nachweises

Ob mit Hilfe des Chemolumineszenztests ein quantitativer PrP-Nachweis auf Metalloberflächen möglich ist, wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe untersucht. Zu diesem Zweck wurden Metallnetze für 10 min in unterschiedlichen Verdünnungen von 10% Hirnhomogenat (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8}) einer terminal an Scrapie erkrankten Maus inkubiert und nach Reinigung in PBS-Puffer mit Hilfe des Tests untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Balken im Diagramm entsprechen jeweils der Chemolumineszenzstärke der einzelnen Metallnetze. Diese sind in Form der mit Hilfe der *GeneTools* Software ermittelten MPVs aufgetragen. Dabei liegen die MPVs aller mit verdünntem Scrapie-Hirnhomogenat behandelten Netze über dem des unbehandelten Netzes. Allerdings zeigt die Höhe der ermittelten MPVs keine Korrelation zur jeweiligen Verdünnung des Hirnhomogenats. Dies

zeigt, dass mit Hilfe des Chemolumineszenztests ein sensitiver und qualitativer, aber kein quantitativer Nachweis von PrP möglich ist.

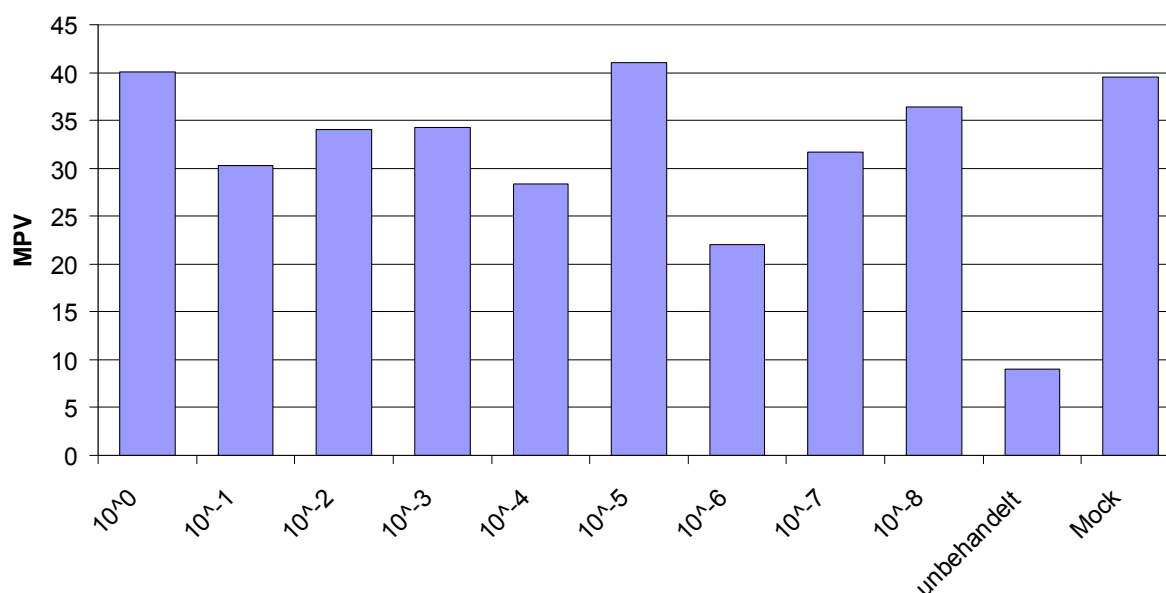


Abbildung 11: Chemolumineszenzsignal von Metallnetzen mit unterschiedlichen Anschmutzungen;

„Mock“: Metallnetz mit Hirnhomogenat einer uninfizierten Maus beschmutzt; „unbehandelt“: unbehandeltes Metallnetz; „10⁰“ bis „10⁻⁸“: Metallnetze mit Verdünnungen von 10⁰ bis 10⁻⁸ von 10% Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus kontaminiert

Die Säulen zeigen den mit Hilfe der *GenTools*-Software ermittelten MPV des jeweiligen Netzes.

Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und meerrettlichperoxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;

4.1.1.5 Unterscheidbarkeit von PrP^C und PrP^{Sc} mit Hilfe des Chemolumineszenztests

Da der verwendete 4H11 Erstantikörper PrP^C und PrP^{Sc} gleichermaßen erkannte, detektierte auch der Chemolumineszenztest beide Isoformen. Um mit Hilfe des Tests selektiv PrP^{Sc} nachweisen zu können, wurde versucht, beide Isoformen vor Durchführung des Tests über ihre physikalisch/chemischen Eigenschaften zu trennen. Dazu wurden die beschmutzten Metallnetze vor Beprobung mit Hilfe des Chemolumineszenztests einem Verdau mit Proteinase K (10 µg/ml bei 37°C für 30 min) ausgesetzt, um an der Oberfläche anhaftendes PrP^C zu beseitigen. Dabei sollte nur das partiell proteaseresistente PrP^{Sc} übrig bleiben, welches dann mit Hilfe des Chemolumineszenztests ohne das störende Signal des PrP^C nachgewiesen werden hätte können. In Abbildung 12 sind die mit Hilfe der *GenTools* Software ermittelten MPVs eines Versuchs aufgetragen, bei dem die Durchführbarkeit eines solchen PK-Verdaus untersucht wurde. Dabei zeigt die mit „unbehandelt“ beschriftete Säule den ermittelten MPV für ein unbehandeltes Metallnetz. Die ermittelten MPVs eines mit Hirnhomogenat einer uninfizierten („Mock“) sowie einer

22L-scrapieinfizierten („22L“) Maus liegen deutlich über dem Wert des unbehandelten Metallnetzes. Die mit „Mock+PK“ beschriftete Säule zeigt den MPV-Wert eines, analog zum „Mock“-Metallnetz, mit dem Hirnhomogenat einer uninfizierten Maus beschmutzten, und anschließend einem PK-Verdau zugeführten Metallnetzes. Da das Gehirn der uninfizierten Maus kein proteaseresistentes PrP^{Sc} enthielt, hätte der MPV des Metallnetzes bei erfolgreichem Verdau des anhaftenden PrP^C sinken müssen, da kein PrP mehr durch den Erstantikörper detektiert werden hätte können. Allerdings war der im vorliegenden Versuch für das PK-behandelte „Mock+PK“-Metallnetz ermittelte MPV nicht niedriger als der des nicht PK-behandelten „Mock“-Netzes. Dies zeigt, dass mit Hilfe von Proteinase K kein Verdau von oberflächengebundenem PrP^C möglich ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Flechsig et al., die beschrieben, dass auch ihnen mit Hilfe eines Chemolumineszenztests kein selektiver PrP^{Sc}-Nachweis nach Verdau des oberflächengebundenen PrP^C gelang (Flechsig *et al.* 2001).

Der Chemolumineszenztest erkennt oberflächengebundenen PrP unabhängig von seiner Konformation, es ist also nicht möglich damit PrP^{Sc} selektiv zu detektieren.

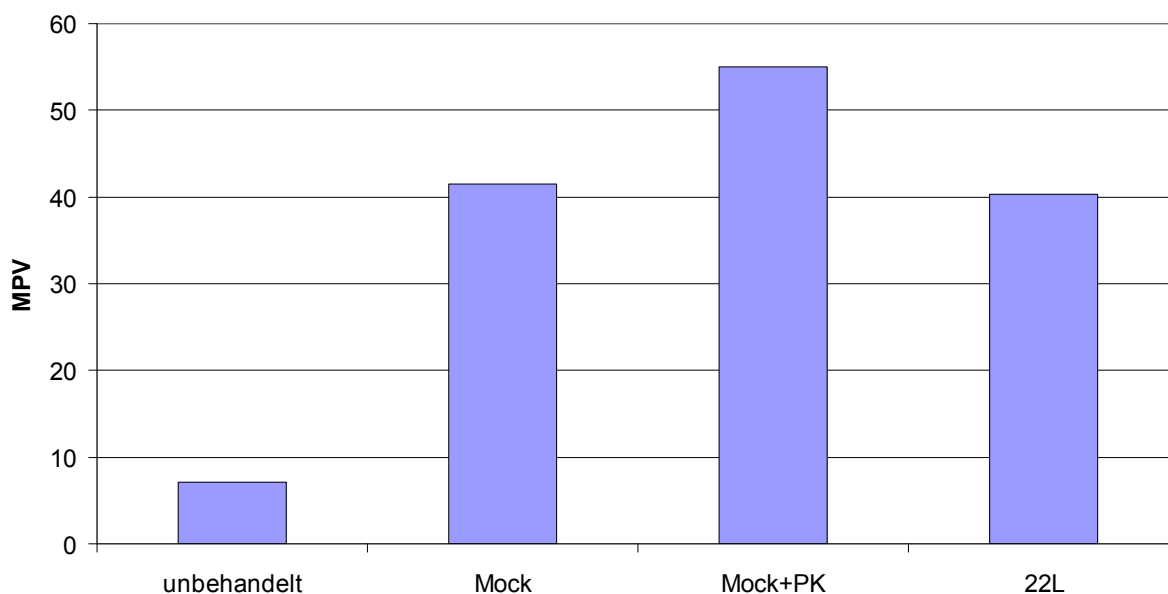


Abbildung 12: Chemolumineszenzsignal von Metallnetzen mit unterschiedlichen Anschmutzungen;

„unbehandelt“: unbehandeltes Metallnetz; „22L“: Metallnetz mit dem Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus kontaminiert; „Mock“: Metallnetz mit Hirnhomogenat einer uninfizierten Maus beschmutzt; „Mock+PK“: Metallnetz mit Hirnhomogenat einer uninfizierten Maus beschmutzt und anschließend mit Proteinase K verdaut (10µg/ml, 30min bei 37°C);

Die Säulen zeigen den mit Hilfe der *GenTools*-Software ermittelten MPV des jeweiligen Netzes. Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und meerrettichperoxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;

4.1.2 Zellkulturtest für metallgebundene Prionen

4.1.2.1 Herstellung von Einzelzellklonen mittels Endpunkttitration

Da es sich bei den verwendeten N2a-Zellen um eine sehr heterogene Population von Tumorzellen handelt, unterschieden sich diese oftmals in verschiedenen Kulturschalen in Hinblick auf Infizierbarkeit mit Scrapie und Kinetik der Infektion. Nach eigenen Erfahrungen kam es nach Passage der Zellen auf zwei Kulturschalen vor, dass sich die Zellen der einen Schale gut mit Scrapie infizieren ließen, während die Zellen der anderen Schale gar nicht empfänglich für Prionen waren. Auch gab es Kulturschalen, in denen eine erfolgreiche Scrapieinfektion der Zellen über lange Zeit stabil erhalten blieb, während die Zellen in anderen Schalen diese sehr schnell verloren.

Da bei Verwendung der N2a-Zellen als Indikatorzellen eine gute Charakterisierbarkeit von Empfindlichkeit für eine Prioninfektion und genaue Kenntnis der Infektionskinetik nötig sind, wurden zuerst homogene N2a-Kulturen hergestellt.

Dazu wurde eine Einzelzellklonierung der N2a-Zellen mittels Endpunkttitration durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf zwei 96-Well-Kulturplatten in 24 Verdünnungsreihen ausgesät. Auf diesen Platten entstanden 17 N2a-Populationen, die aus jeweils einer einzelnen Zelle entstammten. Diese Klone wurden mit den Namen „I1“ bis „I17“ benannt. Als die Klone 4-6 Wochen nach Einzelzellklonierung auf eine 57cm²-Kulturschale expandiert worden waren und diese zu ca. 80% bedeckten, wurden sie für eine spätere Charakterisierung eingefroren.

4.1.2.2 Infizierbarkeit der Einzelzellklone über Hirnhomogenat und metallgebundene Prionen

Um die Einzelzellklone hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für eine Prioninfektion zu charakterisieren, wurden sie mit Hilfe von Hirnhomogenat von terminal am 22L-Prionstamm erkrankten Mäusen infiziert. In Passage 5 nach Infektion wurden die Zellen lysiert und auf eine Prioninfektion hin untersucht. Dazu wurde eventuell in den Lysaten vorhandenes PrP^{Sc} in Anwesenheit von 1% Sarcosyl in der Ultrazentrifuge bei 100000 x g selektiv präzipitiert. Die bei der Ultrazentrifugation entstandenen Pellets wurden nach Suspension in TNE mit Hilfe eines Westernblots auf vorhandenes PrP^{Sc} analysiert. Auf diese Weise wurden 11 Einzelzellklone („I7“ bis „I17“) und N2a-„Wildtyp“-Zellen auf ihre Empfänglichkeit für eine Prioninfektion getestet.

Abbildung 13 zeigt den Westernblot nach Ultrazentrifugation in Passage 5. Dabei ließ sich in allen untersuchten Zellklonen (Spur 3-13), bis auf Klone „I10“ (Spur 6) und „I17“ (Spur 13), unlösliches PrP^{Sc} nachweisen. Dieser Nachweis gelang ebenfalls bei den N2a-

„Wildtyp“-Zellen (Spur 2). Das Prionprotein stellt sich im Westernblot durch die typischen drei Banden des un-, mono- und diglykosylierten PrP dar. Von den 11 getesteten Zellklonen sind also 9 empfänglich für eine Infektion mit 22L-Scrapie.

Die Infektion der 9 Einzelzellklone mittels Hirnhomogenat konnte in Passage 10 nach Verdau der Zellysate mittels Proteinase K durch Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} bestätigt werden (Daten nicht abgebildet).

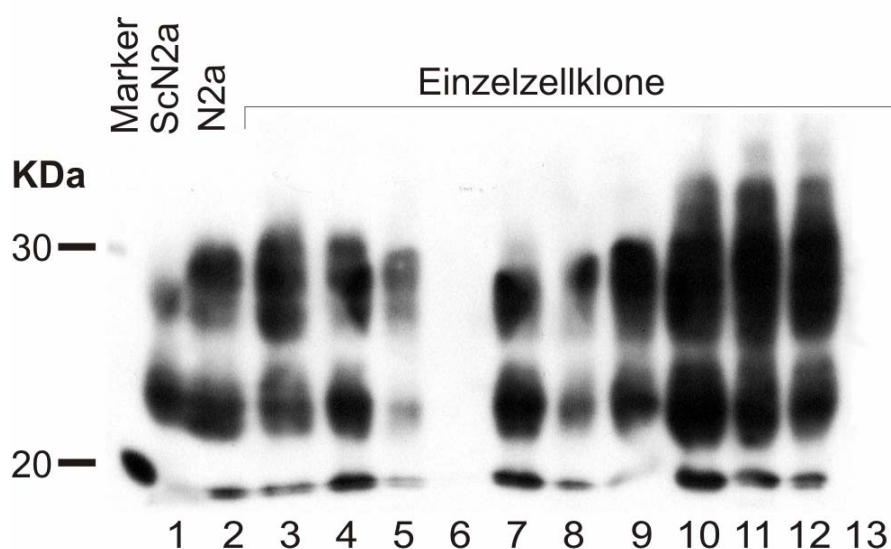


Abbildung 13: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten der Zellklone „I7“ (Spur 3) bis „I17“ (Spur13). Die Zellen wurden in Passage 5 nach Infektion mittels 10% Hirnhomogenat lysiert. Die Lysate wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer in Anwesenheit von 1% Sarcosyl für 1h bei 100000 x g ultrazentrifugiert um PrP^{Sc} selektiv zu präzipitieren. Als Kontrolle sind in Spur 1 stabil scrapieinfizierte N2a-Zellen („ScN2a“) und in Spur 2 „N2a-Wildtypzellen“ („N2a“) aufgetragen. Die „N2a“-Zellen wurden ebenso wie die Einzelzellklone mittels 10% Hirnhomogenat infiziert und nach Passage 5 ultrazentrifugiert. Das in Spur 1 aufgetragene „ScN2a“-Zell-Lysat dient als Positivkontrolle. Im Gegensatz zu den anderen aufgetragenen Lysaten wurde dieses vor Denaturierung im Probenpuffer PK-verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK).

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

Zur Untersuchung der Einzelzellklone hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für metallgebundene Prionen, wurden die Klone „I7“ bis „I17“ mit Hilfe von Metallnetzen infiziert, welche zuvor im Hirnhomogenat von terminal an 22L-Scrapie erkrankten Mäusen kontaminiert wurden. In Passage 7 nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Proteinase K verdaut. Abbildung 14 zeigt den Westernblot zum Nachweis von proteinaseresistentem PrP^{Sc}. Neben den N2a-„Wildtyp“-Zellen (Spur 2) lässt sich auch in den Einzelzellklonen „I7“, „I12“, „I13“, „I16“ und „I17“ (Spuren 3, 8, 9, 12 und 13)

PrP^{Sc} nachweisen. Dabei ist die detektierte PrP^{Sc}-Menge bei Klon „I13“ (Spur 9) am größten.

Von den 11 getesteten Einzelzellklonen ist also nur bei fünf eine Scrapieinfektion in Passage 7 nachweisbar. Außer Klon „I17“ sind alle über oberflächengebundene Prionen infizierbaren Klone auch über Hirnhomogenat zu infizieren.

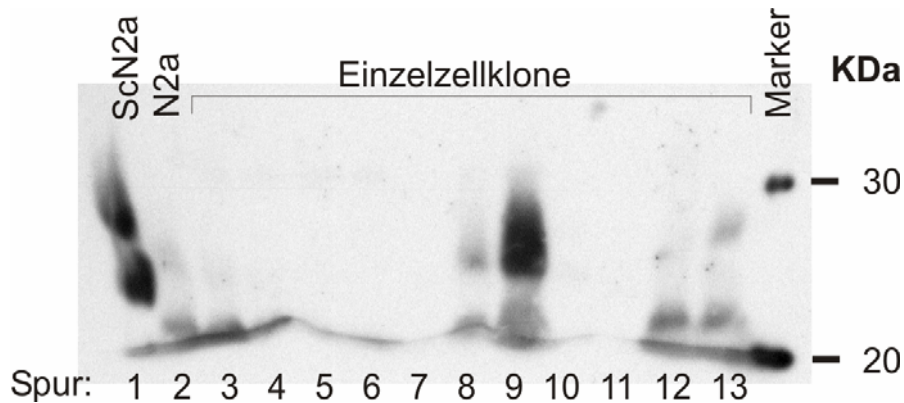


Abbildung 14: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten der Zellklone „I7“ (Spur 3) bis „I17“ (Spur13). Die Zellen wurden in Passage 7 nach Infektion mittels prionkontaminierten Metallnetzen lysiert. Die Lysate wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer PK-verdaut (30min bei 37°C mit 10 µg/ml PK). Als Kontrolle sind in Spur 1 stabil scrapieinfizierte N2a-Zellen („ScN2a“) als Positivkontrolle und in Spur 2 „N2a-Wildtypzellen“ („N2a“) aufgetragen. Die „N2a“-Zellen wurden ebenso wie die Einzelzellklone mittels prionkontaminierten Metallnetzen infiziert und nach Passage 7 PK-verdaut. Das in Spur 1 aufgetragene, PK-verdaute „ScN2a“-Zell-Lysat dient als Positivkontrolle.

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

4.1.2.3 Zeitverlauf der Infektion einzelner Klone

Die fünf über metallgebundene Prionen infizierbaren Einzelzellklone wurden zur Überprüfung ihrer Eignung als Indikatorzellen weiter untersucht. Dabei wurde die Infektion der Zellen im Zeitverlauf analysiert. Dazu wurden die Klone jeweils in einem Ansatz mit Hirnhomogenat und in einem anderen mit prionkontaminierten Metallnetzen infiziert. Nach Passage 4, 5, 7 und 10 wurden die Zellen lysiert. In den Lysaten von Passage 4 und 5 wurde PrP^{Sc} mittels Ultrazentrifugation präpariert, während in den Lysaten der Passagen 5, 7 und 10 ein Proteinase K-Verdau durchgeführt wurde. Auf diese Weise wurde die Scrapieinfektion der fünf metallinfizierbaren und einiger nicht über oberflächengebundene Prionen infizierbarer Klone untersucht.

Abbildung 15 zeigt ein Beispiel für den Infektionsverlauf eines nicht über prionkontaminierte Metallnetze infizierbaren Klons. Im abgebildeten Westernblot ist der Vergleich der Infektion mittels Hirnhomogenat und über metallgebundene Prionen bei Klon „I15“ abgebildet. Nach Infektion mit Hirnhomogenat lässt sich nach Passage 4 und 5 unlösliches PrP^{Sc} nachweisen. Nach den Passagen 5, 7 und 10 lassen sich große

Mengen PK-resistentes PrP^{Sc} detektieren. Dies zeigt, dass die Zellen stabil mit Scrapie infiziert sind. Anders sieht es nach Infektion des Klons „I15“ mittels oberflächengebundenen Prionen aus. Zwar lässt sich nach Passage 4 und 5 etwas unlösliches PrP nachweisen, der PK-Verdau nach Passage 5, 7 und 10 zeigt allerdings, dass kein proteaseresistentes PrP^{Sc} gebildet wurde.

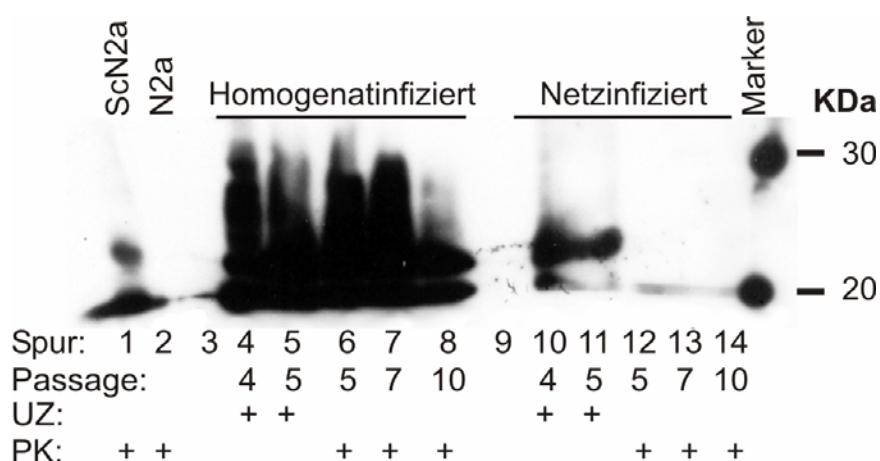


Abbildung 15: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Zellklons I15 in verschiedenen Passagen nach Infektion mittels 10% Hirnhomogenat (Spur 4-8) oder prionkontaminierten Metallnetzen (Spur 10-14). Zellen jeweils in Passage 4, 5, 7 und 10 nach Infektion lysiert. Die Lysate der Passagen 4 und 5 wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer ultrazentrifugiert („UZ“ in Spur 4,5,10 und 11), während die Lysate der Passagen 5, 7 und 10 PK-verdaut wurden („PK“ in Spuren 6, 7, 8, 12, 13 und 14; Verdau 30 min bei 37°C mit 10µg/ml PK). Als Kontrolle ist in Spur 1 das Lysat von stabil scrapieinfizierten N2a-Zellen („ScN2a“) als Positivkontrolle und in Spur 2 das Lysat von uninfizierten N2a-Zellen („N2a“) aufgetragen. Diese wurden vor Denaturierung im Probenpuffer jeweils mittels PK verdaut (30min bei 37°C mit 10 µg/ml PK).

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

Bei anderen Klonen, bei denen in Passage 7 nach Infektion mit oberflächengebundenen Prionen kein Nachweis von PK-resistentem PrP^{Sc} gelang (Abbildung 14), zeigte sich bei Betrachtung der Prioninfektion über die Zeit, dass diese doch über metallgebundene Prionen infizierbar waren, sie allerdings die Infektion schnell wieder verloren. In Abbildung 16 ist die Infektion von Klon „I11“ im Zeitverlauf gezeigt. Während sich auch dieser Einzelzellklon stabil über Hirnhomogenat infizieren lässt, verliert er die Infektion über oberflächengebundene Prionen, die in Passage 5 durch PK-resistentes PrP^{Sc} nachweisbar ist, sehr schnell wieder. Dadurch ist er trotz seiner Infizierbarkeit als Indikatorklon zur Detektion von oberflächengebundenen Prionen ungeeignet.

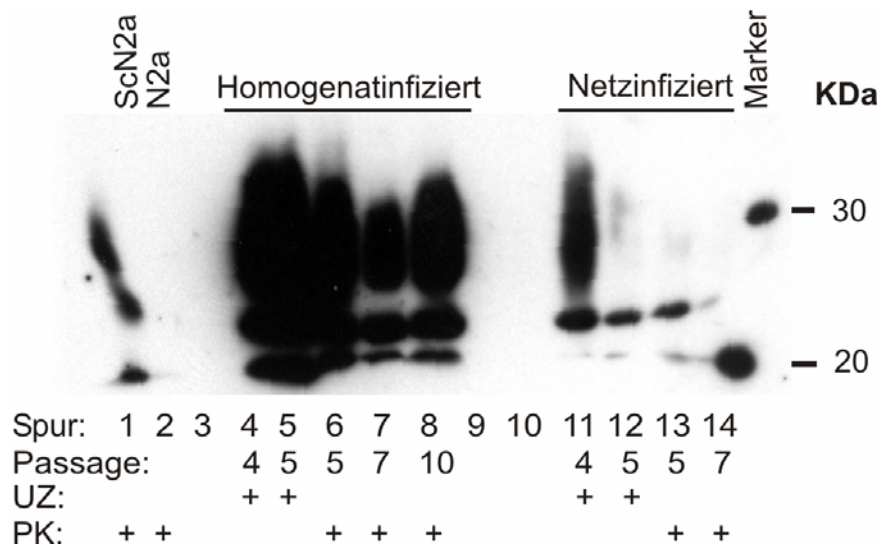


Abbildung 16: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Zellklons I11 in verschiedenen Passagen nach Infektion mittels 10% Hirnhomogenat (Spur 4-8) oder prionkontaminierten Metallnetzen (Spur 11-14). Zellen jeweils in Passage 4, 5, 7 und 10 (Passage 10 nur nach Homogenatinfektion) nach Infektion lysiert. Die Lysate der Passagen 4 und 5 wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer ultrazentrifugiert („UZ“ in Spur 4, 5, 11 und 12), während die Lysate der Passagen 5, 7 und 10 PK-verdaut wurden („PK“ in Spur 6, 7, 8, 13 und 14; 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK).

Als Kontrolle ist in Spur 1 das Lysat von stabil scrapieinfizierten N2a-Zellen („ScN2a“) als Positivkontrolle und in Spur 2 das Lysat von uninfizierten N2a-Zellen („N2a“) aufgetragen. Diese wurden vor Denaturierung im Probenpuffer jeweils mittels PK verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK).

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

Von den in Passage 7 als empfänglich für oberflächengebundene Prionen erkannten Einzelzellklonen zeigte Klon „I13“ das stärkste PrP^{Sc}-Signal in Passage 7 (Abbildung 14). In Abbildung 17 ist die Infektion von Klon „I13“ über der Zeit gezeigt. Nach Infektion mit Hirnhomogenat zeigt der Klon eine stabile Scrapieinfektion, wobei das PrP^{Sc}-Signal in Passage 10 deutlich schwächer wird. Bei Infektion über oberflächengebundene Prionen gelingt der Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} erst relativ spät in Passage 7, die Scrapieinfektion der Zellen bleibt allerdings dann stabil nachweisbar bis in Passage 10.

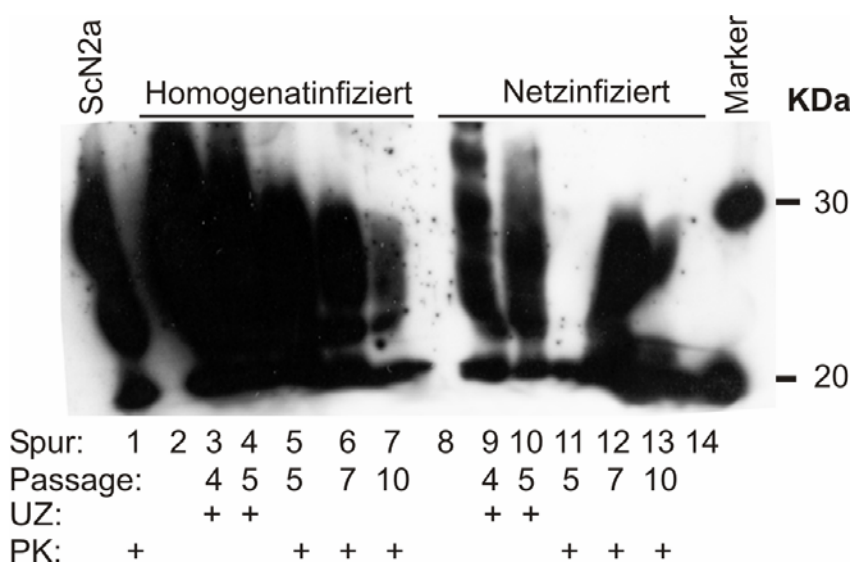


Abbildung 17: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Zellklons I13 in verschiedenen Passagen nach Infektion mittels 10% Hirnhomogenat (Spur 3-7) oder prionkontaminierten Metallnetzen (Spur 9-13). Zellen jeweils in Passage 4, 5, 7 und 10 nach Infektion lysiert. Die Lysate der Passagen 4 und 5 wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer ultrazentrifugiert („UZ“ in Spur 3, 4, 9 und 10), während die Lysate der Passagen 5, 7 und 10 PK-verdaut wurden („PK“ in Spuren 5, 6, 7, 11, 12 und 13; Verdau 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK). Als Kontrolle ist in Spur 1 das Lysat von stabil scrapieinfizierten N2a-Zellen („ScN2a“) als Positivkontrolle aufgetragen. Dieses wurde vor Denaturierung im Probenpuffer mittels PK verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK).

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

Da der Einzelzellklon „I13“ nach Infektion über oberflächengebundene Prionen das stärkste PrP^{Sc}-Signal aller untersuchten Klone zeigte und er die Infektion über mehrere Passagen stabil behielt, wurde er als der am besten geeignete Indikatorklon für metallgebundene Prionen befunden. Das erst spät detektierbare proteinaseresistente PrP^{Sc} ist allerdings ein deutlicher Nachteil gegenüber anderer scrapiesensitiver Zellklone.

4.1.2.4 Subklonierung des Einzelzellklons „I13“

Um einen Indikatorzellklon zu erhalten, welcher ebenso empfindlich für oberflächengebundene Prionen ist wie Klon „I13“, aber einen früheren Nachweis der Infektion über PK-resistentes PrP^{Sc} erlaubt, wurde eine Subklonierung des Klons „I13“ mittels Endpunkttitration durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf zwei 96-Well-Kulturplatten in 24 Verdünnungsreihen ausgesät. Auf diesen Platten entstanden 15 N2a-Populationen, die aus jeweils einer einzelnen Zelle der „I13“-Kultur entstammten. Diese Subklone wurden mit den Namen „13A1“ bis „13A15“ benannt. Als die Subklone 4-6 Wochen nach Einzelzellklonierung auf eine 57cm²-Kulturschale expandiert worden waren und diese zu ca. 80% bedeckten, wurden sie für eine spätere Untersuchung eingefroren.

4.1.2.5 Selektion eines I13-Subklons mit früher Bildung von proteaseresistentem PrP^{Sc}

Von den 15 durch Einzelzellklonierung erhaltenen Subklonen von „I13“ wurden sieben (Subklon 13A7 bis 13A15, ohne 13A9) mit Hilfe von prionkontaminierten Metallnetzen infiziert und nach Passage 5 auf Proteinase K-resistentes PrP^{Sc} hin untersucht. Um einen Vergleich mit den Ausgangszellen zu erhalten, wurden parallel N2a-„Wildtyp“- und „I13“-Zellen über oberflächengebundene Prionen infiziert. Abbildung 18 zeigt einen Westernblot mit den in Passage 5 nach Infektion Proteinase K-behandelten Lysaten der Subklone 13A7 bis 13A15 (ohne 13A9; Spur 4-11), der ebenso behandelten N2a-„Wildtyp“-Zellen („N2a“ in Spur 2) und des Klons „I13“ (Spur 3). In Passage 5 ist bei den N2a-„Wildtyp“-Zellen keine Infektion über den Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} zu detektieren. Überraschenderweise lässt sich in diesem Versuch bei Infektion des Klons „I13“ schon in Passage 5 proteaseresistentes PrP^{Sc} nachweisen. Von den sieben getesteten Subklonen zeigen 4 schon in Passage 5 proteaseresistentes PrP^{Sc} (Subklon 13A7, 13A10, 13A11 und 13A15 in den Spuren 4,6,7 und 11). Die stärksten PrP^{Sc}-Signale haben dabei die beiden Subklone 13A7 (Spur 4) und 13A15 (Spur 11). Das Signal dieser beiden Subklone ist stärker als das der „I13“-Ausgangszellen (Spur 3).

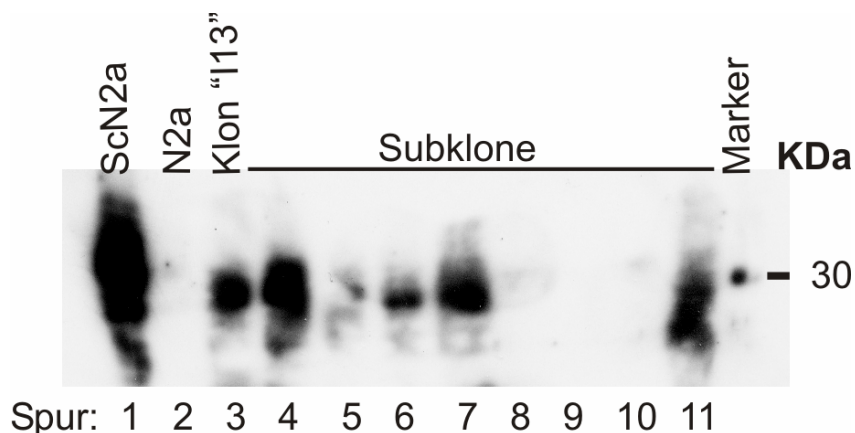


Abbildung 18: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Einzelzellklons I13 (Spur 3) und der Subklone „13A7“ (Spur 4) bis „13A15“ (Spur 11), ohne 13A9. Die Zellen wurden in Passage 5 nach Infektion mittels prionkontaminierten Metallnetzen lysiert. Die Lysate wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer PK-verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK). Als Kontrolle sind in Spur 1 stabil scrapieinfizierte N2a-Zellen („ScN2a“) als Positivkontrolle und in Spur 2 „N2a-Wildtypzellen“ („N2a“) aufgetragen. Die „N2a“-Zellen wurden ebenso wie die Einzelzellklone mittels prionkontaminierten Metallnetzen infiziert und nach Passage 5 PK-verdaut. Das in Spur 1 aufgetragene, PK-verdaute „ScN2a“-Zell-Lysat dient als Positivkontrolle. Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

Da die Subklone 13A7 und 13A15 in Passage 5 nach Infektion ein stärkeres PrP^{Sc}-Signal nach PK-Verdau zeigen, sind diese besser geeignet zum Nachweis von oberflächengebundenen Prionen, als der Ausgangsklon „I13“. Bei der Kultivierung des Subklons 13A15 war es aufgrund einer geringen Resistenz gegenüber einem verspäteten Nährmediumwechsel öfter zu Ausfällen ganzer Schalen gekommen. Deswegen wurden im Folgenden die einfacher zu kultivierenden 13A7-Zellen als Indikatorzellen verwendet. Auch wenn der Nachweis von Proteaseresistentem PrP^{Sc} bei den 13A7-Zellen schon nach Passage 5 möglich war, wurde dieser bei Verwendung als Indikatorzellen erst in Passage 8 durchgeführt. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass bei erfolgreicher Infektion schon genügend proteaseresistentes PrP^{Sc} für den Nachweis vorhanden war.

4.1.2.6 Sensitivität des Indikatorklons

Um die Sensitivität des zellbasierten Nachweisverfahrens für oberflächengebundene Prionen zu testen, wurden die 13A7-Indikatorzellen mit Metallnetzen infiziert, die mit unterschiedlichen Verdünnungen von Hirnhomogenat terminal an 22L-Scrapie erkrankter Mäuse kontaminiert worden waren. Dazu wurde jeweils ein Metallnetz in einer der Verdünnungen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} eines 10%igen Hirnhomogenates für 10 min inkubiert. Nach gründlicher Wäsche der Netze in sterilem PBS wurden die Indikatorzellen mit diesen infiziert. In Passage 8 nach Infektion wurden die Zellen lysiert und auf proteaseresistentes, unlösliches PrP^{Sc} hin untersucht. Dazu wurden die Zelllysate zuerst einem Verdau mit Proteinase K unterzogen und dann, nach Beendigung des Verdau durch Zugabe eines Proteaseinhibitors, in Anwesenheit von 1% Sarcosyl bei 100000 x g ultrazentrifugiert. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Der Westernblot zeigt, dass der Subklon 13A7 noch mit einem Metallnetz infiziert werden konnte, welches mit einer Verdünnung von 10^{-4} des 10% Hirnhomogenats einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus kontaminiert wurde. Dabei wurde die detektierbare PrP^{Sc}-Menge bei stärkerer Verdünnung des Hirnhomogenats, das zur Kontamination der Metallnetze benutzt wurde, immer geringer.

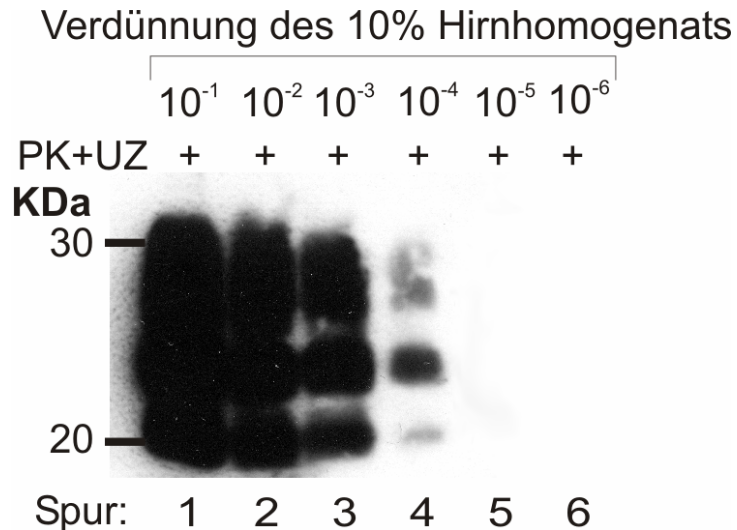


Abbildung 19: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Subklons „13A7“ nach Infektion mittels Metallnetzen, die zuvor in verschiedenen Verdünnungen von 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren (Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-6}). Die Zellen wurden in Passage 8 nach Infektion lysiert. Die Lysate wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer PK-verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK) und anschließend ultrazentrifugiert (100000 x g für 1 Stunde). Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

4.1.3 Tierversuchstest für metallgebundene Prionen

4.1.3.1 Wahl der Indikatortiere und Etablierung der stereotaktischen Operation zur Implantation der Prüfkörper

Der Goldstandard bei Testung auf oberflächengebundene Prionen ist der Tierversuch. Dabei wird einem für Prionen empfindlichen Versuchstier ein Prüfkörper dauerhaft ins Gehirn implantiert. Wenn an der Oberfläche des Prüfkörpers Prionen in ausreichender Menge haften, so erkrankt das Indikatortier an der Prionerkrankung. Verbreitete Indikatortiere zur Testung der Prionwirksamkeit von Dekontaminationsverfahren sind Mäuse und Hamster (Zobeley *et al.* 1999; Fichet *et al.* 2004; Yan *et al.* 2004; Baxter *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2005).

Da auch für die Überprüfung der Prionwirksamkeit der Dekontaminationsprogramme mit Hilfe des Tierversuchs der murine 22L-Prionstamm verwendet werden sollte, wurden Tga20 Mäuse als Indikatortiere gewählt. Diese zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit für 22L-Prionen aus und zeigen eine kurze Inkubationszeit bei der Prioninfektion (Fischer *et al.* 1996). Aus diesem Grund wurden die Tga 20-Mäuse schon in verschiedenen Studien anderer Autoren als Indikatortiere für metallgebundene Prionen verwendet und sind im Hinblick auf den Verlauf der Scrapie-Erkrankung gut charakterisiert (Flechsich *et al.* 2001; Weissmann *et al.* 2002; Jackson *et al.* 2005).

In diesen Studien wurden feine Metalldrähte mit 0,15 mm Durchmesser und 5 mm Länge als Prüfkörper benutzt. Diese sollten auch für den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuch eingesetzt werden.

Die Drähte sollten den Indikatormäusen stereotaktisch im Bereich der Basalganglien ins Gehirn implantiert werden. Dazu wurden mit Hilfe eines Stereotaxieatlanten die Koordinaten für die Trepanation der Schädeldecke bestimmt (Paxinos und Franklin 2003). Die ermittelte Stelle für das Bohrloch in der Schädeldecke lag 2 mm rechts-lateral und 1,5 mm rostral des Bregmas. Ein dort senkrecht eingebrachter Metalldraht sollte direkt im Bereich des Striatums der rechten Großhirnhemisphäre zu liegen kommen.

Das praktische Vorgehen bei der Operation wurde an toten Mäusen erarbeitet. Dazu wurden die Tiere mit Äther getötet und dann in einen stereotaktischen Rahmen für Kleintiere in flacher Kopf-Position fixiert. Nach Freipräparation der Schädeldecke wurde das Bregma lokalisiert und die Schädeldecke an der zuvor festgelegten Stelle mittels eines Feinbohrers (Durchmesser <1,5 mm) eröffnet. Daraufhin wurde der Metalldraht mit Hilfe einer Pinzette senkrecht durch das Bohrloch ins Gehirn eingeführt und durch Druck mit der geschlossenen Pinzette auf das Drahtende vollständig in diesem versenkt. Danach wurden die Gehirne der Tiere heraus präpariert und die Lage der eingebrachten Drähte überprüft. Die Metalldrähte lagen alle im Zielbereich und waren ganz im Gehirn versenkt. Allerdings zeigte sich bei manchen Tieren, dass der Draht mit 5 mm zu lang war und auf der Unterseite des Gehirns aus diesem heraus stand. Da dies bei einem lebendigen Tier eine meningeale Reizung mit Schmerzen hervorrufen hätte können, wurden die Drähte für den Tierversuch statt 5 mm nur 3 mm lang gewählt.

4.1.3.2 Infektion von Tga 20-Mäusen über metallgebundene Prionen

Zur Überprüfung der Infizierbarkeit von Tga20-Mäusen mittels oberflächengebundenen 22L-Prionen wurden zuvor zugeschnittene Metalldrähte mit 0,15mm Durchmesser und 3mm Länge für 14h in 10% Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus inkubiert. Nach gründlichem Waschen durch dreimaliges Vortexen in jeweils frischem PBS wurden die Drähte für 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und den Tieren implantiert.

Gleichzeitig wurden weitere Metalldrähte auf die gleiche Weise präpariert. Diese wurden allerdings nicht im Hirnhomogenat einer prioninfizierten, sondern in dem einer gesunden Maus beschmutzt. Nach der Reinigung in PBS und dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden diese ebenfalls in das Gehirn von Versuchsmäusen eingebracht.

Nach Implantation der Drähte erholten sich die Tiere innerhalb von 1-2 Tagen vollständig. In der darauffolgenden Inkubationsperiode der Scrapieinfektion zeigten die Mäuse keine

klinisch feststellbaren Belastungssymptome oder neurologische Auffälligkeiten. Erst 96 Tage nach Implantation des Metalldrahtes fiel das erste Tier der Gruppe, die prionkontaminierte Metalldrähte implantiert bekommen hatte, durch eine Kopfschiefhaltung auf. In den darauf folgenden Tagen traten auch bei anderen Tieren dieser Gruppe Verhaltensauffälligkeiten auf. 103 Tage nach Implantation der kontaminierten Drähte wurden die ersten Mäuse als terminal krank eingestuft und getötet. In Abbildung 20 ist die Überlebenszeit der einzelnen Tiere in Form einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen. Dabei variieren die Inkubationszeiten der Mäuse, die einen prionkontaminierten Draht implantiert bekamen, zwischen 103 und 119 Tagen, wobei die mittlere Inkubationszeit bei 109 Tagen liegt. Die Tiere, die einen mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus beschmutzten Metalldraht implantiert bekommen hatten, zeigten bis zu ihrer Tötung 236 Tage nach Implantation keine klinischen Auffälligkeiten.

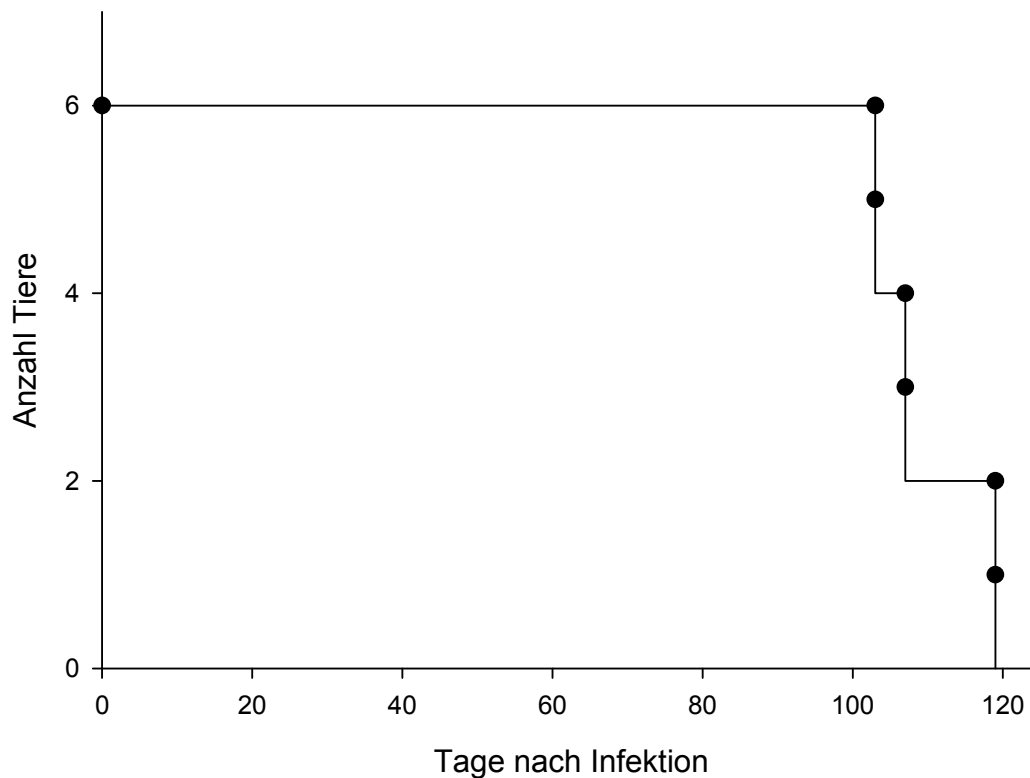


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeit von 6 Tga20-Mäusen nach Implantation eines mit 10% 22L-Hirnhomogenat kontaminierten Metalldrahtes.

Nach dem Tod konnte bei allen Tieren, die einen prionkontaminierten Metalldraht implantiert bekommen hatten, mittels Westernblot oder durch histologische Untersuchung der Gehirne das Vorliegen einer Scrapieinfektion bestätigt werden. In der Histologie fiel auf, dass die scapietypischen, pathologischen Veränderungen hauptsächlich lokalisiert um den eingebrachten Draht herum auftraten. Abbildung 21 zeigt den histologischen

Befund der Gehirne von zwei Mäusen. Dabei hatte das eine Tier (Abbildung 21 A, C, E) einen prionkontaminierten und das andere Tier einen mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus beschmutzten Metalldraht implantiert bekommen (Abbildung 21 B, D, F). In der HE-Färbung (Abbildung 21 A und B) zeigt sich jeweils der Kanal, in dem der Metalldraht implantiert gewesen ist. Um den Metalldraht herum zeigen sich bei dem Tier, welches den prionkontaminierten Draht implantiert bekommen hatte, die für eine Prioninfektion typischen, histologischen Veränderungen. So ist das Hirngewebe in diesem Bereich spongiform aufgelockert und es zeigt sich ein deutlicher Nervenzellverlust (Abbildung 21 A). In der immunhistochemischen Färbung für PrP^{Sc} sind ausgedehnte, retikuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen um den Draht herum nachzuweisen (Abbildung 21 E). Die GFAP-Färbung zeigt eine starke Gliose in diesem Bereich (Abbildung 21 C).

Im Gegensatz zu der prioninfizierten Maus lässt sich in der histologischen Untersuchung des Gehirns, des Tieres, welches den mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus benetzten Metalldraht implantiert bekommen hatte, keine scrapietypische Pathologie nachweisen. Bei dieser Maus zeigt sich in der HE-Färbung keine spongiforme Veränderung des Hirngewebes mit Nervenzelluntergang (Abbildung 21 B). Es lässt sich immunhistochemisch auch kein PrP^{Sc} nachweisen (Abbildung 21 F). In der GFAP-Färbung findet sich auch bei diesem Tier eine leichte Gliose um den Draht herum. Diese ist als unspezifische Reaktion der Gliazellen auf den Reiz des implantierten Metalldrahtes zu verstehen (Abbildung 21 D).

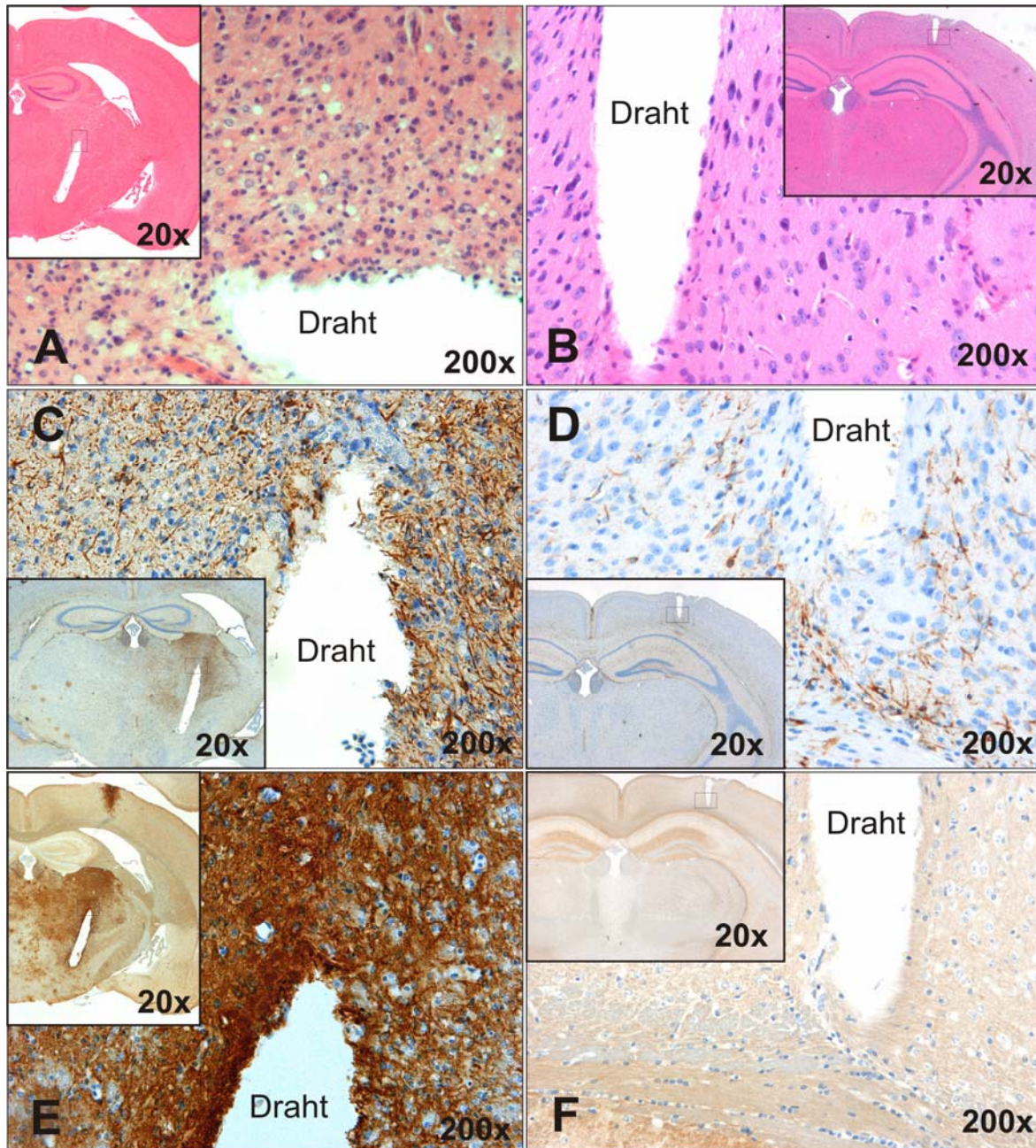


Abbildung 21: Histologische Gehirnschnitte zweier Mäuse. Die eine Maus („22L“) hatte einen mit 22L-Prionen kontaminierten Metalldraht (Schnitt A, C und E), das andere Tier einen, mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus benetzten, Metalldraht implantiert bekommen („Mock“) (Schnitt B, D und F). In dem mit dem Wort „Draht“ markierten Hohlraum war zuvor der Metalldraht eingebracht gewesen. Die kleinen Bilder zeigen jeweils eine Übersicht des Präparates in einer 20-fachen Vergrößerung, während die großen Bilder den mit einem Viereck im Übersichtsbild markierten Bildausschnitt in 200-Facher Vergrößerung darstellen.

Die Bilder A und B zeigen eine HE-Färbung der Hirne der „22L-“ (Bild A) und der „Mock“-Maus (Bild B). In diesen zeigen sich bei der 22L-infizierten Maus die scapietypischen, histologischen Veränderungen, wie Nervenzellverlust und spongiforme Veränderungen. Diese sind bei der „Mock“-Maus nicht nachweisbar.

In der GFAP-Färbung, welche ein Marker für die Gliose ist, zeigt sich bei der „Mock“-Maus (Bild D) eine Aktivierung einzelner Astrozyten, als unspezifische Reaktion auf den implantierten Draht. Die Gliose ist allerdings bei der 22L-infizierten Maus (Bild C) deutlich stärker ausgeprägt.

In der PrP^{Sc}-Färbung lässt sich nur bei dem 22L-infizierten Tier (Bild E) Prionprotein in Form von dichten, retikulären, um den Draht herum konzentrierten, Ablagerungen nachweisen. Das Präparat der „Mock“-Maus ist PrP^{Sc}-negativ.

4.1.3.3 Sensitivität der Indikatortiere für metallgebundene Prionen und Beziehung von Infektionsdosis und Inkubationszeit

Um die Sensitivität der Indikatormäuse für metallgebundene Prionen zu testen, wurden den Tieren Metalldrähte implantiert, die zuvor mit jeweils unterschiedlichen Verdünnungen von 10% Hirnhomogenat terminal an Scrapie erkrankter Mäuse kontaminiert worden waren. Dazu wurden die Drähte mit den Verdünnungen von 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} des 10%igen 22L-Hirnhomogenats für 14h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen durch dreimaliges Vortexen in PBS wurden sie für 2h bei Raumtemperatur getrocknet und dann stereotaktisch in die Gehirne der Tiere implantiert. Auf diese Weise wurden jeweils 7 bis 9 Tiere pro Verdünnung behandelt.

Bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} des verwendeten 10% Hirnhomogenates erkrankten jeweils alle Tiere, die einen damit kontaminierten Metalldraht implantiert bekommen hatten an einer Prioninfektion. Selbst sieben der acht Mäuse, die Metalldrähte implantiert bekommen hatten, welche mit einer Verdünnung von 10^{-7} des 10% Hirnhomogenats inkubiert worden waren, entwickelten eine Scrapieinfektion. Die Sensitivität der Indikatormäuse liegt im vorliegenden Versuch also bei mindestens einer Verdünnung von 10^{-6} des 10% Hirnhomogenats.

Dabei zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Verdünnung des verwendeten Hirnhomogenats und der Inkubationszeit der Tiere. Die Überlebenszeiten der einzelnen Tiere nach Infektion sind in Abbildung 22 in Form einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen. Die Korrelation zwischen Verdünnung des Hirnhomogenats und Inkubationszeit wird in Abbildung 23 verdeutlicht. Dabei lag die mittlere Inkubationszeit nach Infektion mit Drähten, welche mit unverdünntem 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren, bei 109 Tagen. Die Verdünnung des verwendeten Hirnhomogenats um jeweils den Faktor 10 führte zu einem Anstieg der mittleren Inkubationszeit auf 113, 116, 122, 139, 151 und 179 Tage. Bei einer Verdünnung des 10%igen Hirnhomogenates von 10^{-7} hatte sie bei den erkrankten Tieren eine Dauer von 195 Tagen erreicht. Eine der acht Mäuse, der Verdünnungsstufe 10^{-7} zeigte bis 426 Tage nach Implantation keinen Hinweis auf eine Prioninfektion. Nach Tötung des Tieres lies sich in der postmortalen, histologischen Untersuchung des Gehirnes, keine Prioninfektion nachweisen.

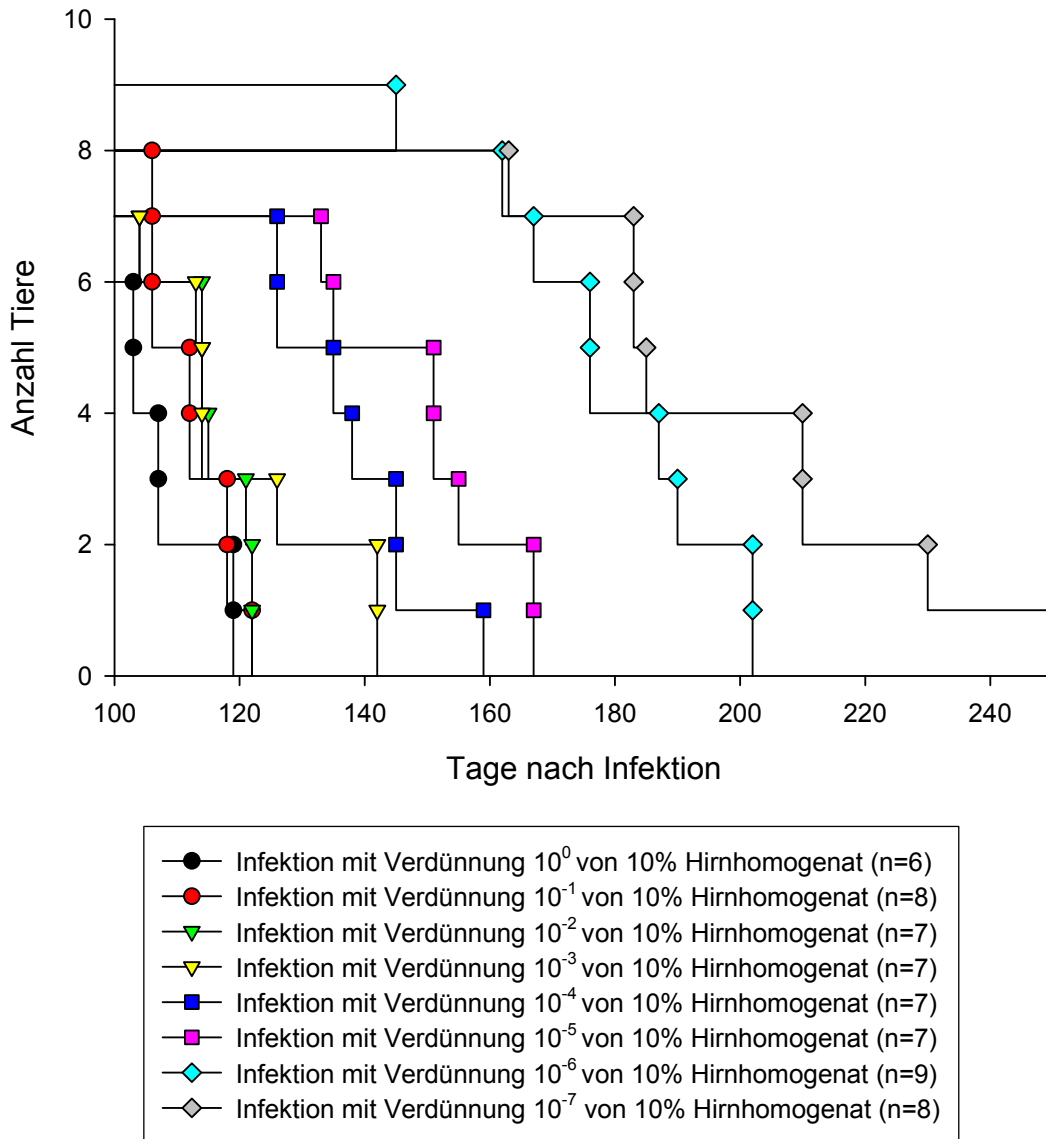


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben der Indikatortiere nach Implantation eines prionkontaminierten Metalldrahtes in Abhängigkeit zur Verdünnung des zur Kontamination verwendeten Hirnhomogenates.

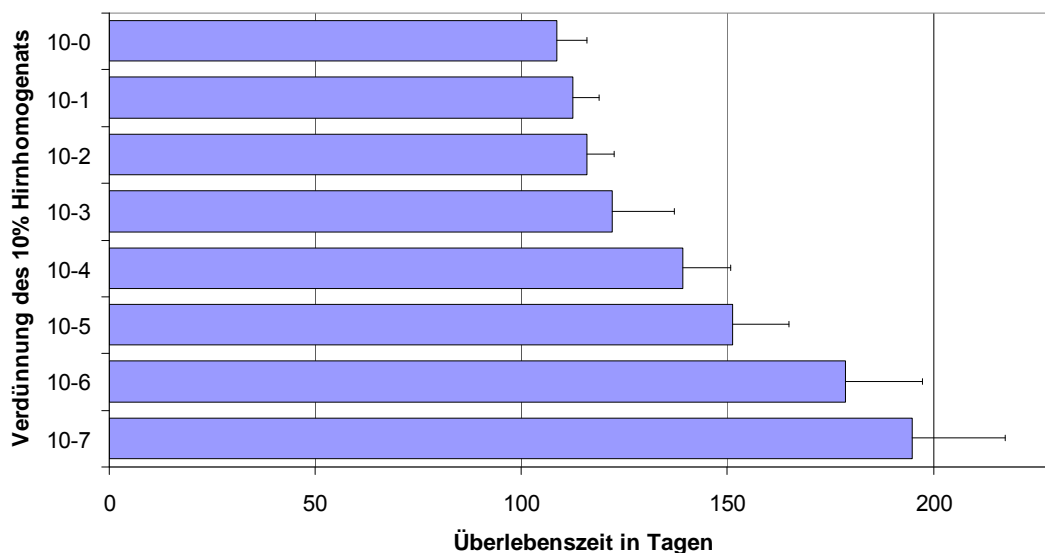


Abbildung 23: Überlebensdauer der Indikatortiere nach Implantation eines prionkontaminierten Metalldrahtes, in Abhängigkeit der Verdünnung des zur Kontamination der Drähte verwendeten 10%igen Hirnhomogenats. Die Balken beschreiben die durchschnittliche Inkubationszeit der Mäuse der jeweiligen Verdünnungsgruppe. Der T-förmige Strich am Ende jedes Balkens zeigt die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe. Anzahl der Tiere pro Gruppe zwischen 6 und 9 Tieren ($n=6$ für Gruppe 10^0 ; $n=7$ für Gruppen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} ; $n=8$ für Gruppe 10^{-1} ; $n=9$ für Gruppe 10^{-6}).

*In der Gruppe 10^{-7} sind von den acht Tieren der Verdünnungsstufe nur die sieben berücksichtigt, die an der Prioninfektion erkrankt sind.

4.2 Evaluierung der Prionwirksamkeit der Dekontaminationsverfahren mit Hilfe der etablierten Nachweisverfahren für metallgebundene Prionen

4.2.1 Chemolumineszenztest

Die erste Evaluation der Prionwirksamkeit der beiden Dekontaminationsprogramme B und C erfolgte mit Hilfe des Chemolumineszenztests. Dabei wurde das nach Behandlung der Prüfkörper mit den Verfahren B und C zu detektierende PrP erfasst und mit der PrP-Menge nach Reinigung durch Referenzverfahren A verglichen.

Als Prüfkörper wurden Metallnetze in 10% Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus für 10 min inkubiert, kurz in PBS gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wurden die Netze mit dem jeweiligen zu testenden Dekontaminationsverfahren behandelt und dann mit dem Chemolumineszenztest beprobt. Außerdem wurden die mit Prionen kontaminierten Prüfkörper in einem zweiten Ansatz vor Behandlung mit dem jeweiligen Dekontaminationsverfahren mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut benetzt. Dadurch sollte die Ausgangsbeschmutzung bei der Aufbereitung von Operationsbesteck möglichst realistisch imitiert werden. Nach Antrocknung des geronnenen Blutes erfolgten die Reinigung mit den zu testenden

Dekontaminationsverfahren und die anschließende Testung auf detektierbares PrP mit Hilfe des Chemolumineszenztests.

Zusätzlich zu den prionkontaminierten Metallnetzen wurden einige analog mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus („Mock“) benetzt. Diese Netze wurden daraufhin mit dem Referenzverfahren A behandelt. Diese Kontrolle sollte für den Fall, dass nach Behandlung der prionkontaminierten Metallnetze mit dem Referenzverfahren A ein PrP-Signal zu detektieren sei, die Unterscheidung erlauben, ob es sich dabei um ein PrP^{Sc}-spezifisches Signal handelt, oder nicht. Wenn gleichzeitig die ebenso behandelten „Mock“-Netze negativ für PrP getestet worden wären, so hätte es sich bei dem Signal des prionkontaminierten Metallnetzes um ein PrP^{Sc}-spezifisches Signal handeln müssen.

Als weitere Kontrollen dienten Netze, die in 10% Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus beziehungsweise einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus inkubiert wurden und dann keinem Dekontaminationsverfahren zugeführt wurden. Diese Netze wurden nach Reinigung in PBS getrocknet und dann analog zu den anderen Prüfkörpern mit dem Chemolumineszenztest untersucht. Zusätzlich wurde der Test auf nicht beschmutzte, unbehandelte Metallnetze angewendet.

Das Ergebnis der Evaluierung der Dekontaminationsverfahren mit dem Chemolumineszenztest ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei wurden jeweils 4 Metallnetze parallel für jede Behandlungsart untersucht. Das mit Hilfe der *GeneTools* Software quantifizierte Chemolumineszenzsignal für PrP ist in Form des ermittelten MPVs aufgetragen. Die Höhe der einzelnen Säulen entspricht dem jeweiligen, aus paralleler Testung von 4 Metallnetzen ermittelten, durchschnittlichem MPV. Die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe ist durch einen T-förmigen Strich oberhalb der entsprechenden Säule dargestellt.

Das durchschnittliche Chemolumineszenzsignal der mit dem Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus beschmutzten Netze („PrP^{0/0}“) liegt dabei nahe am mittleren MPV der unbehandelten Netze („unbehandelt“). Die Benetzung mit Hirnhomogenat führte demnach ohne Anwesenheit von PrP zu keinem verstärkten Chemolumineszenzsignal. Im Gegensatz dazu zeigen die mit dem Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus beschmutzten und nur in Puffer gereinigten Netze („22L-Hirnhomogenat“), einen deutlich höheren durchschnittlichen MPV. Dieser liegt über der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs.

Auch die mit prionhaltigem Hirnhomogenat benetzten und mit dem Referenzverfahren A behandelten Metallnetze („Verfahren A“) zeigen einen mittleren MPV, welcher über der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs liegt. Dies trifft auch für die prionkontaminierten Netze zu, die vor Behandlung mit Verfahren A zusätzlich mit Blut beschmutzt wurden („Verfahren A + Blut“). Das Verfahren A hinterlässt

also ein mit dem Chemolumineszenztest zu detektierendes PrP-Signal auf den behandelten Oberflächen. Da auch die „Mock“-kontaminierten und mit Verfahren A behandelten Netze („Mock“ und „Mock + Blut“) einen mittleren MPV zeigen, der über der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs liegt, handelt es sich bei dem detektierten PrP Signal um kein reines PrP^{Sc}- Signal. Es muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass das Referenzverfahren A PrP^C sowie PrP^{Sc} auf der behandelten Oberfläche zurück lässt.

Die auf den mit den Verfahren B und C behandelten, prionkontaminierten Metallnetzen („Verfahren B“ und „Verfahren C“) zu detektierenden durchschnittlichen Chemolumineszenzsignale liegen unter denen der „PrP^{0/0}“-Netze. Da sie sogar unter der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs liegen, handelt es sich um einen negativen PrP-Nachweis. Bei den vor Behandlung mit den Verfahren B und C zusätzlich zur Kontamination mit prionhaltigem Hirnhomogenat auch mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzten Metallnetzen („Verfahren B + Blut“ und „Verfahren C + Blut“) liegt die detektierte, mittlere Chemolumineszenz ebenfalls unter der der „PrP^{0/0}“-Netze. Allerdings liegt nur der durchschnittliche MPV der „Verfahren C + Blut“-Netze unter der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs. Es kann also nur bei diesen Metallnetzen von einem sicher negativen PrP-Nachweis mit Hilfe des Chemolumineszenztests ausgegangen werden. Der durchschnittlich für die „Verfahren B + Blut“-Netze bestimmte MPV liegt im Bereich der doppelten Standardabweichung der für die „PrP^{0/0}“-Netze bestimmten MPVs. In diesem Bereich ist keine sichere Aussage über das Vorhandensein von PrP möglich.

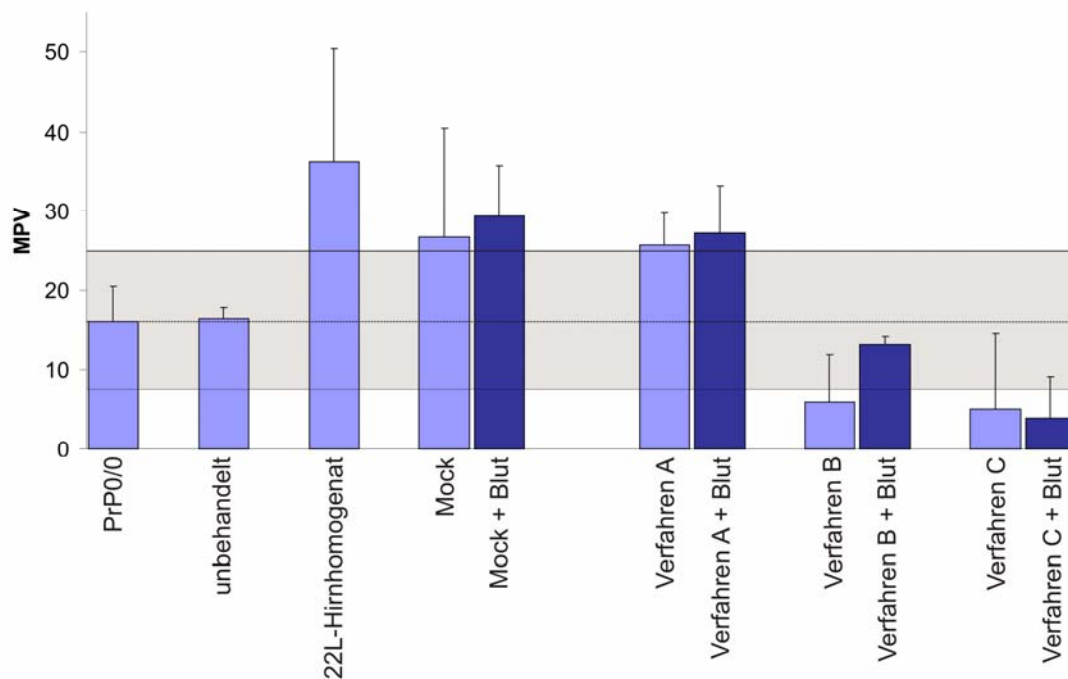


Abbildung 24: Chemolumineszenzsignal von prionkontaminierten Metallnetzen nach Behandlung mit unterschiedlichen Dekontaminationsverfahren.

„Verfahren A“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert und anschließend mit Verfahren A behandelt; „Verfahren A + Blut“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert, zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt und anschließend mit Verfahren A behandelt; „Verfahren B“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert und anschließend mit Verfahren B behandelt; „Verfahren B + Blut“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert, zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt und anschließend mit Verfahren B behandelt; „Verfahren C“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert und anschließend mit Verfahren C behandelt; „Verfahren C + Blut“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert, zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt und anschließend mit Verfahren C behandelt; „Mock“: Metallnetze mit Hirnhomogenat einer gesunden Maus kontaminiert und anschließend mit Verfahren A behandelt; „Mock+Blut“: Metallnetze mit Hirnhomogenat einer gesunden Maus kontaminiert, zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt und anschließend mit Verfahren A behandelt; „22L-Hirnhomogenat“: Metallnetze mit 22L-Hirnhomogenat kontaminiert und anschließend nur in PBS gewaschen; „unbehandelt“: unbehandelte Metallnetze; „PrP^{0/0}“: Metallnetze mit dem Hirnhomogenat einer PrP^{0/0}-Maus beschmutzt und anschließend in PBS gereinigt.

Die Säulen zeigen den durchschnittlichen MPV der jeweiligen Gruppe. Pro Gruppe wurden 4 verschiedene Metallnetze beprobt. Der T-förmige Strich über den Säulen gibt die Standardabweichung der jeweiligen Gruppe wieder.

Die gestrichelte Linie zeigt den durchschnittlichen MPV der „PrP^{0/0}“-Netze. Der graue Balken zeigt den durchschnittlichen MPV der „PrP^{0/0}“-Netze plus und minus der doppelten Standardabweichung dieser Gruppe. MPV-Werte im Bereich des grauen Balkens erlauben keine sichere Aussage über das Vorhandensein von PrP. Werte unterhalb des grauen Balkens sprechen für einen negativen und Werte über dem grauen Balken für einen positiven PrP-Nachweis.

Immunodetektion von PrP mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und meerrettichperoxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000); Chemolumineszenzreagenz ECLplus;

4.2.2 Zellkulturtest

Nach der ersten Evaluierung mit Hilfe des Chemolumineszenztests, der nur in der Lage ist, das Vorhandensein des 4H11-Epitops des PrP-Proteins auf Oberflächen zu detektieren, sollte im nächsten Schritt die Dekontaminationsleistung der Verfahren A, B und C im Hinblick auf die Beseitigung der Infektiosität von den Metalloberflächen untersucht werden. Dazu wurde der Zellkulturtest verwendet.

Zur Prüfung der Dekontaminationsverfahren mit Hilfe des Zellkulturtests wurden die gleichen Metallnetze wie für die Durchführung des Chemolumineszenztests verwendet. Diese wurden auf dieselbe Weise mit Prionen kontaminiert, getrocknet und den zu testenden Dekontaminationsverfahren zugeführt. Dann wurden die so behandelten Netze in eine Zellkulturschale überführt und mit den Indikatorzellen 13A7 beprobt. In Passage 8 nach Infektion erfolgte die Testung der Zellen auf das Vorhandensein einer Prioninfektion. Dazu wurden sie lysiert, das Lysat für 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml Proteinase K verdaut und nach Abbruch des Verdaus durch Zugabe eines Proteaseinhibitors (nach Anweisung des Herstellers) bei 100000 x g, in Anwesenheit von 1% Sarcosyl, ultrazentrifugiert. Das in TNE resuspendierte Pellet wurde dann mit Hilfe eines Westernblots auf vorhandenes PrP^{Sc} hin untersucht.

Ebenso wie bei der Überprüfung der Dekontaminationsverfahren mit Hilfe des Chemolumineszenztests wurde auch bei der Prüfung mit Hilfe des Zellkulturtests ein zweiter Ansatz durchgeführt. In diesem wurden die prionkontaminierten Metallnetze zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt, bevor sie mit den zu testenden Dekontaminationsverfahren behandelt wurden.

Zusätzlich zu den mit prionhaltigem Hirnhomogenat kontaminierten Metallnetzen wurden auch Netze verwendet, die auf gleiche Weise mit Hirnhomogenat von nicht mit Prionen infizierten Mäusen benetzt wurden („Mock“). Diese wurden vor Beprobung mit den Indikatorzellen mit dem Referenzverfahren A behandelt. Die so behandelten „Mock“-Netze dienten zum Einen dazu, einen von PrP^{Sc} unabhängigen Einfluss des Hirnhomogenats und der Metallnetze auf die Indikatorzellen auszuschließen, zum anderen sollte damit überprüft werden, ob es durch Behandlung von prionkontaminierten und nicht prionkontaminierten Metallnetzen im selben Reinigungs- und Desinfektionsgerät (RDG) zur Kreuzkontamination zwischen den Netzen kommt.

Außerdem wurden die Indikatorzellen noch auf einem Metallnetz ausgesät, welches nach Kontamination mit dem Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus keinem Dekontaminationsverfahren ausgesetzt worden war („22L“). Anstatt dessen wurde das Netz nach Kontamination nur ausgiebig in sterilem PBS gereinigt. Diese Positivkontrolle diente dazu, zu überprüfen, ob die Infektion der Indikatorzellen überhaupt

funktioniert hatte. Dadurch ließ sich ein Fehler bei der Infektion ausschließen, falls die Zellen nach Wachstum auf den mit den Dekontaminationsverfahren behandelten Netzen keine Prioninfektion zeigten.

In Abbildung 25 ist das Ergebnis der Überprüfung der Prionwirksamkeit der verschiedenen Reinigungsverfahren A, B und C mit dem Zellkulturtest dargestellt. Mit Hilfe des abgebildeten Westernblots wurden die in Passage 8 hergestellten Lysate der Indikatorzellen auf vorhandenes PrP^{Sc} hin untersucht, um eine Infektion der Zellen nachzuweisen.

Dabei zeigt das aufgetragene Proteinase K-verdaute Lysat einer stabil mit Prionen infizierten N2a-Zelllinie („ScN2a“), dass die Westernblot-Analyse der Lysate auf PrP^{Sc} funktioniert hat. Das für dieses Lysat detektierte Chemolumineszenzsignal zeigt die typischen drei Banden des un-, mono- und diglykosylierten PrP^{Sc}.

Ebenso gelang für das in Spur 9 aufgetragene Lysat der Indikatorzellen, die mit Hilfe eines 22L-kontaminierten und anschließend nur in Puffer gereinigten Netzes infiziert worden waren, ein positiver PrP^{Sc}-Nachweis. Dies zeigt, dass die Infektion der Indikatorzellen im vorliegenden Versuch funktioniert hatte.

Wie erwartet ist im Lysat der Zellen, die auf dem mit Verfahren A gereinigten „Mock“-Netz kultiviert worden waren, kein PrP^{Sc}-Signal detektierbar (Spur 7). Dies trifft auch für das in Spur 8 aufgetragene Lysat zu. Dies stammt von Indikatorzellen, die auf dem „Mock“-Netz kultiviert wurden, welches vor Behandlung mit dem Referenzverfahren A zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt worden war. Die Behandlung der „Mock“-Netze in einem RDG, in welchem zuvor prionkontaminierte Metallnetze gereinigt wurden, führt also zu keiner mit Hilfe der Indikatorzellen detektierbaren Kreuzkontamination der Metallnetze.

Ebenso gelang kein positiver PrP^{Sc} Nachweis in den Lysaten der Zellen, mit denen die mit Verfahren A, B, und C behandelten, prionkontaminierten Metallnetze beprobt worden waren (Spur 1, 3 und 5). Dies trifft auch für die Lysate der Zellen zu, die auf prionkontaminierten Metallnetzen kultiviert wurden, welche vor Dekontamination mit den zu testenden Verfahren A, B und C, zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut benetzt worden waren (Spur 2, 4 und 6). Die Verfahren B und C, sowie das Referenzverfahren A führten also zu einer Reduktion der an den Netzen anhaftenden Infektiosität unter die Nachweisgrenze des Zellkulturtests. Dies traf auch für zusätzlich mit Blut kontaminierte Netze zu.

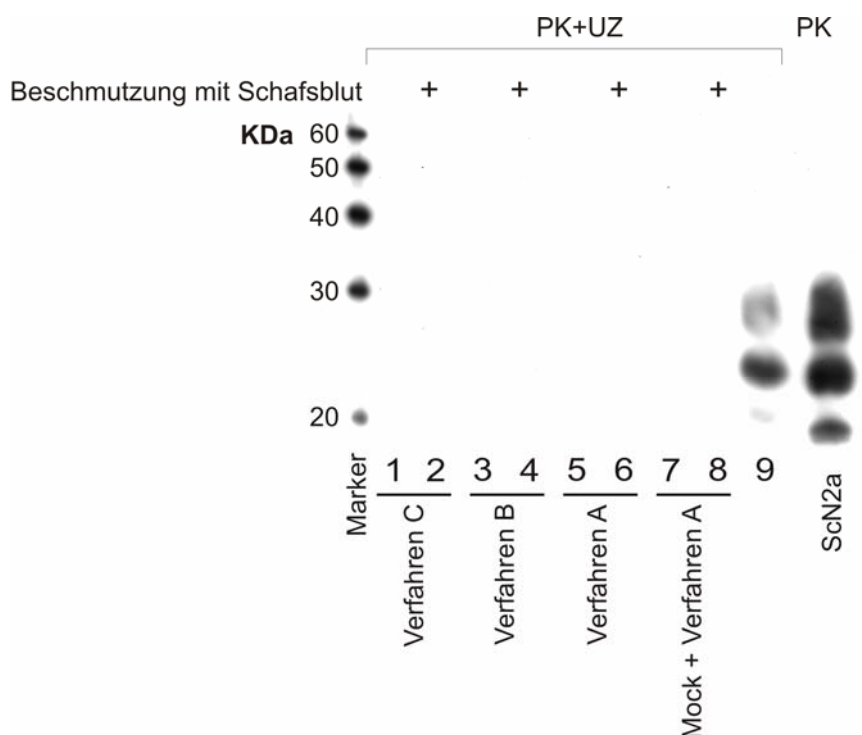


Abbildung 25: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} in Lysaten des Indikatorklons „13A7“ nach Infektion mittels prionkontaminierten Metallnetzen, die zuvor mit jeweils verschiedenen Dekontaminationsverfahren behandelt worden waren (Verfahren A, B und C). Dabei wurden die Metallnetze nach Antrocknung der Prionkontamination entweder sofort dem jeweiligen Dekontaminationsverfahren zugeführt (Spur 1, 3 und 5) oder zuvor zusätzlich mit gerinnungsaktiviertem Schafsblut beschmutzt (Spur 2, 4 und 6).

Als Kontrollen wurden mit Hilfe der Indikatorzellen zusätzlich Metallnetze beprobt, die mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus beschmutzt und anschließend mit Verfahren A behandelt wurden („Mock+Verfahren A“; Spur 7 ohne und Spur 8 mit zusätzlicher Schafsblutbeschmutzung). Als Positivkontrolle diente ein prionkontaminiertes Metallnetz welches vor Beprobung mit Hilfe der Indikatorzellen nur in PBS gereinigt wurde (Spur 9). Außerdem wurde zusammen mit den anderen Proben auch das Lysat von stabil scrapieinfizierten N2a-Zellen auf das SDS-Gel aufgetragen („ScN2a“).

Die Zellen wurden in Passage 8 nach Infektion lysiert. Die Lysate wurden vor der Denaturierung im Probenpuffer PK-Verdaut (30 min bei 37°C mit 10 µg/ml PK) und anschließend ultrazentrifugiert (100000 x g für 1 Stunde).

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

4.2.3 Tierversuch

Nach erfolgter Evaluation der Prionwirksamkeit der beiden Dekontaminationsverfahren B und C *in vitro* wurde eine endgültige Überprüfung der Prionwirksamkeit *in vivo* angeschlossen. Da nur das Verfahren B auch eine für die breite Anwendung in der Routineaufbereitung von chirurgischen Instrumenten nötige Materialverträglichkeit besitzt, wurde die Testung im Tierversuch nur für das Verfahren B durchgeführt.

Dazu wurden kleine Metalldrähte als Prüfkörper benutzt. Nach Kontamination in 10% Hirnhomogenat von terminal an 22L-Scrapie erkrankten Mäusen, erfolgte die Behandlung der Drähte mit Verfahren B. Anschließend wurde jeweils einer der so behandelten Prüfkörper stereotaktisch in das Gehirn von acht Indikatormäusen implantiert.

Analog zu den mit Verfahren B behandelten wurden auch kontaminierte Drähte mit dem Referenzverfahren A gereinigt. Auch von diesen Drähten wurde jeweils einer in das Gehirn von acht Indikatormäusen eingebracht. Dies sollte einen direkten Vergleich der Prionwirksamkeit zwischen den beiden Verfahren ermöglichen.

Als Kontrolle wurden prionkontaminierte Metalldrähte mit einem etablierten, zumindest partiell prionwirksamen Verfahren behandelt. Dazu wurden sie für 2 Std. bei 134°C autoklaviert, bevor jeweils einer der Drähte in das Gehirn von weiteren acht Indikatormäusen implantiert wurde.

236 Tage nach Implantation der Drähte wurden die Tiere getötet, sofern sie noch nicht vorher Symptome der terminalen Scrapieinfektion gezeigt hatten. Diese Zeitspanne entspricht mehr als der doppelten, mittleren Inkubationszeit der Positivkontrolle. Als Positivkontrolle dienten Mäuse welchen Metalldrähte implantiert wurden, die mit 10% Hirnhomogenat kontaminiert und anschließend keinem Dekontaminationsverfahren zugeführt worden waren. Diese Tiere zeigten eine durchschnittliche Inkubationszeit von 109 Tagen nach Implantation.

Nach der Tötung der Tiere wurden diese auf das Vorhandensein einer Prioninfektion hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Gehirne der Tiere mittels Westernblot oder mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} getestet.

Das Überleben der Tiere nach Implantation der Prüfkörper ist in Abbildung 26 in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Von den 8 Tieren, die einen Draht implantiert bekommen hatten, welcher zuvor mit dem Referenzverfahren A behandelt wurden (Gruppe „Verfahren A“), erkrankten drei innerhalb der 236-tägigen Versuchsdauer an der Scrapieinfektion. Im Gegensatz dazu zeigten weder Tiere der Gruppe, die einen mit dem Verfahren B behandelten Draht (Gruppe „Verfahren B“), noch Tiere der Gruppe, die einen bei 134°C für 2 Stunden autoklavierten Metalldraht implantiert bekommen hatten (Gruppe „Autoklaviert 134°C 2h“), Symptome einer Prionerkrankung. Ein Tier der Gruppe „Verfahren B“ musste 161 Tage nach Implantation des Prüfkörpers getötet werden, da es sich eine große Verletzung am Rücken zugezogen hatte. Dieses Tier wurde beim späteren Vergleich der Überlebenszeiten nicht berücksichtigt.

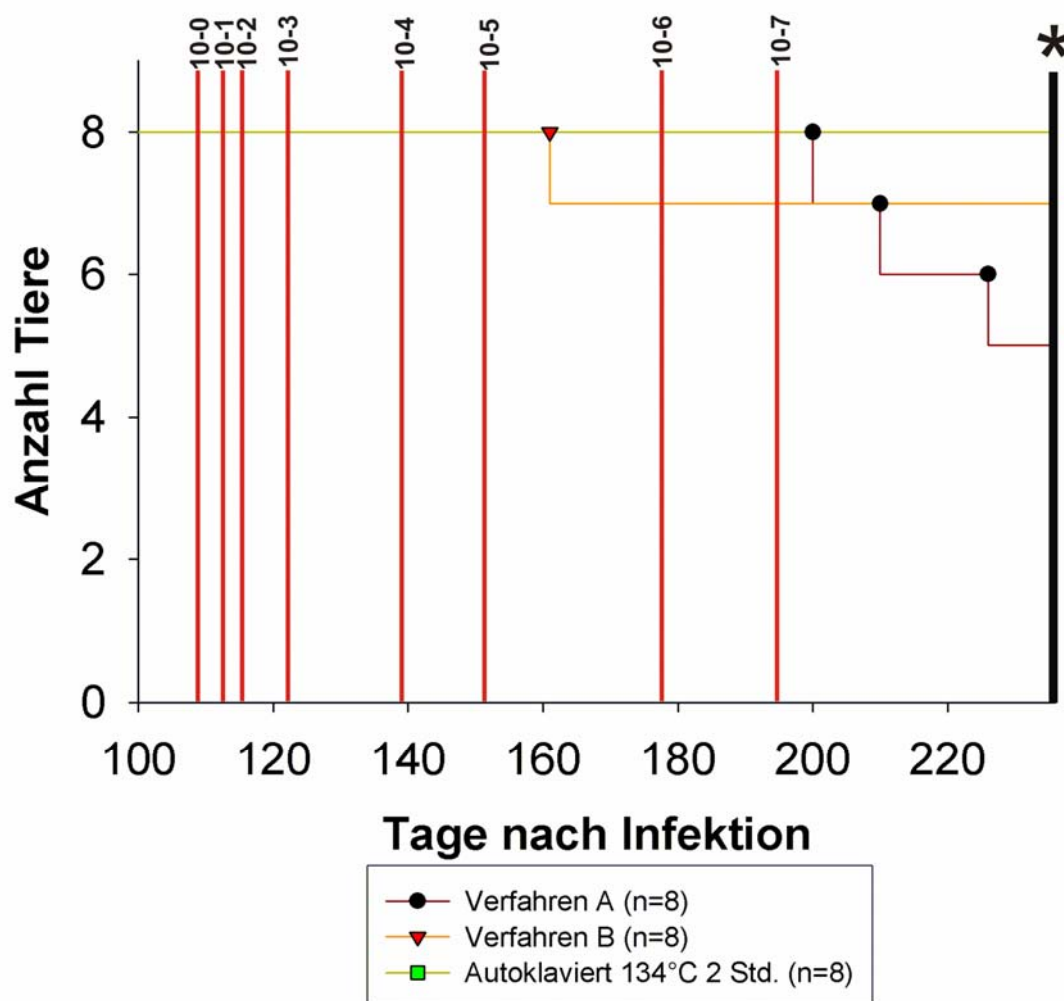


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve des Überlebens der Indikatormäuse nach Implantation prionkontaminierter und mit verschiedenen Dekontaminationsverfahren behandelter Metalldrähte. Nach 236 Tagen (Zeitpunkt „*“) wurde der Versuch abgebrochen und alle zu diesem Zeitpunkt noch nicht erkrankten Tiere getötet. Bis zum Versuchsabbruch erkrankten drei Tiere, die einen mit „Verfahren A“ behandelten Metalldraht implantiert bekommen hatten, an einer Prioninfektion. Weder Tiere, die einen mit „Verfahren B“ behandelten, noch einen autoklavierten Metalldraht implantiert bekommen hatten, erkrankten in diesem Zeitraum an einer Prionerkrankung. Ein Tier der Gruppe „Verfahren B“ musste nach 161 Tagen getötet werden, da es sich eine große Verletzung zugezogen hatte.

Die roten, senkrechten Linien zeigen die durchschnittliche Inkubationszeit der Indikatortiere nach Implantation von Metalldrähten, die mittels verschiedenen Verdünnungen von 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren (10⁻⁰ bis 10⁻⁷; siehe Kapitel 4.1.3.3). Dabei wurden bei der durchschnittlichen Inkubationszeit der Verdünnung 10⁻⁷ nur die sieben erkrankten Tiere der Gruppe berücksichtigt.

Weder bei diesem Tier, noch bei einem anderen Tier der Gruppen „Verfahren B“ und „Autoklaviert 134°C 2h“ ließ sich nach dem Tod PrP^{Sc} im Gehirn nachweisen. Bei den drei Tieren der Gruppe „Verfahren A“, welche vor Beendigung des Versuchs Symptome der Scrapieinfektion gezeigt hatten, konnte diese nach dem Tod durch den Nachweis von PrP^{Sc} im Westernblot, beziehungsweise in der histologischen Untersuchung, bestätigt werden. Darüber hinaus gelang bei drei weiteren Tieren der Gruppe „Verfahren A“ der

Nachweis einer Scrapieinfektion durch Detektion von PrP^{Sc} in der postmortalen Untersuchung des Gehirns. Diese Tiere hatten bis zur Beendigung des Versuchs keine Krankheitssymptome gezeigt (Abbildung 27, Spur 12 und 13). Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Untersuchung der Gehirne von jeweils 6 Tieren der Gruppen „Verfahren A“ und „Verfahren B“ für PrP^{Sc}.

Mit Hilfe der Indikatormäuse ließ sich also auf der Oberfläche von 6 der 8 mit Verfahren A behandelten Prüfkörper Prioninfektiosität nachweisen, während dieser Nachweis weder auf den mit Verfahren B, noch mit dem Autoklaven bei 134°C für 2h behandelten Drähten gelang.

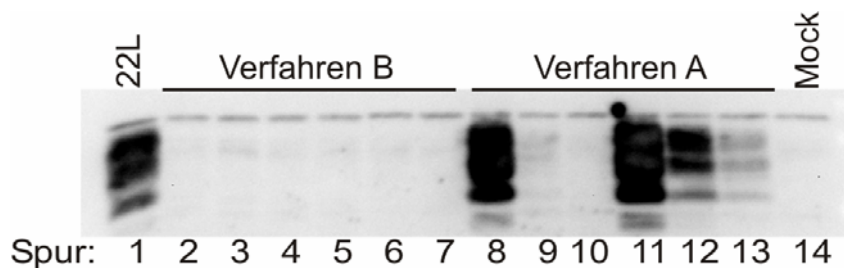


Abbildung 27: Westernblot zum Nachweis von PrP^{Sc} im Gehirn von Indikatortieren nach Implantation von prionkontaminierten Metalldrähten, welche zuvor mittels Verfahren A (Spur 8-13) oder Verfahren B (Spur 2-7) behandelt wurden. Von jeder Gruppe wurden dabei bei 6 Tieren ein Westernblot und von 2 Tieren eine histologische Untersuchung des Gehirns durchgeführt. Die mittels Westernblot auf vorhandenes PrP^{Sc} untersuchten Hirnhomogenate wurden vor Denaturierung im Probenpuffer mit Proteinase K (100 µg/ml für 1h bei 37°C) verdaut. Von den Tieren der Gruppe „Verfahren A“ erkrankten 2 der mittels Westernblot untersuchten vor Beendigung des Versuchs. Deren Hirnhomogenat ist in Spur 8 (terminal erkrankt nach 226 Tagen) und in Spur 11 (terminal erkrankt nach 200d) aufgetragen. Die anderen untersuchten Tiere zeigten bis zum Versuchsabbruch nach 236 Tagen keine Krankheitssymptome.

Als Positivkontrolle ist in Spur 1 das Hirnhomogenat einer Indikatormaus aufgetragen, welche einen mit 22L-Hirnhomogenat („22L“) kontaminierten und anschließend nur mit Puffer gewaschenen Metalldraht implantiert bekommen hatte. In Spur 14 ist das Hirnhomogenat einer Indikatormaus aufgetragen, welche einen, mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus („Mock“), kontaminierten Metalldraht implantiert bekommen hatte. Auch die Hirnhomogenate der Kontrolltiere wurden vor Denaturierung im Probenpuffer mit Proteinase K (100 µg/ml für 1h bei 37°C) verdaut.

Immunodetektion mit Erstantikörper 4H11 (1:2000) und Zweitantikörper Ziege-Anti-Maus (1:5000); Chemolumineszenzreaktion mit ECLplus-Reagenz.

In Abbildung 26 sind zusätzlich die in Kapitel 4.1.3.3 ermittelten durchschnittlichen Inkubationszeiten der Indikatortiere nach Implantation von Metalldrähten aufgetragen, welche zuvor mit unterschiedlichen Verdünnungen von 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren. Dabei fällt auf, dass die mittlere Inkubationszeit der erkrankten Tiere nach Implantation von Drähten, welche zuvor mit 10⁻⁷ verdünntem 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren, nur bei 195 Tagen lag. Die ersten Tiere, die einen mit Verfahren A behandelten Draht implantiert bekommen hatten, starben allerdings erst nach

200 Tagen. Bei Betrachtung der Inkubationszeiten der Tiere beider Gruppen zeigt sich, dass Verfahren A im Vergleich zur Implantation eines Metalldrahtes der Verdünnungsstufe 10^{-7} zu einem signifikant längerem Überleben der Mäuse geführt hat (einfacher, einseitiger T-Test mit Signifikanzniveau 97,5% und $\alpha=2,5\%$ bei $n=8$). Aus dieser Tatsache lässt sich darauf schließen, dass das Verfahren A zu einer Reduktion der ursprünglichen Infektiosität, nach Kontamination mit dem 10% Hirnhomogenat, von mehr als 7 log geführt hat. Da Verfahren B und das Autoklavieren bei 134°C für 2h zu einem signifikant längerem Überleben als Verfahren A geführt haben (einfacher, einseitiger T-Test mit Signifikanzniveau 87,5% und $\alpha=12,5\%$ bei $n=7$ bei Verfahren B, bzw. $n=8$ beim Autolavieren), kann für diese Verfahren von einer Reduktion der ursprünglichen Infektiosität um deutlich mehr als 7 log ausgegangen werden.

In Abbildung 28 sind die histologischen Schnitte der Gehirne jeweils einer Maus der Gruppe „Verfahren A“ (Abbildung 28 A und C) und „Verfahren B“ (Abbildung 28 B und D) abgebildet. Dabei ist jeweils der Kanal zu sehen, in dem der Metalldraht implantiert war. Um den Metalldraht herum zeigen sich bei dem Tier aus der Gruppe „Verfahren A“ die für eine Prioninfektion typischen, histologischen Veränderungen. So ist das Hirngewebe in diesem Bereich spongiform aufgelockert und es zeigt sich ein deutlicher Nervenzellverlust. In der immunhistochemischen Färbung für PrP^{Sc} sind ausgedehnte, retikuläre PrP^{Sc} -Ablagerungen um den Draht herum nachzuweisen (Abbildung 28 A). Die GFAP-Färbung zeigt eine starke Gliose in diesem Bereich (Abbildung 28 C).

Im Gegensatz dazu zeigt die histologische Untersuchung des Gehirns des Tieres aus der Gruppe „Verfahren B“ keine für eine Prionerkrankung typischen Veränderungen. Bei diesem Tier lässt sich immunhistochemisch kein PrP^{Sc} nachweisen (Abbildung 28 B) und das Hirngewebe um den Draht herum zeigt keine Spongiformität mit Nervenzellverlust. In der GFAP-Färbung lässt sich auch bei diesem Tier eine leichte Gliose um den Draht herum nachweisen (Abbildung 28 D). Diese ist als unspezifische Reaktion der Gliazellen auf einen Reiz, wie die Implantation des Metalldrahtes zu verstehen.

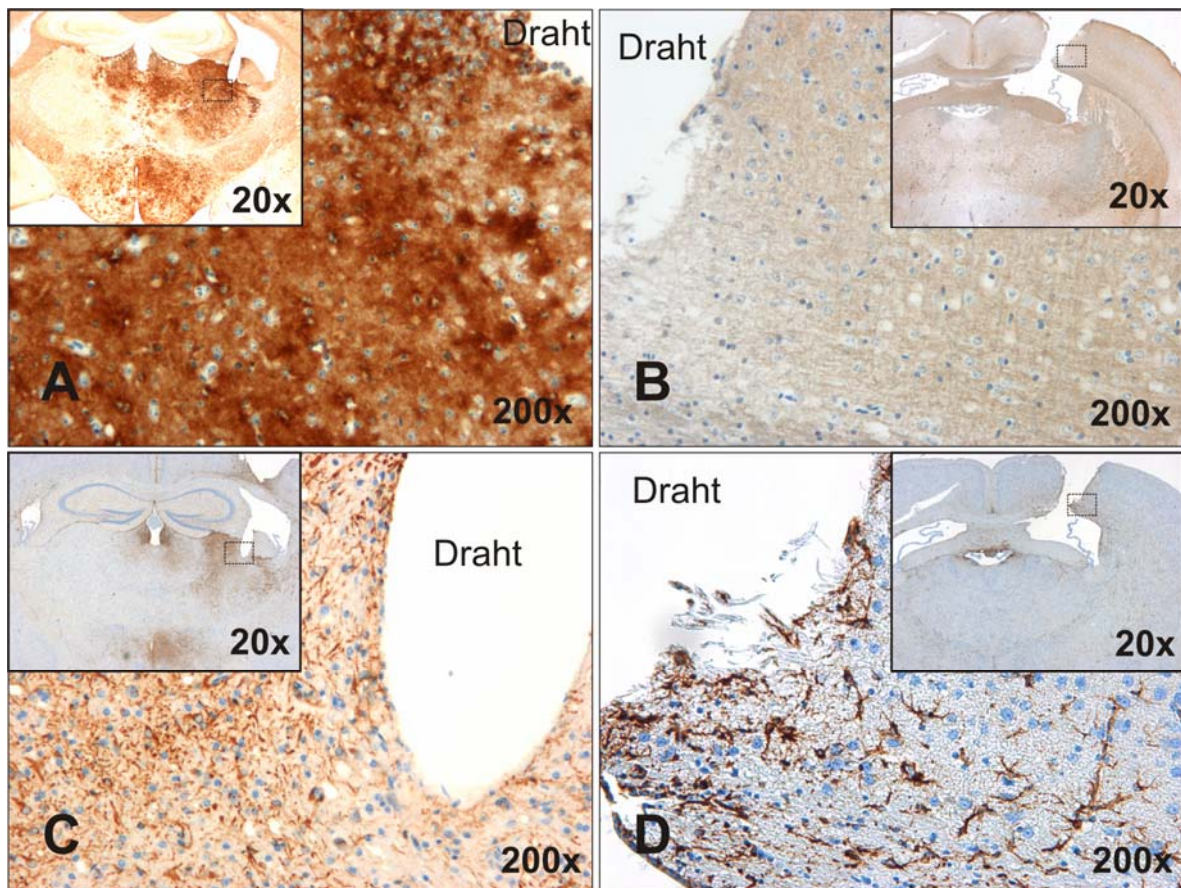


Abbildung 28: Histologische Gehirnschnitte zweier Indikatormäuse, die jeweils einen 22L-prionkontaminierten und anschließend mit einem zu testenden Reinigungsverfahren behandelten Metalldraht implantiert bekommen hatten. Die Schnitte A und C stammen von einem Tier, welches einen mit „Verfahren A“, die Schnitte B und D von einem Tier, das einen mit „Verfahren B“ behandelten Prüfkörper implantiert bekommen hatte. In dem in den Schnitten mit dem Wort „Draht“ markierten Hohlraum war zuvor der Metalldraht eingebracht gewesen. Die kleinen Bilder zeigen jeweils eine Übersicht des Präparates in einer 20-fachen Vergrößerung, während die großen Bilder den mit einem Viereck im Übersichtsbild markierten Bildausschnitt in 200-Facher Vergrößerung darstellen.

Die Bilder A und B zeigen eine immunhistochemische PrP^{Sc}-Färbung der Hirne der beiden Indikatortiere. In diesen lässt sich nur bei der Maus, welche den mit „Verfahren A“ behandelten Prüfkörper implantiert bekommen hatte (Bild A) Prionprotein in Form von dichten, retikulären, um den Draht herum konzentrierten, Ablagerungen nachweisen. Das Tier wies also eine Scrapieinfektion auf. Das Präparat der Maus, welche den mit „Verfahren B“ behandelten Metalldraht implantiert bekommen hatte (Bild B) ist PrP^{Sc}-negativ, das Tier war also nicht mit Scrapie infiziert.

Die in Bild C und D dargestellte immunhistochemische Färbung für GFAP zeigt in dem Präparat der Maus, die den mit „Verfahren A“ behandelten Draht implantiert bekommen hatte (Bild C), die für die Prioninfektion typische Gliose im Bereich um den Prüfkörper herum. Auch bei der Indikatormaus, die den mit „Verfahren B“ dekontaminierten Metalldraht implantiert bekommen hatte (Bild D), lässt sich um den Draht herum eine geringe Gliose nachweisen, die als unspezifische Reaktion auf den implantierten Metalldraht gewertet werden muss.

Im Vergleich mit dem Befund einer Kontrollmaus, die einen mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus kontaminierten Metalldraht implantiert bekommen hatte, zeigt das Tier der Gruppe „Verfahren B“ keine vermehrten pathologischen Veränderungen. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass nach Behandlung mit „Verfahren B“ keine toxischen Stoffe, wie Reiniger, auf dem Prüfkörper verblieben sind, die zu einer, über die durch den Draht hinausgehenden, Schädigung des Hirngewebes geführt hätten (Abbildung 29).

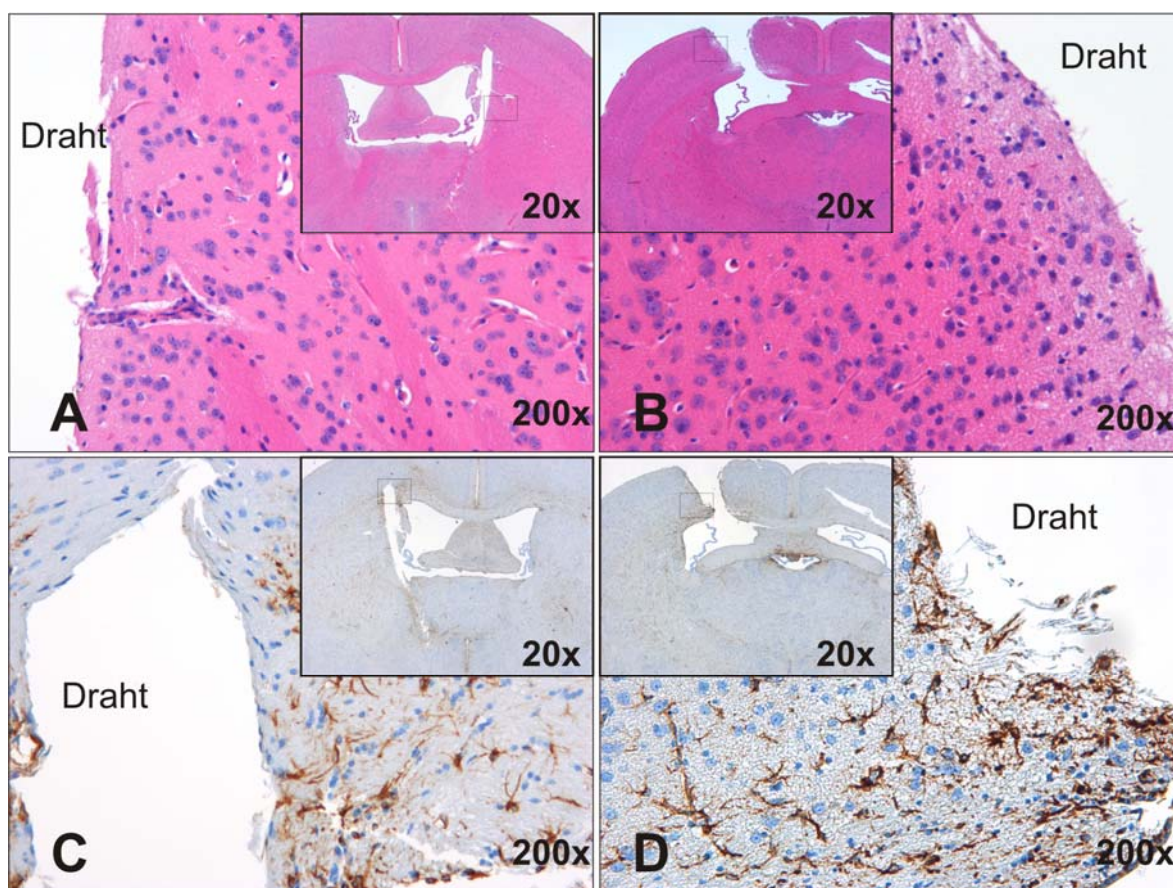


Abbildung 29: Histologische Gehirnschnitte zweier Indikatormäuse. Das eine Tier hatte einen 22L-prionkontaminierten und anschließend mit dem „Reinigungsverfahren B“ behandelten Metalldraht (Bild B und D), die andere Maus einen mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus beschmutzten und anschließend mit „Reinigungsverfahren A“ behandelten Metalldraht implantiert bekommen („Mock“) (Bild A und C). In dem in den Schnitten mit dem Wort „Draht“ markierten Hohlraum war zuvor der Metalldraht eingebracht gewesen. Die kleinen Bilder zeigen jeweils eine Übersicht des Präparates in einer 20-fachen Vergrößerung, während die großen Bilder den mit einem Viereck im Übersichtsbild markierten Bildausschnitt in 200-Facher Vergrößerung darstellen. Die Bilder A und B zeigen eine HE-Färbung der Hirne der beiden Tiere. In diesen zeigt der Gehirnschnitt der Maus, welche den prionkontaminierten und anschließend mit „Verfahren B“ behandelten Prüfkörper implantiert bekommen hatte (Bild B), im Gegensatz zu dem Tier, welches den „Mock“-Draht implantiert hatte (Bild A), keine vermehrte Schädigung des Hirngewebes um den Prüfkörper herum.

In den in Bild C und D dargestellten immunohistochemischen Färbungen der Gehirnschnitte für GFAP lässt sich in dem Präparat der Maus, die den prionkontaminierten und anschließend mit „Verfahren B“ behandelten Draht implantiert bekommen hatte (Bild D), keine vermehrte Gliose im Gegensatz zu dem Tier nachweisen, bei welchem der „Mock“-Draht implantiert war (Bild C).

5 Diskussion

5.1 Detektionsverfahren für oberflächengebundene Prionen

Um die Wirksamkeit neu entwickelter Dekontaminationsverfahren zur Priondekontamination beurteilen zu können, ist es Voraussetzung, Möglichkeiten zu besitzen, um Prionen detektieren zu können. Es wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt, um Prionen zur Evaluation von Dekontaminationsverfahren nachzuweisen. Mit manchen Methoden lassen sich die Prionen direkt detektieren, mit anderen werden sie indirekt über ihre Infektiosität nachgewiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren zur Priondetektion auf Oberflächen etabliert und auf ihre Leistungsfähigkeit überprüft.

5.1.1 Direkte Detektion des Prion-Proteins

Der etablierte Chemolumineszenztest ermöglicht es, Prionen direkt auf Oberflächen zu detektieren. Das Prinzip dieses Tests basiert auf einem von Flechsig *et al.* publizierten Verfahren zum Nachweis von oberflächengebundenen Prionen (Flechsig *et al.* 2001).

Nach erfolgreicher Etablierung des Protokolls konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Chemolumineszenztests PrP selektiv, jedoch nicht quantitativ, zu detektieren ist (Abbildung 10 und Abbildung 11). Damit ist der Test spezifischer als viele Methoden, die in den letzten Jahren verwendet wurden, um die Prionwirksamkeit von Dekontaminationsverfahren zu evaluieren.

Teilweise fand in den Arbeiten eine rein optische Kontrolle der behandelten Oberflächen zur Überprüfung der Effizienz einer Instrumentenaufbereitung statt (Dinakaran und Kayarkar 2002; Stone *et al.* 2004). Bei einer bestehenden, optisch zu detektierenden Restanschmutzung ist natürlich auch von keiner erfolgreichen Elimination der anhaftenden Prionen auszugehen. Außerdem ist der Erfolg einer Dekontamination der anhaftenden Prionen bei zusätzlicher Beschmutzung mit organischem Material fraglich, da dieses den Zugang von chemischen Dekontaminationsmitteln zum PrP^{Sc} verhindern kann (Bauman *et al.* 2006). Außerdem scheint insbesondere die zusätzliche Anwesenheit von Lipiden zu einer Stabilisierung von PrP^{Sc} gegenüber einer thermischen Inaktivierung durch trockene und feuchte Hitze zu führen (Appel *et al.* 2001). Insgesamt ist die Sensitivität der rein optischen Überprüfung des Reinigungsergebnisses so gering, dass diese bestenfalls ausreicht, um ein grobes Versagen der Reinigung zu registrieren. Von einer optisch erfolgreichen Reinigung ist es nicht möglich, Aussagen hinsichtlich einer erfolgreichen Priondekontamination abzuleiten.

In anderen Arbeiten wurden Methoden vorgeschlagen, um Dekontaminationsverfahren auf ihre Prionwirksamkeit hin zu überprüfen, mit deren Hilfe zumindest Proteine auf Oberflächen spezifisch nachgewiesen werden können. Dazu wurden spezielle mikroskopische Techniken, Elektronenmikroskopie kombiniert mit Energiedispersiver Röntgenanalytik (EDX), oder allgemeine Proteinanalyse benutzt (Whittaker *et al.* 2004; Baxter *et al.* 2005; Lipscomb *et al.* 2006b; Murdoch *et al.* 2006). Zwar kann bei einem positivem Proteinnachweis auf einer Oberfläche nach Durchführung einer Dekontaminationsmaßnahme auch von keiner erfolgreichen Entfernung der anhaftenden Prionen ausgegangen werden, allerdings kann bei einem negativem Proteinnachweis auf den Oberflächen umgekehrt nicht auf eine Elimination der anhaftenden Prionen geschlossen werden. Aufgrund der besonderen biochemischen Eigenschaften von PrP^{Sc} und dessen Resistenz gegenüber von Umwelteinflüssen, besteht die Gefahr, dass PrP^{Sc} auf den behandelten Oberflächen verbleibt, während die anderen Proteine erfolgreich entfernt werden konnten. Flechsig *et al.* konnten zeigen, dass sich von einem mit Prionen kontaminierten Metalldraht mit Hilfe von NaOH nur weniger als 15 pg PrP ablösen lassen, obwohl mit dem Draht infizierte Versuchstiere eine Inkubationszeit zeigten, die einer infektiösen Dosis von 20000 LD₅₀ entsprach (Flechsig *et al.* 2001). Dies verdeutlicht, dass sich mit Verfahren, die eine Nachweisgrenze von 85 pg/mm² (Lipscomb *et al.* 2006b) bis zu 200 µg Protein (Murdoch *et al.* 2006) haben, bei negativem Proteinnachweis keine Aussage über eventuell anhaftende Prionen machen lässt. Die auf Elektronenmikroskopie basierenden Verfahren setzen voraus, dass sich die Prionen auf den Oberflächen in detektierbaren Aggregaten befinden. Allerdings entsprechen die von Flechsig *et al.* beschriebenen 15 pg an eluierbarem PrP nur einer Anzahl von weniger als 3×10^8 PrP-Molekülen auf einer untersuchten Oberfläche von 2,36 mm² (Flechsig *et al.* 2001). Es ist daher fraglich, ob sich mit Hilfe von Elektronenmikroskopie, bei erfolgreicher Proteinelimination, überhaupt übriggebliebenes PrP^{Sc} detektieren lässt.

Aus den beschriebenen Gründen ist es sinnvoll bei der Überprüfung eines Dekontaminationsverfahrens nicht von einer erfolgreichen Beseitigung von organischer Beschmutzung oder von Proteinresten auf die Elimination von PrP^{Sc} zu schließen. Zur Evaluation von priondekontaminierenden Maßnahmen sollte deswegen immer ein PrP-spezifischer Nachweis des Dekontaminationsergebnisses erfolgen.

Als weiteres PrP-spezifisches Nachweisverfahren neben dem Chemolumineszenztest bietet sich der Westernblot an. Dieser wurde in einigen Arbeiten zur Überprüfung von Dekontaminationsmaßnahmen verwendet (Kasermann und Kempf 2003; Langeveld *et al.* 2003; Baier *et al.* 2004; Fichet *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2004; McLeod *et al.* 2004; Solassol *et al.* 2004; Jackson *et al.* 2005; Bauman *et al.* 2006; Muller-Hellwig *et al.* 2006; Yoshioka *et al.* 2007). Bei Versuchen in Suspension ist der Chemolumineszenztest nicht

anwendbar. Der Westernblot stellt hier ein sensitives PrP-spezifisches Verfahren dar, mit dessen Hilfe es möglich ist, PrP^C und PrP^{Sc} durch einen Proteinase K-Verdau voneinander zu unterscheiden.

Allerdings scheint der Westernblot als Verfahren zur Überprüfung von Oberflächen auf anhaftende Prionen nur eingeschränkt geeignet zu sein. So konnten Flechsig *et al.* zeigen, dass die Sensitivität des Westernblots die des Chemolumineszenztests nicht erreicht. In der zugrundeliegenden Arbeit war es nicht möglich, mit dem Westernblot ein PrP-spezifisches Signal zu detektieren, obwohl die beprobten Prüfkörper infektiös waren und der Chemolumineszenztest einen eindeutigen PrP-Nachweis lieferte (Flechsig *et al.* 2001).

Trotz dieser Einschränkung wurde der Westernblot in einigen Arbeiten dazu verwendet, um den Erfolg einer Dekontamination auf Oberflächen zu überprüfen (Kasermann und Kempf 2003; Fichet *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2004; Yoshioka *et al.* 2007). Dabei konnten die Autoren PrP auf den Oberflächen detektieren, sowie teilweise eine Umwandlung von proteaseresistentem PrP^{Sc} in proteasesensitives PrP^C durch die Dekontaminationsmaßnahmen nachweisen. Die Ursache, weshalb in der Arbeit von Flechsig *et al.* mit Hilfe des Westernblots auch auf hoch infektiösen Oberflächen kein PrP-Signal zu detektieren war, in anderen Dekontaminationsstudien aber doch, liegt wahrscheinlich im unterschiedlichen Anschmutzungsverfahren der verwendeten Prüfkörper begründet.

In der Studie von Flechsig *et al.* wurden die Metalldrähte nach kurzem Einbringen in nicht homogenisierte Gehirne zuerst durch eine gründliche Wäsche in PBS von anhängender Beschmutzung befreit und dann getrocknet. Auf den kontaminierten Drähten befand sich dadurch nur eine dünne Schicht von organischem Material, die direkt auf der Oberfläche haftete. Dennoch waren die so behandelten Drähte im Tierversuch hochinfektiös (Flechsig *et al.* 2001).

Im Gegensatz dazu wurden die Prüfkörper in den durchgeführten Dekontaminationsstudien nach Inkubation in Hirnhomogenat sofort getrocknet (Kasermann und Kempf 2003; Fichet *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2004; Yoshioka *et al.* 2007). Dadurch waren sie dick mit einer Schicht aus getrocknetem Homogenat überzogen. Bei einer Schichtdicke von teilweise 100 µm, was etwa einer Menge von 1,1 mg Trockenmasse Gewebe pro 12,6 mm² Prüfkörperoberfläche entspricht (Baxter *et al.* 2005), befand sich dabei viel PrP^{Sc} im organischen Material eingebettet und nicht in direktem Kontakt zur Metalloberfläche. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass in den mit Hilfe eines Westernblots durchgeführten Studien nicht das direkt oberflächengebundene PrP^{Sc}, welches von der Menge unter der Nachweisgrenze der Westernblot-Analyse liegt, sondern das PrP^{Sc} im getrockneten Hirnhomogenat detektiert wurde. Da das direkt an der

Oberfläche anhaftende PrP^{Sc} aber einer Elimination, bzw. Dekontamination schwieriger zugänglich sein könnte, als das detektierte, besteht die Gefahr, dass trotz vermeintlich erfolgreicher Dekontamination, infektiöses, nicht mit dem Westernblot zu detektierendes, PrP^{Sc} auf der Oberfläche des Prüfkörpers verbleibt.

Die unzureichende Sensitivität des Westernblots wird auch durch Untersuchungen von Lemmer et al. unterstrichen. Diese prüften mit Hilfe des Westernblots Metalldrähte, die sofort nach der Kontamination mit Hirnhomogenat in destilliertem Wasser gespült wurden. Dabei mussten sie das PrP von einer Oberfläche von 23,1 mm² eluieren, um im Westernblot ein gerade noch detektierbares PrP-Signal zu erhalten (Lemmer *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu reichten in der Arbeit von Flechsig et al. Oberflächen von 2,36mm², um mit Hilfe des Chemolumineszenztests ein deutliches PrP-Signal detektieren zu können (Flechsig *et al.* 2001).

Mit dem etablierten Chemolumineszenztest gelang es noch bei Kontamination der beprobten Metallnetze mit einer Verdünnung von 10⁻⁸ eines 10%igen Hirnhomogenats, ein PrP-spezifisches Signal zu detektieren (Abbildung 11). Dabei fällt auf, dass sich die Stärke des zu detektierenden Chemolumineszenzsignals nicht umgekehrt proportional zur Verdünnung des Hirnhomogenats verhält. Dadurch ist kein quantitativer PrP-Nachweis möglich. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre, dass der Metallkörper bei Inkubation im Hirnhomogenat das PrP aus dem Homogenat anzieht, bis alle Bindungsstellen auf dessen Oberfläche besetzt sind. Dann wäre die PrP-Menge auf der Oberfläche immer dieselbe, auch wenn die Konzentration des zur Kontamination verwendeten PrP, in gewissen Grenzen, variiert wird. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass mit der Verdünnung des zur Kontamination verwendeten Hirnhomogenats auch die anhaftende Infektiosität abnimmt. Dies zeigen die Ergebnisse der Titration der Nachweisgrenzen des etablierten Zellkultur- und Tierversuchstests. Insgesamt ist die Kinetik der Oberflächenanlagerung noch wenig erforscht und bedarf weiterer Untersuchungen. Dafür könnte der direkte Nachweis von PrP auf Oberflächen mit Hilfe des Chemolumineszenztests ein nützliches Werkzeug darstellen.

Mit dem Chemolumineszenztest ist keine Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} möglich. Die unterschiedliche Proteaseresistenz von PrP^C und PrP^{Sc} ließ sich nicht dazu benutzen, um die beiden Isoformen zu unterscheiden, da ein Verdau mittels Proteinase K auf den Metalloberflächen nicht funktionierte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Flechsig et al. denen es ebenfalls nicht gelang, oberflächengebundenes PrP^C und PrP^{Sc} über einen Proteaseverdau zu trennen (Flechsig *et al.* 2001). Eine Erklärung für die Tatsache, dass das detektierbare Chemolumineszenzsignal von PrP^C nach Proteaseverdau nicht abgenommen hat (Abbildung 12), ist, dass der Verdau des in Suspension proteasesensitiven PrP^C auf Oberflächen nicht funktioniert. Wahrscheinlich

herrschen für Proteine, die direkten Kontakt zu Oberflächen haben, andere Bedingungen, als in Suspension. Deswegen ist es kritisch, aus Suspensionsversuchen gewonnene Daten auf die Situation auf Oberflächen zu übertragen.

Dass in einigen mit Hilfe einer Westernblot-Untersuchung durchgeführten Arbeiten zur Priondekontamination ein Proteinase K-Verdau auf den Oberflächen möglich war, kann mit der oben beschriebenen Hypothese erklärt werden, dass der Westernblot nur das PrP detektiert, welches sich in der dicken, organischen Schmutzschicht auf den Prüfkörpern befindet und keinen direkten Kontakt zur Metalloberfläche hat. Der Westernblot ist aufgrund seiner Sensitivität praktisch „blind“ für die Vorgänge, die sich direkt auf der Metalloberfläche abspielen. Dass der PK-Verdau bei dem PrP funktioniert, welches sich ohne direkten Kontakt zur Oberfläche in der Schmutzschicht befindet, direkt auf der Metalloberfläche aber nicht, könnte auf der anderen Seite bedeuten, dass die Einwirkung von Dekontaminationsmitteln auf die Prionen in der Schmutzschicht eventuell besser erfolgen kann als auf die direkt oberflächengebundenen Prionen. Dies würde die mit Hilfe des Westernblot ermittelten Daten zur Dekontamination auf Oberflächen in Frage stellen. Eine Möglichkeit, den Chemolumineszenztest trotz Schwierigkeiten beim PK-Verdau von oberflächengebundenem PrP^C PrP^{Sc}-spezifisch zu gestalten, wäre der Einsatz von PrP^{Sc}-spezifischen Erstantikörpern, die allerdings bisher nicht frei erhältlich sind (Paramithiotis *et al.* 2003).

Im Vergleich zu dem von Flechsig *et al.* publizierten Chemolumineszenztest wurde der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Test verändert (Flechsig *et al.* 2001). Dabei erfolgt die Detektion des Chemolumineszenzsignals über eine Kamera. Das dabei erzeugte Foto bietet bessere Möglichkeiten in der Auswertung des Reinigungsergebnisses als die Methode von Flechsig *et al.* Durch Visualisierung der PrP-Anschmutzung auf der Oberfläche können leicht „Problemstellen“ auf den Prüfkörpern erkannt werden. Dadurch können Instrumentendesign und Reinigungsverfahren weiter optimiert werden. Außerdem erlaubt die Detektion des Chemolumineszenzsignals über eine Kamera die Verwendung von ganz unterschiedlichen Prüfkörpern. Da einfache Metalldrähte, wie sie bei dem von Flechsig *et al.* publizierten Verfahren verwendet werden müssen, die realen Gegebenheiten bei der Dekontamination von medizinischen Instrumenten nur unzureichend imitieren können (Lipscomb *et al.* 2006a), wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kleine Metallnetze verwendet, die der Situation in der Realität näher kommen sollen. Mit Hilfe des Chemolumineszenztests ist es sogar möglich, die Detektion von PrP auf realen Instrumenten durchzuführen.

Mit dem Chemolumineszenztest wurde ein Verfahren etabliert, mit dem PrP spezifisch und sensitiv direkt auf Oberflächen detektiert werden kann. Mit diesem Verfahren ist im

Moment noch keine Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} möglich. Der Chemolumineszenztest erlaubt daher nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von oberflächengebundenen Prionen. Die Visualisierung der PrP-Anschmutzung *in situ* erlaubt es, Problemstellen direkt auf Instrumenten zu detektieren.

Insgesamt ist zu bedenken, dass Verfahren, die PrP direkt detektieren eine eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich der vorhandenen Infektiosität besitzen. So lässt sich vom Nachweis proteaseresistenter PrPs nicht zwangsläufig auf vorhandene Infektiosität schließen. Ebenso beweist das Verschwinden von proteaseresistentem PrP nicht die erfolgreiche Elimination der Infektiosität (McLeod *et al.* 2004; Solassol *et al.* 2004).

Aus diesen Gründen kann die Evaluation eines Dekontaminationsverfahrens durch direkten Nachweis von PrP nur als Voruntersuchung zur ersten Begutachtung der Leistungsfähigkeit einer Dekontaminationsmaßnahme dienen. Zur abschließenden Beurteilung der Prionwirksamkeit muss immer der Nachweis von prionspezifischer Infektiosität erfolgen.

5.1.2 Indirekter Nachweis von Prionen durch Detektion der Infektiosität

5.1.2.1 Nachweis von oberflächengebundener Prioninfektiosität *in vitro*

Der Nachweis der Infektiosität von Prionen war lange Zeit nur *in vivo* im Versuchstier möglich. Dies änderte sich 1970, als es erstmals gelang, Zellen in Kultur mit Prionen zu infizieren (Clarke und Haig 1970). In der darauf folgenden Zeit wurden verschiedene Zellarten auf ihre Infizierbarkeit mit Prionen und auf die Persistenz einer erfolgreichen Infektion hin untersucht (Gibson *et al.* 1972; Clarke und Millson 1976; Elleman 1984).

Dabei testeten Race *et al.* 1987 erstmalig eine murine Neuroblastom-Zelllinie, die „N2a-Zellen“, auf ihre Infizierbarkeit mit Prionen (Race *et al.* 1987). Bald zeigte sich, dass sich diese sehr einfach zu kultivierenden Zellen neuronalen Ursprungs gut mit einer Vielzahl von verschiedenen Prionstämmen infizieren lassen und dass die Zellen die Infektion teilweise stabil über lange Zeit behalten können. Auf Grund dieser Eigenschaften sind die N2a-Zellen seit dem das am weitesten verbreitete Zellkulturmodell zur Untersuchung der Prioninfektion.

Es stellte sich heraus, dass es sich bei den N2a-Zellen um eine Population von Zellen handelt, die sehr heterogen hinsichtlich ihrer Infizierbarkeit für Prionen sind. Bei Untersuchung der ursprünglichen N2a-Zellpopulation nach experimenteller Infektion zeigte sich, dass sich nur durchschnittlich eine von 144 Zellen erfolgreich mit Prionen infizieren ließ (Race *et al.* 1987). Durch Einzelzellklonierung der N2a-Zellen nach Infektion

mit Prionen gelang es, Zellklone zu isolieren, die zu einem hohen Anteil mit Prionen infiziert waren und die Infektion stabil über lange Zeit behielten (Butler *et al.* 1988).

Bosque *et al.* benutzten die Einzelzellklonierung, um Zellen zu isolieren, die besonders empfänglich für die Prioninfektion waren. Dazu führten sie die Einzelzellklonierung vor Infektion der Zellen durch. Die dadurch entstandenen Zellklone wurden dann jeweils mit Prionen infiziert und hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für Prionen verglichen. Auf diese Weise wurde ein Zellkulturtest etabliert, mit dessen Hilfe sich die Infektiosität von Prionen reproduzierbar *in vitro* nachweisen lässt (Bosque und Prusiner 2000).

Durch Subklonierung und weitere Isolation einer prionempfindlichen N2a-Zelllinie gelang es, Zellklone herzustellen, die eine Empfindlichkeit für Prionen zeigen, die mit der eines Versuchstiers zu vergleichen sind. Die hergestellten Zellklone waren teilweise noch mit einer Verdünnung von 10^{-6} eines Hirnhomogenats einer terminal am RML-Scrapiestamm erkrankten Maus zu infizieren. Dabei konnte eine lineare Beziehung zwischen der logarithmischen Verdünnung des verwendeten Hirnhomogenats und der Anzahl an erfolgreich infizierten Zellen aus der Indikatorzellkultur nachgewiesen werden (Klohn *et al.* 2003).

Mit Hilfe solcher N2a-Indikatorzellklone wurden bereits Dekontaminationsstudien in Suspension durchgeführt. Dabei stellten sich die Zellen als wertvolles Instrument heraus, um Prioninfektiosität *in vitro* zu detektieren. Im Rahmen dieser Studien konnte durch die Indikatorzellen gezeigt werden, dass einige der getesteten Dekontaminationsverfahren zwar das detektierbare PrP^{Sc}-Signal in einem behandelten Hirnhomogenat stark reduzieren, die Infektiosität dabei aber kaum abnimmt. Diese Studie unterstreicht die Wichtigkeit einer Betrachtung der Infektiosität bei der Beurteilung des Erfolgs einer Dekontaminationsmaßnahme (Solassol *et al.* 2004).

Weissmann *et al.* konnten 2002 erstmals die Infektion über oberflächengebundene Prionen in Zellkultur nachstellen. Zu diesem Zweck brachten sie scrapiekontaminierte Metalldrähte in eine Kultur von N2a-Zellen ein. Diese überführten sie nach einer Weile zusammen mit einigen, inzwischen daran wachsenden Zellen, von der ersten Kulturschale in eine neue, zweite Kulturschale. Nach einiger Zeit untersuchten sie die Zellen auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} hin. In den zusammen mit dem Metalldraht in die zweite Kulturschale überführten Zellen lies sich eine Prioninfektion nachweisen. Im Gegensatz zu diesen Zellen blieben die in der ersten Kulturschale zurückgelassenen Zellen uninfiziert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Infektion über oberflächengebundene Prionen auf ein Zellkulturmodell übertragen werden kann. Zur Infektion der Zellen ist dabei ein direkter Zell/Oberflächenkontakt nötig (Weissmann *et al.* 2002).

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Zellkulturtest für oberflächengebundene Prionen basiert auf dem von Weissmann *et al.* etablierten N2a-Modell (Weissmann *et al.* 2002).

Dabei wurden anstatt der von Weissmann et al. verwendeten Metalldrähte, feine Metallnetze zur Infektion der Zellen benutzt. Diese haben eine deutlich größere Oberfläche, wodurch bei Infektion mehr Zellen in direktem Kontakt mit der Oberfläche wachsen können. Außerdem haben die Metallnetze im Gegensatz zu Metalldrähten den Vorteil, dass sie bei Verwendung als Prüfkörper zur Evaluation von Dekontaminationsverfahren die Situation bei der Instrumentenaufbereitung durch ihre komplexere Oberfläche besser imitieren (Lipscomb *et al.* 2006a).

Im ersten Teil der Etablierung des Zellkulturtests wurde die Infizierbarkeit von verschiedenen N2a-Zellklonen mit Hirnhomogenat und über oberflächengebundene Prionen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Infektion über oberflächengebundene Prionen weniger effektiv war. Bei Untersuchung der Infektion im Zeitverlauf stellte sich heraus, dass sich nicht alle über Metallnetze infizierbaren N2a-Zellklone auch als Indikatorzellen für den Nachweis von oberflächengebundenen Prionen eigneten. Einige infizierte Klone zeigten ein zu schwaches PrP^{Sc}-Signal, andere verloren ihre Infektion zu schnell. Nachdem ein geeigneter Zellklon identifiziert worden war, wurde er subkloniert, um einen Indikatorklon zu erhalten, welcher leicht zu kultivieren und sehr empfänglich für die Infektion mit oberflächengebundenen Prionen ist. Außerdem sollte er möglichst kurz nach Infektion ein starkes PrP^{Sc}-Signal im Westernblot zeigen. Auf diese Weise wurde der Indikatorklon 13A7 selektiert, mit dem es möglich ist, Infektiosität auf einem Metallnetz zu detektieren, welches mit einer Verdünnung von 10^{-4} eines 10% Hirnhomogenats einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus kontaminiert wurde (Abbildung 19). Bei Verwendung von Klon 13A7 ist dementsprechend bei einer Ausgangskontamination der Prüfkörper mit einem 10%igen Hirnhomogenat davon auszugehen, dass mit Hilfe der Zellen nach Reduktion der anhaftenden Infektiosität um 4 log-Stufen immer noch Prioninfektiosität nachzuweisen ist. Sind die Zellen mit Hilfe des kontaminierten und dann mit dem zu überprüfenden Dekontaminationsverfahren behandelten Prüfkörper nicht zu infizieren, kann demzufolge von einer Verminderung der anhaftenden Infektiosität um mehr als 4 log-Stufen ausgegangen werden.

Damit ist der Indikatorzellklon für oberflächengebundene Prionen nicht so sensitiv, wie der von Klöhn et al. vorgestellte N2a-Klon für Infektion mit Hirnhomogenat (Klöhn *et al.* 2003). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten, vergleichenden Untersuchungen von Infektion mittels Hirnhomogenat und mittels metallgebundener Prionen haben allerdings gezeigt, dass Erstere generell mit deutlich höherer Effektivität gelingt. Die Sensitivität des etablierten Zellkulturtests ist ausreichend, um eine Abreicherung der Infektiosität im Vergleich zur Ausgangskontamination um 4 log nachzuweisen, wie sie in den Empfehlungen des RKI für die Phase 1b der Evaluation neuer Dekontaminationsmethoden gefordert wird (Robert-Koch-Institut 2004).

Der etablierte Zellkulturtest für metallgebundene Prionen stellt einen *in vitro* Test zur Detektion von oberflächengebundener Prioninfektiosität dar, mit dessen Hilfe eine quantitative Aussage zur Abreicherung der Infektiosität möglich ist. Wenngleich der Test nicht so sensitiv wie ein *in vivo* Test im Versuchstier ist, eignet er sich gut als Vortest vor einem eigentlichen Tierversuch, um die Dekontaminationsleistung von priondekontaminierenden Verfahren *in vitro* zu überprüfen. Durch Anwendung des Tests vor Durchführung eines Tierversuchs kann der Zellkulturversuch dazu beitragen, um die Anzahl von nötigen Tierversuchen zu reduzieren. Dadurch kann Geld und Zeit gespart werden. Im Gegensatz zum Tierversuch ist zur Durchführung kein aufwendiges Genehmigungsverfahren nötig, da ethische Bedenken bei der Durchführung eines Zellkulturtests keine Rolle spielen.

Wenn die Wirksamkeit eines Verfahrens mit Hilfe des Zellkulturtests bestätigt werden konnte, so muss aufgrund der eingeschränkten Sensitivität der Indikatorzellen eine abschließende Bestätigung der Prionwirksamkeit im Tierversuch erfolgen.

Ein Nachteil des Zellkulturtests ist die Spezifität der Indikatorzellen für einen Prionstamm. Der in dieser Arbeit verwendete 13A7-Zellklon wurde auf Empfänglichkeit für oberflächengebundene 22L-Prionen selektiert. In anderen Arbeiten hat sich gezeigt, dass die gute Infizierbarkeit von Zellen mit einem Prionstamm oftmals nicht mit einer ebenso großen Empfänglichkeit bei Verwendung anderer Prionen einhergeht (Bosque und Prusiner 2000).

5.1.2.2 Nachweis von Infektiosität im Tierversuch

Nach wie vor ist die Austestung eines Dekontaminationsergebnisses im Tierversuch das sensitivste Verfahren bei der Beurteilung der Prionwirksamkeit.

Anfänglich wurden die meisten Untersuchungen zu Prionerkrankungen an Schafen und Ziegen durchgeführt. Erst mit der erfolgreichen Übertragung der Scrapieinfektion auf Nagetiere stand ein schnelleres und günstigeres Tiermodell für die Prionerkrankung zur Verfügung (Chandler 1961). Dies ermöglichte erst eine systematische Erforschung der Prionerkrankungen und ihres infektiösauslösenden Agens (Alper *et al.* 1966; Alper *et al.* 1967; Gibbons und Hunter 1967; Pattison und Jones 1967; Millson *et al.* 1971; Alper *et al.* 1978).

Auch zur Untersuchung der Prionwirksamkeit verschiedener Dekontaminationsmaßnahmen fanden Nagetiere Anwendung. Dazu wurden vor allem verschiedene Mäuse- und Hamsterrassen verwendet, die sich teilweise stark in ihrer Inkubationszeit und ihrer Empfindlichkeit für die Prioninfektion unterscheiden. Besonders viele Studien wurden dabei mit dem Syrischen Hamster als Indikatortier durchgeführt.

Dieser hat eine mit nur ca. 80 Tagen, nur etwa halb so lange Inkubationszeit bei der Prioninfektion, wie viele Mäuserassen. Außerdem ist der 263K-Hamsterprionstamm sehr resistent gegenüber Dekontaminationsmaßnahmen, wodurch er sich gut eignet, um die Prionwirksamkeit von neuen Inaktivierungsverfahren für Prionen zu überprüfen (Baier *et al.* 2004; Fichet *et al.* 2004; Race und Raymond 2004; Yan *et al.* 2004; Baxter *et al.* 2005; Paspaltsis *et al.* 2006; Riemer *et al.* 2006).

Bei Verwendung von Mäusen als Indikatortiere werden bevorzugt transgene Tiere verwendet, die im Gegensatz zu Wildtypmäusen eine stark verkürzte Inkubationszeit und erhöhte Empfindlichkeit für Prionen aufweisen. Eine häufig verwendete Indikatormaus ist die Tga20-Maus, die im Vergleich zur Wildtypmaus, eine um den Faktor 6-7 erhöhte PrP^C-Expression aufweist. Dadurch ist sie sehr empfindlich für Prionen und besitzt mit nur ca. 70 Tagen eine ebenso kurze Inkubationszeit wie der Syrische Hamster bei der Prioninfektion. Durch die häufige Verwendung der Tga20-Mäuse als Indikatortiere sind gut charakterisiert hinsichtlich des Verlaufs und der Empfindlichkeit gegenüber einer Scrapieinfektion (Fischer *et al.* 1996; Zobeley *et al.* 1999; Flechsig *et al.* 2001; Weissmann *et al.* 2002; Jackson *et al.* 2005).

Zobeley *et al.* gelang es erstmals 1999 die Infektion über oberflächengebundene Prionen im Tierversuch nachzustellen. Dazu implantierten sie mit Prionen kontaminierte Metalldrähte dauerhaft in das Gehirn von Versuchstieren, woraufhin diese an der Prioninfektion erkrankten (Zobeley *et al.* 1999). Dieses Modell ermöglichte es die Mechanismen der Prionübertragung über oberflächengebundene Prionen näher zu untersuchen (Zobeley *et al.* 1999; Flechsig *et al.* 2001; Weissmann *et al.* 2002). Ebenso fand es als Indikatorsystem für oberflächengebundene Prionen Anwendung bei der Austestung der Prionwirksamkeit von Dekontaminationsverfahren (Zobeley *et al.* 1999; Flechsig *et al.* 2001; Weissmann *et al.* 2002; Fichet *et al.* 2004; Yan *et al.* 2004; Jackson *et al.* 2005).

Da die im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Nachweisverfahren für oberflächengebundene Prionen auf den murinen 22L-Prionstamm optimiert wurden, sollte dieser auch für den Tierversuchstest Verwendung finden. Auf Grund der bekannten Eignung als Indikatortiere für metallgebundene Prionen wurden zu diesem Zweck die Tga20-Mäuse gewählt.

Die Etablierung der stereotaktischen Operation erfolgte nach den publizierten Angaben in anderen Arbeiten (Zobeley *et al.* 1999; Flechsig *et al.* 2001; Weissmann *et al.* 2002). Allerdings fiel bei Überprüfung des Operationsergebnisses am toten Tier auf, dass die in der Literatur angegebene Länge des verwendeten Prüfkörpers von 5 mm zu lang war, da der verwendete Draht auf der Unterseite des Gehirns heraus stand. Aus diesem Grund wurde in den Experimenten am lebenden Tier nur eine Drahtlänge von 3 mm verwendet.

Als Prüfkörper wurden feine Metalldrähte verwendet, auch wenn diese die Gegebenheiten bei der Instrumentenaufbereitung eventuell nicht in idealer Weise imitieren (Lipscomb *et al.* 2006a). Der Vorteil der Metalldrähte im Vergleich zu anderen Prüfkörpern, wie zum Beispiel feinen Metallplatten, ist deren vergleichsweise gewebeschonende Implantierbarkeit ins Gehirn. Dies wirkt sich positiv auf die operationsbedingte Mortalität und Morbidität der Tiere aus. Anhand einer durchgeführten Negativkontrolle, bei der den Tieren mit Hirnhomogenat gesunder Mäuse beschmutzte Metalldrähte („Mock“) implantiert wurden, konnte die relativ geringe Belastung der Tiere durch die Implantation des Prüfkörpers selbst bestätigt werden. Nach der Operation erholten sich die Tiere nach spätestens 1-2 Tagen komplett. Im restlichen Versuchszeitraum zeigten die Mäuse keinerlei Verhaltensauffälligkeiten, die auf ein Leiden oder Schmerzen hingedeutet hätten. Nach Infektion der Indikatormäuse mit Metalldrähten, die zuvor mit 10% 22L-Hirnhomogenat kontaminiert worden waren, überraschte die lange Inkubationszeit. Sie lag mit durchschnittlich 109 Tagen deutlich über der in anderen Arbeiten ermittelten, durchschnittlichen Inkubationszeit von etwa 70 Tagen bei Infektion mit oberflächengebundenen RML-Prionen. Dies ist auffällig, da der 22L-Prionstamm bei Infektion von Wildtypmäusen über intrazerebrale Injektion keine außergewöhnlich lange Inkubationszeit im Vergleich zu anderen Prionstämmen zeigt (Carp *et al.* 1998). Möglicherweise ist diese Besonderheit in der Inkubationszeit durch Unterschiede im Prnp-Gen von Wildtyp- und Tga20-Mäusen bedingt. Im Gegensatz zum Wildtyp-Gen fehlen dem Prnp-Gen der Tga20-Tiere das zweite 6-12 kb große Intron und ein Großteil des 17 kb großen Genabschnitts, der sich in 3'-Richtung des dritten Exons anschließt. Folge dieser Veränderungen in der Genstruktur ist ein unterschiedliches Expressionsmuster von PrP im Gehirn von Tga20- und Wildtypmäusen (Fischer *et al.* 1996). Dieses konnte die Unterschiede in der Inkubationszeit nach 22L- und RML-Infektion zwischen Wildtyp- und Tga20-Mäusen erklären.

Bei Untersuchung der Sensitivität der Indikatortiere durch Infektion mit Metalldrähten, die in einer Verdünnungsreihe von Hirnhomogenat kontaminiert worden waren, zeigte sich, dass die Tga20-Mäuse ein sehr sensitives Nachweissystem für oberflächengebundene 22L-Prionen darstellen. Mit Hilfe des Tierversuchs war es noch möglich, eine Kontamination eines Metalldrahtes bis zu einer 10^7 -fachen Verdünnung des 10% Hirnhomogenats zu detektieren. Damit ist die Sensitivität des Tga20/22L-Modells mindestens um zwei log-Stufen größer, als die für das Hamster/263K-System ermittelte. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Titration der Empfindlichkeit der Hamster mit Metalldrähten durchgeführt wurde, die nach der Kontamination nicht wie in der vorliegenden Arbeit abgespült wurden, bevor sie getrocknet wurden. Bei sofortiger

Abspülung der Drähte nach Kontamination sank die Infektionseffizienz noch erheblich (Fichet *et al.* 2004).

Bei Infektion der Indikatormäuse mit den in einer Verdünnungsreihe von Hirnhomogenat kontaminierten Metalldrähten, konnte eine gute, inverse Korrelation zwischen Inkubationszeit der Tiere und dem Logarithmus der inokulierten Prionmenge nachgewiesen werden. Solche Korrelationen wurden auch schon in anderen Arbeiten beschrieben (Prusiner *et al.* 1980; Prusiner *et al.* 1982). Dieser Zusammenhang ermöglicht es, bei Untersuchung der Prionwirksamkeit von Dekontaminationsmaßnahmen, quantitative Aussagen zu deren Wirksamkeit zu machen.

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte tierversuchbasierende Test für oberflächengebundene Prionen ermöglicht es, sehr sensitiv oberflächengebundene 22L-Prionen nachzuweisen. Eine ausgeprägte, inverse Korrelation zwischen Inkubationszeit der Tiere und dem Logarithmus der inokulierten Prionmenge erlaubt es, eine quantitative Aussage über die anhaftende Prioninfektiosität zu machen.

5.2 Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination

Das deutsche Robert-Koch-Institut (RKI) empfiehlt ein mehrstufiges Vorgehen bei der Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination (Robert-Koch-Institut 2004). Dadurch können Geld und Zeit gespart werden. Durch Vorauswahl von potentiell prionwirksamen Verfahren durch günstige und schnell durchzuführende *in vitro*-Methoden müssen weniger Verfahren einer teuren und aufwendigen *in vivo*-Überprüfung unterzogen werden. Außerdem steigt die Zuverlässigkeit eines positiven Wirknachweises des untersuchten Dekontaminationsverfahrens durch die Untersuchung mit Hilfe verschiedener Testverfahren.

Das vom Robert-Koch-Institut empfohlene Vorgehen bei der Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination ist allerdings in erster Linie dazu geeignet, um die Prionwirksamkeit von einzelnen Dekontaminationsmitteln zu bewerten. Bei der Untersuchung der Prionwirksamkeit von (z.B. automatisierten) Dekontaminationsverfahren ist die Testung der Wirksamkeit der einzelnen eingesetzten Chemikalien nicht ausreichend. Vielmehr kommt es bei der Bewertung eines Verfahrens, wie es bei der Aufbereitung chirurgischer Instrumente eingesetzt wird, auf das Zusammenspiel der physikalischen Faktoren, wie mechanischer Reinigung und Temperatur, mit den eingesetzten Chemikalien an. Da ein vom RKI in Phase 1 vorgeschlagener Suspensionstest nicht zur Überprüfung eines automatisierten Reinigungsverfahren angewendet werden kann, muss dieses mit Hilfe von Prüfkörpern untersucht werden, die dem gesamten zu evaluierenden Verfahren ausgesetzt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein geeignetes Vorgehen zur Untersuchung der Prionwirksamkeit maschineller Verfahren erarbeitet. Dabei wurde die vom RKI empfohlene Prüfung in mehreren Stufen beibehalten. In der Stufe 1 erfolgt eine erste Testung der Prionwirksamkeit *in vitro*. Dabei kommen ein qualitatives (Stufe 1a) und ein quantitatives (Stufe 1b) Nachweisverfahren für oberflächengebundene Prionen zum Einsatz. Erst bei Bestätigung der Prionwirksamkeit in Stufe 1, erfolgt in Stufe 2 die abschließende Testung im Versuchstier (Tabelle 7).

Für die erste Untersuchung eines Dekontaminationsverfahrens in Stufe 1a der Wirksamkeitsprüfung, wurde ein günstiger, schnell durchführbarer *in vitro*-Test auf Chemolumineszenzbasis etabliert. Mit dessen Hilfe ist ein qualitativer, sensitiver und spezifischer PrP-Nachweis auf Oberflächen von Prüfkörpern möglich. Durch den Chemolumineszenztest wird die Elimination von PrP von Oberflächen durch das zu testende Dekontaminationsverfahren überprüft.

Da die Zielgröße bei der Priondekontamination auf Oberflächen nicht die Elimination von PrP, sondern die Beseitigung der Infektiosität ist, erfolgt in Stufe 1b die zusätzliche Überprüfung der Wirkung des zu untersuchenden Dekontaminationsverfahrens auf die Infektiosität. Dazu wurde ein Zellkulturtest für metallgebundene Prionen etabliert. Dieser ermöglicht einen kostengünstigen und, im Gegensatz zu einem Tierversuch, schnellen Nachweis der Prioninfektiosität *in vitro*. Dabei sind mit Hilfe des Zellkulturtests quantitative Aussagen über die Reduktion der oberflächengebundenen Infektiosität durch das Dekontaminationsverfahren möglich. Bei einer Ausgangskontamination der Prüfkörper mit 10% Hirnhomogenat einer terminal an 22L-Scrapie erkrankten Maus liegt die Nachweisgrenze der Indikatorzellen bei einer Verminderung der anhaftenden Infektiosität um 4 log-Stufen. Damit kann bei Nicht-Infizierbarkeit der Indikatorzellen mit Hilfe eines kontaminierten und dann mit dem zu überprüfenden Dekontaminationsverfahren behandelten Prüfkörpers, von einer Reduktion der primär anhaftenden Prioninfektiosität um mehr als 4 log-Stufen ausgegangen werden. Ein Nachweis der Reduktion in dieser Höhe wird auch in den Empfehlungen des RKI zur Prüfung neuer Verfahren zur Priondekontamination in Phase 1 gefordert, um ein Dekontaminationsmittel als „Prion-inaktivierend“ zu deklarieren (Robert-Koch-Institut 2004).

Kann nach Behandlung eines kontaminierten Prüfkörpers mit einem zu testenden Dekontaminationsverfahren mit Hilfe des Chemolumineszenztests kein anhaftendes PrP mehr detektiert werden (Stufe 1a) und gelingt es zusätzlich mit dem Zellkulturtest eine Reduktion der anhaftenden Prioninfektiosität um mehr als 4 log nachzuweisen (Stufe 1b), so gilt die Stufe 1 des Wirksamkeitsnachweises als bestanden. Dekontaminationsverfahren, die die Stufe 1 des Wirksamkeitsnachweises bestanden

haben, müssen in Stufe 2 einer abschließenden Wirksamkeitsprüfung *in vivo* unterzogen werden.

Dazu wurden Tga 20-Mäuse als Indikatortiere verwendet. Diese stellen zusammen mit dem verwendeten 22L-Prionstamm ein hochsensitives Nachweisverfahren für metallgebundene Prionen dar. Die Indikatortiere erlauben noch bei einer Abreicherung der Infektiosität um 7 log den Nachweis von Prioninfektiosität.

Kann neben bestandener Stufe 1 des Wirksamkeitsnachweises auch in Stufe 2 mit Hilfe der Indikatormäuse keine anhaftende Prioninfektiosität mehr detektiert werden, so gilt die Prionwirksamkeit des Verfahrens als belegt. Dann kann dieses analog zu den Empfehlungen des RKI als „Prion-dekontaminierend auf Oberflächen“ deklariert werden.

Bei dem erarbeiteten Vorgehen zur Untersuchung der Prionwirksamkeit neuer Dekontaminationsverfahren wurde bewusst auf einen Tierversuch in Stufe 1 der Überprüfung verzichtet. Die etablierten Nachweisverfahren erlauben eine ausreichend genaue Untersuchung des Dekontaminationsergebnisses *in vitro*. Die ausgiebige *in vitro*-Testung der Prionwirksamkeit in Stufe 1 hilft die Zahl der nötigen Tierversuche zu reduzieren. Dieses Vorgehen hilft Zeit und Geld zu sparen, da nur Verfahren, die sich in Stufe 1 der Testung als prionwirksam erwiesen haben, auch im zeitaufwendigen und kostenintensiven Tierversuch überprüft werden. Außerdem bestehen weniger ethische Bedenken, ein ausgiebig *in vitro* untersuchtes und für prionwirksam befundenes Verfahren *in vivo* zu überprüfen, als ein breites *in vivo*-screening auf prionwirksame Verfahren durchzuführen.

Phase 1 –Prüfung der Wirksamkeit <i>in vitro</i>		Phase 2 –Bestätigung der Wirksamkeit <i>in vivo</i>
Phase 1a	Phase 1b	
Vorprüfung von Verfahren <i>in vitro</i> im qualitativen Chemolumineszenztest	Vorprüfung von Verfahren <i>in vitro</i> im quantitativen Zellkulturtest	Quantitativer Test im Indikatortier
Zielgröße: Beseitigung von PrP von Oberflächen durch das Verfahren	Zielgröße: Beseitigung von oberflächengebundener Prion-Infektiosität durch das Verfahren	Zielgröße: Beseitigung von oberflächengebundener Prion-Infektiosität durch das Verfahren

Tabelle 7: Vorgehen bei der Überprüfung der Prionwirksamkeit maschineller Verfahren zur Priondekontamination

Im Gegensatz zu der vom RKI empfohlenen Vorgehensweise bei der Untersuchung der Wirksamkeit von neuen Verfahren zur Priondekontamination, erfolgt bei der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode kein Nachweis der direkt prioninaktivierenden Wirkung

des Verfahrens in Suspension. Daher kann mit dem beschriebenen Vorgehen nur eine Aussage dazu getroffen werden, ob ein Verfahren dazu in der Lage ist, Prionen von Oberflächen zu beseitigen. Ob diese dabei inaktiviert werden, ist dabei nicht feststellbar. Deswegen sind Verfahren, die mit Hilfe des erarbeiteten Vorgehens überprüft und als „Prion-dekontaminierend auf Oberflächen“ befunden wurden, nicht automatisch zur Dekontamination von sicher prionbesetzten Instrumenten geeignet. Dies war allerdings auch nicht Ziel dieser Arbeit, da bei sicher kontaminierten Instrumenten generell von einer Aufbereitung abgesehen werden soll (Robert-Koch-Institut 2002). Vielmehr sind die als „Prion-dekontaminierend auf Oberflächen“ deklarierten Verfahren dazu gedacht, um präventiv in der Instrumentenaufbereitung eingesetzt zu werden. Dabei wird im Moment vom RKI die Kombination von zwei zumindest partiell prionwirksamen Verfahren gefordert (Robert-Koch-Institut 2002). Da auch die Kombination der vom RKI als partiell priondekontaminierend eingestuft Verfahren nur eine eingeschränkte Prionwirksamkeit besitzt, ist der Gebrauch der so aufbereiteten Instrumente mit einem Restrisiko für eine Übertragung der Prionerkrankung behaftet. Dies unterstreicht auch die vom britischen Department of Health erarbeitete Risikoabschätzung zur Übertragung der vCJD durch chirurgisches Instrumentarium. Darin wird von einer Verminderung der an den Instrumenten anhaftenden Infektiosität von 1-3 log-Stufen bei der Reinigung und weiteren 2-3 log-Stufen bei der Dampfsterilisation ausgegangen. Das entspricht einer Gesamtreduktion der Infektiosität von 3-6 log-Stufen bei Kombination von Reinigung und Dampfsterilisation, wie sie vom RKI empfohlen wird. Bei einer vom britische Department of Health angenommenen Kontamination der Instrumente nach Benutzung mit bis zu 10^6 ID₅₀ bei Beschmutzung mit ZNS- oder Augenhintergrund-Gewebe und bis zu 10^3 ID₅₀ bei Milz- oder Tonsillengewebe wird deutlich, dass trotz der vom RKI empfohlenen Instrumentenaufbereitung weiterhin ein Restrisiko für die iatrogene Übertragung der vCJD über die wiederverwendeten Instrumente nicht ausgeschlossen werden kann (Department of Health 2005) (Tabelle 8). Ein neues Dekontaminationsverfahren, für das mit Hilfe des erarbeiteten Vorgehens eine Prionreduktion von mehr als 7 log- Stufen nachgewiesen werden kann, ist demnach deutlich wirksamer als die vom RKI empfohlene (maschinelle) Reinigung. Wird ein solches Verfahren mit der Dampfsterilisation kombiniert, dann ist von einer Gesamtreduktion der anhaftenden Infektiosität um 9-10 log-Stufen auszugehen. Bei einer priondekontaminierenden Wirkung in dieser Größenordnung ist von einer wirkungsvollen Prävention der iatrogenen CJD und vCJD-Übertragung, auch bei Behandlung von stark prionkontaminierten Instrumenten, auszugehen.

Angenommene Infektiosität (ID50/g Gewebe)		
ZNS / hinterer Augenabschnitt (bei intrazerebraler Infektion)	Letzte 40% der Inkubationszeit (nur bei peripherer Infektion; bei Infektion ins ZNS oder posteriore Auge wird von einem sofortigen Auftreten der Infektiosität in ZNS und hinterem Auge ausgegangen)	10 ⁸ ID50/g Gewebe (Gehirn, hinterer Augenabschnitt)
Vorderer Augenabschnitt (bei Infektion ins vordere Auge)		10 ⁶ ID50/g Gewebe (Rückenmark)
LRS (bei Infektion in LRS und periphere Nerven)	Gesamte Inkubationszeit	10 ³ -10 ⁴ ID50/g Gewebe
		10 ⁴ -10 ⁵ ID50/g Gewebe (Tonsillen, Milz)
Restliche Gewebe	Gesamte Inkubationszeit	10 ³ -10 ⁴ ID50/g Gewebe (alle anderen Gewebe des LRS)
		10 ³ ID50/g Gewebe
Angenommene Ausgangsbeschmutzung an Instrumenten vor Aufbereitung		
Kontamination bei Benutzung		10mg Gewebe
Angenommener Effekt der Verfahren zur Instrumentenaufbereitung		
Effekt der Reinigung	Reduktion bei erstmaliger Reinigung	Reduktion der Infektiosität um Faktor 10 ¹ -10 ³
	Infektiöse Restbeschmutzung nach erstmaliger Reinigung	Bis zu 1 mg
Effekt der Dampfsterilisation	Weitere Reinigungszyklen	Reduktion der Infektiosität um Faktor 10 ¹
	Erstmalige Dampfsterilisation	Reduktion der Infektiosität um Faktor 10 ² -10 ³
	Weitere Dampfsterilisationszyklen	Keine weitere Reduktion der Infektiosität

Tabelle 8: Annahmen zu Infektiosität der verschiedenen Gewebe, Ausgangsbeschmutzung von aufzubereitenden Instrumenten und Effektivität der Aufbereitungsverfahren, wie sie der Risikoabschätzung zur Übertragung der vCJD durch chirurgisches Instrumentarium durch das britische Department of Health zugrunde liegen (Department of Health 2005)

5.3 Die Dekontaminationsverfahren

In der jüngeren Vergangenheit wurden eine Vielzahl von Substanzen und Verfahren auf ihre Prionwirksamkeit hin untersucht. Dabei konnte für einige Substanzen eine Wirksamkeit bei der Priondekontamination bestätigt werden. Allerdings fanden die Untersuchungen hierzu teilweise nur in Suspension, oder auf dick beschmutzten Oberflächen statt und die Auswertung des Dekontaminationsergebnisses erfolgte häufig nur mittels Nachweis von proteaseresistentem PrP^{Sc} im Westernblot oder durch Mikroskopie. Wie in Kapitel 5.1 diskutiert, sind dadurch viele dieser Wirksamkeitsnachweise nur eingeschränkt verwertbar.

Ein Nachweis der Wirksamkeit auf die Prioninfektiosität wurde bisher nur für die Dampfsterilisation, die Plasmareinigung, die alkalische Reinigung, die Behandlung mittels 2M NaOH, verschiedenen Proteasen, NaOCl (20000ppm freies Chlor), phenolischen Desinfektionsmitteln, verdampftem H₂O₂, 3-methyl-4-chlorophenol, einem Cu²⁺/H₂O₂-Gemisch und Detergenzien, wie SDS erbracht (Taylor *et al.* 1997; Baier *et al.* 2004; Fichet *et al.* 2004; McLeod *et al.* 2004; Solassol *et al.* 2004; Baxter *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2005; Peretz *et al.* 2006; Riemer *et al.* 2006; Solassol *et al.* 2006; Vadrot und Darbord 2006; Lemmer *et al.* 2008).

Methoden für die breite Anwendung in der Instrumentenaufbereitung müssen kostengünstig, effizient und sicher ablaufen. Zu diesem Zweck eignen sich nur Verfahren, die automatisierbar sind. Von den prionwirksamen Verfahren sind bisher nur die Dampfsterilisation, die Plasmareinigung und die alkalische Reinigung als automatisierte Verfahren erhältlich. Einige Substanzen, wie enzymatische Reiniger oder NaOCl ließen sich ebenfalls in vollautomatisierten Reinigungs- und Desinfektionsgeräten einsetzen. Bei anderen, wie zum Beispiel dem stark schaubildenden SDS, gestaltet sich die automatisierte Anwendung schwieriger.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Eignung von Dekontaminationsverfahren für die Anwendbarkeit bei der Routineaufbereitung von Instrumenten ist deren Materialverträglichkeit. Hochalkalische Verfahren, wie die Behandlung mittels 2M NaOH führen zur Korrosion von Stahlinstrumenten, zur Verfärbung von Titaninstrumenten und zur Trübung von Linsen bei optischen Instrumenten. Auch Dekontamination mit stark oxidierenden Substanzen, wie NaOCl führen zur Oxidation von Instrumenten (Brown *et al.* 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier automatisierte Dekontaminationsverfahren auf ihre Wirksamkeit bei der Beseitigung von oberflächengebundener Prioninfektiosität untersucht.

Als Referenzverfahren wurde das „Verfahren A“ untersucht, welches ein übliches, kommerziell erhältliches und in der Routineaufbereitung weit verbreitetes, alkalisches

Reinigungsverfahren darstellt. Für solche alkalischen Reinigungsverfahren wurde bereits in verschiedenen Arbeiten eine Prionwirksamkeit nachgewiesen (Baier *et al.* 2004; Fichet *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2004; Lemmer *et al.* 2008). Auch das deutsche Robert-Koch-Institut empfiehlt die alkalische Reinigung als zumindest partiell prionwirksames Verfahren bei der Instrumentenaufbereitung (Robert-Koch-Institut 2002). Bereits in der qualitativen *in-vitro*-Testung mit Hilfe des Chemolumineszenztests gelang der Nachweis der unvollständigen PrP-Elimination von den Oberflächen der Prüfkörper mit Hilfe von „Verfahren A“. Dass dabei auch Prioninfektiosität auf den Oberflächen verblieben ist, konnte mit dem Tierversuchstest für oberflächengebundene Prionen bestätigt werden. Von den acht Indikatormäusen, die einen prionkontaminierten und mit „Verfahren A“ behandelten Metalldraht implantiert bekommen hatten, entwickelten sechs eine Prioninfektion. Die Indikatortiere zeigten dabei ein signifikant längeres Überleben im Gegensatz zu Mäusen, welchen Metalldrähte implantiert wurden, welche zuvor mit 10^{-7} -verdünntem 10% Hirnhomogenat kontaminiert worden waren (einfacher, einseitiger T-Test mit Signifikanzniveau 97,5% und $\alpha=2,5\%$ bei $n=8$). Aus dieser Tatsache lässt sich darauf schließen, dass das Verfahren A zu einer Reduktion der ursprünglichen Infektiosität, nach Kontamination mit dem 10% Hirnhomogenat, von mehr als 7 log geführt hat.

Damit zeigt sich die maschinelle, alkalische Reinigung in der vorliegenden Untersuchung sehr viel effektiver, als bei der Risikoabschätzung des britischen „Department of Health“ bei der Beurteilung der Effektivität der Instrumentenreinigung ausgegangen wurde. In dieser Veröffentlichung wurde lediglich von einer Verminderung der anhaftenden Infektiosität um 1-3 log durch eine Reinigung ausgegangen (Department of Health 2005). Diese hohe Effektivität bei der Reinigung kann allerdings auch mit der Wahl der verwendeten Prüfkörper zusammenhängen. Lipscomb *et al.* konnten zeigen, dass die Reinigung von feinen Metalldrähten sehr viel effektiver erfolgt, als zum Beispiel von Metallplättchen. Aus diesem Grund muss bei der Anwendung der Reinigungsverfahren bei der Instrumentenaufbereitung von einer geringeren Effektivität bei der Priondekontamination ausgegangen werden (Lipscomb *et al.* 2006a).

Insgesamt konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, dass die maschinelle, alkalische Reinigung eine partiell priondekontaminierende Wirkung besitzt. Diese reicht allerdings nicht aus, um eine sichere Prävention der iatrogenen Prionübertragung zu gewährleisten.

Als weiteres automatisierbares Verfahren zur Priondekontamination empfiehlt das Robert-Koch-Institut die Dampfsterilisation bei 134°C . Diese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf ihre Prionwirksamkeit hin untersucht. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten wurde dabei die Sterilisation bei 134°C für 2 Stunden durchgeführt, wie sie am

Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München üblich ist. Fichet et al. konnten bei einer Haltezeit von 18 min bei 134°C nur bei Einbringung der Prüfkörper in ein Wasserbad während des Autoklavierens eine vollständige Priondekontamination nachweisen. Bei Dampfsterilisation der Prüfkörper außerhalb des Wasserbads zeigte sich bei einer Haltezeit von 18 min lediglich eine Abreicherung von 4-4,5 log-Stufen gegenüber der Ausgangsinfektiosität (Fichet *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu ließ sich in der vorliegenden Arbeit bei einer Haltezeit der 134°C von 2 Stunden, auch bei Sterilisation der Prüfkörper ohne Wasserbad keine anhaftende Prioninfektiosität mehr nachweisen. Da das Autoklavieren der Prüfkörper bei 134°C für 2h zu einem signifikant längerem Überleben der Indikatortiere geführt hat, als Behandlung mit Verfahren A (einfacher, einseitiger T-Test mit Signifikanzniveau 87,5% und $\alpha=12,5\%$ bei $n=8$), kann für das Autoklavieren bei 134°C für 2h von einer Reduktion der ursprünglichen Infektiosität um deutlich mehr als 7 log ausgegangen werden.

Im Gegensatz zur Dampfsterilisation bei 134°C für 18 min und der alkalischen Reinigung scheint es sich bei der Dampfsterilisation bei 134°C für 2 Stunden um ein wirkungsvolles Verfahren zur Priondekontamination zu handeln, welches keine detektierbare Prioninfektiosität auf den Metalloberflächen zurück lässt. Damit ist beim Einsatz dieses Verfahrens bei der Instrumentenaufbereitung von einer ausreichenden Prävention der iatrogenen Prionübertragung auszugehen.

Das „Verfahren C“, welches in dieser Arbeit *in vitro* mit Hilfe des Chemolumineszenz- und des Zellkulturtests evaluiert wurde, verbindet die in anderen Arbeiten als prionwirksam bestätigten und vom RKI als zumindest partiell priondekontaminierend deklarierte Behandlung von prionkontaminierten Oberflächen mittels NaOH und NaOCl (Robert-Koch-Institut 2002). Dies zeigt, dass es auch möglich ist, solche materialunverträglichen und im Hinblick auf die Arbeitssicherheit problematischen Substanzen in der vollautomatischen Instrumentenaufbereitung einzusetzen. Die Wirksamkeitsprüfung des „Verfahrens C“ erfolgte nur *in vitro*, da die Materialverträglichkeit des Verfahrens keine Anwendung in der breiten Instrumentenaufbereitung erlaubt.

Im Gegensatz dazu ist das „Verfahren B“ deutlich materialverträglicher. Es ist von einer Vielzahl von Instrumentenherstellern für die Aufbereitung zugelassen und eignet sich sogar für die Reinigung von minimalinvasiven Instrumenten inklusive der Optiken. Bereits in der *in vitro* Untersuchung mit Hilfe des Chemolumineszenztests konnte eine Elimination des PrP von der Metalloberfläche unter die Nachweisgrenze des Tests bestätigt werden. Dieses deutlich bessere Reinigungsergebnis von „Verfahren B“ im Gegensatz zu „Verfahren A“ deckt sich mit weiteren *in vitro* Untersuchungen von Draghici et al. Diese hatten mit Hilfe einer radioaktiv markierten Testanschmutzung die Reinigungsleistung eines verkürzten „Verfahrens B“ mit der von „Verfahren A“ verglichen. Dabei konnte

ebenfalls eine deutlich überlegene Reinigungsleistung von „Verfahren B“ gegenüber „Verfahren A“ gezeigt werden (Draghici 2005). Dass die Elimination von nachweisbarem PrP von den Metalloberflächen auch mit einer Beseitigung der Prioninfektiosität einher geht konnte *in vitro* mit Hilfe des Zellkulturtests und *in vivo* mit Hilfe der Indikatormäuse bestätigt werden. Mit keinem der beiden Tests ließ sich auf den Oberflächen der Prüfkörper verbleibende Prioninfektiosität nachweisen. Dabei zeigten die Indikatortiere nach Implantation von Prüfkörpern, welche mit Verfahren B dekontaminiert worden waren, ein signifikant längeres Überleben, als Tiere, welche einen mit Verfahren A behandelten Draht implantiert bekommen hatten (einfacher, einseitiger T-Test mit Signifikanzniveau 87,5% und $\alpha=12,5\%$ bei $n=7$). Auf Grund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass das „Verfahren B“, ebenfalls wie das Autoklavieren bei 134°C für 2h, zu einer Verminderung der anhaftenden Prioninfektiosität um weit mehr als 7 log führt. Somit handelt es sich bei „Verfahren B“, ebenfalls wie bei der Dampfsterilisation bei 134°C für 2 Stunden, um ein wirkungsvolles Verfahren zur Priondekontamination, welches keine detektierbare Prioninfektiosität auf den Metalloberflächen zurücklässt. Damit ist beim Einsatz dieses Verfahrens bei der Instrumentenaufbereitung ebenfalls von einer ausreichenden Prävention der iatrogenen Prionübertragung auszugehen.

Damit stehen mit der Dampfsterilisation bei 134°C für 2h und der vollautomatischen, oxidativen Reinigung mit „Verfahren B“ zwei Methoden zur Verfügung, die jeweils eine nachgewiesene Reduktion der auf Oberflächen anhaftenden Infektiosität um mehr als 7 log-Stufen ermöglichen. Beide Verfahren laufen voll automatisiert ab und sind aus Sicht des Arbeitsschutzes und der Umweltverträglichkeit unbedenklich. Die Verfahren sind beide gut materialverträglich und eignen sich für die breite Anwendung bei der Aufbereitung einer Vielzahl von Instrumenten. Dabei ist allerdings eine gute Thermostabilität der Instrumente Voraussetzung für die Dampfsterilisierbarkeit bei 134°C. Bei einer Behandlung mit „Verfahren B“ müssen die Instrumente lediglich eine Erhitzung auf 93°C überstehen.

Das „Verfahren B“ ist im Gegensatz zur herkömmlichen alkalischen Reinigung nur etwa um 10 Minuten länger, wodurch die Dauer der Instrumentenaufbereitung nur unwesentlich beeinflusst wird. Anders sieht es bei der Dampfsterilisation bei 134°C mit einer Haltedauer von 2h aus. Hier verlängert sich der Sterilisationsprozess im Vergleich zur herkömmlichen Sterilisation bei 121°C und einer Haltedauer von 20 min um mehr als 1,5 Stunden.

Das Robert-Koch-Institut empfiehlt eine Kombination von mindestens zwei partiell prionwirksamen Verfahren bei der Instrumentenaufbereitung. Bei der Kombination von Reinigung mittels „Verfahren B“ gefolgt von einer Dampfsterilisation ist selbst bei einer Haltedauer der Dampfsterilisation bei 134°C für nur 18 min noch von einer additiven

Prionreduktion von mehr als 11 log gegenüber der Ausgangskontamination auszugehen (Fichet *et al.* 2004). Legt man die vom britischen Department of Health angenommene Prionkontamination der Instrumente nach Benutzung mit bis zu 10^6 ID₅₀ bei Beschmutzung mit ZNS- oder Augenhintergrund-Gewebe und bis zu 10^3 ID₅₀ bei Milz- oder Tonsillengewebe zugrunde, so wird deutlich, dass mit der Kombination der Instrumentenreinigung mittels „Verfahren B“ und der Dampfsterilisation bei 134°C mit einer Haltedauer von 18 min eine ausreichende Sicherheit bei der Instrumentenaufbereitung erreicht werden kann.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein standardisiertes Vorgehen zur Evaluation der Prionwirksamkeit von maschinellen Dekontaminationsverfahren erarbeitet. Das Vorgehen umfasst dabei die Überprüfung der Dekontaminationsleistung *in vitro* (Stufe 1), gefolgt von der abschließenden Kontrolle *in vivo* (Stufe 2). Als Prüfkörper wurden jeweils kleine, prionkontaminierte Metallnetze bzw. –drähte verwendet, welche mit dem gesamten zu testenden Dekontaminationsverfahren behandelt werden konnten.

Die Untersuchung der Dekontaminationsleistung *in vitro* erfolgte dabei in zwei Schritten (Stufe 1a und Stufe 1b).

Für die Überprüfung in Stufe 1a wurde ein Test auf Chemolumineszenzbasis etabliert, mit dessen Hilfe PrP direkt auf Metalloberflächen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden kann. Die Visualisierung der PrP-Anschmutzung direkt auf der Oberfläche erlaubt dabei die Aufdeckung von Problemstellen auf den gereinigten Gegenständen. Mit Hilfe des Chemolumineszenztests sind keine quantitativen Aussagen über die Prionanreicherung möglich. Ebenso kann mit Hilfe des Tests nicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} unterschieden werden.

Für die Stufe 1b der Wirksamkeitsprüfung wurde ein Test auf Zellkulturbasis etabliert. Dieser erlaubt es Prioninfektiosität auf Metalloberflächen nachzuweisen. Dabei gelingt mit dem Testverfahren noch ein positiver Prionnachweis bei einer Verdünnung der zur Kontamination der Prüfkörper verwendeten Ausgangsinfektiosität um 4 log-Stufen. Dadurch erlaubt der Zellkulturtest eine quantitative Aussage zur Prionanreicherung durch das zu testende Dekontaminationsverfahren.

In der Stufe 2 erfolgt die abschließende Überprüfung der Dekontaminationsleistung *in vivo*. Hierzu wurde ein Tierversuchstest etabliert, bei dem Indikator-tieren prionkontaminierte Prüfkörper, die zuvor dem zu testenden Dekontaminationsverfahren zugeführt wurden, intracerebral implantiert wurden. Als Indikator-tiere wurden Tga20-Mäuse verwendet. Mit Hilfe der Indikator-tiere ist es möglich mindestens eine Verdünnung der Ausgangskontamination der Prüfkörper um 7 log-Stufen zu detektieren. Durch ein ausgeprägtes, inverses Verhältnis zwischen Logarithmus der am Prüfkörper anhaftenden Prionmenge und der Inkubationszeit der Tiere bis zum Auftreten von scrapiespezifischen Symptomen, kann mit Hilfe des Tierversuchstests eine quantitative Aussage zur Anreicherung der Prioninfektiosität durch das zu überprüfende Dekontaminationsverfahren gemacht werden.

Mit Hilfe des erarbeiteten Vorgehens zur Evaluation maschineller Dekontaminationsverfahren wurden verschiedene Verfahren auf ihre Prionwirksamkeit hin überprüft.

Bei dem getesteten „Verfahren A“, welches einem herkömmlichen, alkalischen Reinigungsverfahren entspricht, wie es in der Instrumentenaufbereitung weit verbreitet ist, zeigte sich bereits in der Vortestung in „Stufe 1a“ eine ungenügende Reinigungsleistung. Diese bestätigte sich bei der Überprüfung mit Hilfe der Indikatortiere. Hier starben während des Versuchszeitraumes drei der 8 Versuchstiere an einer Scrapieinfektion. Bei insgesamt 6 der 8 Tiere ließ sich nach Beendigung des Versuchs eine Prioninfektion in der immunhistochemischen, bzw. Westernblot-Untersuchung des Gehirns nachweisen. In der quantitativen Versuchsauswertung zeigte sich dennoch, dass das „Verfahren A“ zu einer Abreicherung der Ausgangsinfektiosität um mindestens 7 log geführt hatte.

Im Gegensatz zu „Verfahren A“ konnte weder bei Behandlung der Prüfkörper mit „Verfahren B“ noch nach Autoklavieren bei 134°C für 2h verbliebene Prioninfektiosität auf den Oberflächen nachgewiesen werden. Die quantitative Versuchsauswertung zeigte, dass beide Verfahren zu einer Abreicherung der Ausgangsinfektiosität um weit mehr als 7 log geführt hatten.

Bei einem weiteren in Stufe 1 erfolgreich getesteten „Verfahren C“ wurde aufgrund der geringen Materialverträglichkeit und dem damit unmöglichen Einsatz in der breiten Instrumentenaufbereitung, auf eine Austestung im Tierversuch verzichtet. Im Gegensatz dazu ist das „Verfahren B“ gut materialverträglich. Es ist von vielen Instrumentenherstellern zur Reinigung zugelassen und sogar zur Aufbereitung von minimalinvasiven Instrumenten inklusive der Optiken geeignet. Der Reinigungszyklus ist im Gegensatz zur herkömmlichen, maschinellen Reinigung nur um etwa 10 Minuten länger, wodurch die Dauer der Instrumentenaufbereitung nur unwesentlich beeinflusst wird.

Damit steht in Zukunft ein vollautomatisches Reinigungsverfahren für die breite Anwendung in der Instrumentenaufbereitung zur Verfügung, welches gut prionwirksam ist und somit eine echte Prävention der iatrogenen CJD-Übertragung erlaubt. In Kombination mit der Dampfsterilisation bei 134°C für 18 min sind damit Abreicherungen von 11 log-Stufen der anhaftenden Prioninfektiosität zu erreichen.

Der erfolgreiche Einsatz des etablierten Vorgehens zur Überprüfung von Dekontaminationsverfahren für oberflächengebundene Prionen bestätigt dessen Praxistauglichkeit. Dieses Vorgehen erlaubt in Zukunft neue, automatisierte Verfahren zur Priondekontamination zu entwickeln und zu überprüfen. Die durchgeführten Wirksamkeitsprüfungen werden durch das standardisierte Prüfprotokoll vergleichbare und reliable Ergebnisse liefern. Durch die Evaluation der Prionwirksamkeit in mehreren Stufen wird das Prüfprotokoll helfen, Kosten zu senken und den Einsatz von Tierversuchen zu vermindern.

7 Literaturverzeichnis

- Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig and M. C. Clarke (1967). "Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?" Nature **214**(90): 764-766.
- Alper, T., D. A. Haig and M. C. Clarke (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." Biochem.Biophys.Res.Comm. **22**(3): 278-284.
- Alper, T., D. A. Haig and M. C. Clarke (1978). "The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid." J Gen Virol **41**(3): 503-16.
- Appel, T., M. Wolff, F. von Rheinbaben, M. Heinzl and D. Riesner (2001). "Heat stability of prion rods and recombinant prion protein in water, lipid and lipid-water mixtures." J Gen Virol **82**(Pt 2): 465-73.
- Arnold, J. E., C. Tipler, L. Laszlo, J. Hope, M. Landon and R. J. Mayer (1995). "The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain." Journal of Pathology **176**(4): 403-411.
- Asano, M., S. Mohri, J. W. Ironside, M. Ito, N. Tamaoki and T. Kitamoto (2006). "vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection." Biochem Biophys Res Commun **342**(1): 293-9.
- Baier, M., A. Schwarz and M. Mielke (2004). "Activity of an alkaline 'cleaner' in the inactivation of the scrapie agent." J.Hosp.Infect. **57**(1): 80-84.
- Ballerini, C., P. Gourdain, V. Bachy, N. Blanchard, E. Levavasseur, S. Gregoire, P. Fontes, P. Aucouturier, C. Hivroz and C. Carnaud (2006). "Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells." J Immunol **176**(12): 7254-62.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46**(3): 417-428.
- Bauman, P. A., L. A. Lawrence, L. Biesert, H. Dichtelmuller, F. Fabbrizzi, R. Gajardo, A. Groner, J. I. Jorquera, C. Kempf, T. R. Kreil, I. von Hoegen, D. Y. Pifat, S. R. Petteway, Jr. and K. Cai (2006). "Critical factors influencing prion inactivation by sodium hydroxide." Vox Sang **91**(1): 34-40.

- Baxter, H. C., G. A. Campbell, A. G. Whittaker, A. C. Jones, A. Aitken, A. H. Simpson, M. Casey, L. Bountiff, L. Gibbard and R. L. Baxter (2005). "Elimination of transmissible spongiform encephalopathy infectivity and decontamination of surgical instruments by using radio-frequency gas-plasma treatment." J Gen Virol **86**(Pt 8): 2393-9.
- Beekes, M., P. A. McBride and E. Baldauf (1998). "Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie." J Gen Virol **79 (Pt 3)**: 601-7.
- Bencsik, A., S. Lezmi and T. Baron (2001). "Autonomic nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie." J Neurovirol **7**(5): 447-53.
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman and D. C. Bolton (1992). "Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein." Neurology **42**(1): 149-56.
- Bernoulli, C., J. Siegfried, G. Baumgartner, F. Regli, T. Rabinowicz, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1977). "Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery." The Lancet **1**(8009): 478-479.
- Bessen, R. A. (1996). "Neurodegenerative Prion Diseases." Science & Medicine(9-10): 12-19.
- Bessen, R. A., D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury and B. Caughey (1995). "Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein." Nature **375**(6533): 698-700.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992a). "Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent." J Virol **66**(4): 2096-101.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992b). "Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters." J Gen Virol **73 (Pt 2)**: 329-34.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). "Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy." J Virol **68**(12): 7859-7868.
- Bishop, M. T., P. Hart, L. Aitchison, H. N. Baybutt, C. Plinston, V. Thomson, N. L. Tuzi, M. W. Head, J. W. Ironside, R. G. Will and J. C. Manson (2006). "Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD." Lancet Neurol **5**(5): 393-8.

- Blattler, T., S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtlander, C. Weissmann and A. Aguzzi (1997). "PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain." Nature **389**(6646): 69-73.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." Science **218**(4579): 1309-1311.
- Bolton, D. C., R. K. Meyer and S. B. Prusiner (1985). "Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein." J Virol. **53**(2): 596-606.
- Borchelt, D. R., A. Taraboulos and S. B. Prusiner (1992). "Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway." J.Biol.Chem. **267**(23): 16188-16199.
- Bosque, P. J. and S. B. Prusiner (2000). "Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection." Journal of Virology **74**(9): 4377-4386.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal.Biochem. **72**: 248-254.
- Brandner, S., S. Isenmann, G. Kuhne and A. Aguzzi (1998). "Identification of the end stage of scrapie using infected neural grafts." Brain Pathol **8**(1): 19-27.
- Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann and A. Aguzzi (1996). "Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity." Nature **379**(6563): 339-43.
- Brown, D. R. (2005). "Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence." Folia Neuropathol **43**(4): 229-43.
- Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway and H. Kretzschmar (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." Nature **390**(6661): 684-687.
- Brown, D. R., B. Schmidt and H. A. Kretzschmar (1996). "Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment." Nature **380**(6572): 345-347.
- Brown, D. R., B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell and I. M. Jones (1999). "Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase." Biochem J **344 Pt 1**: 1-5.

Brown, P., J. P. Brandel, M. Preece and T. Sato (2006). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: the waning of an era." Neurology **67**(3): 389-93.

Brown, P., L. Cervenakova, L. G. Goldfarb, W. R. McCombie, R. Rubenstein, R. G. Will, M. Pocchiari, J. F. Martinez-Lage, C. Scalici, C. Masullo and et al. (1994). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine." Neurology **44**(2): 291-3.

Brown, P., P. P. Liberski, A. Wolff and D. C. Gajdusek (1990). "Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications." J Infect Dis **161**(3): 467-72.

Brown, P., M. Preece, J. P. Brandel, T. Sato, L. McShane, I. Zerr, A. Fletcher, R. G. Will, M. Pocchiari, N. R. Cashman, J. H. d'Aignaux, L. Cervenakova, J. Fradkin, L. B. Schonberger and S. J. Collins (2000). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium." Neurology **55**(8): 1075-81.

Brown, P., R. G. Rohwer, B. C. Dunstan, C. MacAuley, D. C. Gajdusek and W. N. Drohan (1998). "The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy." Transfusion **38**(9): 810-6.

Brown, S. A., K. Merritt, T. O. Woods and D. N. Busick (2005). "Effects on instruments of the World Health Organization--recommended protocols for decontamination after possible exposure to transmissible spongiform encephalopathy-contaminated tissue." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **72**(1): 186-90.

Bruce, M. E. and A. G. Dickinson (1987). "Biological evidence that scrapie agent has an independent genome." J Gen Virol **68 (Pt 1)**: 79-89.

Bruce, M. E. and H. Fraser (1991). "Scrapie strain variation and its implications." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 125-38.

Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser and C. J. Bostock (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.

Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-47.

- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-82.
- Butler, D. A., M. R. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury and S. B. Prusiner (1988). "Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins." J Virol. **62**(5): 1558-1564.
- Carp, R. I., H. Meeker, E. Sersen and P. Kozlowski (1998). "Analysis of the incubation periods, induction of obesity and histopathological changes in senescence-prone and senescence-resistant mice infected with various scrapie strains." J.Gen.Virol. **79 (Pt 11)**: 2863-2869.
- Cashman, N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton and P. E. Bendheim (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-92.
- Caughey, B. (1993). "Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture." Br Med Bull **49**(4): 860-72.
- Caughey, B. and G. J. Raymond (1993). "Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells." J Virol **67**(2): 643-50.
- Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes and W. S. Caughey (1991). "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy." Biochemistry **30**(31): 7672-7680.
- Chandler, R. L. (1961). "Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material." Lancet **1**: 1378-9.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer and J. M. Keith (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie- infected and uninfected brain." Nature **315**(6017): 331-333.
- Clarke, M. C. and D. A. Haig (1970). "Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture." Nature **225**(227): 100-101.
- Clarke, M. C. and G. C. Millson (1976). "Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent." Nature **261**(5556): 144-145.
- Collinge, J., M. S. Palmer and A. J. Dryden (1991). "Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **337**(8755): 1441-2.

Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey and P. L. Lantos (1995). "Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein." Nature **378**(6559): 779-83.

Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside and A. F. Hill (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." Nature **383**(6602): 685-690.

Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, J. Beck, S. Mead, D. J. Thomas and M. P. Alpers (2006). "Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods." Lancet **367**(9528): 2068-74.

Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke and J. G. Jefferys (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**(6487): 295-7.

Come, J. H., P. E. Fraser and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **90**(13): 5959-5963.

Cordeiro, Y. and J. L. Silva (2005). "The hypothesis of the catalytic action of nucleic acid on the conversion of prion protein." Protein Pept Lett **12**(3): 251-5.

Creutzfeldt, H. G. (1920). "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems." Z. Ges. Neurol. Psychiatr. **57**: 1-18.

Davanipour, Z., L. Goodman, M. Alter, E. Sobel, D. Asher and D. C. Gajdusek (1984). "Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **311**(24): 1582-3.

DeArmond, S. J., S. L. Yang, A. Lee, R. Bowler, A. Taraboulos, D. Groth and S. B. Prusiner (1993). "Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6449-53.

Department of Health (2005). "Assessing the risk of vCJD transmission via surgery:an interim review."

<http://www.dh.gov.uk/PublicationsAndStatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/fs/en#6311145>.

Deslys, J. P., D. Marce and D. Dormont (1994). "Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." J Gen Virol **75 (Pt 1)**: 23-7.

- Dickinson, A. G. and V. M. Meikle (1971). "Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent." Mol Gen Genet **112**(1): 73-9.
- Dinakaran, S. and V. V. Kayarkar (2002). "Debris on processed ophthalmic instruments: a cause for concern." Eye **16**(3): 281-4.
- Diringer, H., H. Gelderblom, H. Hilmert, M. Ozel, C. Edelbluth and R. H. Kimberlin (1983). "Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein." Nature **306**(5942): 476-8.
- Dodelet, V. C. and N. R. Cashman (1998). "Prion protein expression in human leukocyte differentiation." Blood **91**(5): 1556-1561.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright and H. J. Dyson (1997). "Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29- 231): the N terminus is highly flexible." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**(25): 13452-13457.
- Dormont, D. (2002). "Prion diseases: pathogenesis and public health concerns." FEBS Lett **529**(1): 17-21.
- Draghici, A., Gauer, J., Michels, W., & Roth, K. (2005). "Investigation of cleaning performance following the standard prEN/ISO 15883-1." Zentr Steril **13**(1): 3444.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten and D. Cowen (1974). "Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **290**(12): 692-3.
- Eigen, M. (1996). "Prionics or the kinetic basis of prion diseases." Biophys Chem **63**(1): A1-18.
- Elleman, C. J. (1984). "Attempts to establish the scrapie agent in cell lines." Vet.Res.Comm. **8**(4): 309-316.
- Endo, T., D. Groth, S. B. Prusiner and A. Kobata (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8388.
- Fichet, G., E. Comoy, C. Duval, K. Antloga, C. Dehen, A. Charbonnier, G. McDonnell, P. Brown, C. I. Lasmezas and J. P. Deslys (2004). "Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices." The Lancet **364**(9433): 521-526.

- Finkenstaedt, M., A. Szudra, I. Zerr, S. Poser, J. H. Hise, J. M. Stoebner and T. Weber (1996). "MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease." Radiology **199**(3): 793-8.
- Fischer, M., T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi and C. Weissmann (1996). "Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie." EMBO J. **15**(6): 1255-1264.
- Fischer, M. B., C. Roeckl, P. Parizek, H. P. Schwarz and A. Aguzzi (2000). "Binding of disease-associated prion protein to plasminogen." Nature **408**(6811): 479-83.
- Flechsig, E., I. Hegyi, M. Enari, P. Schwarz, J. Collinge and C. Weissmann (2001). "Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions." Molecular Medicine **7**(10): 679-684.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani and F. Tagliavini (1993). "Neurotoxicity of a prion protein fragment." Nature **362**(6420): 543-546.
- Gabriel, J. M., B. Oesch, H. Kretzschmar, M. Scott and S. B. Prusiner (1992). "Molecular cloning of a candidate chicken prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9097-101.
- Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs and M. Alpers (1966). "Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees." Nature **209**(25): 794-6.
- Gajdusek, D. C. and V. Zigas (1957). "Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population." N Engl J Med **257**(20): 974-8.
- Garske, T., H. J. Ward, P. Clarke, R. G. Will and A. C. Ghani (2006). "Factors determining the potential for onward transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease via surgical instruments." J R Soc Interface **3**(11): 757-66.
- Gibbons, R. A. and G. D. Hunter (1967). "Nature of the scrapie agent." Nature **215**(105): 1041-1043.
- Gibbs, C. J., Jr., D. M. Asher, A. Koblina, H. L. Amyx, M. P. Sulima and D. C. Gajdusek (1994). "Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery." J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry **57**(6): 757-758.
- Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel and W. B. Matthews (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." Science **161**(839): 388-9.

- Gibson, P. E., T. M. Bell and E. J. Field (1972). "Failure of the scrapie agent to replicate in L5178Y mouse leukaemic cells." Res.Vet.Sci. **13**(1): 95-96.
- Giese, A., D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist and H. A. Kretzschmar (1998). "Role of microglia in neuronal cell death in prion disease." Brain Pathol **8**(3): 449-57.
- Giese, A., M. H. Groschup, B. Hess and H. A. Kretzschmar (1995). "Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis." Brain Pathol **5**(3): 213-21.
- Giese, A. and H. A. Kretzschmar (2001). "Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies." Curr Top Microbiol Immunol **253**: 203-17.
- Glockshuber, R., S. Hornemann, M. Billeter, R. Riek, G. Wider and K. Wuthrich (1998). "Prion protein structural features indicate possible relations to signal peptidases." FEBS Lett **426**(3): 291-6.
- Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2004). "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101**(22): 8342-8347.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." Nature **215**(105): 1043-1044.
- Hadlow, W. J. (1959). "Scrapie and kuru." The Lancet **ii**: 289-290.
- Harris, D. A., P. Lele and W. D. Snider (1993). "Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4309-13.
- Herms, J. W., H. A. Kretzschmar, S. Titz and B. U. Keller (1995). "Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice." Eur. J. Neurosci. **7**: 2508-2512.
- Herzog, C., J. Riviere, N. Lescoutra-Etcheagaray, A. Charbonnier, V. Leblanc, N. Sales, J. P. Deslys and C. I. Lasmézas (2005). "PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease." J Virol **79**(22): 14339-45.
- Hill, A. F., R. J. 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 and J. Collinge (1999). "Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples." Lancet **353**(9148): 183-9.

Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey and P. Lantos (1997a). "The same prion strain causes vCJD and BSE." Nature **389**(6650): 448-50, 526.

Hill, A. F., M. Zeidler, J. Ironside and J. Collinge (1997b). "Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy." The Lancet **349**(9045): 99-100.

Hilton, D. A., E. Fayers, P. Edwards, J. W. Ironside and J. Zajicek (1998). "Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **352**(9129): 703-4.

Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, D. Ritchie, M. Penney, D. Hegazy and J. W. Ironside (2004). "Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples." J Pathol **203**(3): 733-9.

Hornshaw, M. P., J. R. McDermott and J. M. Candy (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein." Biochem Biophys Res Commun **207**(2): 621-9.

Houston, F., J. D. Foster, A. Chong, N. Hunter and C. J. Bostock (2000). "Transmission of BSE by blood transfusion in sheep." Lancet **356**(9234): 999-1000.

Hsiao, K., H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott and S. B. Prusiner (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome." Nature **338**(6213): 342-5.

Hsich, G., K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee and M. G. Harrington (1996). "The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies." New England Journal of Medicine **335**(13): 924-930.

Huang, Z., J. M. Gabriel, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (1994). "Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7139-43.

Huang, Z., S. B. Prusiner and F. E. Cohen (1995). "Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment." Fold Des **1**(1): 13-9.

Huillard d'Aignaux, J., D. Costagliola, J. Maccario, T. Billette de Villemeur, J. P. Brandel, J. P. Deslys, J. J. Hauw, J. L. Chaussain, Y. Agid, D. Dormont and A. Alperovitch (1999). "Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France." Neurology **53**(6): 1197-201.

Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. MacKenzie and F. Houston (2002). "Transmission of prion diseases by blood transfusion." J Gen Virol **83**(Pt 11): 2897-905.

Ironside, J. W., M. T. Bishop, K. Connolly, D. Hegazy, S. Lowrie, M. Le Grice, D. L. Ritchie, L. M. McCardle and D. A. Hilton (2006). "Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study." Bmj **332**(7551): 1186-8.

Jackson, G. S., E. McKintosh, E. Flechsig, K. Prodromidou, P. Hirsch, J. Linehan, S. Brandner, A. R. Clarke, C. Weissmann and J. Collinge (2005). "An enzyme-detergent method for effective prion decontamination of surgical steel." J Gen Virol **86**(Pt 3): 869-78.

Jakob, A. M. (1921a). "Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose - Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)." Dtsch. Z. Nervenheilk. **70**: 132-146.

Jakob, A. M. (1921b). "Über eine der Multiplen Sklerose klinisch nahestehenden Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde." Medizinische Klinik **13**: 372.

Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**(6): 1055-8.

Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1997). "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**(19): 10069-10074.

Kasermann, F. and C. Kempf (2003). "Sodium hydroxide renders the prion protein PrPSc sensitive to proteinase K." J Gen.Virol. **84**(Pt 11): 3173-3176.

Kimberlin, R. H., S. Cole and C. A. Walker (1986). "Transmissible mink encephalopathy (TME) in Chinese hamsters: identification of two strains of TME and comparisons with scrapie." Neuropathol Appl Neurobiol **12**(2): 197-206.

Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1978). "Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves." J Comp Pathol **88**(1): 39-47.

Kimberlin, R. H., C. A. Walker and H. Fraser (1989). "The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice." J Gen Virol **70 (Pt 8)**: 2017-25.

Kimberlin, R. H., C. A. Walker, G. C. Millson, D. M. Taylor, P. A. Robertson, A. H. Tomlinson and A. G. Dickinson (1983). "Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents." J Neurol Sci **59(3)**: 355-69.

Kitamoto, T., R. Yi, S. Mohri and J. Tateishi (1990). "Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent." Brain Res **508(1)**: 165-7.

Klatzo, I., D. C. Gajdusek and V. Zigas (1959). "Pathology of Kuru." Lab Invest **8(4)**: 799-847.

Klohn, P. C., L. Stoltze, E. Flechsig, M. Enari and C. Weissmann (2003). "A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **100(20)**: 11666-11671.

Kramer, M. L., H. D. Kratzin, B. Schmidt, A. Romer, O. Windl, S. Liemann, S. Hornemann and H. Kretzschmar (2001). "Prion protein binds copper within the physiological concentration range." J Biol.Chem. **276(20)**: 16711-16719.

Kretzschmar, H. A. and W. Feiden (2002). "Prionkrankheiten des Menschen." Pathologe **23**: 241-251.

Kretzschmar, H. A., J. W. Ironside, S. J. DeArmond and J. Tateishi (1996). "Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Arch Neurol **53(9)**: 913-20.

Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring and S. J. DeArmond (1986). "Scrapie prion proteins are synthesized in neurons." Am.J Pathol. **122(1)**: 1-5.

Kretzschmar, H. A., T. Tings, A. Madlung, A. Giese and J. Herms (2000). "Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse." Arch.Virol.Suppl(16): 239-249.

Kurschner, C. and J. I. Morgan (1995). "The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system." Brain Res Mol Brain Res **30(1)**: 165-8.

Kurschner, C. and J. I. Morgan (1996). "Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein." Brain Res Mol Brain Res **37(1-2)**: 249-58.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.

Langeveld, J. P., J. J. Wang, D. F. Van de Wiel, G. C. Shih, G. J. Garssen, A. Bossers and J. C. Shih (2003). "Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep." J Infect Dis **188**(11): 1782-9.

Lasmezas, C. I., E. Comoy, S. Hawkins, C. Herzog, F. Mouthon, T. Konold, F. Auvre, E. Correia, N. Lescoutra-EtcheGARAY, N. Sales, G. Wells, P. Brown and J. P. Deslys (2005). "Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates." Lancet **365**(9461): 781-3.

Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside and J. J. Hauw (1996). "BSE transmission to macaques." Nature **381**(6585): 743-744.

Laszlo, L., J. Lowe, T. Self, N. Kenward, M. Landon, T. McBride, C. Farquhar, I. McConnell, J. Brown and J. Hope (1992). "Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies." Journal of Pathology **166**(4): 333-341.

Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2004). "Synthetic mammalian prions." Science **305**(5684): 673-6.

Lemmer, K., M. Mielke, C. Kratzel, M. Joncic, M. Oezel, G. Pauli and M. Beekes (2008). "Decontamination of surgical instruments from prions. II. In vivo findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces." J Gen Virol **89**(Pt 1): 348-58.

Lemmer, K., M. Mielke, G. Pauli and M. Beekes (2004). "Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrPSc bound to steel surfaces." J.Gen.Virol. **85**(Pt 12): 3805-3816.

Lin, M. C., T. Mirzabekov and B. L. Kagan (1997). "Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment." J Biol.Chem. **272**(1): 44-47.

Lipscomb, I. P., H. E. Pinchin, R. Collin, K. Harris and C. W. Keevil (2006a). "Are surgical stainless steel wires used for intracranial implantation of PrPsc a good model of iatrogenic transmission from contaminated surgical stainless steel instruments after cleaning?" J Hosp Infect **64**(4): 339-43.

- Lipscomb, I. P., A. K. Sihota, M. Botham, K. L. Harris and C. W. Keevil (2006b). "Rapid method for the sensitive detection of protein contamination on surgical instruments." J Hosp Infect **62**(2): 141-8.
- Lledo, P. M., P. Tremblay, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and R. A. Nicoll (1996). "Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2403-7.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie and R. G. Will (2004). "Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion." Lancet **363**(9407): 417-21.
- Locht, C., B. Chesebro, R. Race and J. M. Keith (1986). "Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6372-6.
- Lorains, J. W., C. Henry, D. A. Agbamu, M. Rossi, M. Bishop, R. G. Will and J. W. Ironside (2001). "Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient." Lancet **357**(9265): 1339-40.
- Mabbott, N. A., F. Mackay, F. Minns and M. E. Bruce (2000). "Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie." Nat Med **6**(7): 719-20.
- Maignien, T., C. I. Lasmezas, V. Beringue, D. Dormont and J. P. Deslys (1999). "Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents." J Gen Virol **80** (Pt 11): 3035-42.
- Maissen, M., C. Roeckl, M. Glatzel, W. Goldmann and A. Aguzzi (2001). "Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species." Lancet **357**(9273): 2026-8.
- Mallucci, G. R., S. Ratte, E. A. Asante, J. Linehan, I. Gowland, J. G. Jefferys and J. Collinge (2002). "Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration." Embo J **21**(3): 202-10.
- Manson, J., P. McBride and J. Hope (1992a). "Expression of the PrP gene in the brain of sinc congenic mice and its relationship to the development of scrapie." Neurodegeneration **1**: 45-52.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman and J. Hope (1992b). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-122.

Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell and J. Hope (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**(2-3): 121-7.

Masters, C. L. and E. P. Richardson, Jr. (1978). "Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change." Brain **101**(2): 333-44.

McKinley, M. P., D. C. Bolton and S. B. Prusiner (1983). "A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." Cell **35**(1): 57-62.

McLeod, A. H., H. Murdoch, J. Dickinson, M. J. Dennis, G. A. Hall, C. M. Buswell, J. Carr, D. M. Taylor, J. M. Sutton and N. D. Raven (2004). "Proteolytic inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent." Biochem Biophys Res Commun **317**(4): 1165-70.

Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski and K. Iqbal (1981). "Abnormal fibrils from scrapie-infected brain." Acta Neuropathol (Berl) **54**(1): 63-74.

Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski, L. Manuelidis and E. E. Manuelidis (1983). "Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease." Nature **306**(5942): 474-6.

Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry and S. B. Prusiner (1986). "Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2310-4.

Millson, G. C., G. D. Hunter and R. H. Kimberlin (1971). "An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures. II. The association of scrapie activity with membrane fractions." J Comp Pathol **81**(2): 255-65.

Mohan, J., K. L. Brown, C. F. Farquhar, M. E. Bruce and N. A. Mabbott (2004). "Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues." J Dermatol Sci **35**(2): 101-11.

Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi and C. Weissmann (2000). "Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells." Science **288**(5469): 1257-9.

Morante, S., R. Gonzalez-Iglesias, C. Potrich, C. Meneghini, W. Meyer-Klaucke, G. Menestrina and M. Gasset (2004). "Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries in the

prion protein: implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II)-mediated assemblies." J Biol Chem **279**(12): 11753-9.

Moser, M., R. J. Colello, U. Pott and B. Oesch (1995). "Developmental expression of the prion protein gene in glial cells." Neuron **14**(3): 509-17.

Muller-Hellwig, S., M. H. Groschup, R. Pichner, M. Gareis, E. Martlbauer, S. Scherer and M. J. Loessner (2006). "Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrP^{Sc} in hamster brain homogenates by foodborne bacteria." Syst Appl Microbiol **29**(2): 165-71.

Murdoch, H., D. Taylor, J. Dickinson, J. T. Walker, D. Perrett, N. D. Raven and J. M. Sutton (2006). "Surface decontamination of surgical instruments: an ongoing dilemma." J Hosp Infect **63**(4): 432-8.

Naslavsky, N., R. Stein, A. Yanai, G. Friedlander and A. Taraboulos (1997). "Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform." J Biol.Chem. **272**(10): 6324-6331.

Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow and L. E. Hood (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-746.

Oldstone, M. B., R. Race, D. Thomas, H. Lewicki, D. Homann, S. Smelt, A. Holz, P. Koni, D. Lo, B. Chesebro and R. Flavell (2002). "Lymphotoxin-alpha- and lymphotoxin-beta-deficient mice differ in susceptibility to scrapie: evidence against dendritic cell involvement in neuroinvasion." J Virol **76**(9): 4357-63.

Onodera, T., T. Ikeda, Y. Muramatsu and M. Shinagawa (1993). "Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan." Microbiol Immunol **37**(4): 311-6.

Owen, F., M. Poulter, J. Collinge and T. J. Crow (1990). "A codon 129 polymorphism in the PRIP gene." Nucleic Acids Res **18**(10): 3103.

Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes and J. Collinge (1991). "Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Nature **352**(6333): 340-2.

Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen and et al. (1993). "Conversion of alpha-helices into

beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10962-6.

Paramithiotis, E., M. Pinard, T. Lawton, S. LaBoissiere, V. L. Leathers, W. Q. Zou, L. A. Estey, J. Lamontagne, M. T. Lehto, L. H. Kondejewski, G. P. Francoeur, M. Papadopoulos, A. Haghghat, S. J. Spatz, M. Head, R. Will, J. Ironside, K. O'Rourke, Q. Tonelli, H. C. Ledebur, A. Chakrabarty and N. R. Cashman (2003). "A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation." Nat.Med. **9**(7): 893-899.

Parchi, P., S. Capellari, S. G. Chen, R. B. Petersen, P. Gambetti, N. Kopp, P. Brown, T. Kitamoto, J. Tateishi, A. Giese and H. Kretzschmar (1997). "Typing prion isoforms." Nature **386**(6622): 232-234.

Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). "Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **39**(6): 767-78.

Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti and H. Kretzschmar (1999). "Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects." Ann Neurol **46**(2): 224-33.

Paspaltsis, I., K. Kotta, R. Lagoudaki, N. Grigoriadis, I. Poullos and T. Sklaviadis (2006). "Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions." J Gen Virol **87**(Pt 10): 3125-30.

Pattison, I. H. (1964). "The spread of Scrapie by contact between affected and healthy sheep, goats or mice." Vet Rec **76**: 333-6.

Pattison, I. H. (1965). "Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats." Vet.Rec. **77**(47): 1388-1390.

Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett and W. A. Watson (1972). "Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep." Vet Rec **90**(17): 465-8.

Pattison, I. H. and K. M. Jones (1967). "The possible nature of the transmissible agent of scrapie." Vet Rec **80**(1): 2-9.

- Pattison, I. H. and G. C. Millson (1960). "Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep." J Comp Pathol **70**: 182-93.
- Pattison, I. H. and G. C. Millson (1961). "Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome." J Comp Pathol **71**: 101-9.
- Pattison, I. H. a. M., G.C. (1961). "Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route." J Comp Pathol, **71**: 171-6.
- Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2003). "The mouse brain in stereotaxic coordinates." Academic Press **2**.
- Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell and J. W. Ironside (2004). "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient." Lancet **364**(9433): 527-9.
- Peretz, D., S. Supattapone, K. Giles, J. Vergara, Y. Freyman, P. Lessard, J. G. Safar, D. V. Glidden, C. McCulloch, H. O. Nguyen, M. Scott, S. J. Dearmond and S. B. Prusiner (2006). "Inactivation of prions by acidic sodium dodecyl sulfate." J Virol **80**(1): 322-31.
- Peretz, D., R. A. Williamson, G. Legname, Y. Matsunaga, J. Vergara, D. R. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and M. R. Scott (2002). "A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain." Neuron **34**(6): 921-32.
- Prinz, M., F. Montrasio, M. A. Klein, P. Schwarz, J. Priller, B. Odermatt, K. Pfeffer and A. Aguzzi (2002). "Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 919-24.
- Priola, S. A. (1996). "Similar protein signatures for BSE and vCJD." Nat Med **2**(12): 1303-4.
- Priola, S. A. and B. Chesebro (1995). "A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells." J Virol. **69**(12): 7754-7758.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**(5012): 1515-22.
- Prusiner, S. B. (1998). "Prions." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **95**(23): 13363-13383.

- Prusiner, S. B., S. P. Cochran, D. F. Groth, D. E. Downey, K. A. Bowman and H. M. Martinez (1982). "Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay." Ann Neurol **11**(4): 353-8.
- Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. Burton, S. L. Yang and S. J. DeArmond (1993a). "Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10608-12.
- Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, N. Stahl and R. Gabizon (1993b). "Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2793-7.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, S. P. Cochran, F. R. Masiarz, M. P. McKinley and H. M. Martinez (1980). "Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent." Biochemistry **19**(21): 4883-91.
- Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth and G. G. Glenner (1983). "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." Cell **35**(2 Pt 1): 349-58.
- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban and G. A. Carlson (1990). "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." Cell **63**(4): 673-686.
- Race, R. E., L. H. Fadness and B. Chesebro (1987). "Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells." J Gen Virol **68** (Pt 5): 1391-9.
- Race, R. E. and G. J. Raymond (2004). "Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy (prion) agents by environ LpH." J Virol. **78**(4): 2164-2165.
- Rachidi, W., J. Riondel, H. M. McMahon and A. Favier (2005). "[Prion protein and copper: a mysterious relationship]." Pathol Biol (Paris) **53**(4): 244-50.
- Raeber, A. J., D. R. Borchelt, M. Scott and S. B. Prusiner (1992). "Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems." J Virol. **66**(10): 6155-6163.
- Ridley, R. M. and H. F. Baker (1996). "Oral transmission of BSE to primates." The Lancet **348**(9035): 1174.

Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1997). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." FEBS Letters **413**(2): 282-288.

Riemer, C., T. Bamme, S. W. Mok and M. Baier (2006). "3-Methyl-4-chlorophenol for prion decontamination of medical devices." Infect Control Hosp Epidemiol **27**(7): 778-80.

Robert-Koch-Institut (2002). "Die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD)." Bundesgesundheitsblatt **45**: 376-394.

Robert-Koch-Institut (2004). "Inaktivierung und Entfernung von Prionen bei der Aufbereitung von Medizinprodukten." Bundesgesundheitsblatt **47**: 36-40.

Robert-Koch-Institut and Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2001). "Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten." Bundesgesundheitsblatt **44**: 1115-1126.

Rutala, W. A. and D. J. Weber (2001). "Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilization." Clin Infect Dis **32**(9): 1348-56.

Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1993a). "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein." J Biol Chem **268**(27): 20276-84.

Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1993b). "Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity." Protein Sci **2**(12): 2206-16.

Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." Nat Med **4**(10): 1157-65.

Sailer, A., H. Bueler, M. Fischer, A. Aguzzi and C. Weissmann (1994). "No propagation of prions in mice devoid of PrP." Cell **77**(7): 967-8.

Scott, J. R., J. D. Foster and H. Fraser (1993a). "Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease." Vet Microbiol **34**(4): 305-9.

Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson and S. J. DeArmond (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." Cell **59**(5): 847-857.

- Scott, M., D. Groth, D. Foster, M. Torchia, S. L. Yang, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1993b). "Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes." Cell **73**(5): 979-88.
- Scott, M. R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1997). "Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **94**(26): 14279-14284.
- Scott, M. R., R. Will, J. Ironside, H. O. Nguyen, P. Tremblay, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1999). "Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96**(26): 15137-15142.
- Shyng, S. L., M. T. Huber and D. A. Harris (1993). "A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells." J Biol.Chem. **268**(21): 15922-15928.
- Sigurdsson, B. (1954). Br.Vet.J **110**: 341-354.
- Solassol, J., M. Arlotto and S. Lehmann (2004). "Detection of prion after decontamination procedures: comparative study of standard Western blot, filter retention and scrapie-cell assay." J.Hosp.Infect. **57**(2): 156-161.
- Solassol, J., M. Pastore, C. Crozet, V. Perrier and S. Lehmann (2006). "A novel copper-hydrogen peroxide formulation for prion decontamination." J Infect Dis **194**(6): 865-9.
- Sparkes, R. S., M. Simon, V. H. Cohn, R. E. Fournier, J. Lem, I. Klisak, C. Heinzmann, C. Blatt, M. Lucero, T. Mohandas and et al. (1986). "Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7358-62.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao and S. B. Prusiner (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**(2): 229-240.

- Steinhoff, B. J., S. Racker, G. Herrendorf, S. Poser, S. Grosche, I. Zerr, H. Kretzschmar and T. Weber (1996). "Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease." Arch Neurol **53**(2): 162-6.
- Stone, T., J. Brimacombe, C. Keller, D. Kelley and G. Clery (2004). "Residual protein contamination of ProSeal laryngeal mask airways after two washing protocols." Anaesth Intensive Care **32**(3): 390-3.
- Stork, M., A. Giese, H. A. Kretzschmar and P. Tavan (2005). "Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln." Biophys J **88**(4): 2442-51.
- Sutton, J. M., J. Dickinson, J. T. Walker and N. D. Raven (2006). "Methods to minimize the risks of Creutzfeldt-Jakob disease transmission by surgical procedures: where to set the standard?" Clin Infect Dis **43**(6): 757-64.
- Tagliavini, F., F. Prelli, L. Verga, G. Giaccone, R. Sarma, P. Gorevic, B. Ghetti, F. Passerini, E. Ghibaudi and G. Forloni (1993). "Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **90**(20): 9678-9682.
- Taraboulos, A., A. J. Raeber, D. R. Borchelt, D. Serban and S. B. Prusiner (1992). "Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells." Mol Biol Cell **3**(8): 851-63.
- Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo, S. B. Prusiner and D. Avraham (1995). "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." J Cell Biol. **129**(1): 121-132.
- Taylor, D. M. (1999). "Inactivation of prions by physical and chemical means." J.Hosp.Infect. **43** **Suppl**: S69-S76.
- Taylor, D. M. (2003). "Preventing accidental transmission of human transmissible spongiform encephalopathies." Br Med Bull **66**: 293-303.
- Taylor, D. M., K. Fernie and I. McConnell (1997). "Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide." Vet Microbiol **58**(2-4): 87-91.
- Taylor, D. M., H. Fraser, I. McConnell, D. A. Brown, K. L. Brown, K. A. Lamza and G. R. Smith (1994). "Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie." Arch Virol **139**(3-4): 313-26.

Taylor, D. M., I. McConnell and K. Fernie (1996a). "The effect of dry heat on the ME7 strain of mouse-passaged scrapie agent." J Gen Virol **77 (Pt 12)**: 3161-4.

Taylor, D. M., I. McConnell and H. Fraser (1996b). "Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice." J Gen Virol **77 (Pt 7)**: 1595-9.

Taylor, D. R. and N. M. Hooper (2006). "The prion protein and lipid rafts." Mol Membr Biol **23(1)**: 89-99.

Telling, G. C., M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1994). "Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91(21)**: 9936-40.

Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." Cell **83(1)**: 79-90.

Tobler, I., T. Deboer and M. Fischer (1997). "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **17(5)**: 1869-79.

Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380(6575)**: 639-42.

Vadrot, C. and J. C. Darbord (2006). "Quantitative evaluation of prion inactivation comparing steam sterilization and chemical sterilants: proposed method for test standardization." J Hosp Infect **64(2)**: 143-8.

Vassallo, N. and J. Herms (2003). "Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse." J Neurochem **86(3)**: 538-44.

Viles, J. H., F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright and H. J. Dyson (1999). "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96(5)**: 2042-7.

Wadsworth, J. D., E. A. Asante, M. Desbruslais, J. M. Linehan, S. Joiner, I. Gowland, J. Welch, L. Stone, S. E. Lloyd, A. F. Hill, S. Brandner and J. Collinge (2004). "Human prion

protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype." Science **306**(5702): 1793-6.

Wadsworth, J. D., A. F. Hill, S. Joiner, G. S. Jackson, A. R. Clarke and J. Collinge (1999). "Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions." Nat.Cell Biol. **1**(1): 55-59.

Wadsworth, J. D., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert and J. Collinge (2001). "Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay." The Lancet **358**(9277): 171-180.

Weber, T., Poser, S., and Kretzschmar, H.A. . (1994). "Prionkrankheiten - heutiger Wissensstand." Dtsch. Ärztebl. **44**: 2226-2232.

Weissmann, C. (1991). "Spongiform encephalopathies. The prion's progress." Nature **349**(6310): 569-71.

Weissmann, C. (1996). "The Ninth Datta Lecture. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies." FEBS Lett **389**(1): 3-11.

Weissmann, C., H. Bueler, M. Fischer, A. Sauer and M. Aguet (1994). "Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **343**(1306): 431-3.

Weissmann, C., M. Enari, P. C. Kohn, D. Rossi and E. Flechsig (2002). "Transmission of prions." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **99 Suppl 4**: 16378-16383.

Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson and R. Bradley (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Vet.Rec. **121**(18): 419-420.

Westaway, D., P. A. Goodman, C. A. Mirenda, M. P. McKinley, G. A. Carlson and S. B. Prusiner (1987). "Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice." Cell **51**(4): 651-62.

Westaway, D., C. A. Mirenda, D. Foster, Y. Zabarjadian, M. Scott, M. Torchia, S. L. Yang, H. Serban, S. J. DeArmond, C. Ebeling and et al. (1991). "Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice." Neuron **7**(1): 59-68.

- Whittaker, A. G., E. M. Graham, R. L. Baxter, A. C. Jones, P. R. Richardson, G. Meek, G. A. Campbell, A. Aitken and H. C. Baxter (2004). "Plasma cleaning of dental instruments." J.Hosp.Infect. **56**(1): 37-41.
- Wilesmith, J. W. and G. A. Wells (1991). "Bovine spongiform encephalopathy." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 21-38.
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell and J. B. Ryan (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." Vet Rec **123**(25): 638-44.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman and P. G. Smith (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." Lancet **347**(9006): 921-5.
- Will, R. G. and W. B. Matthews (1982). "Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **45**(3): 235-8.
- Wille, H., M. D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F. E. Cohen, D. A. Agard and S. B. Prusiner (2002). "Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **99**(6): 3563-3568.
- Williams, A., P. J. Lucassen, D. Ritchie and M. Bruce (1997). "PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie." Exp.Neurol. **144**(2): 433-438.
- Wilson, D. R., R. D. Anderson and W. Smith (1950). "Studies in scrapie." J Comp Pathol **60**(4): 267-82.
- Windl, O. and H. A. Kretzschmar (2000). "Prion Diseases." Contemporary Neurology (Neurogenetics) **57**: 191-218.
- Yan, Z. X., L. Stitz, P. Heeg, E. Pfaff and K. Roth (2004). "Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies." Infect.Control Hosp.Epidemiol. **25**(4): 280-283.
- Yoshioka, M., T. Miwa, H. Horii, M. Takata, T. Yokoyama, K. Nishizawa, M. Watanabe, M. Shinagawa and Y. Murayama (2007). "Characterization of a proteolytic enzyme derived from a Bacillus strain that effectively degrades prion protein." J Appl Microbiol **102**(2): 509-15.
- Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider and K. Wuthrich (2000). "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 145-50.

Zeidler, M., E. C. Johnstone, R. W. Bamber, C. M. Dickens, C. J. Fisher, A. F. Francis, R. Goldbeck, R. Higgo, E. C. Johnson-Sabine, G. J. Lodge, P. McGarry, S. Mitchell, L. Tarlo, M. Turner, P. Ryley and R. G. Will (1997a). "New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features." Lancet **350**(9082): 908-10.

Zeidler, M., G. E. Stewart, C. R. Barraclough, D. E. Bateman, D. Bates, D. J. Burn, A. C. Colchester, W. Durward, N. A. Fletcher, S. A. Hawkins, J. M. Mackenzie and R. G. Will (1997b). "New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests." Lancet **350**(9082): 903-7.

Zerr, I., W. J. Schulz-Schaeffer, A. Giese, M. Bodemer, A. Schroter, K. Henkel, H. J. Tschampa, O. Windl, A. Pfahlberg, B. J. Steinhoff, O. Gefeller, H. A. Kretzschmar and S. Poser (2000). "Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants." Ann Neurol **48**(3): 323-9.

Zobeley, E., E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari and C. Weissmann (1999). "Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface." Molecular Medicine **5**(4): 240-243.

Zulianello, L., K. Kaneko, M. Scott, S. Erpel, D. Han, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (2000). "Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein." J Virol **74**(9): 4351-60.

8 Anhang

8.1 Verwendete Abkürzungen

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
cDNS	Komplementäre DNS
CJD	Creutzfeldt Jakob Erkrankung
CWD	Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteri, und andere
EtOH	Ethanol
fCJD	familiäre Form der CJD
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm, auch Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Erkrankung
h	Stunde/n

HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
ID50	Menge an infektiösem Agenz, die bei 50% der Individuen zu einer Infektion führt
i. d. R.	in der Regel
i.c.	intracerebral
iCJD	iatrogen verursachte Form der CJD
k	Kilo
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LRS	lymphoretikuläres System
22L	muriner Prionstamm
LD50	Menge an infektiösem Agenz/Gift, die bei 50% der Individuen zum Tod führt
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
M	molar
max.	maximal
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MPS	mean pixel value
mRNS	Boten-RNS („messenger“-RNS)
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NaOH	Natriumhydroxid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NMR	Kernresonanzspektroskopie („nuclear magnetic resonance“)
NP40	Nonidet-P40
OD	Optische Dichte
OD600	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PK	Proteinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification

Prnp	Gen des Prion Proteins
PrP	Prion Protein
PrP ^{0/0}	PrP-Knockout; Organismus mit inaktiviertem Prnp-Gen
PrP ^C	Zelluläres Prionprotein
PrP ^{res}	Proteinase K-resistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prionprotein
RDG	Reinigungs- und Desinfektionsgerät
RKI	Robert-Koch Institut
RML	Rocky Mountain Laboratory- muriner Prionstamm
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrille
sCJD	sporadische CJD
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium Dodecylsulfate“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tga20-Maus	gentechnisch veränderter Mäusestamm mit Prnp-Gen Überexpression
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
U	Units (Hersteller-spezifische Enzymaktivitätseinheit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vCJD	neue Variante der CJD
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
UZ	ultrazentrifugiert (z.B. 1h bei 100000 x g)
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar für die ausgezeichneten Forschungsbedingungen am ZNP und die Überlassung des Themas.

Meinem Betreuer Dr. med. Ingo Westner möchte ich für den Enthusiasmus und die Geduld danken mit dem er mir das wissenschaftliche Arbeiten beibrachte. Er war immer außerordentlich hilfsbereit und voller konstruktiver Vorschläge.

Einen großen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit hat Dr. med. vet. Gerda Mitteregger geleistet. Durch ihre große Unterstützung, ihr fachliches Wissen, ihre Geduld und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft hat sie die Beantragung und Durchführung des Tierversuchs erst ermöglicht.

Weiterhin möchte mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. rer. nat. Kathrin Dittmar, Dr. rer. nat. Petra Weber und Dr. med. vet. Claudia Pace für deren Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Winfried Michels der Firma Miele Professional für die Bereitstellung der Dekontaminationsverfahren und der nötigen Technik.

Ich bedanke mich bei der Förderung für Forschung und Lehre der LMU (FöFoLe) für die Aufnahme in das Promotionsstudium „Molekulare Medizin“, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

8.3 Eigene Veröffentlichungen

A. Schmitt, I. Westner, L. Reznicek, W. Michels, G. Wünsch, W. Xiang, H.A. Kretzschmar (2004). "Automated decontamination of surface-bound prions". Poster-präsentation Prion 2004 - Konferenz; Paris; Frankreich

A. Schmitt, I. Westner, L. Reznicek, W. Michels, G. Wünsch, H.A. Kretzschmar (2005). "Evaluierung maschineller Dekontaminationsverfahren zur Priondekontamination mittels eines Zellkulturassays"; Vortrag WFK-Meeting 2005; Düsseldorf; Deutschland

A. Schmitt, I. Westner, L. Reznicek, W. Michels, G. Wünsch, H.A. Kretzschmar (2006). "Evaluation of automated decontamination processes for surface-adherent prions using a cell based infectivity assay"; Posterpräsentation CHICA-Conference 2006; London; Kanada

A. Schmitt, I. Westner, L. Reznicek, W. Michels, G. Mitteregger, H.A. Kretzschmar (2006). "Evaluation of fully automated decontamination processes for prion decontamination using cell culture and chemiluminescence tests for surface-bound prions"; Aseptica (1), 20-21

A. Schmitt (2007). "Übertragungsrisiko von Prionen und die Dekontamination medizinischer Instrumente"; Medical spezial (2), 33-34

A. Schmitt (2008). "Evaluation of automated decontamination processes for surface-adherent prions"; Vortrag 30èmes Journées Nationales d'Etude sur la stérilisation dans les Etablissements de Santé 2008; Nantes; Frankreich

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andreas Schmitt
Geburtstag / -ort: 17.08.1979 / München
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

09/1986 - 07/1990 Philipp-Weiß-Grundschule in Fürstenfeldbruck
09/1990 - 07/1999 Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck

Wehrdienst:

07/1999 - 04/2000 im Facharztzentrum der Sanitätsakademie München

Studium:

04/2000 - 03/2002 vorklinisches Studium an der LMU München
03/2002 Ärztliche Vorprüfung
04/2002 - 07/2006 klinisches Studium an der LMU München
03/2003 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
08/2005 - 07/2006 Praktisches Jahr in den Fächern:
Innere Medizin (Medizinische Poliklinik; München)
Chirurgie (Krankenhaus Schwabing; München)
Anästhesiologie (Klinikum Großhadern; München)
11/2006 dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
12/2006 Approbation

Famulaturen:

07/2002 Allgemein-, Visceral- und Gefäßchirurgie (Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck)
09/2003 Neuropathologie (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München)
02/2004 Praxisfamulatur Dermatologie (Fürstenfeldbruck)

08/2004 Allgemein- und Visceralchirurgie (Universitätsklinikum von Kyoto, Japan)

Promotion:

11/2002 - 06/2004 Teilnahme am Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU München.

seit 11/2002 Promotionsarbeit am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) der LMU München.
Leiter des ZNP: Professor Dr. med. H.A. Kretzschmar

Berufliche Tätigkeit:

seit 5/2007 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar der TU-München

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....
(Andreas Schmitt)

Dissertation eingereicht am: 09.09.2008