Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von zellulärem Prion Protein bei Wiederkäuern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Melanie Boesen
aus München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. R. Mansfeld

Tag der Promotion 15. Juli 2005

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Schrifttum 3

2.1 Struktureller Aufbau von Prion Proteinen 3
2.1.1 Strukturcharakterisierung und Funktion von PrP^{C} 3
2.1.2 Biochemische Eigenschaften von PrP^{C} und PrP^{Sc} 6

2.2 Nachweis von Prion Proteinen 7
2.2.1 Bioassay 8
2.2.2 Histopathologie 9
2.2.3 Immunchemische Verfahren 10
2.2.3.1 Immunhistochemie 10
2.2.3.2 Analytische Methoden 10
2.2.4 Weitere Methoden zum Nachweis von PrP 11

2.3 Verteilung von Prion Proteinen in verschiedenen Organen 12

2.4 Antikörper gegen Prion Proteine 14

3 Eigene Untersuchungen 20

3.1 Materialien und Geräte 20
3.1.1 Chemikalien und Biochemika 20
3.1.2 Lösungen und Puffer 21
3.1.3 Organ- und Milchproben 22
3.1.4 Immunreagenzien 24
3.1.5 Sonstige Materialien 24
3.1.6 Geräte 25

3.2 Methodik und Ergebnisse 26
3.2.1 Etablierung eines Sandwich-EIA's zum Nachweis von zellulärem PrP 26
3.2.2 Optimierung der Probenaufarbeitung 30
3.2.2.1 Extraktion 30
3.2.2.2 Einfluss von Detergenzien 33
3.2.2.3 Modifikation der Extraktaufarbeitung 36
3.2.3 Spezifität des entwickelten EIA 41
3.2.4 Weitere Charakteristika des Untersuchungsverfahrens 42
3.2.5 Nachweisbarkeit von PrP^C in verschiedenen Organen bei Wiederkäuern 45
3.2.6 Nachweisbarkeit von PrP^C in Milch 54
3.2.6.1 Etablierung der Methodik 54
3.2.6.2 PrP^C in Schafmilch 56
3.2.6.3 Verteilung von PrP^C bei Fraktionierung von Milch 57

4 Diskussion 63

4.1 Entwicklung eines Nachweisverfahrens 64

4.2 Körperverteilung von PrP^C in Rind und Schaf 66

5 Zusammenfassung/Summary 71

6 Literaturverzeichnis 73

Abkürzungsverzeichnis

a. dest.	aqua destillata
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease
CWD	Chronic Wasting Disease
Cys	Cystein
EIA	Enzymimmunoassay (Enzymimmuntest)
FCS	fetales Kälberserum
FFI	Fatal Familial Insomnia
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GPI	Glykosyl-Phospatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	N-Morpholino-ethansulfonsäure
nvCJD	neue Variante Creutzfeldt-Jakob-Disease
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PK	Proteinase K
Pro	Prolin
PrP	Prion Protein
PrP^{27-30}	Proteinase K resistenter Anteil von PrP^{Sc}
PrP^{C}	zelluläres Prion Protein
PrP^{res}	Proteinase K resistentes PrP
PrP^{Sc}	TSE-assoziiertes Prion Protein
PrP^{sen}	Proteinase K sensitives PrP

rPrP	rekombinantes Prion Protein
SAFs	Scrapie assoziierte Fibrillen
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecylsulfate)
Ser	Serin
SIFT	Scanning for intensely fluorescent targets
TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
Trp	Tryptophan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) kommen bis auf wenige Ausnahmen weltweit vor. Der Name resultiert einerseits aus ihrer Übertragbarkeit, andererseits aus den schwammartigen Hirnveränderungen, die bei diesen Erkrankungen histopathologisch nachgewiesen werden können. In Deutschland gehören TSEs zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Als Verursacher werden nach heutigem Kenntnisstand Prionen (proteinaceous infectious particles) angesehen.

Inzwischen sind eine ganze Reihe von Krankheitsbildern sowohl beim Menschen [Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), Neue Variante Creutzfeldt-Jakob Disease (nvCJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), Fatal Familial Insomnia (FFI)] als auch bei Tieren [u.a. Scrapie bei Schaf und Ziege, Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rind und Bison, Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei der Katze, Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) beim Nerz, sowie Chronic wasting disease (CWD) beim Maultierhirsch] beschrieben.

Seit einigen Jahren konnten durch epidemiologische Studien wie auch experimentell die Übertragbarkeit dieser Erkrankung über verschiedene Speziesbarrieren hinweg (z.B. von Schaf auf Rind/Ziege/Nerz, von Rind auf Mensch/Nerz/Affe/andere Wiederkäuer/Katze etc.) beobachtet werden (HOUSTON et al., 2000; GROSCHUP et al., 2001). Die genauen Übertragungswege der TSE sind jedoch noch nicht geklärt. Im Falle der BSE wird von einer oralen Infektion durch Verfütterung unzureichend erhitzten Tiermehls ausgegangen. Bei Kuru ist bekannt, dass diese Erkrankung sich durch den im betroffenen Kulturkreis praktizierten Kannibalismus verbreitete. Bei CJD wiederum kann man eine familiäre Form (genetisch bedingt), eine sporadische Form (vermutlich eine Mutation) und eine iatrogene Form (z.B. durch Hornhauttransplantation) unterscheiden. Die nvCJD wird, da überproportional in GB vertreten [bis Januar 2005: 153 Fälle, außerhalb von GB im selben Zeitraum: 18 Fälle (Quelle: http://vetolavie.chez.tiscali.fr/bse/details/mcj.htm)], mit dem Verzehr von BSE-Fleisch in Zusammenhang gebracht (WILL, 2001; ZERR & POSER, 2001).

Nachdem bis heute weder Therapie- noch Impfmöglichkeit bestehen, ist eine rigorose BSE-Bekämpfung zum Schutz von Verbraucher und Tierpopulation von vorrangiger Bedeutung.

Da zelluläres Prion Protein (PrP^C) als Quelle für die Replikation von PrP^{Sc} fungiert, und somit das Vorkommen von PrP^C in unterschiedlichen Geweben Rückschlüsse auf deren potentielle Infektiosität ermöglicht, ist es von grundsätzlichem lebensmittelhygienischem Interesse, entsprechende Daten zur physiologischen Verteilung dieses Proteins im Organismus zur Verfügung zu haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines möglichst sensitiven Enzymimmuntests zum Nachweis von zellulärem Prion Protein um damit nach Optimierung der Extraktionsbedingungen das Vorkommen und die Verteilung dieses körpereigenen Proteins in verschiedenen Geweben von Lämmern, Kälbern sowie erwachsenen Rindern zu untersuchen. Auch Milch verschiedener Tierarten wurde auf ihren Gehalt an zellulärem PrP^C analysiert, wobei auch das Verteilungsmuster dieses Proteins auf die einzelnen Milchfraktionen, wie z.B. Magermilch, Molke und Caseinfraktion bestimmt wurde.

Teile dieser Arbeit wurden durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz im Rahmen des BSE-Forschungsverbundes gefördert.

2 Schrifttum

2.1 Struktureller Aufbau von Prion Proteinen

Der Begriff des Prion Proteins (PrP) wurde von PRUSINER (1982a) geprägt. Er leitet sich ab von „proteinaceous infectious particle“. Prionen gelten als Verursacher der sog. Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Anders als bei konventionellen Krankheitserregern, wie Bakterien, Pilze und Viren, scheint die „Erreger“-Amplifikation unabhängig von Nukleinsäuren abzulaufen (ALPER et al., 1967; PRUSINER et al., 1982b; OESCH et al., 1985). Aus diesem Grunde kann nicht von Erregern im herkömmlichen Sinn gesprochen werden. In der Literatur findet man daher vielfach den Begriff des „infektiösen Agens“. Eine weitere Besonderheit ist die mangelnde Immunreaktion sowohl im betroffenen Wirt als auch bei der Generierung von Antikörpern im Versuchstier (siehe dazu auch 2.4) im Rahmen dieser Erkrankungen.

Beim Prion Protein handelt es sich um ein körpereigenes (OESCH et al., 1985) Glykoprotein (ENDO et al., 1989; HARAGUCHI et al., 1989; RUDD et al., 1999; STIMSON et al., 1999), welches an der Zelloberfläche in cholesterinreichen, detergenzunlöslichen Domänen der Membran gebunden vorliegt (TARABOULOS et al., 1995; VEY et al., 1996; KANEKO et al., 1997). Dieses „normale“, zelluläre PrP (PrP^{C}) weist die selbe Aminosäuresequenz auf wie das krankheitsauslösende, Scrapie-assoziierte PrP (PrP^{Sc}) (STAHL et al., 1993) und unterscheidet sich von diesem lediglich in seiner Sekundär- und Tertiärstruktur.

2.1.1 Strukturcharakterisierung und Funktion von PrP^{C}

Die Aminosäuresequenzen von Prionproteinen sind bei den verschiedenen Tierarten weitgehend konserviert (SCHÄTZL, 2001). Es besteht eine Sequenzhomologie des Prionproteins bei den verschiedenen Säugerspezies von über 90 % (GROSCHUP et al., 1997).

Zur besseren Vergleichbarkeit der vorliegenden Daten über die Bedeutung bestimmter Aminosäuresequenzen wurden alle Angaben an die von HILLS et al. (2001) vorgeschlagene

Nummerierung angepasst.

PrP^C weist drei α–Helices auf, welche die Aminosäuren (AS) 147-157 (1), 176-197 (2) und 203-229 (3) umspannen (GARCIA et al., 2000). Hinzu kommt eine zweisträngige antiparallele β–Faltblattstruktur (AS 131-134 und 164-167) (GARCIA et al., 2000). Aus diesem doppelsträngigem β–Faltblatt, der α-Helix 2 und der α-Helix 3 ergibt sich ein stabiler hydrophober Kern. Das N-terminale Ende des Moleküls hingegen ist eher unstrukturiert (RIEK et al., 1997; JAMES et al., 1997; RIEK et al., 1998; GARCIA et al., 2000; ZAHN et al., 2000). Der Transport an die Zelloberfläche findet über eine N-terminal lokalisierte Leadersequenz statt. Als weitere Strukturen am N-Terminus finden sich charakteristische Oktarepeatsequenzen (Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln; AS 54-103). Ferner weist das Molekül zwischen Cys 190 und Cys 225 eine Disulfidbrücke auf (TURK et al., 1988), sowie zwei Glykosylierungsstellen an Asn 192 und Asn 208. Da diese in unterschiedlichem Maße glykosyliert sein können, wird dieses Charakteristikum auch in der Diagnostik verwendet (2.2.3.2). Am C-terminalen Ser 242 befindet sich ein Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker, mit dessen Hilfe das Glykoprotein an der Zellmembran fixiert ist. Die Struktur von PrP^C ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

PAN et al. (1993) und SAFAR et al. (1993) führten Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Hamster PrP^C und PrP^{Sc} durch. Für rekombinantes Maus-PrP (rPrP) liegen Daten von RIEK et al. (1997) vor. Hamster rPrP wurde von DONNE et al. (1997), sowie bovines rPrP von GARCIA et al. (2000) untersucht.

Im Hinblick auf die physiologische Funktion des PrP im Organismus gibt es verschiedene Forschungsansätze. MOUILETT-RICHARD et al. (2000) vermuten in PrP^C ein Signaltransduktionsprotein, welches seine Signalaktivität vor allem an Neuriten entfaltet. Des Weiteren kann PrP mit seiner Oktarepeatregion Kupfer binden (BROWN et al., 1997; STÖCKEL et al., 1998; MIURA et al., 1999; VILES et al., 1999; ARONOFF-SPENCER et al., 2000), wobei pH-abhängig jeweils ein Oktarepeat (mittels His-Gly-Gly-Gly) ein Kupferion binden kann (MIURA et al., 1999). Damit kann PrP^C als Carrier für diese Ionen fungieren oder möglicherweise selbst als Cu-abhängiges Enzym, wie beispielsweise die Superoxiddismutase (BROWN et al., 1999; WAGGONER et al., 2000), agieren. Letztere Funktion konnte jedoch von HUTTER et al. (2003) nicht bestätigt werden.

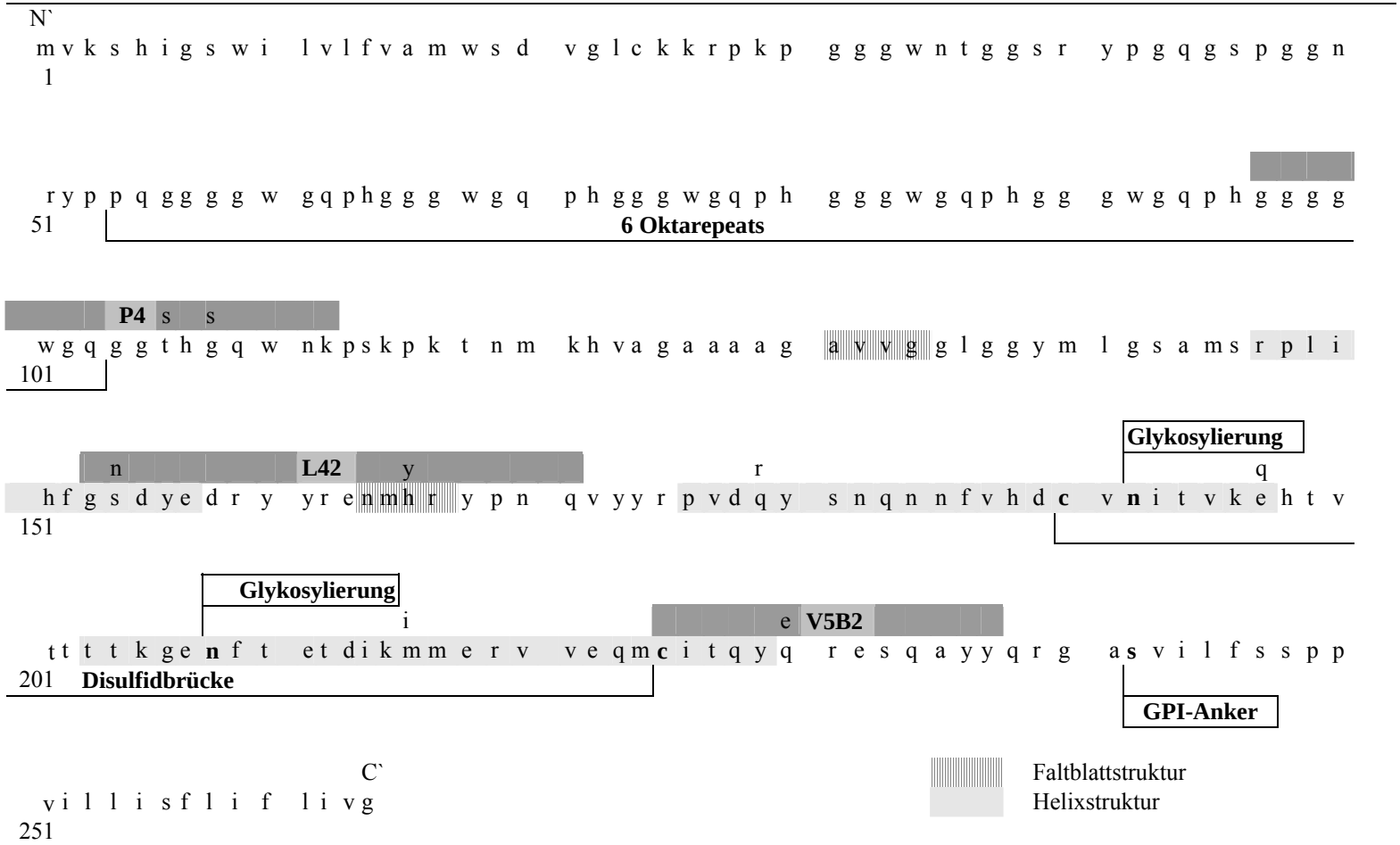

Abbildung 1: Aminosäuresequenz des bovinen PrP (Nummerierung nach HILLS et al., 2001), Aminosäuredifferenzen zum Schaf sind jeweils über der fortlaufenden Sequenz eingetragen. Die Epitope, die von den in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpern (mAk) erkannt werden, sind grau unterlegt und mit dem Namen des jeweiligen mAk versehen.

2.1.2 Biochemische Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Während die Sekundärstruktur von PrP^C wie oben beschrieben u. a. mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie untersucht worden ist, liegen derartige Daten für PrP^{Sc} noch nicht vor, bislang existieren lediglich Modellvorstellungen. Überwiegt bei PrP^C mit 42 % der α–Helix-Anteil gegenüber 3 % β–Faltblatt-Anteil, so finden sich bei PrP^{Sc} 43 % β–Faltblattstrukturen und 30 % α–Helix-Strukturen (CAUGHEY et al., 1991; PAN et al., 1993; SAFAR et al., 1993; HARRIS, 1999). Das Molekulargewicht des Proteins liegt, bedingt durch unterschiedliche Glykosylierungsstufen (un-, einfach- oder zweifach glykosyliert) bei 33-35 kDa (OESCH et al., 1985). Abb. 2 zeigt eine Modellvorstellung der globulären Region von PrP^C und PrP^{Sc}. Was die Quartärstruktur anbelangt, so kommt PrP^{Sc} in sog. Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF) „gestapelt" vor (MERZ et al., 1981; PRUSINER et al., 1983), während PrP^C über einen (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (STAHL et al., 1987).

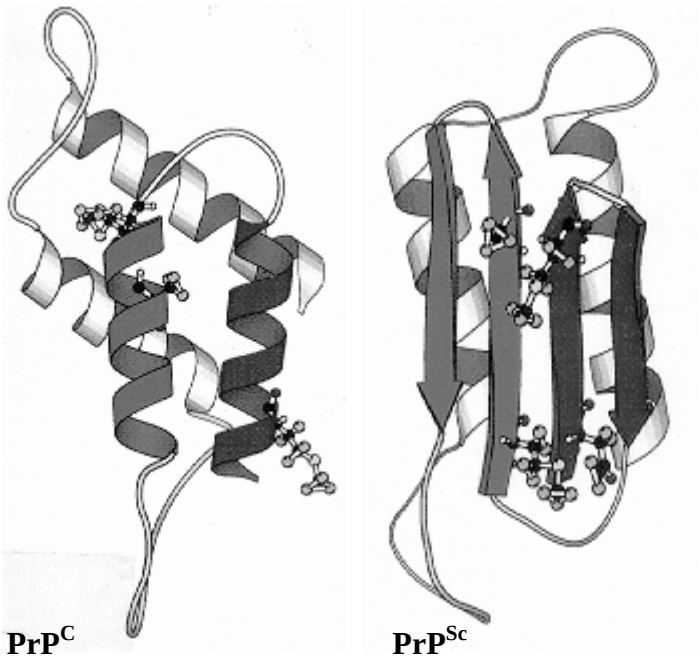

Abbildung 2: Modellvorstellung von PrP^C und PrP^{Sc}. Entnommen aus: http://www.bio.vu.nl/thb/users/ingeborg/PrionImages_p1.html

Das biochemische Hauptmerkmal, das in der Diagnostik und Forschung häufig genutzt wird, ist die Proteinase K (PK)–Sensitivität von PrP. Während PrP^{C} durch PK nahezu vollständig abgebaut wird, wird PrP^{Sc} lediglich bis auf eine Größe von 27-30 kDa (je nach Glykosylierung) reduziert (PrP^{27-30}) (PRUSINER et al., 1982b), da sich die C-terminalen 141 Aminosäuren von PrP^{Sc} durch Resistenz gegen PK auszeichnen (PRUSINER et al., 1982b; McKINLEY et al., 1983). Daher rühren die in der Literatur häufig verwendeten Abkürzungen PrP^{sen} (PK-sensitiv) und PrP^{res} (PK-resistent), welche jedoch nicht synonym mit PrP^{C} und PrP^{Sc} zu verstehen sind. Diese Resistenz ist jedoch nicht absolut zu sehen. Lässt man die PK zu lange einwirken, wird auch PrP^{Sc} abgebaut (KUCZIUS & GROSCHUP, 1999).

2.2 Nachweis von Prion Proteinen

Nachdem nvCJD kausal mit dem Auftreten von BSE in Zusammenhang gebracht wurde (vgl. 1), ist der Nachweis von Prion Proteinen nicht zuletzt im Sinne des Verbraucherschutzes von besonderem Interesse sowohl für die Diagnostik von TSE-Erkrankungen bei Mensch und Tier, als auch für die Erforschung des Krankheitsgeschehens.

In der Regel können Infektionskrankheiten, wie sie bislang herkömmlicherweise definiert wurden, direkt, durch Nachweis des Erregers bzw. seiner Stoffwechselprodukte, oder indirekt, durch Nachweis von Antikörpern, die gegen den Erreger gebildet worden sind, diagnostiziert werden. Als Probenmaterial für die Diagnostik dienen: Unterschiedliche Körperflüssigkeiten, wie Blut, Liquor, Urin und Milch, sowie durch Biopsie erhaltene Gewebeproben.

Blut BSE-erkrankter Tiere erwies sich als unverändert gegenüber dem gesunder Tiere (JOHNSON & WHITAKER, 1988; SCOTT et al., 1989). Auch die Untersuchung des Liquors dient bei Rindern bislang lediglich dazu, differentialdiagnostisch Infektionen bakterieller oder viraler Art auszuschließen (SCOTT et al., 1989; SCOTT et al., 1995). Was die für den Menschen zur Verfügung stehenden Surrogatmarker, wie unter anderem das 14-3-3 Protein (HSICH et al., 1996; MOUSSAVIAN et al., 1997; ZERR et al., 1997), sowie die neuronspezifische Enolase (SCHAARSCHMIDT et al., 1994) anbelangt, so sind diese für die BSE-Diagnostik ungeeignet (ROBEY et al., 1998). Allerdings sind diese Marker allgemein

bei Nervenzelluntergang oder Astrozytenaktivierung erhöht. Somit stellt bislang der Direktnachweis des infektiösen Agens (im Gehirn) die einzig sichere Diagnosemöglichkeit dar.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei PrP um ein körpereigenes Protein handelt und aufgrund der bereits unter 2.1.1 beschriebenen großen Homologie des PrP innerhalb der Säugerspezies kann nicht per se von einer Immunreaktion nach einer Infektion ausgegangen werden. Somit ist nicht damit zu rechnen, dass zytotoxische T-Zellen oder spezifische B-Zellen gebildet werden. Die einzige immunologische Veränderung im betroffenen Wirt besteht in einer Aktivierung von Gliazellen (Astrozyten und Mikrogliazellen) und Einwanderung von Makrophagen (KRETZSCHMAR, 2002).

Im Folgenden werden einige Methoden, zelluläres bzw. Scrapie-assoziierte PrP nachzuweisen, beschrieben. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der Nachweis von PrP^{C} vor allem für die Grundlagenforschung von Bedeutung ist, während die Detektion von PrP^{Sc} in der Diagnostik der Krankheit eine entscheidende Rolle spielt.

2.2.1 Bioassay

Hierbei wird gesunden Tieren - dabei werden wegen der verglichen mit anderen Tierarten kurzen Inkubationszeit i.d.R. Mäuse oder auch Syrian Golden Hamster verwendet - TSE-Verdachtsmaterial verfüttert oder direkt ins Gehirn inokuliert. Nicht zuletzt wegen der langen Testdauer, [bei C57BL/6 Mäusen für BSE mind. 197 Tage (KUCZIUS et al., 1998)] eignet sich dieses Verfahren nicht für die Routinediagnostik, wird jedoch in einigen Forschungsbereichen noch verwendet. Im Unterschied zu den folgenden (immunchemischen) Nachweisverfahren wird im Bioassay Infektiosität und damit PrP^{Sc} nachgewiesen, während bei den Methoden, die sich eines PK-Verdaus bedienen, lediglich PrP^{res} nachgewiesen wird.

2.2.2 Histopathologie

Bei dieser seit längerem in der Diagnostik verwendeten Technik, werden anhand von Gewebeschnitten aus dem ZNS spongiforme Veränderungen des Neuropils, sowie z. B. mit Kongorot-Färbung Ablagerungen sog. amyloide Plaques (Abb. 3) nachgewiesen. Elektronenmikroskopisch sind ferner Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAFs) erkennbar (RUBENSTEIN et al., 1986). In der Veterinärmedizin wird die Histopathologie ausschließlich zur postmortem Diagnostik eingesetzt. Zur schnellen und spezifischen Diagnosestellung beim Menschen werden aber gelegentlich auch durch Gehirnbiopsie gewonnene Proben untersucht, wobei allerdings charakteristische Veränderungen erst kurz vor Beginn der klinischen Phase erkennbar sind (HÖRNLIMANN et al., 2001).

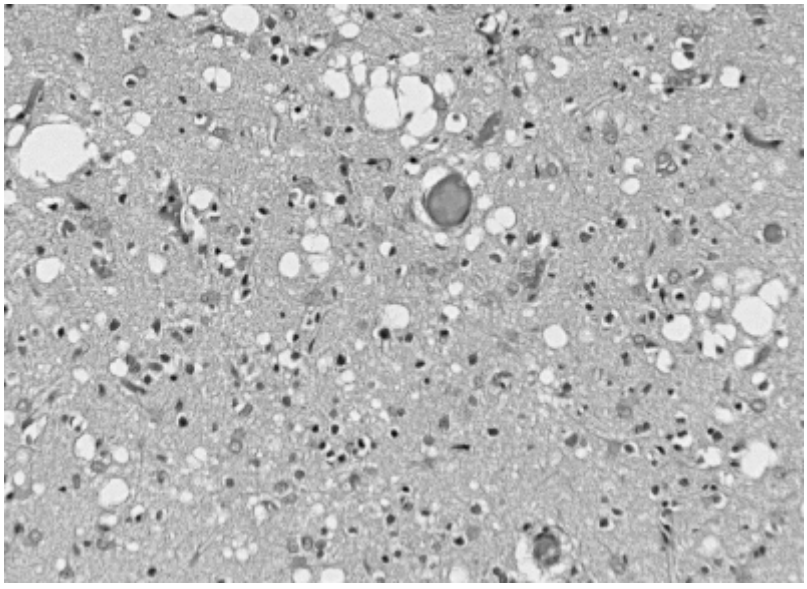

Abbildung 3: Histologische Veränderung im ZNS bei CJD: vakuoläre Degeneration und Bildung von amyloiden Plaques.
Entnommen aus: http://www.cjd.ed.ac.uk/path.htm

2.2.3 Immunchemische Verfahren

2.2.3.1 Immunhistochemie

Hierbei wird PrP^{C} bzw. PrP^{Sc} in Gewebeschnitten mittels Antikörpern nachgewiesen. Als Untersuchungsmaterial kann beim Rind bislang ausschließlich ZNS-Gewebe verwendet werden, während bei Schafen PrP^{Sc} auch in Nickhaut (O´ROURKE et al., 1998a; O`ROURKE et al., 2000), Tonsillen (SCHREUDER et al., 1998) und Lymphknoten (GARSSEN et al., 2000; HEGGEBØ et al., 2003) nachweisbar ist. Da diese Gewebe per Biopsie entnommen werden können, ist bei Schafen prinzipiell auch eine Diagnosestellung am lebenden Tier möglich. Ob PrP^{C} oder PrP^{Sc} nachgewiesen wird, hängt von der Vorbehandlung des Gewebes ab. Die bisher etablierten Antikörper sind alle gegen lineare Sequenzen des Prions gerichtet (vgl. 2.4), und können ohne eine spezielle Vorbehandlung des Materials PrP^{C} und PrP^{Sc} nicht unterscheiden. So wird beispielsweise in einer von O`ROURKE et al. (1998b) entwickelten Methode das Gewebe erst bei 121 °C autoklaviert und dann unter Verwendung des Antikörpers F89/160.1.5 der Prion-Nachweis in den entsprechenden Gehirnschnitten durchgeführt.

Eine Sonderform der Immunhistochemie ist der PET-Blot (paraffin embedded tissue-blot) (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000; RITCHIE et al., 2004), bei dem das PrP aus den zu untersuchenden Gewebeschnitten zuerst auf eine Membran geblottet und vor Durchführung der Immunodetektion mit PK-verdaut wird.

2.2.3.2 Analytische Methoden

Als weitere auf immunchemischen Prinzipien basierende Nachweisverfahren stehen Westernblot und Enzymimmunoassay (EIA) zur Verfügung. Diese erlauben einen PrP-Nachweis in einem breiten Gewebsspektrum. Im Unterschied zur Immunhistochemie geht hier jedoch der PrP-Detektion eine Gewebezerkleinerung voraus. Die PrP^{Sc} assoziierten Veränderungen sind also nicht mehr im natürlichen Gewebekontext sichtbar. Beide Verfahren, Immunoblot (Abb. 4) (FARQUHAR et al., 1989; IKEGAMI et al., 1991; RACE et al., 1992; MURAMATSU et al., 1993; SOMERVILLE et al., 1997; SCHALLER et al., 1999) und EIA (GRATHWOHL et al., 1997; BIFFIGER et al., 2002; GRASSI, 2003) werden sehr häufig in der Diagnostik eingesetzt. MOYNAGH & SCHIMMEL führten 1999 eine

Evaluierung von vier dieser Tests, drei EIAs und einem Immunoblot, im Auftrag der EU Kommission durch. Aufgrund der dabei erhaltenen Ergebnisse wurden folgende drei Verfahren zur BSE-Diagnostik zugelassen: Prionics-Check-Test, Prionics A.G., Schweiz, Enfer BSE Test, Enfer Technology Ltd., Irland, Platelia BSE-Test der Firma BioRad, entwickelt vom Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Frankreich. DESLYS et al. (2001) berichteten, dass einer dieser Schnelltests eine dem Mausbioassay vergleichbare Sensitivität aufweist. Auch für den Nachweis von zellulärem PrP ist ein Sandwich-Assay erhältlich (ANONYM, 2003b).

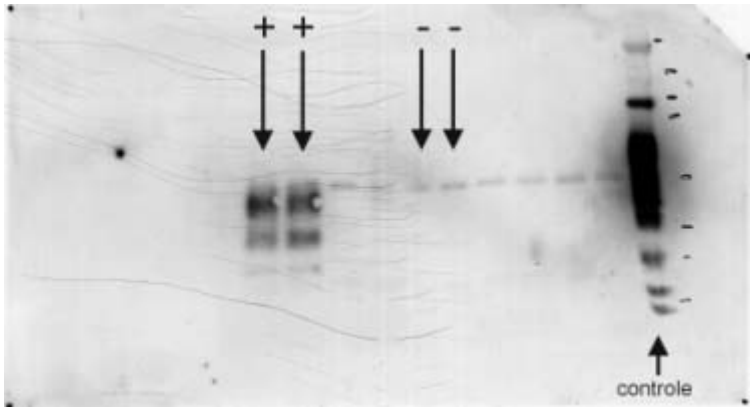

Abbildung 4: Beispielhafte Ergebnisdarstellung eines Immunoblots: + PrP^{res}; - PrP^{sen}; Die drei Banden spiegeln die drei möglichen Glykosylierungsstufen (un-, einfach-, zweifach glykosyliert) und damit drei verschiedene Molekulargewichte wieder.
Entnommen aus:
http://www.bio.vu.nl/thb/users/ingeborg/PrionImages_m1.html

2.2.4 Weitere Methoden zum Nachweis von PrP

Weitere immunologische wie auch nicht immunologische Methoden, die den Nachweis von Prion Protein auch im Blut ermöglichen sollen, werden von BROWN et al. (2001) beschrieben. Dazu zählt u.a. die Kapillarelektrophorese (SCHMERR et al., 1998; SCHMERR et al., 1999; CERVENAKOVA et al., 2003). Versuche zum Nachweis kleinster PrP^{Sc}-Mengen im Liquor mittels Dual-color SIFT (Scanning for intensely fluorescent targets) (BIESCHKE et al., 2000) zeigten, dass diese Methode ca. 20-fach sensitiver als der

Westernblot ist. Den Bioassay ins Reagenzglas übertragen haben SABORIO et al. (2001). Sie entwickelten einen Test, der auf einer zyklischen Amplifikation von PrP^{Sc} (aus einer Probe eines TSE-infizierten Tieres) in einem PrP^{C}-reichen Medium beruht. Modifiziert wurde dieses System von NISHINA et al. (2004). Die meisten dieser Nachweisverfahren befinden sich derzeit allerdings noch im Entwicklungsstadium.

2.3 Verteilung von Prion Proteinen in verschiedenen Organen

Nachdem das zelluläre Prion Protein als Template für die Replikation von PrP^{Sc} dient (PRUSINER et al., 1990; KOCISKO et al., 1994; BLÄTTLER et al., 1997; KIRBY et al., 2003; LUCASSEN et al., 2003) und weiterhin bis heute die Erregerausbreitung innerhalb des Körpers, trotz einiger Theorien, die sich vor allem auf die Rolle von B-Lymphozyten und den axonalen Transport beziehen (vgl. BLÄTTLER et al., 1997; BEEKES et al., 1998; BRANDNER et al., 1999; WEISSMANN, 2004), nicht bekannt ist, war und ist die Verteilung und Expression des zellulären Prion Proteins von grundlegendem Forschungsinteresse.

Während man zunächst davon ausging, dass Prion Proteine nahezu ausschließlich in Neuronen exprimiert werden (KRETSCHMAR et al., 1986), konnten CASHMAN et al. (1990) die Expression von PrP mRNA und Protein in Lymphozyten zeigen. BENDHEIM et al. (1992) untersuchten Hamstergewebe mittels Immunoblot und erhielten PrP-assoziierte Banden in Gehirn, Lunge, Milz, Niere, Nebenniere, Ovarien, Testes, Skelettmuskulatur, Intestinaltrakt und Buffy Coat. Unter anderem konnten, entgegen WEISSMANN (1994), auch in Pankreas und Leber geringe Level an zellulärem PrP nachgewiesen werden (BENDHEIM et al., 1992; MOUDJOU et al., 2001). SHAKED et al. (1999) wiesen PrP^{C} in der Zellmembran von Spermien bei Rind, Mensch, Hamster und Maus nach. PAMMER et al. konnten 1999 zelluläres Prion Protein in Plattenepithelzellen der Haut und des oberen Gastrointestinaltraktes des Rindes nachweisen und beobachteten dabei eine Hochregulation der Expression im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen. Unter dem Aspekt des Verbraucherschutzes ist der Nachweis von PrP^{Sc} im Muskel von entscheidender Bedeutung. Hierzu liegen folgende Ergebnisse vor: 2002 fand die Arbeitsgruppe um BOSQUE PrP^{C} in Skelettmuskulatur von Mäusen in einer Größenordnung von 5 – 10 % verglichen mit dem PrP^{C}-Gehalt des Hirngewebes. Die Scrapie-assoziierte Form konnten sie bei infizierten

Tieren in manchen Muskelgruppen ebenfalls nachweisen. Auch ANDRÉOLETTI et al. (2004) konnten PrP^{Sc} mittels Immunhistochemie in Muskulatur bei scrapieinfizierten Schafen detektieren. MOUDJOU et al. (2001) wiesen PrP^{C} in diversen Geweben beim Schaf mittels monoklonaler und polyklonaler Antikörpern nach (Tab. 1).

Tabelle 1: PrP^{C}-Gehalt in verschiedenen Geweben bei Schafen mit unterschiedlichen Genotypen. Alle Angaben beziehen sich auf ng PrP^{C}/g Gewebe bzw. bei Gehirn auf µg PrP^{C}/g Gewebe.
Daten entnommen aus MOUDJOU et al. (2001)

	Schaf 1	**Schaf 2**	**Schaf 3**	**Schaf 4**	**Schaf 5**	**Mittelwerte**
Tonsillen	32	48		132	19	**57,75**
Zunge	81	72	94	137	47	**86,20**
Lunge	204	250	190	100	218	**192,40**
Herz	154	150	92	170	79	**129,00**
Leber	3,5	4	0,3	6,2	n.d.	**3,50**
Milz	55	20		10	27	**28,00**
Pankreas	30	50	31	50	58	**43,80**
Niere	30	8	11,2	10	9	**13,64**
Skelettmuskel	123	112	112	142	68	**111,40**
Uterus				250	77	**163,50**
Thymus				180	48	**114,00**
Reticulum				126	86	**106,00**
Rumen				137	171	**154,00**
Duodenum				124	25	**74,50**
Jejunum				60	47	**53,50**
Ileum				30	14,8	**22,40**
Euter				39,1		**39,10**
Speicheldrüsen					112	**112,00**
Gehirn	3,8	4	4,54	3,5	5,43	**4,25**

n.d. nicht detektiert

TICHOPAD et al. (2003) untersuchten Rindergewebe hinsichtlich ihrer Expression von PrP^{C} mRNA. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefasst.

Eine Übersicht über die Verteilung der Infektiosität von Körpergeweben bei BSE bzw. scrapiepositiver Rinder und Schafe gibt das EU-DIREKTORAT FÜR VERBRAUCHER-POLITIK UND GESUNDHEITSSCHUTZ (2002) sowie das SCIENTIFIC PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS OF THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004).

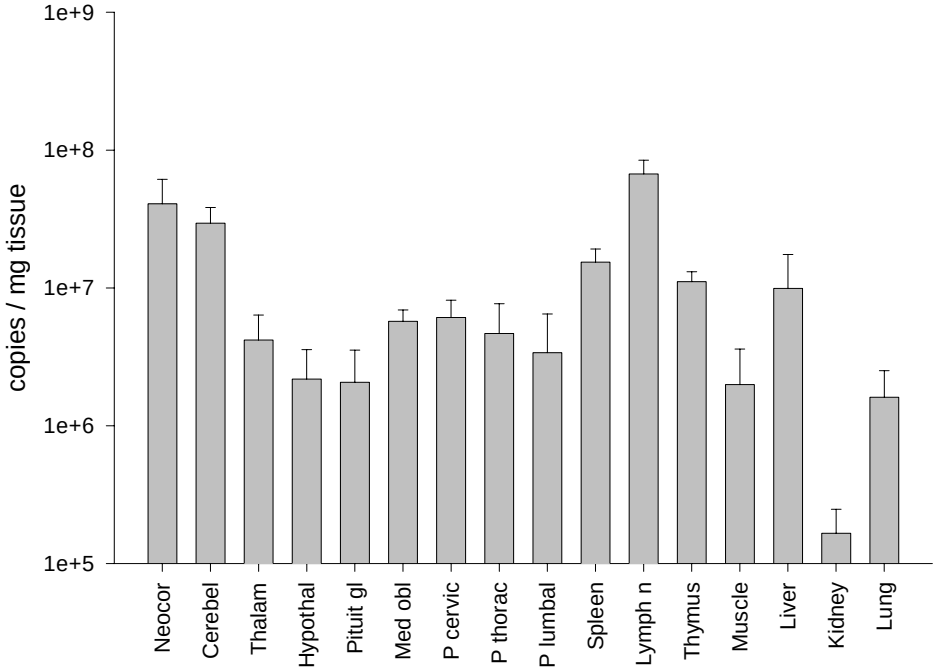

Abbildung 5: Quantifizierung von PrP mRNA Kopien in 1 mg Gewebe (Rind). Entnommen aus TICHOPAD et al. (2003).

2.4 Antikörper gegen Prion-Proteine

Wie bereits unter 2.1 beschrieben ist PrP^C ein körpereigenes Protein, dessen AS-Sequenz zudem innerhalb der Säugerspezies stark konserviert ist und das deshalb nur eine geringe Immunogenität aufweist. Dies hat unter Anderem zur Folge, dass Prion Proteine fremder Spezies nicht unbedingt als Fremdeiweiß erkannt werden können und deshalb übliche Immunisierungsmethoden modifiziert werden müssen, um eine Antikörperproduktion zu ermöglichen. Häufig werden aus diesem Grunde sog. PrP knock-out Mäuse (PRUSINER et al., 1993; KRASEMANN et al., 1996; WILLIAMSON et al., 1996; WILLIAMSON et al., 1998; ZANUSSO et al., 1998), die das Prion Protein Gen nicht mehr in sich tragen und somit das Protein nicht mehr exprimieren, zur Immunisierung verwendet. Ein anderer Ansatz ist die Immunisierung von Hühnern (GROSCHUP et al., 1997; SOMERVILLE et al., 1997; NAKAMURA et al., 2004), deren Prion Protein sich in der Sequenz deutlich von dem der Säugetiere unterscheidet.

Als Immunogen dienen sowohl PrP^{C}, als auch aufgereinigtes PrP^{Sc} bzw. PrP^{27-30} unterschiedlicher Tierarten (BENDHEIM et al., 1984; BARRY & PRUSINER, 1986; RUBENSTEIN et al., 1986; TAKAHASHI et al., 1986; KASCSAK et al., 1997), sowie synthetische PrP-Fragmente (SHINAGAWA et al., 1986; YOKOYAMA et al., 1995; GROSCHUP et al., 1997; PICCARDO et al., 1998) und rekombinantes PrP (rPrP) (BARCLAY et al., 1999; BETEMPS & BARON, 2001; BARBIERI et al., 2003), welches i.d.R. aus *E. coli* gewonnen wird (MEHLHORN et al., 1996) und im Gegensatz zum „natürlichen" PrP unglykosyliert ist und keinen GPI-Anker aufweist.

Verwendung finden diese Antikörper bisher vor allem in Diagnostik und Forschung. Ferner sind Anwendungen von Anti-Prion-Antikörpern im Bereich der TSE-Prophylaxe und Therapie in Entwicklung (ENARI et al., 2001; PERETZ et al., 2001; GILCH et al., 2003; SIGURDSSON et al., 2003; WHITE et al., 2003).

In Tabellen 2 und 3 sind monoklonale Antikörper gegen das bovine bzw. ovine Prion Protein sowie ihre Kreuzreaktivitäten mit dem Prion Protein anderer Tierarten aufgelistet, wobei in Tab. 3 lediglich Antikörper mit Kreuzreaktivität zum bovinen Prion Protein aufgenommen wurden. Die Reihenfolge richtet sich nach dem Sequenzbereich des Epitops bzw. des Immunogens. Daneben wurde die Gewinnung einer Vielzahl von polykonalen Seren beschrieben, auf die an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

Tabelle 2: Publizierte monoklonale Antikörper gegen das bovine Prion Protein. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte nach HILLS et al. (2001). Hamster (Ha), Hund (Hu), Kaninchen (Ka), Katze (Ktz), Maus (Ma), Mensch (Me), Meerschwein (Ms), Schaf (S), Schwarzwedelhirsch (SWH), Schwein (Schw), Ziege (Z). fl= full length

Antikörper	Immunogen	Epitop	Kreuzreaktivität	Autor
FH11 **BG4**	rPrP	23-90 fl	Me, S, Ha nicht: Ma	BARCLAY et al. (1999)
3G5 **3H1**	rPrP/25-241	63-103	**PrP^C**: S, Z, Schw, Hu, Ha, Ma, Me, Ka **PrP^{Sc}**: S, Z, Ha, (Me)	BARBIERI et al. (2003)
4D7	rPrP/25-241	63-103 97-113	**PrP^C**: S, Z, Schw, Hu, Ha, Ma, Me, Ka **PrP^{Sc}**: S, Z, Ha, (Me)	BARBIERI et al. (2003)
DF7	rPrP	90-231 fl		BARCLAY et al. (1999)
2B10 **4E3**	rPrP/25-241	104-156	**PrP^C**: Ktz, Schw, Hu, (S, Z, Ha, Ma, Me, Ka) **Prp^{Sc}**: S, Me	BARBIERI et al. (2003)
BSPX-54	146-159		S, (Ma)	HORIUCHI et al. (1995)
34C9	149-153		Kan, Schw, SWH	ANONYM (2003a)
F89/160.1.5	146-159	150-153	S, SWH, Elch, Me	O`ROURKE et al. (1998a/b)
3E2	153-172	153-172	**PrP^C**: S, Zg, Ktz, Ka, Schw nicht: Schw, Ha, Ma, Me **PrP^{Sc}**: S, Zg, (Me) nicht: Ha	BARBIERI et al. (2003)
3G6 **4D10**	153-172	153-172	**PrP^C/PrP^{Sc}**: Me	BARBIERI et al. (2003)
6H4	rPrP	155-163	Ma, Ha Me, Ma,S	MEYER et al. (1999) KORTH et al. (1997)
KG9	rPrP	166-170	Me nicht: S, Ma	LAFFLING et al. (2001)

Fortsetzung Tabelle 2

Antikörper	Immunogen	Epitop	Kreuzreaktivität	Autor
4G11	rPrP/25-241	199-216	**PrP^{C}**: S, Z, Schw, Hu, Ha, Ma, Me, Ka, (Ktz) **PrP^{Sc}**: S, Z, Schw, Hu, Ha, Ma, Me, Ka, Ktz	BARBIERI et al. (2003)
A2 **A3** **A6** **B5** **B9** **C3** **C4** **D21** **E18** **E20**	204-220			MATSUSHITA et al. (1998)
A4	204-220		Ma, Me, S, Ha	MATSUSHITA et al. (1998)
B10 **B12** **C5**	204-220		S, Ha	MATSUSHITA et al. (1998)
B23 **B24** **E11** **E13**	204-220		Ma, Me, S, Ha	MATSUSHITA et al. (1998)
E13	204-220		Ma, Me	MATSUSHITA et al. (1998)
B225-101	225-241		S nicht: Ma	HORIUCHI et al. (1995)

Tabelle 3: Publizierte monoklonale Antikörper gegen das ovine Prion Protein mit Kreuzreaktivität zum bovinen Prion Protein. Aminosäureunterschiede im Immunogen zum entsprechenden Rinderpeptid sind dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte nach HILLS et al. (2001). Hamster (Ha), Hund (Hu), Kaninchen (Ka), Katze (Ktz), Maus (Ma), Mensch (Me), Meerschwein (Ms), Schaf (S), Schwein (Schw), Ziege (Z). - (keine), + (schwache), ++ (mittelstarke), +++ (sehr starke) Reaktivität.

Antikörper	**Immunogen**	**Aminosäure-unterschied zum Rind**	**Reaktivität**	**Autor**
p4	97-112	**2** (106, 108)	**PrP^C**: S ++, Z++, Ha+-, Ma+- **PrP^{Sc}**: Me-, S-, Hu-, Ka-, Nerz-, Ms-, Ra-, Ka++ **nicht denaturiertes PrP^C**: S++, Z++, Me-, Ha-, Ma-, Ka-	HARMEYER et al. (1998)
R10	97-112	**2** (106, 108)	S	HARDT et al. (2000)
l3	153-171	**2** (154,166)	**PrP^C**: S++, Z++, Me++, Schw++, Hu+, Ktz+, Nerz++, Ms++, Ka++ nicht: Ha, Ma, Ra **PrP^{Sc}**: S++, Z++, Ha+ nicht: Ma	HARMEYER et al. (1998)
l42	153-171	**2** (154,166)	**PrP^C**: S++, Z++, Schw++, Me++, Hu++, Ktz++, Nerz++, Ha+, Ka++ nicht: Ma, Ra **PrP^{Sc}**: S++, Z++, Ha+, Ma+-	HARMEYER et al. (1998)
e31	217-236	**0**	**PrP^C**: S++, Z+, Ha+-, Ma+, Me+++, Schw+++, Hu+, Ktz+, Nerz++, Ka++ nicht: Ms **PrP^{Sc}**: S+, Z++ nicht: Ha,Ma	HARMEYER et al. (1998)
e41	217-236	**0**	**PrP^C**: S+-, Z+-, Ma+-, Me+, Schw+- nicht: Hu, Ktz, Nerz, Ms, Ka **PrP^{Sc}**: S+, Z++ nicht: Ma, Ha	HARMEYER et al. (1998)

KORTH et al. (1997) beschrieben einen Antikörper (15B3), der zunächst konformationsabhängig PrP^{C} und PrP^{Sc} zu unterscheiden schien, was in einer späteren Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte (FISCHER et al., 2000). LAFFLING et al. (2001) berichteten ebenfalls über einen Antikörper (KG9), der, immunhistologisch eingesetzt, PrP^{Sc}-spezifisch zu sein scheint. Eine eingehendere Charakterisierung dieses Antikörpers steht allerdings noch aus. Auch für Plasminogen, welches nach FISCHER et al. (2000) selektiv PrP^{Sc} sowie PrP^{27-30} binden soll, stellte sich heraus, dass es außerdem mit rPrP Komplexe bildet (KORNBLATT et al., 2003).

Die konformationsabhängige Exposition von Tyr-Tyr-Arg–Resten wurde von PARAMITHIOTIS et al. (2003) zur Entwicklung PrP^{Sc} spezifischer Antikörper (Tab. 4) genutzt, wobei allerdings auch hier noch Daten zur weiteren Charakterisierung der Reaktivität ausstehen.

Tabelle 4: Monoklonale Antikörper, die selektiv mit PrP^{Sc} reagieren. ND = nicht durchgeführt, (a) nur CJD und GSS, (b) nur vCJD. Daten entnommen aus PARAMITHIOTIS et al. (2003)

Antikörper	**Maus**	**Hamster**	**Schaf**	**Rind**	**Mensch**
1A12	++	++	++	+	+[a]
17D10	++	++	+	+	++
17D4	++	++	+	+	++
16A18	++	++	+	+	++[a]
20A13	+	+	+	+	ND
1A7	++	+	-	+	ND
3A2	+	++	-	+	ND
9A4	++	++	++	++	+
12A5	++	++	+	+	ND
12B1	++	++	++	++	++[b]

MORONCINI et al. (2004) generierten Antikörper, in deren schwere Ketten sie die Interaktionsstellen zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} einfügten. Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte dann durch Wechselwirkung dieser eingefügten Sequenz mit der Interaktionsstelle von PrP^{Sc}.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton	(Riedel-de-Haën, 32201)
Bovines rekombinantes Prion Protein	(Chemicon Europe Limited, AG 210)
Bovines Serumalbumin	(BSA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A-7030)
Casein	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654)
Citronensäure-Monohydrat	(Merck, 1.00244.0500)
D(+) Glucose-Monohydrat	(Merck, 1.08342.1000)
Ethylendiamintetraessigsäure	(EDTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ED2SS)
ExtrAvidin-Peroxidase	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E-2886)
Fetales Kälberserum	(Biochrom AG, S-0115)
Guanidin-Thiocyanat	(Guanidin-SCN; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G-9277)
Igepal CA-630	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, l-3021)
Kaliumchlorid	(Merck, 4935)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Riedel-de-Haën, 30407)
Laurylsulfat	(SDS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L-4509)
Magnesiumchlorid	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, M-2670)
MES	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, M-5287)
Methanol	(Riedel-de- Haën, 32213)
Natriumcarbonat	(Riedel-de-Haën, 31432)
Natriumchlorid	(Riedel-de-Haën, 31434)
Natriumdeoxycholat	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-6750)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	(Merck, 1.06346.1000)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, 1.06329.1000)
Natriumhydroxid	(Merck, 1.06498.1000)
Natriumphosphat, dibasisch	(Riedel-de-Haën, 30427)
N-Glykosidase F	(Roche Diagnostics GmbH, 1365169)
N-Lauroylsarkosin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L-5000)
Pefabloc SC (AEBSF)	(Roche Diagnostics GmbH, 1429868)
Phosphorwolframsäure	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-6395)

Proteinase K	(Roche Diagnostics GmbH, 0161519)
Rennin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, R-4879)
Salzsäure 1 mol/l	(Riedel-de-Haën, 35328)
Schwefelsäure 95-97 %	(Riedel-de-Haën, 30743)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Triton-X-100	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-6878)
Trizma Base	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-1503)
Tween 20	(Riedel-de-Haën, 63158)
Wasserstoffperoxid 30 %	(Merck, 8597)
Zwittergent 3-12	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-4516)

3.1.2 Lösungen und Puffer

Extraktionslösung

Phosphatpuffer (0,01 mol/l, pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl und 0,15 mol/l Glucose-Monohydrat

Enzymimmunoassay (EIA)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):
0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl

Bicarbonatpuffer: 0,05 mol/l (pH 9,6)

Absättigungslösung: 3 % (v/v) Fetales Kälberserum/PBS-Lösung

Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

Probenverdünnungspuffer:
1 % (w/v) BSA/PBS

Modifizierter Phosphatpuffer:
Phosphatpuffer (0,01 mol/l, pH 7,4) mit Zusatz von 8,065 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl und 0,05 % Tween 20

Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS):
10 mmol/l Tris/HCl (pH 7,4) mit Zusatz von 150 mM NaCl

Antikörperpuffer: modifizierter Phosphatpuffer mit Zusatz von 5 % (v/v) fetalem Kälberserum und 5 % (v/v) Tris/HCl-Puffer

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit Zusatz von 3,15 mol/l H_2O_2 (pH 3,9)

Tetramethylbenzidinlösung:

1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol

Substrat/Chromogenlösung nach GALLATI & PRACHT (1985):

20 Teile Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Stopp-Reagenz: 1 mol/l H_2SO_4 in a.dest.

3.1.3 Organ- und Milchproben

Für die Untersuchung der Organverteilung von PrP^C standen Materialien folgender Tiere zur Verfügung:

- Stammhirnproben von zwölf BSE-negativen Rindern (erhalten 4/2002 vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart)

- Stammhirnprobe eines BSE-Verdachtsrindes (erhalten 7/2002 vom Institut für Tierpathologie, Tierärztliche Fakultät, LMU München)

- Stammhirnproben von zehn Scrapie-negativen Schafen (erhalten 7/2002 von r-Biopharm)

- Hamsterhirnhomogenat (PrP^{Sc}-; erhalten von Dr. Groschup, Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems)

- Hamsterhirnhomogenat (PrP^{Sc}+; erhalten von Dr. Groschup, Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems)

- Stammhirnproben von zwei Kamelen (erhalten 2/2003 vom Central Veterinary Research Laboratory, Dubai)

- Rohmilch von zwei Kamelen (erhalten 2/2003 vom Central Veterinary Research Laboratory, Dubai)

Wesentliche Daten zu den Tieren, bei denen die PrP^C-Expression in verschiedenen Organen bzw. der PrP^C-Gehalt der Milch semiquantitativ bestimmt wurde, sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Daten der Tiere, deren Organe[1] bzw. Milch[2] im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf PrP^C untersucht wurden.

	Geburtsdatum	Geschlecht	Rasse	Schlachttag bzw. Tag der Probennahme
Kalb 1	3.1.2004	weiblich	Fleckvieh	30.03.2004[1]
Kalb 2	18.1.2004	männlich	Fleckvieh	30.03.2004[1]
Kalb 3	19.2.2004	männlich	Fleckvieh	30.03.2004[1]
Kalb 4	29.1.2004	männlich	Fleckvieh	30.03.2004[1]
Kalb 5	6.1.2004	männlich	Fleckvieh	30.03.2004[1]
Rind 1	01.01.1991	weiblich	Rotbunt	15.03.2004[1]
Rind 2	05.08.1995	weiblich	Fleckvieh	15.03.2004[1]
Rind 3	16.07.2002	männlich	Fleckvieh	15.03.2004[1]
Rind 4	18.04.2002	männlich	Fleckvieh	15.03.2004[1]
Rind 5	10.08.2002	männlich	Fleckvieh	15.03.2004[1]
Rind 6	09.09.1999	weiblich	Fleckvieh	15.03.2004[1]
Lamm 1	13.12.2001	männlich	Schwarzkopf x Bergschaf	17.04.2003[1]
Lamm 2	25.10.2002	weiblich	Schwarzkopf x Bergschaf	17.04.2003[1]
Lamm 3	27.11.2001	männlich	Schwarzkopf x Bergschaf	17.04.2003[1]
Schaf 1	2001	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 2	1999	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 3	2001	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 4	1998	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 5	2001	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 6	1999	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 7	1997	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 8	2000	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 9	1997	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]
Schaf 10	2001	weiblich	ostfriesisches Milchschaf	16.04.2003[2]

3.1.4 Immunreagenzien

mAk P4	(r-Biopharm, R8007)
mAk V5B2-POD	(r-Biopharm)
mAk V5B2	(r-Biopharm, R8009)
mAk L42	(r-Biopharm, R8005)

3.1.5 Sonstige Materialien

Für die Probennahme

Cellstar PP-Test tubes 50 ml	(Greiner bio-one, 210261)
Skalpellgriff Gr. 3	(Plazotta, 5690)
Skalpellklingen 40 mm, Fig.10	(Zefa, 3351180640)
Chirurgische Pinzette 14,5 cm	(Plazotta, 9960)

Herstellung der Homogenate

Lysing MatrixD	(Q-Biogene, 6913-100)
BSE-Spritze zur Probenentnahme	(BIO-RAD, 355-1121)
BSE-Spritze für den kalibrierten Probentransfer	(BIO-RAD; 355-1123)
BSE-Nadel für den kalibrierten Probentransfer	(BIO-RAD; 355-1124)
Kryoröhrchen 1,8 ml	(Nunc, 377267)

Enzymimmunoassay

Mikrotiterplatten F8 MaxiSorp loose	(Nunc, 469949)
Mikrotiterplatten F96 MaxiSorp loose	(Nunc, 068705)
12 Kanalpipette research variabel 30-300 µl	(Eppendorf)
Pipette Reference variabel 100-1000 µl, 10-100 µl	(Eppendorf)
Pipette Research variabel 0,5-10 µl	(Eppendorf)
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	(Eppendorf, 0030120.086)

3.1.6 Geräte

Herstellung der Homogenate

Tischwaage BL150S	(Sartorius, Göttingen)
RiboLyser	(Hybaid, Ashford)

Enzymimmunoassay

Reagenzrohrschüttler Press-to-mix 34524	(Snijders, Tilburg)
Taumler Reax 3	(Heidolph, Schwabach)
Thermomixer Comfort	(Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Biofuge pico	(Kendro, Langenselbold)
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	(Kendro, Langenselbold)
ELISA Reader Sunrise	(Tecan, Crailsheim)

3.2 Methodik und Ergebnisse

3.2.1 Etablierung eines Sandwich-EIA's zum Nachweis von zellulärem PrP

Zur Etablierung eines Nachweissystems standen die in Tab. 6 aufgeführten mAk zur Verfügung. Da alle mAk eine unterschiedliche Epitopspezifität aufwiesen und somit die Voraussetzungen für die Erstellung eines Sandwich-EIA's erfüllt waren, wurde in einem ersten Schritt überprüft, welche Ak-Kombinationen den sensitiven Nachweis von PrP^C ermöglichen.

Tabelle 6: Eigenschaften der verwendeten Antikörper

mAk	Spezifität	Ig-Klasse	Verwendung	Autor
P4	Schaf PrP AS 97-112	IgG	EIA, Immunoblot	HARMEYER et al. (1998)
V5B2	Human PrP AS 225-237	IgG		Produktinformation (r-Biopharm); ŠERBEC et al. (2004)
L42	Schaf PrP AS 153-171	IgG	EIA, Immunoblot	HARMEYER et al. (1998)

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 5, 2,5 µg/ml PBS) der zur Verfügung stehenden mAk beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Leeren der Platten, wurden die noch vorhandenen freien Bindungsstellen mit 3 % FCS/PBS für 30 min abgesättigt. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang, sowie die Zugabe des Antigens (1:10 in 1 % BSA/PBS verdünnt). Hierbei wurde ein, wie in 3.2.2.1 beschrieben, hergestelltes Hirnhomogenat (25 %) verwendet, um bereits im frühen Stadium der Testentwicklung den Einfluss des Probenmaterials auf das Testsystem zu überprüfen. Als Proben (50 µl/Kavität) wurden grundsätzlich Hirnhomogenate vor bzw. nach Proteinase K (PK)-Verdau (Negativkontrolle) zusammen mit dem Antikörper-Enzymkonjugat (V5B2-HRP, 1:5.000 bzw. P4-HRP, 1:5.000; 50 µl/Kavität) aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und erneutem Waschschritt erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl/Kavität). Die einsetzende Farbreaktion wurde nach 30 min mit Schwefelsäure (1 mol/l, 100 µl/Kavität) gestoppt. Zur Bestimmung der photometrischen Extinktion wurde ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader Sunrise) verwendet.

Ergebnisse

Wie in den Abb. 6 und 7 dargestellt, bewegten sich die Extinktionswerte der antigenfreien Ansätze (abhängig vom jeweiligen Sandwich-EIA-System) durchgehend auf einem niedrigen Niveau von 0,02 bis 0,08 – ein Beleg für die Effektivität der verwendeten Absättigungs- und Verdünnungspuffer (3.1.2). Ähnliche Messwerte wurden für die durch PK-Verdau generierten Probenkontrollansätze erhalten, so dass von einem minimalen Probenmatrix-bedingten Background auszugehen ist.

Die nach Einsatz von PrP^C-haltigem Material erhaltenen Signale variierten deutlich hinsichtlich ihrer Intensität. Die Sandwich-EIA-Variante bei der mAk P4 als Beschichtungsantikörper und V5B2-HRP als Nachweisantikörper eingesetzt wurde, erwies sich als das mit Abstand sensitivste System (Abb. 7) und wurde deshalb für die weiteren Untersuchungen verwendet. Der Einsatz einer 2,5 %igen Hirnsuspension resultierte in diesem System in Extinktionswerten von > 2,0.

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Testmodifikationen überprüft. Bei Untersuchung von stärker verdünnten Hirnhomogenaten zeigte sich, dass durch hohe Beschichtungs-konzentrationen von 10 µg mAk P4/ml im Vergleich zu 5 µg/ml keine Steigerung der Testempfindlichkeit erzielt werden konnte. Wurde zur Beschichtung der Platten Bicarbonatpuffer (pH 9,6) eingesetzt, wurden hingegen wahrscheinlich bedingt durch eine teilweise Denaturierung des mAk P4 deutlich niedrigere Extinktionen (ca. 40 %) erhalten. Im Hinblick auf den Testablauf wurde des Weiteren auch eine konsekutive Testanordnung, d.h. Probe und Nachweisantikörper werden getrennt nacheinander auf der Platte inkubiert, mit dem bislang verwendeten simultanen Testprinzip verglichen. Beide Testanordnungen resultierten in nahezu identischen Ergebnissen, so dass im Hinblick auf den reduzierten Zeitaufwand das simultane Testprinzip beibehalten wurde.

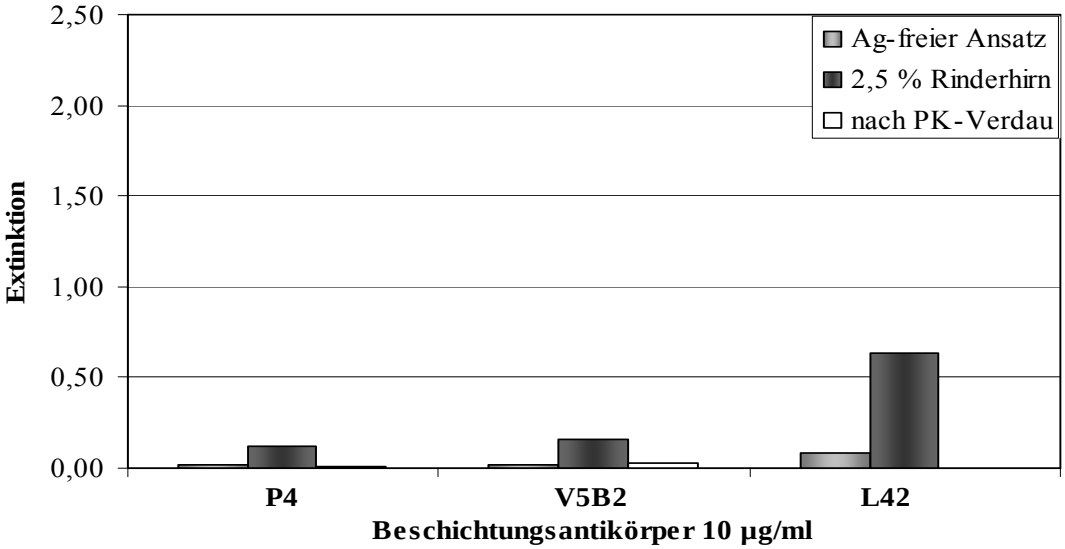

Abbildung 6: Nachweis von bovinem PrP^C in Hirnhomogenaten mittels verschiedener Sandwich-EIAs bei Verwendung von peroxidase-markiertem mAk P4 (1:5.000) als Nachweisantikörper. Ebenfalls dargestellt sind die Extinktionswerte der PK-verdauten Proben sowie des antigenfreien Kontrollansatzes.

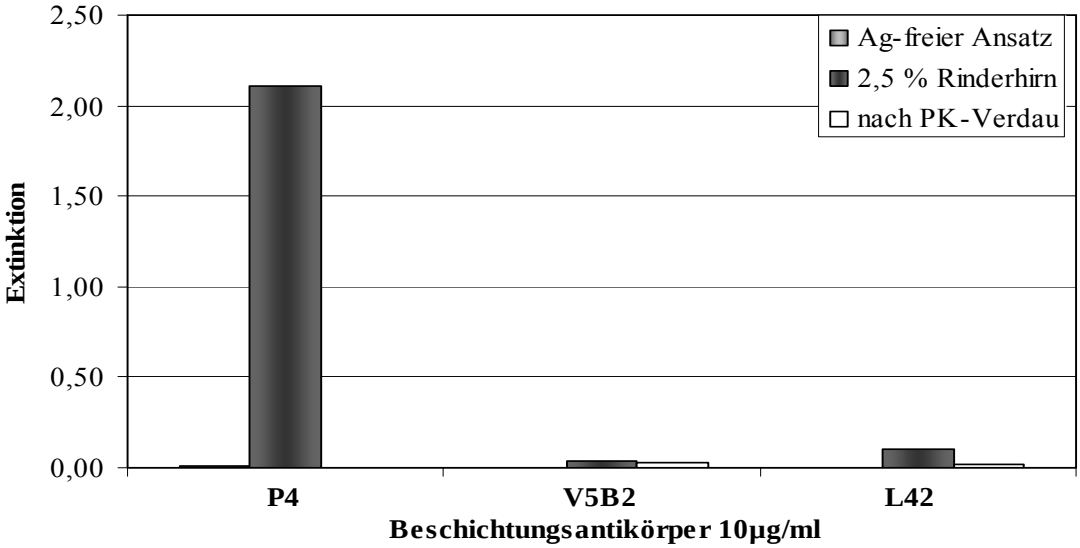

Abbildung 7: Nachweis von bovinem PrP^C in Hirnhomogenaten mittels verschiedener Sandwich-EIAs bei Verwendung von peroxidase-markiertem mAk V5B2 (1:5.000) als Nachweisantikörper. Ebenfalls dargestellt sind die Extinktionswerte der PK-verdauten Proben sowie des antigenfreien Kontrollansatzes.

Da sich im Laufe der vorliegenden Arbeit zeigte, dass die Verfügbarkeit des peroxidasemarkierten Antikörpers limitiert war, wurde im Hinblick auf die Etablierung eines alternativen Testprotokolls der mAk V5B2 nach einem Standardverfahren (HETZELT, 2005) mit Biotin markiert und der EIA-Ablauf entsprechend modifiziert. Wie in Abb. 8 gezeigt, waren die Testcharakteristika beider EIA-Varianten vergleichbar.

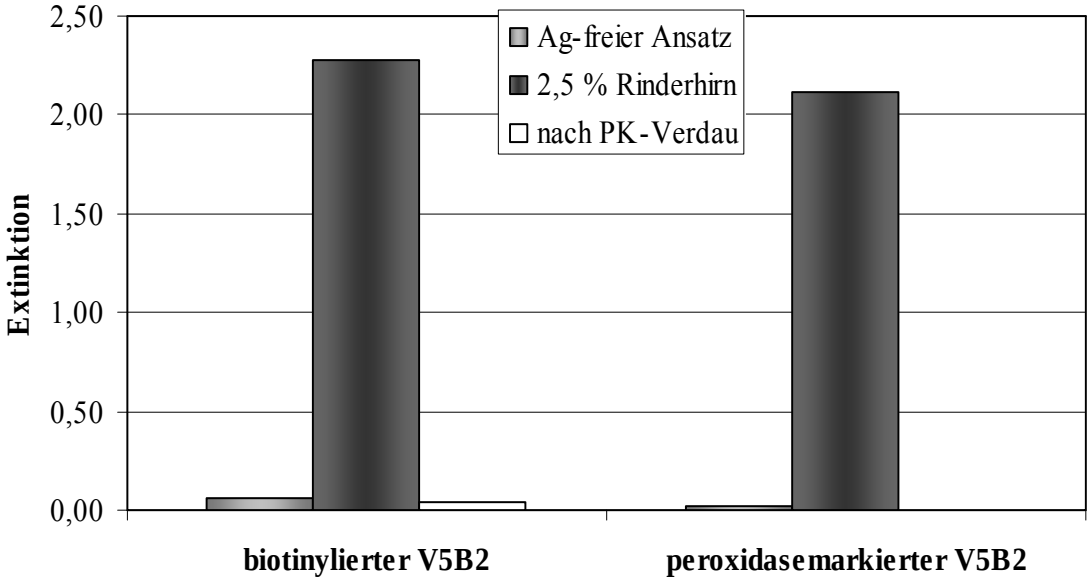

Abbildung 8: Nachweis von bovinem PrP^C in Hirnhomogenaten bei Verwendung unterschiedlich markierter Nachweisantikörper. Ebenfalls dargestellt sind die Werte nach PK-Verdau der Probe sowie der antigenfreie Ansatz.

Somit wurden folgende Sandwich-EIAs als Standardverfahren für die weiteren Untersuchungen, insbesondere dem semiquantitativen PrP^C-Nachweis in Organ- und Milchproben, verwendet:

EIA P4/V5B2-HRP

Mikrotiterplatten wurden mit mAk P4 (5 µg/ml PBS; 100 µl/Kavität) bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 4 °C für 48 h beschichtet. Danach wurden die noch vorhandenen freien Bindungsstellen mit 3 % FCS/PBS für 30 min abgesättigt und anschließend Verdünnungsreihen der Proben (50 µl/Kavität) zusammen mit dem Antikörper-Enzymkonjugat (V5B2-HRP; 1:5.000 in Antikörperpuffer; 50 µl/Kavität) aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und einem erneutem Waschschritt, erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl/Kavität). Die Farbreaktion wurde nach 30 min gestoppt und die Extinktion gemessen.

EIA P4/V5B2-Biotin/ExtrAvidin-HRP

Die Beschichtung der Platten und das Auftragen der Proben erfolgte wie oben beschrieben, statt des Enzymkonjugates wurden jedoch biotinylierte V5B2-Antikörper (5 µg/ml; 50 µl/Kavität) eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und einem Waschschritt wurden die Platten mit ExtrAvidin (1:2.000 in Antikörperpuffer; 100 µl/Kavität) für 1 h inkubiert.

3.2.2 Optimierung der Probenaufarbeitung

3.2.2.1 Extraktion

Um das vorwiegend membrangebundene PrP^C mittels EIA nachweisen zu können, mussten die zu untersuchenden Gewebe homogenisiert und extrahiert werden. Bei Flüssigkeiten, wie z.B. Milch, war diese Maßnahme nicht nötig. Verschiedene Verfahren, wie sie auch in der Literatur zu finden sind, wurden zu diesem Zweck anhand von Rinderstammhirnen überprüft, wobei die Homogenisierung der Proben jeweils mittels RiboLyser erfolgte.

Variante A (nach BONS et al., 2002 bzw. THACKRAY et al., 2003): Jeweils 400 mg Gewebe wurde in Lysing Matrix D Röhrchen eingewogen und mit 1,2 ml einer 3 % (w/v) Glucoselösung in PBS versetzt. Dann erfolgte der Zellaufschluss im RiboLyser über 45 sek bei 6,5 m/sek. Mittels einer BSE Spritzen-Nadelkombination für den kalibrierten

Probentransfer wurde das Homogenat in Kryotubes zur Weiterverarbeitung überführt. Zu Kontrollzwecken wurde parallel dazu ein Ansatz mit Proteinase K (20 µg/100 µl Homogenat) für 10 min bei 37 °C verdaut und nach Hitzebehandlung (100 °C für 5 min) ebenfalls in den EIA eingesetzt.

Variante B (nach BERINGUE et al., 2003): Hierbei wurde als Extraktionspuffer TBS mit Zusatz von 0,5 % Nonidet P40 und 0,5 % Na-Deoxycholat verwendet, die anderen Extraktionsparameter entsprachen den bei Variante A beschriebenen Bedingungen.

Variante C (nach MOUDJOU et al., 2001): Hirn wurde mit Extraktionspuffer [12,5 mmol/l Trizma, 12,5 mmol/l MES, 50 mmol/l NaCl (pH 6,8) und 1 % Zwittergent 3-12] im Verhältnis 1:10 versetzt und wie oben beschrieben im RiboLyser zerkleinert. Die 10 %ige Hirnsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand geteilt. Einem Teil wurde vor der 5 minütigen Inkubation bei 37 °C und anschließendem Erhitzen auf 100 °C PK (10 µg/500 µl Probenüberstand) zugesetzt.

Variante D (nach SAFAR et al., 1998; BOSQUE et al., 2002): Hierbei wurden 150 mg Hirn mit 1 ml PBS mit Zusatz von 4 % (w/v) Lauroylsarkosin für 45 sec im RiboLyser auf höchster Stufe homogenisiert und dann mit PBS auf eine 5 %ige Suspension weiterverdünnt. Dieser Ansatz wurde dann in Aliquote à 400 µl aufgeteilt, wobei zu Kontrollzwecken eine Portion mit 0,8 µl Proteinase K-Lösung (5 mg/ml) bei 37 °C für 1 h inkubiert wurde. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert (20 sec; $20x10^3$ U/min) und neun Teile Überstand mit einem Teil a. dest. mit Zusatz von 4 % Phosphorwolframsäure und 170 mmol/l $MgCl_2$ (pH 7,4) versetzt. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei 37 °C folgte nochmals ein Zentrifugationsschritt (30 min; $12,2x10^3$ U/min). Der Überstand wurde verworfen, die Reaktionsgefäße umgedreht für 5 min trocknen lassen und die Pellets in 500 µl 1 % BSA/PBS resuspendiert.

Von den bei Variante A-D erhaltenen Extrakten wurde jeweils eine 1:2 Verdünnungsreihe in PBS angelegt und mit dem in 3.2.1 beschriebenem EIA analysiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 9 zusammengefasst. Von allen untersuchten Verfahren eignete sich die Extraktionsmethode unter Verwendung von PBS mit Glucose-Zusatz am besten und wurde deshalb in den weiteren Versuchen als Standardverfahren verwendet.

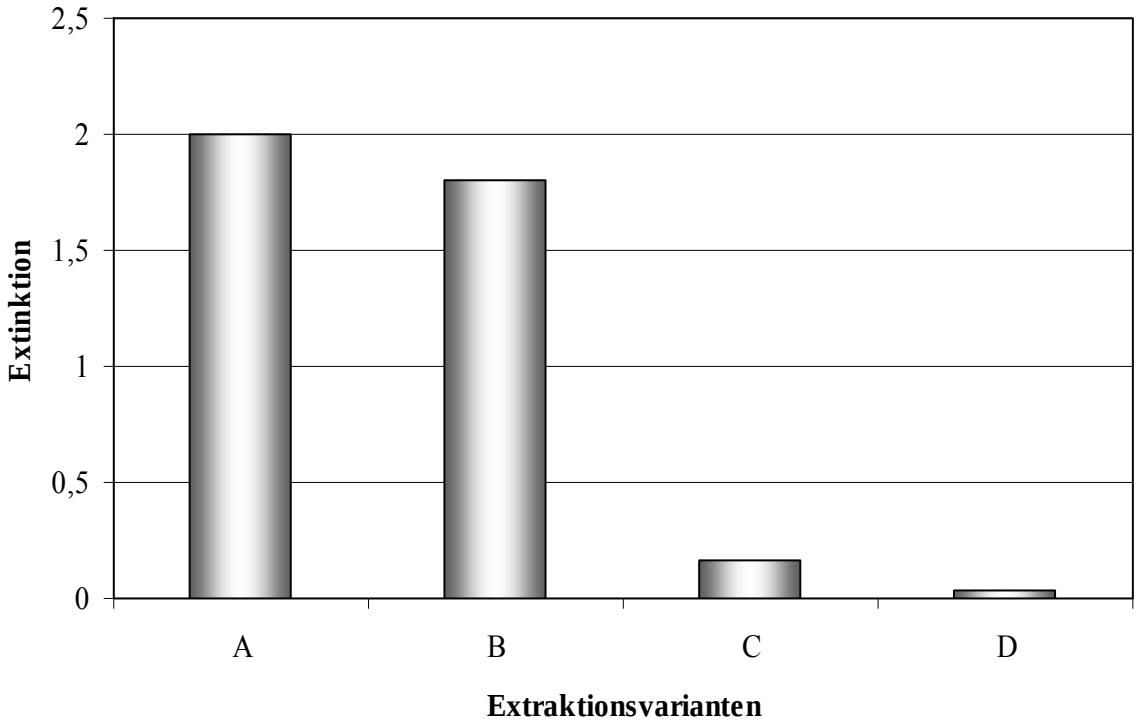

Abbildung 9: Effizienz verschiedener Extraktionsverfahren (Varianten A-D, Details siehe Text) zum Nachweis von PrP^C in Rinderhirn mittels Sandwich-EIA.

Die anderen Verfahren, bei denen zur Steigerung der Extraktionseffizienz verschiedene Detergenzienzusätze verwendet werden, führten hingegen zu z.T. deutlich schlechteren Ergebnissen. Während dies für die Variante D – ein zur Extraktion von SAFs optimiertes Verfahren – noch zu erwarten war, konnten die niedrigen Extinktionswerte für die nach Variante C gewonnenen Extrakte zunächst nicht schlüssig erklärt werden. Weitere Versuche zeigten, dass das hierbei eingesetzte Zwittergent auch in hohen Verdünnungen noch zu einer weitgehenden Denaturierung des als Fangantikörper eingesetzten mAk P4 führt. Für die mitgeführten Kontrollansätze (Hirnhomogenate nach PK-Verdau) wurden im Übrigen bei allen Extraktionsvarianten negative Resultate erhalten.

Weitere orientierende Untersuchungen, bei denen Hirnhomogenat mit glykolytisch wirksamen Enzymen wie α-Amylase(0,5-20 U/250 µl Hirnsuspension; Inkubationszeit 10 min bei RT) bzw. N-Glykosidase F (5 U/500 µl Hirnhomogenat; Inkubation über Nacht bei 37 °C unter Zusatz von Proteasehemmern) versetzt wurde, führten zu keiner signifikanten Verbesserung des PrP^C-Nachweises.

3.2.2.2 Einfluss von Detergenzien

Im Rahmen der oben beschriebenen Versuche wurde neben der Empfindlichkeit des mAk P4 gegenüber Detergenzien auch festgestellt, dass bei der Untersuchung einer seriellen (1:2) Verdünnungsreihe des Hirnhomogenates mittels EIA die resultierenden Absorptionswerte keine lineare Reduktion zeigten, wie theoretisch zu erwarten wäre. Solche Kurvenverläufe sind bei EIA-Verfahren üblicherweise ein Indiz für eine mangelnde Löslichkeit des Analyten bzw. für die Bildung von Aggregaten aufgrund des hydrophoben Charakters des Antigens. Dies war Anlass zu überprüfen, ob durch die Verwendung anderer Probenverdünnungspuffer als das bislang verwendete PBS die Nachweisbarkeit des PrP^C gesteigert werden könnte.

Dazu wurden Hirnhomogenate, hergestellt wie unter 3.2.2.1 beschrieben, 1: 10 in PBS bzw. PBS mit verschiedenen Zusätzen verdünnt und zur Entfernung grober Probenbestandteile zentrifugiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen dieser Ansätze in den ausgewählten Puffern angelegt und mittels EIA untersucht. Hierbei wurde der Einfluss folgender Zusätze bzw. Detergenzien überprüft: 1 % (w/v) BSA, 0,2 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton-X-100, 0,1 mol/l Guanidin-SCN-Puffer bzw. SDS in verschiedenen Konzentrationen (0,01-0,05 %).

Wie sich bereits bei der Extraktion nach MOUDJOU et al. (2001) angedeutet hatte, zeigten auch diese Versuchsreihen, dass der EIA sehr empfindlich auf Detergenzien-Zusätze jedweder Art reagiert. Ein typisches Ergebnis, wie es beispielsweise bei der Überprüfung von SDS-Zusätzen zum Probenverdünnungspuffer erhalten wurde, ist in Abb. 10 dargestellt. Selbst geringe Zusätze (0,01 %) von SDS zum Puffer (PBS) resultierten in einer deutlich verringerten Reaktivität des untersuchten Hirnhomogenates. Wurde hingegen zusätzlich der Puffer noch mit 1 % BSA versetzt, um die denaturierende Wirkung des SDS abzuschwächen,

konnten etwas bessere Ergebnisse erhalten werden. Ab SDS-Konzentrationen von 0,04 % war aber trotzdem wieder eine deutliche Beeinträchtigung des EIA-Systems festzustellen.

Vergleichsansätze, bei denen nur BSA zugesetzt wurde, belegten, dass durch diesen Zusatz ein etwas flacherer Kurvenverlauf und dadurch eine geringfügige Steigerung der Nachweisempfindlichkeit induziert werden konnte (Abb. 11).

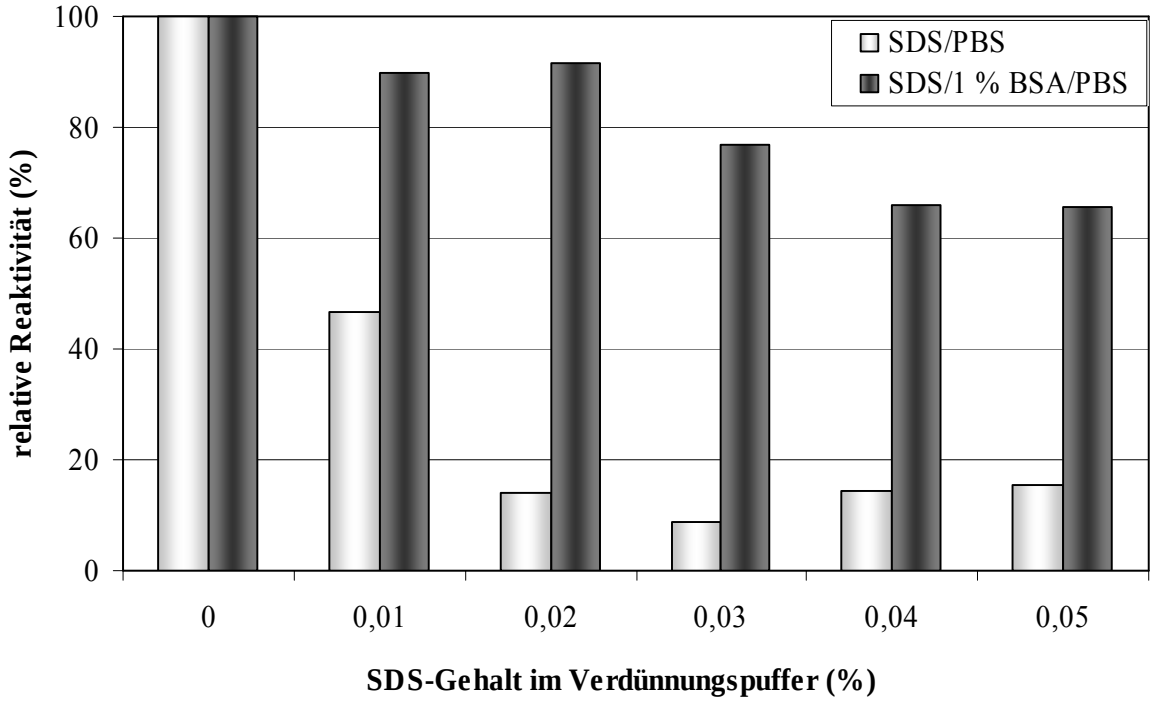

Abbildung 10: Einfluss von SDS-Zusätzen auf die Reaktivität einer 0,625 %igen Hirnsuspension im Sandwich-EIA. Die Extinktionswerte für die Vergleichsansätze ohne SDS (Homogenat in PBS bzw. in 1 % BSA/PBS) wurden gleich 100 % gesetzt.

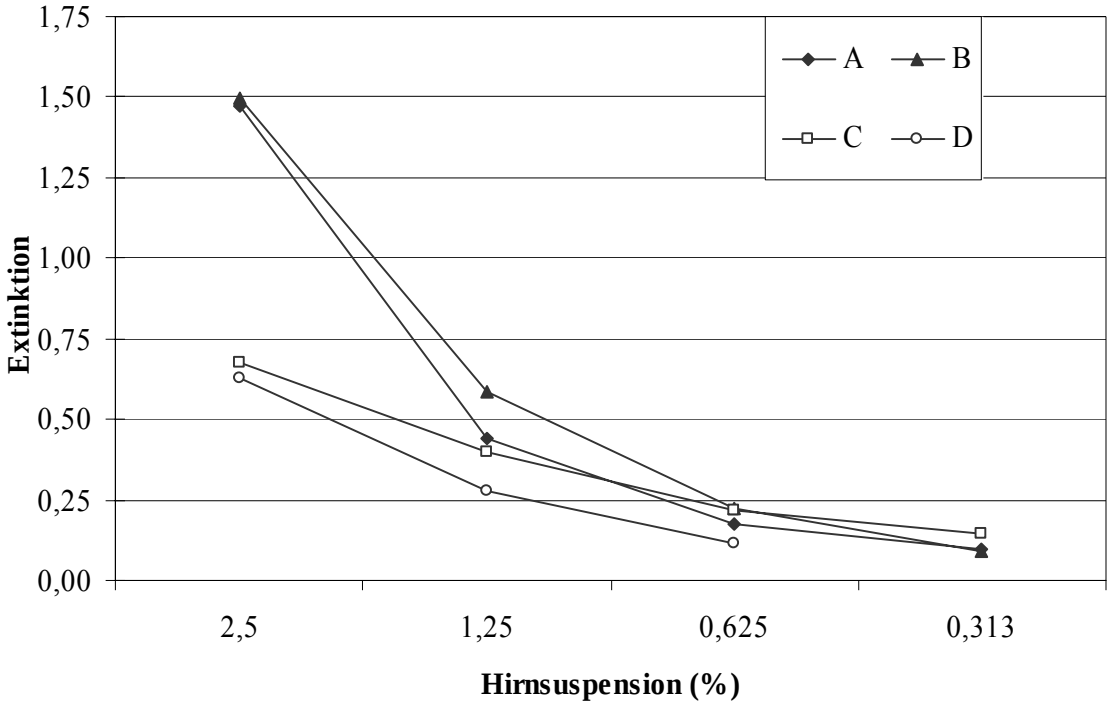

Abbildung 11: Einfluss verschiedener Probenverdünnungspuffer auf die Nachweisbarkeit von PrP^C in Hirnsuspensionen:
(A) PBS (B) 1 % BSA/PBS (C) wie B mit Zusatz von 0,2 % Triton
(D) wie B mit Zusatz von 0,2 % Tween 20.

Die Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes wurden durch den BSA-Zusatz nicht beeinflusst.

Auch der alternativ überprüfte Zusatz nicht ionischer Detergenzien (0,2 %) wie Tween 20 oder Triton-X-100 resultierte in einer Verschlechterung der Assay-Parameter. Wurden zudem detergenzienhaltige Probenverdünnungspuffer bei einer konsekutiven Testanordnung eingesetzt, sanken die Extinktionswerte für antigenhaltige Proben (2,5 % Hirnhomogenat) auf Werte von < 0,1. Damit konnte demonstriert werden, dass die mangelnde Robustheit des Beschichtungsantikörpers (mAk P4) die eigentliche Ursache für die beschriebenen Probleme darstellt.

3.2.2.3 Modifikation der Extraktaufarbeitung

Um den potentiellen Einfluss von Probenmatrix-Interferenzen auf das EIA-System zu überprüfen und somit die analytische Sicherheit des Nachweises zu erhöhen, wurde sowohl im Rahmen der Testentwicklung als auch bei den späteren Untersuchungen von Gewebsproben, als Negativ-Kontrollansatz stets eine mittels Proteinase K (PK) verdaute Probe parallel mituntersucht. Da der PK-Verdau verschiedene Inkubationsschritte erfordert, wurde in einer detaillierten Studie der Einfluss dieser Parameter auf den Verdau der Probe bzw. die PrP^C-Nachweisbarkeit einer identisch behandelten PK-freien Vergleichsprobe untersucht. Die Untersuchungen beinhalteten im Einzelnen die Überprüfung folgender Parameter:

- Konzentration der zugesetzten PK
- Inkubation bei 37 °C
- Inaktivierung der PK

In einem typischen Ansatz wurde eine 2,5 %ige Rinderhirnsuspension (verdünnt in 1 % BSA/PBS) mit unterschiedlichen Konzentrationen an PK (0,625 µg - 5 µg pro 6,25 mg Hirngewebe) versetzt und danach für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der zugesetzten Protease wurde dann ein Teil der Ansätze entweder mit Pefabloc versetzt (Endkonzentration 5 mmol/l bzw. 10 mmol/l; Inkubationszeit 2 h unter Schütteln bei 37 °C) oder für 5 min auf 100 °C erhitzt. Um sicherzustellen, dass unter diesen Bedingungen eine vollständige Inaktivierung der Protease stattgefunden hat, wurden im Anschluss die Ansätze in jeweils zwei Aliquots aufgeteilt und eines davon erneut mit 20 µl unbehandeltem Hirnhomogenat (25 % Hirnanteil) versetzt. Es folgte eine weitere Schüttelinkubation bei 37 °C über 35 min, bevor die Proben zusammen mit den PK-freien Vergleichsansätzen in den oben beschriebenen EIA eingesetzt wurden.

Ab Konzentrationen von 1,25 µg zugesetzter PK pro 6,25 mg Hirngewebe konnte kein PrP^C mehr nachgewiesen werden, die Extinktionen befanden sich innerhalb des doppelten Leerwertbereiches (Abb. 12).

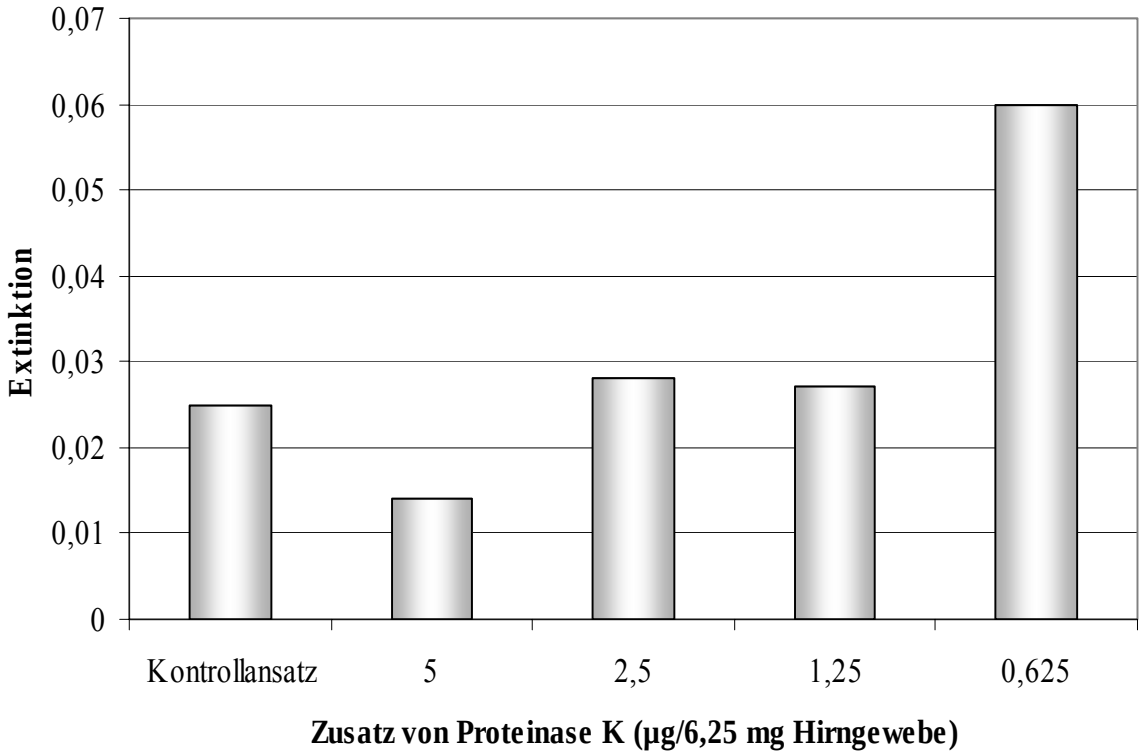

Abbildung 12: Reaktivität von Hirngewebe nach Verdau mit unterschiedlichen Konzentrationen von Proteinase K. Zum Vergleich ist der Extinktionswert des antigenfreien Kontrollansatzes (1 % BSA/PBS) dargestellt.

Wurde die Enzymreaktion durch Hitzebehandlung gestoppt und anschließend erneut Homogenat zugegeben, waren im EIA wieder deutliche Signale vorhanden, – ein Beleg dafür, dass das Enzym durch diesen Inaktivierungsschritt vollständig gehemmt wurde und die niedrigen Extinktionen im EIA somit nicht das Resultat eines Antikörperverdaus darstellen (Abb. 13). Das alternativ überprüfte Inaktivierungsverfahren, nämlich Zusatz eines Enzyminhibitors, bewährte sich hingegen nicht. Wie in Abb. 13 dargestellt, wurde durch Pefabloc SC in den verwendeten Konzentrationen keine bzw. nur eine unvollständige Enzymhemmung bewirkt.

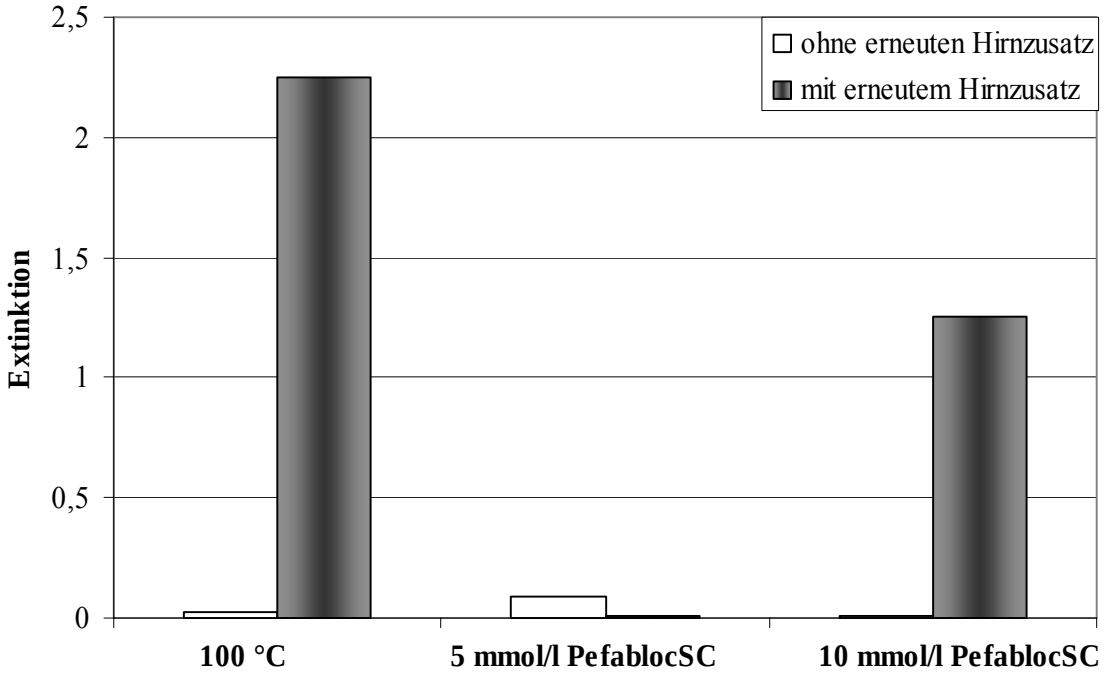

Abbildung 13: Überprüfung verschiedener Inaktivierungsverfahren für Proteinase K-verdaute Proben. Verdaute Proben (5 µg PK pro 6,25 mg Hirngewebe) wurden dazu nach dem Inaktivierungsschritt mit unbehandeltem Hirnhomogenat versetzt und mittels Sandwich-EIA untersucht.

Wie sich bei der Untersuchung von PK-freien Kontrollansätzen zeigte, resultierte die Hitzebehandlung (5 min, 100 °C) der Ansätze allerdings auch in einer deutlichen Reduzierung des PrP^C-Meßsignals um etwa 25-55 % (Abb. 14). Ursächlich hierfür dürfte sein, dass ein Teil der für die Antikörperbindung wichtigen Epitope durch die Hitzebehandlung nicht mehr zugänglich sind (geänderte Tertiärstruktur des PrP^C). Da es sich dabei um ein reproduzierbares Phänomen handelte, wurden insbesondere bei der Untersuchung der Gewebsproben entsprechende Kontrollansätze in die Analysen integriert, um so auch die Richtigkeit der Untersuchungsergebnisse weiter abzusichern.

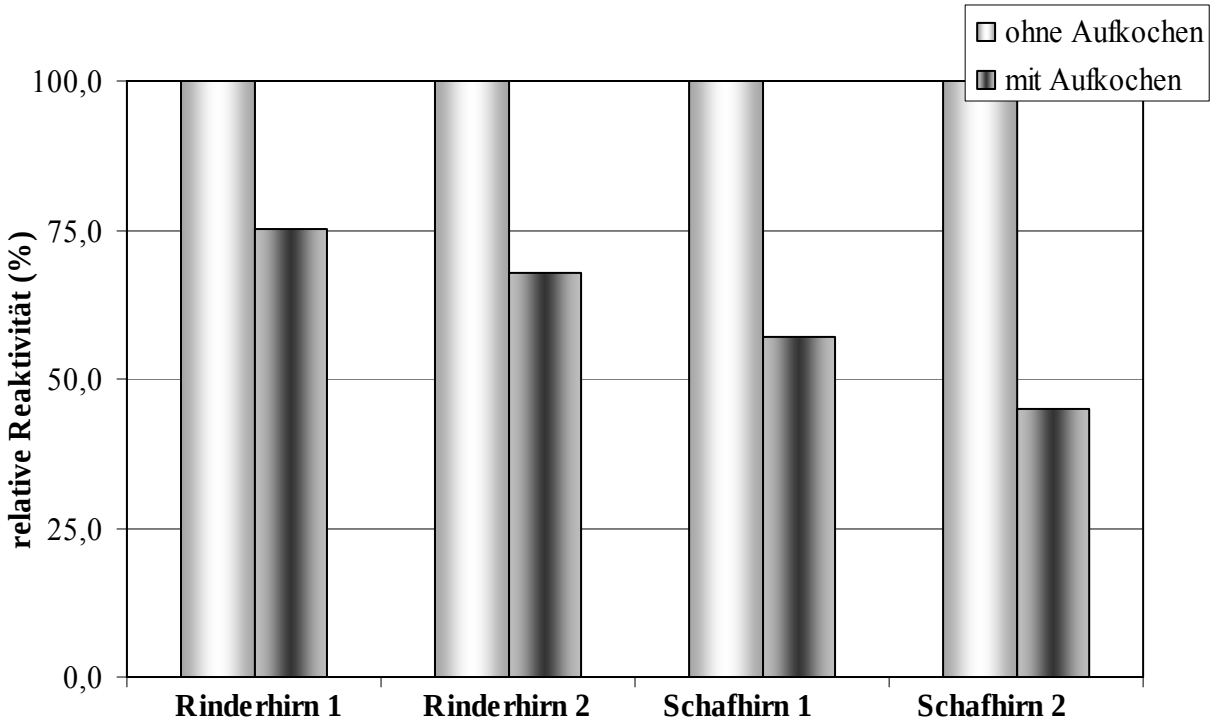

Abbildung 14: Einfluss einer Hitzebehandlung (5 min, 100 °C) auf die Reaktivität verschiedener Hirnhomogenate im Sandwich-EIA. Der PrP^C Gehalt der unbehandelten Probe wurde gleich 100 % gesetzt.

Ein weiterer Zufallsbefund dieser Untersuchungen war, dass grundsätzlich die bei 37 °C inkubierten PK-freien Vergleichsansätze durchwegs höhere Extinktionen im EIA aufwiesen, als die unbehandelten Proben. Dies war Anlass, in einer weiteren Versuchsreihe den Einfluss von Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Proteaseinhibitoren auf dieses Phänomen zu überprüfen.

Dazu wurden Rinderhirnhomogenate [2,5 % (g/v); verdünnt in 1 % BSA/PBS] bis zu 1 h bei 4 °C, 37 °C oder Raumtemperatur inkubiert. Ein Teil der Ansätze wurde dabei mit Pefabloc SC (Endkonzentration 2 mmol/l) und EDTA (Endkonzentration 1 mmol/l) versetzt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Verdünnungsreihen (in 1 % BSA/PBS) der so gewonnenen Überstände in den EIA eingesetzt.

Es zeigte sich, dass insbesondere in Abhängigkeit von der verwendeten Inkubationstemperatur die Menge an nachweisbarem PrP^C anstieg. In Abb. 15 ist dies am Beispiel einer 1,25 %igen Hirnsuspension dargestellt. Nach 40 minütiger Inkubation bei 37 °C lagen die Werte im Vergleich zu den bei RT inkubierten Proben um etwa Faktor 2 und zu den bei 4 °C inkubierten Ansätzen um etwa den Faktor 3 höher. Bei Zusatz von Proteaseinhibitoren konnte hingegen die deutliche Erhöhung der Extinktionswerte nicht mehr beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit bei der Untersuchung der Proben auf PrP^C ein Inkubationsschritt bei 37 °C in die Probenvorbehandlung integriert.

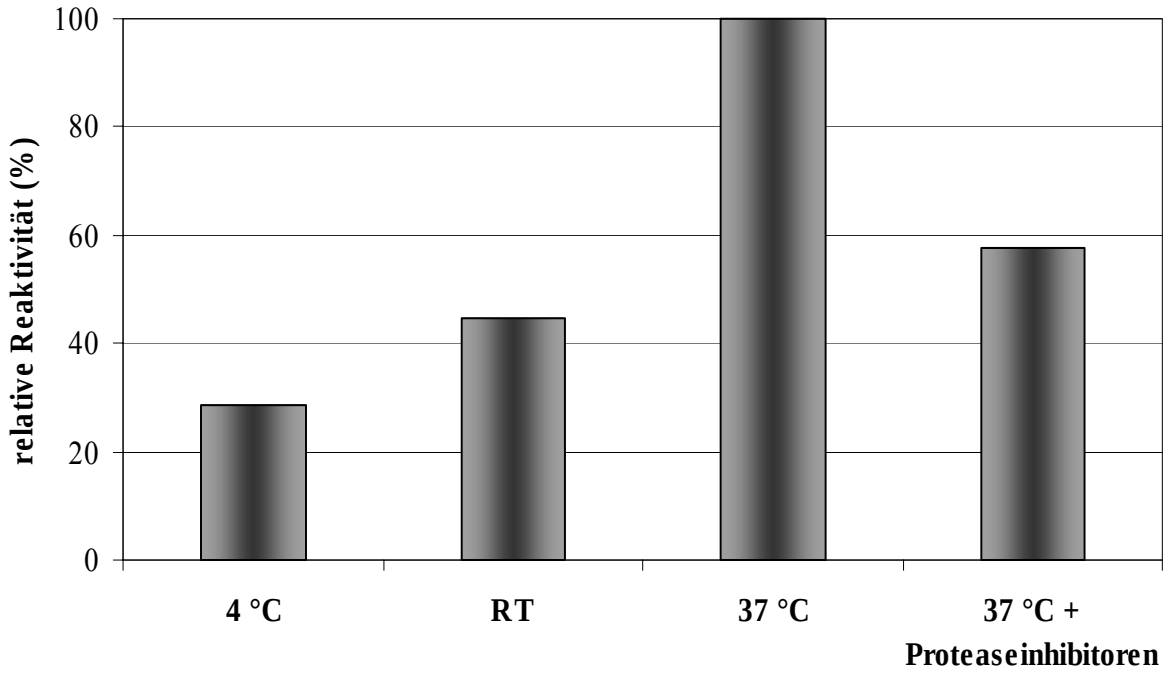

Abbildung 15: Relative Nachweisbarkeit von PrP^C in einer 1,25 %igen Hirnsuspension in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur bzw. dem Zusatz von Proteaseinhibitoren.

3.2.3 Spezifität des entwickelten EIAs

Um die Spezifität des EIAs zu überprüfen, wurden Hirnhomogenate verschiedener Tierarten, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, hergestellt, 1:10 in 1 % BSA/PBS verdünnt und in den EIA eingesetzt. Daneben wurde rekombinantes, bovines PrP in einer Ausgangskonzentration von 0,5 µg/ml untersucht. Alle Hirnproben wurden zusätzlich mit PK verdaut (siehe 3.2.2.3), um unspezifische Reaktionen im EIA ausschließen zu können.

Während bei der Untersuchung von Rinder- und Schafhirn jeweils deutlich positive Ergebnisse im EIA auftraten (Abb. 16), konnte bei Kamelhirn kein PrP^C nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Reaktivität ist die Epitopspezifität der beiden verwendeten mAk, da das Kamel-PrP in den entsprechenden Bereichen deutliche Aminosäureunterschiede zu den jeweiligen Original-Epitopen aufweist (KALUZ et al., 1997; HARMEYER et al., 1998).

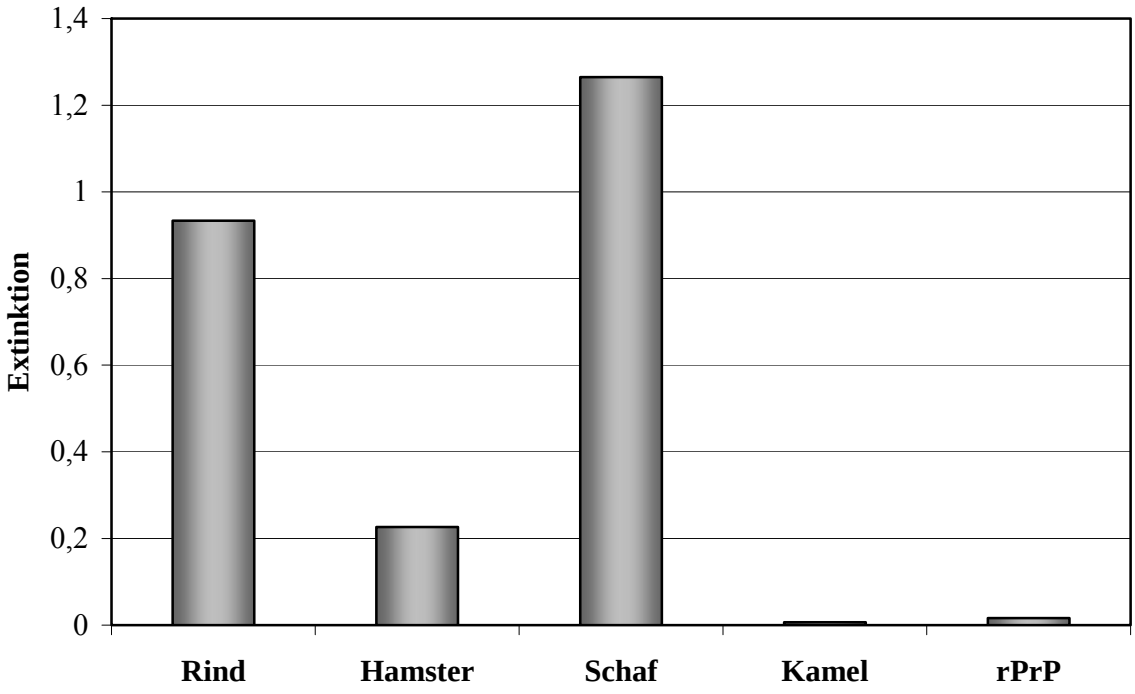

Abbildung 16: Reaktivität einer 0,625 %igen Hirnsuspension von Rind, Hamster, Schaf bzw. Kamel (ohne Proteinase K-Verdau oder Aufkochen), sowie von rPrP (0,5 µg/ml) im Sandwich-EIA.

Hamster PrP war ebenfalls im EIA nicht nachweisbar, wobei bereits HARMEYER et al. (1998) für den mAk P4 eine im Vergleich zu anderen Tierarten relativ geringe Reaktivität dieses Antikörpers mit entsprechendem Material im Immunoblot beschrieben.

Da der als Nachweisantikörper eingesetzte mAk V5B2 ein konformationsabhängiges Epitop erkennt (Produktinformation, r-Biopharm), konnte rekombinantes PrP, das aufgrund der fehlenden Glykosylierung eine andere Tertiärstruktur als natürliches PrP aufweist, im etablierten EIA-System nicht nachgewiesen werden. Dies hatte zur Folge, dass im weiteren Verlauf der Arbeit eine wünschenswerte quantitative Analyse des PrP^C-Gehaltes von Organ- und Milchproben nicht möglich war.

3.2.4 Weitere Charakteristika des Untersuchungsverfahrens

Da wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, der EIA nicht mit rekombinantem PrP reagiert, sind im Hinblick auf die Sensitivität des entwickelten Nachweisverfahrens nur semiquantitative Angaben möglich. Als Bezugsgröße bietet sich hierbei das zu den jeweiligen Verdünnungsstufen korrespondierende Probenäquivalent (in %) an.

Unter Verwendung des im Folgenden nochmals kurz dargestellten, optimieren Probenaufarbeitungs-Verfahrens wurden anhand verschiedener Rinder- und Schafhirne die Sensitivität des Nachweisverfahrens überprüft. Dazu wurden 400 mg Stammhirngewebe in Lysing Matrix D Röhrchen eingewogen, mit 1,2 ml einer 3 % (w/v) Glucoselösung in PBS versetzt und danach der Zellaufschluss im RiboLyser über 45 sek bei 6,5 m/sek durchgeführt. Mittels einer BSE Spritzen-Nadelkombination für den kalibrierten Probentransfer wurde das Homogenat anschließend in Kryotubes zur Weiterverarbeitung überführt. Nach der Inkubation (40 min bei 37 °C) wurden die Proben in den EIA (3.2.1) eingesetzt.

Im Hinblick auf die Nachweisgrenze des verwendeten Sandwich-EIAs wurde ein Cut-off Wert, definiert als die zweifache Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes, festgelegt. Die Extinktionen dieses „Leerwertes“ betrugen durchschnittlich 0,042, der Cut-off-Wert lag demnach bei 0,084. Unter Berücksichtigung dieser Definition konnten Rinderhirnkonzentrationen von 0,16 % bzw. Schafhirnkonzentrationen von 0,06 % nachgewiesen werden. Wie in Abb. 17 dargestellt, reagierte der EIA prinzipiell deutlich

empfindlicher mit Schafhirn als mit Rinderhirn. Der Messbereich des Verfahrens repräsentiert durch Extinktionswerte von 0,15-1,5, lag somit bei relativen Rinderhirnäquivalenten von 0,25 % bis 1,0 % bzw. für Schafhirnäquivalente von 0,12 % bis 0,71 %.

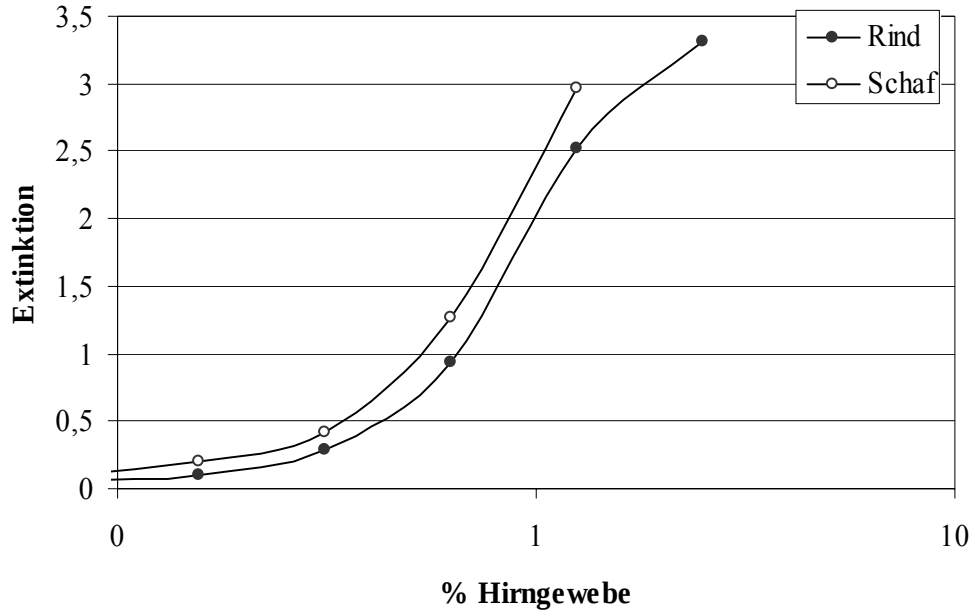

Abbildung 17: Nachweisbarkeit von PrP^C in Rinder- und Schafhirnen mittels EIA.

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse im EIA machen zu können, wurden verschiedene Hirnhomogenate an unterschiedlichen Tagen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 zusammengefasst. Der Variationskoeffizient der Analyse lag durchschnittlich bei 15,4 % bzw. für die Einzelanalysen im Bereich von 1,9 %-23,1 %.

Die Reproduzierbarkeit des Testverfahrens wurde auch dadurch dokumentiert, dass die im Laufe der Arbeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchten Rinderhirne, die als Positivkontrollen bei der Untersuchung der Proben dienten, einen relativ einheitlichen PrP^C-Gehalt aufwiesen (Abb. 19). Die bei Einsatz eines 0,625 %igen Hirnhomogenates gemessenen Extinktionswerte lagen hierbei im Bereich von 0,178 bis 0,460.

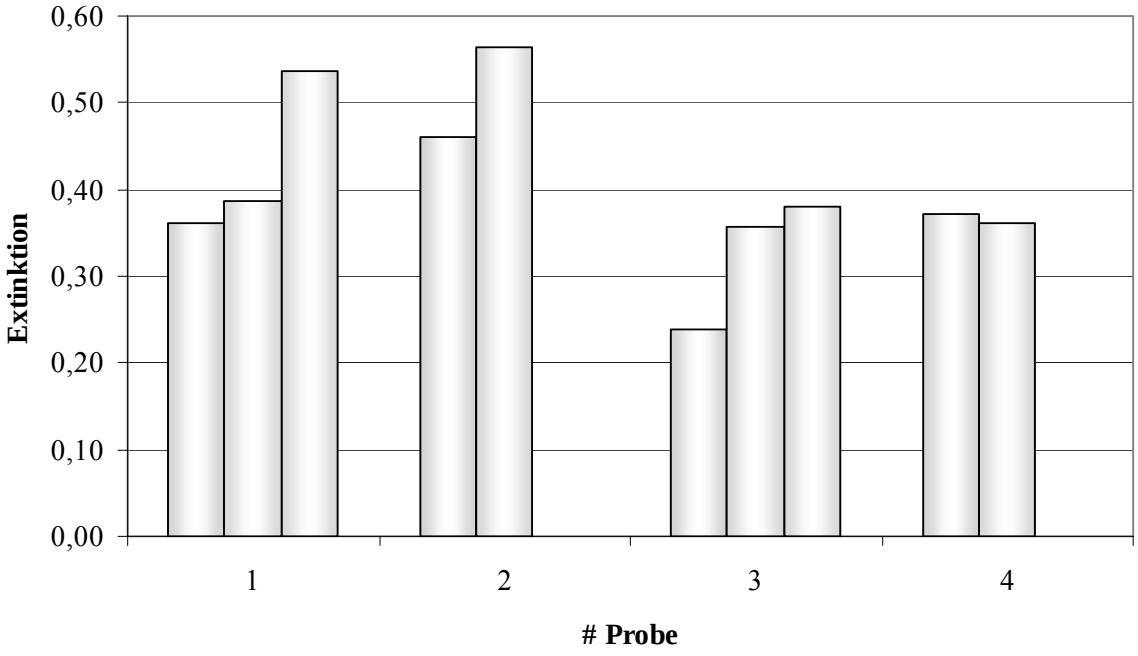

Abbildung 18: Reproduzierbarkeit der EIA-Analysen: vier verschiedene Rinderhirn-homogenate wurden an unterschiedlichen Tagen analysiert. Dargestellt sind die bei den Untersuchungen erhaltenen Einzelmesswerte (0,625 % Hirn in 1 %/BSA/PBS)

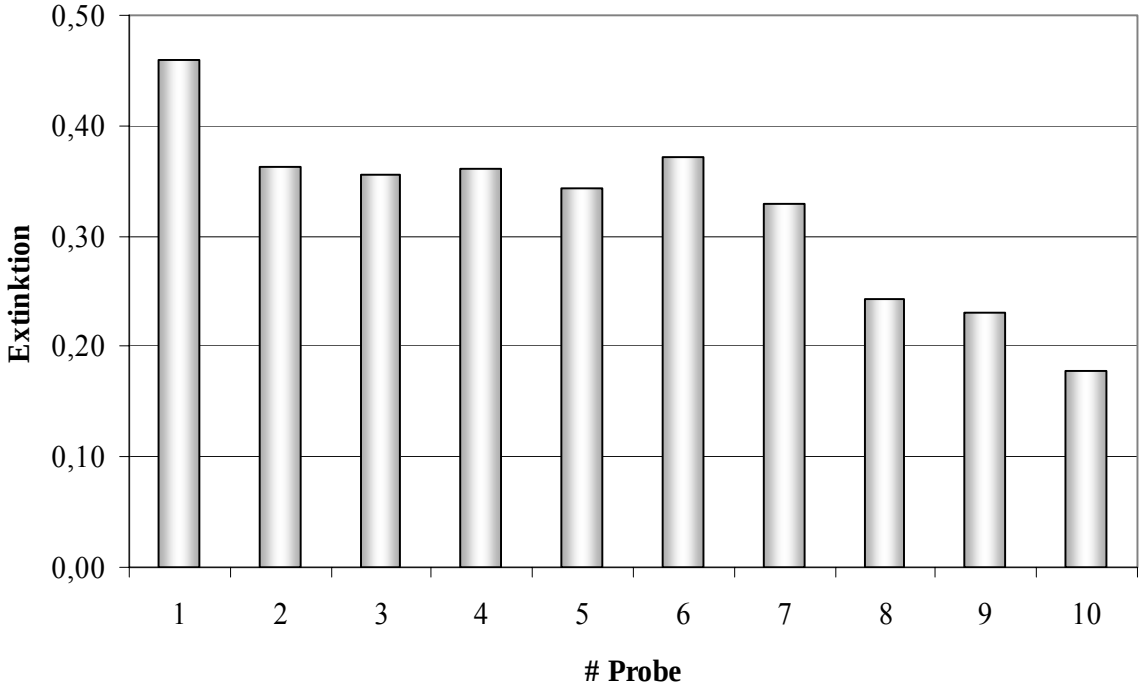

Abbildung 19: Vergleich des relativen PrP^C-Gehaltes von zehn Rinderhirnen (0,625 % Hirngewebe in 1 % BSA/PBS).

3.2.5 Nachweisbarkeit von PrP^C in verschiedenen Organen bei Wiederkäuern

Um Hinweise auf die Verteilung von PrP^C im Organismus zu erhalten, wurden von drei Lämmern, fünf Kälbern und sechs Rindern diverse Organe mittels des in 3.2.1 beschriebenen EIA's untersucht (Tab. 7).

Die Extraktion erfolgte wie bereits unter 3.2.2.1 beschrieben. Zur weiteren Probenaufarbeitung wurde das für Hirngewebe optimierte und unter 3.2.4 beschriebene Verfahren verwendet, wobei allerdings das Organhomogenat für die Inkubation bei 37 °C lediglich 1:5 in 1 % BSA/PBS (entspricht einer 5 %igen Organsuspension) verdünnt wurde. Neben dem Direkteinsatz der so vorbehandelten Proben in den EIA, wurden die Ansätze auch mittels Proteinase K verdaut, um unspezifische Bindungsreaktionen, die das Ergebnis verfälschen könnten, auszuschließen. Den Proben, die mit Proteinase K verdaut werden sollten, wurden dabei vor der Inkubation bei 37 °C 2 µg PK/2,5 mg Probenäquivalent zugesetzt. Nach zehn Minuten wurde die Enzymreaktion durch kurzzeitiges Erhitzen auf 100 °C gestoppt. Von allen der so gewonnen Extrakte wurden Verdünnungsreihen (1:2) in 1 % BSA/PBS angelegt und mittels Sandwich-EIA untersucht. Die Durchführung des EIA erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben, wobei bedingt durch die verschiedenen Untersuchungszeiträume für die Analysen der Rinder- und Kälberorgane biotinylierter mAk V5B2, für die Lämmerproben jedoch peroxidasemarkierter mAk V5B2 als Detektionsantikörper verwendet wurde.

Tabelle 7: Überblick über die mittels EIA untersuchten Gewebs- bzw. Organproben von Wiederkäuern.

	Kälber					**Rinder**						**Lämmer**		
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3
Euter						x						x		
Herzmuskulatur	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
Leber	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ln. cervicalis superficialis												x	x	x
Ln. tracheobronchalis	x	x	x	x	x		x	x	x			x	x	x
Ln. retropharyngealis lateralis	x					x						x		
Ln. subiliacus												x	x	x
Lnn. colici	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Lunge	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Milz	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x
Mukosa der Maulhöhle	x		x	x	x									
Nickhaut	x	x	x		x		x		x			x	x	x
Nierenmark	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nierenrinde	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ovar	x					x						x		
Skelletmuskulatur	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Stammhirn			x		x							x	x	x
Thymus	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tonsillen		x			x	x			x	x	x	x	x	x

Da Stammhirn als das Gewebe mit dem höchsten PrP^C-Gehalt angesehen wird, ist im Folgenden der relative PrP^C-Gehalt der Organe von Lämmern jeweils in Bezug auf das Stammhirnmaterial der jeweiligen Tiere dargestellt. Zur Berechnung wurden jeweils diejenigen Probenverdünnungen herangezogen, deren Extinktionswerte im linearen Messbereich des EIAs lagen. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Probenäquivalents wurde dann der relative PrP-Gehalt der Probe im Vergleich zu einer parallel mituntersuchten Stammhirnprobe extrapoliert, wobei eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung vorausgesetzt wurde. Bei den Rinderorganen war dies jedoch nicht möglich, da die Probennahme im Rahmen einer Routineschlachtung erfolgte und die Stammhirne deshalb für den gesetzlich vorgeschriebenen BSE-Schnelltest sichergestellt wurden. Deshalb wurden für diese Proben der durchschnittliche PrP^C-Gehalt von Hirnhomogenaten anderer Rinder (siehe 3.2.4; Stammhirnproben von 10 Rindern erhalten vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart) als Bezugsgröße verwendet. Dieser Durchschnittsgehalt diente ebenfalls für die von den Kälbern untersuchten Proben als Bezugsgröße, da lediglich von zwei dieser Tiere Hirnmaterial vorlag. Dieses Material wies im Übrigen ähnliche PrP-Gehalte auf wie die Hirne der adulten Rinder.

Lämmer

Mittels EIA konnten bei der Untersuchung der Gewebsproben von Lämmern deutliche Unterschiede im Hinblick auf deren relativen PrP^C-Gehalt festgestellt werden, wobei insbesondere für Nickhaut und Lunge vergleichsweise hohe Messwerte erhalten wurden. So resultierte die Analyse von 2,5 %igen Organsuspensionen z.T. in Extinktionswerten, die denen einer identisch verdünnten Stammhirnprobe entsprachen (Abb. 20). Allerdings wurden bei der Untersuchung von Nickhaut der Einzeltiere stark variierende PrP^C-Gehalte beobachtet.

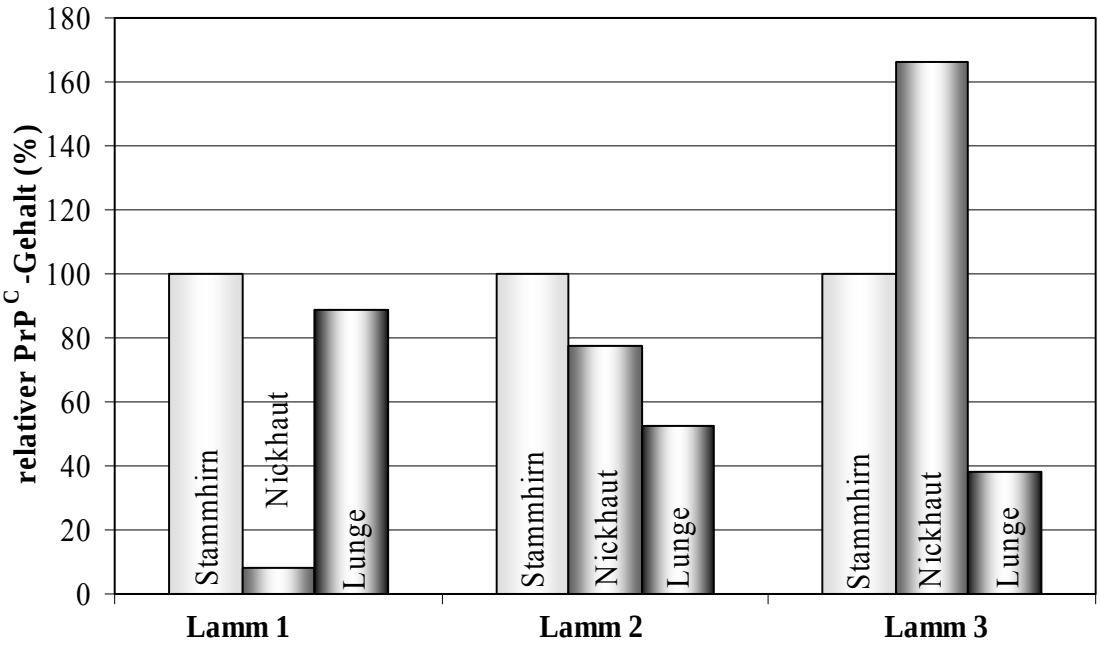

Abbildung 20: Untersuchung von Lämmer-Organen: vergleichende Darstellung der Organe mit hohem PrP^C–Gehalt.

Zu den Organen mit mittlerem PrP^C-Gehalt sind insbesondere lymphatische Organe wie die Tonsillen und Thymus zu rechnen, während für den Großteil der untersuchten Lymphknoten ebenso wie für Nierenmark nur schwach positive Ergebnisse erhalten wurden (Abb. 21 und 22).

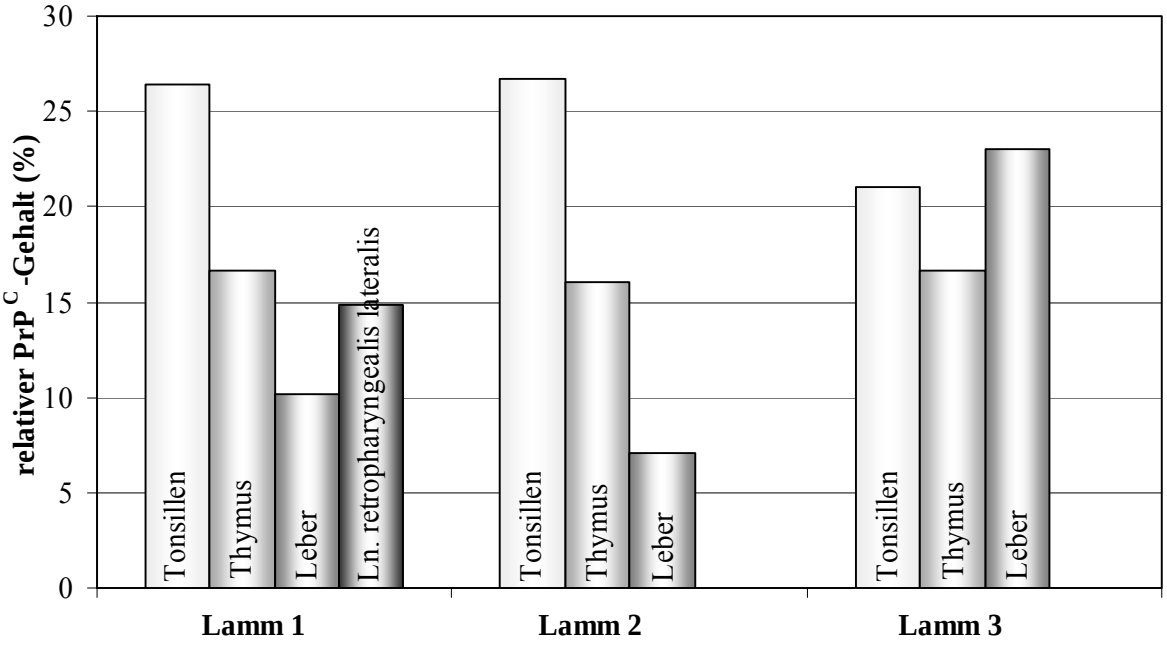

Abbildung 21: Relative Reaktivität von Organen mit mittlerem Gehalt an PrP^C (PrP^C-Gehalt des jeweiligen Stammhirns wurde gleich 100 % gesetzt).

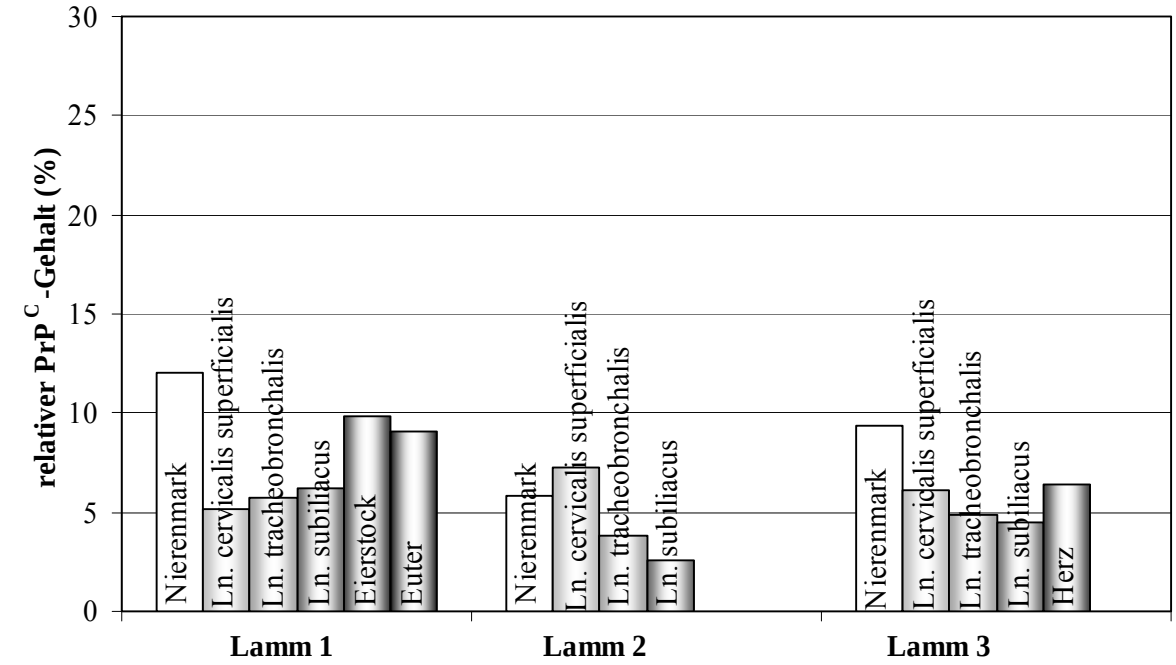

Abbildung 22: Relative Reaktivität von Organen mit mäßigem Gehalt an PrP^C (PrP^C- Gehalt des jeweiligen Stammhirns wurde gleich 100 % gesetzt).

Bei den Lämmerorganen mit mittlerem (d.h. 10-30 % des PrP^C-Gehaltes des Stammhirnes) bzw. mäßigem (d.h. < 10 % des PrP^C-Gehaltes des Stammhirnes) PrP^C-Gehalt wurde mit den Messwerten der 5 %igen Organsuspension gerechnet, da bereits eine 1:2 Verdünnung des Extraktes in Extinktionswerten nahe denen des antigenfreien Ansatzes resultierte.

Zu den Organen, bei denen mittels EIA keine bzw. nur Spuren von PrP^C nachgewiesen werden konnten zählten insbesondere Milz, Lnn. colici, die Nierenrinde und die Skelettmuskulatur. Bei diesen Proben lag die Extinktion einer 5 %igen Organlösung innerhalb des doppelten Leerwertbereiches.

Grundsätzlich konnte bei allen untersuchten Proben nach Proteinase K-Verdau kein PrP^C mehr nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Ähnlich wie bereits für das Hirngewebe beschrieben, wurde nach Erhitzen der Homogenate auf 100 °C im EIA um etwa 1/3-2/3 geringere Extinktionen festgestellt. Dieser Effekt ist in Abb. 23 beispielhaft für Lunge und Thymus eines Lammes dargestellt.

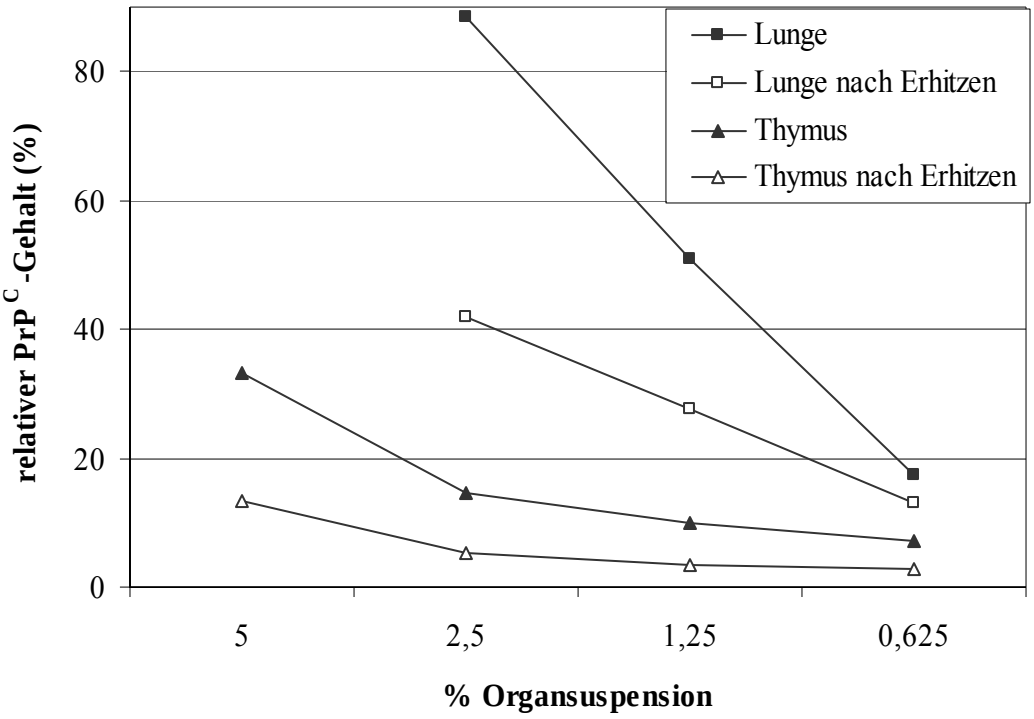

Abbildung 23: Reduktion der EIA-Reaktivität von Organsuspensionen der Lunge bzw. des Thymus nach Erhitzen auf 100 °C (Messwerte einer 2,5 %igen Stammhirnsuspension wurden gleich 100 % gesetzt).

Rinder

Nachdem wie bereits oben erwähnt aufgrund gesetzlicher Bestimmungen von den untersuchten Tieren keine Stammhirnprobe erhalten werden konnte, wurden zum Vergleich Daten, die bei der Untersuchung von Stammhirnproben im Rahmen der EIA-Optimierung gewonnen worden waren, herangezogen. Dabei zeigte sich, dass die Reaktivität verschiedener Rinderhirne im EIA relativ konstant ist. So betrug die Extinktion von 1,25 %igen Hirnsuspensionen durchschnittlich 0,738 (±0,189). Dieser Wert wurde für die weitere Berechnung des relativen PrP-Gehaltes der Organe von Rindern und Kälbern gleich 100 % gesetzt. Grundsätzlich konnten in den meisten Organen der untersuchten Rinder nur relativ geringe PrP^C-Gehalte bestimmt werden, so dass zum Vergleich mit dem Stammhirnmaterial zumeist die Extinktionswerte, die bei der Untersuchung einer 5 %igen Organsuspension erhalten wurden, zur Berechnung verwendet wurden.

Besonders hohe PrP^C-Gehalte (> 20 % des mittleren PrP^C-Gehaltes im Stammhirn) wiesen vor allem die Lungen der untersuchten Tiere auf. Diese entsprachen dem 0,9 – 3,2 fachen des Hirngewebes (nicht dargestellt). Weitere Organe mit hohem Gehalt an PrP^C waren Leber, Niere, sowie bei Rind 1 Euter und Ovar (Abb. 24). Bei allen untersuchten Tieren reagierte die Nierenrinde dabei immer deutlich stärker als das Nierenmark. Dies konnte auch in einer weiteren Versuchsreihe, die in Zusammenarbeit mit Prof. Amselgruber (Lehrstuhl für Anatomie und Physiologie der Haustiere, Universität Hohenheim) erfolgte, bestätigt werden (Abb. 25). Dabei wurden Nierenproben von zehn verschiedenen Tieren untersucht. Der mittlere relative PrP^C-Gehalt der Nierenrinde lag bei 43,9 % bzw. 19,9 % für das Nierenmark. Hierbei ist allerdings noch zu berücksichtigen, dass das Nierenmark der Tiere #1-3 präparationsbedingt relativ stark reagierte. Diese Resultate entsprechen in etwa den in Abb. 24 dargestellten Einzelergebnissen, bei denen für die Nierenrinde ein mittlerer PrP^C-Gehalt von 40,1 % und für das Nierenmark von 24,4 % zu verzeichnen war.

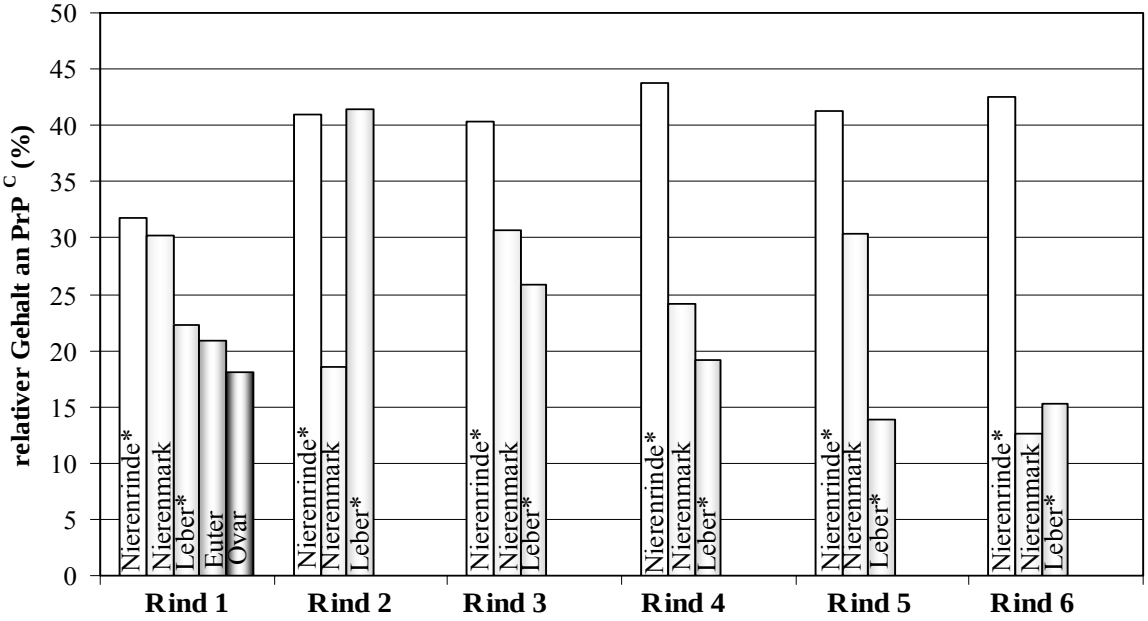

Abbildung 24: Organe mit relativ hohem Gehalt an PrP^C. Untersucht wurden Organe sechs verschiedener Rinder, bei den mit * markierten Organen wurden für die Berechnung des prozentualen Gehaltes an PrP^C die Messwerte der 2,5 %igen Suspension verwendet.

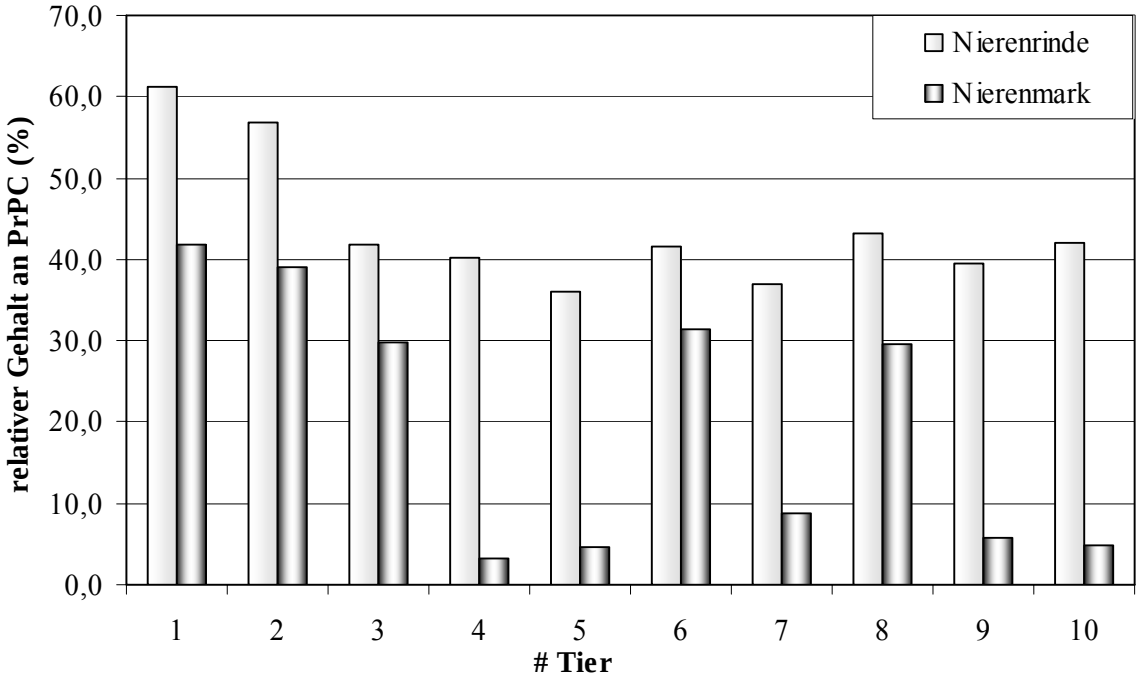

Abbildung 25: Vergleich des relativen PrP^C-Gehaltes von Nierenrinde und –mark bei zehn verschiedenen Rindern. Bei der Nierenrinde wurden die Werte der 2,5 %igen, beim Nierenmark die der 5 %igen Organsuspension zur Berechnung herangezogen.

In Abb. 26 sind die Ergebnisse für Organe mit mittlerem bis mäßigem PrP^C-Gehalt (< 20 % des mittleren PrP^C-Gehaltes im Stammhirn) dargestellt. Dazu zählen neben Muskelgewebe vor allem lymphatische Organe wie Thymus und Tonsillen. Kein PrP^C konnte in den Lnn. colici, Lnn. tracheobronchales, sowie der Milz nachgewiesen werden.

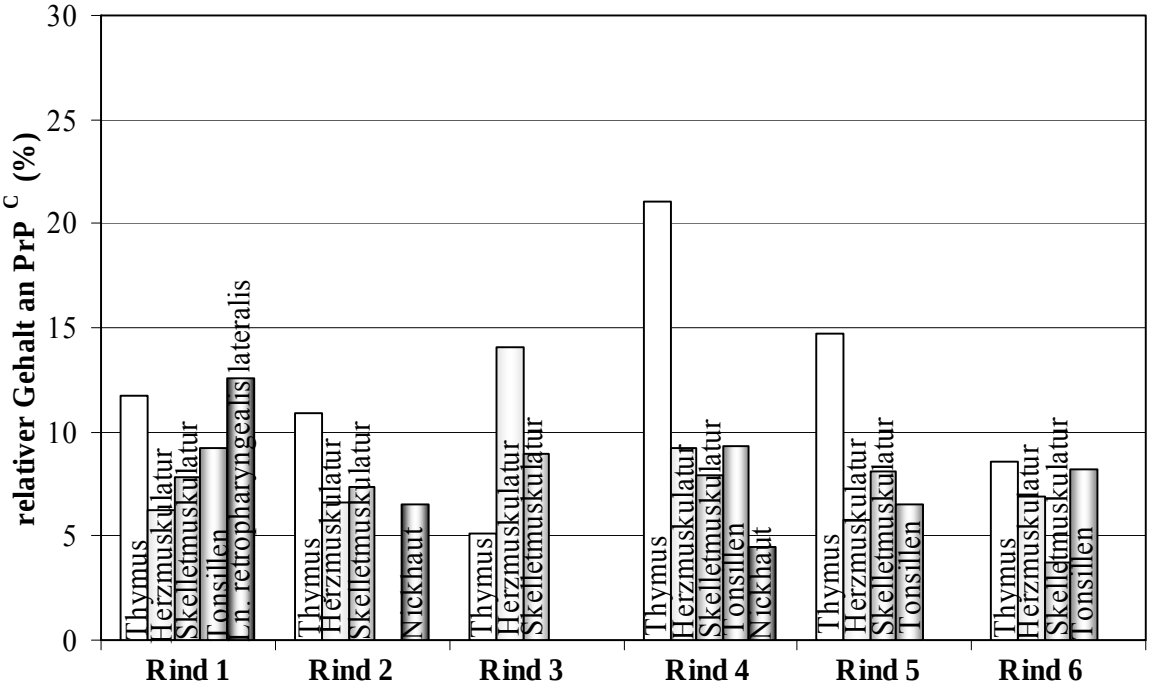

Abbildung 26: Untersuchung von Rinderorganen: vergleichende Darstellung der Organe mit mittlerem bis mäßigem Gehalt an PrP^C.

Kälber

Im Allgemeinen reagierten die Organe der jungen Tiere ähnlich denen der Adulten. Auch hier wiesen die Lungen mit einem relativen Gehalt von 49,3 bis 201,2 % die höchsten PrP^C–Werte auf (nicht dargestellt). In Abb. 27 sind die Organe mit hohem Gehalt (d.h. > 20 % des PrP^C-Gehaltes im Stammhirn) an PrP^C vergleichend dargestellt. Auch bei den juvenilen Tieren reagierte die Nierenrinde deutlich stärker als das Nierenmark. Die Leber hingegen wies bei den Jungtieren im Durchschnitt mit 16,5 % etwas niedrigere Werte auf als bei den adulten Tieren (22,9 %) und wurde deshalb bei den Organen mit mittlerer bis mäßiger Reaktivität (d.h. < 20 % des PrP^C-Gehaltes im Stammhirn) aufgeführt (Abb. 28).

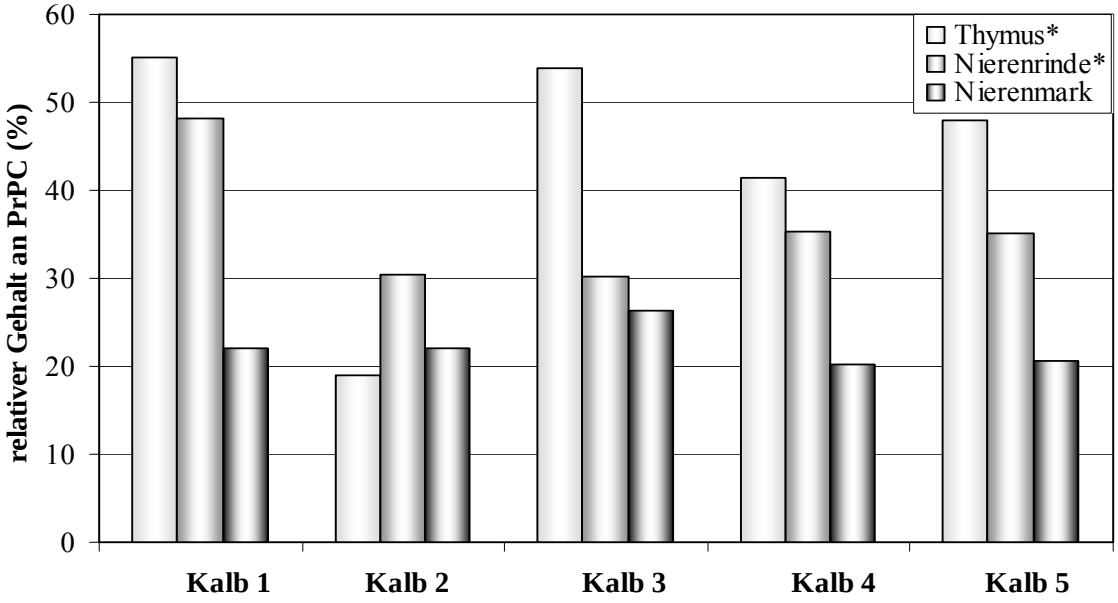

Abbildung 27: Organe mit hohem Gehalt an PrP^C bei fünf Kälbern. Bei den mit * markierten Organen wurden für die Berechnung des prozentualen Gehaltes an PrP^C die Messwerte der 2,5 %igen Suspension verwendet.

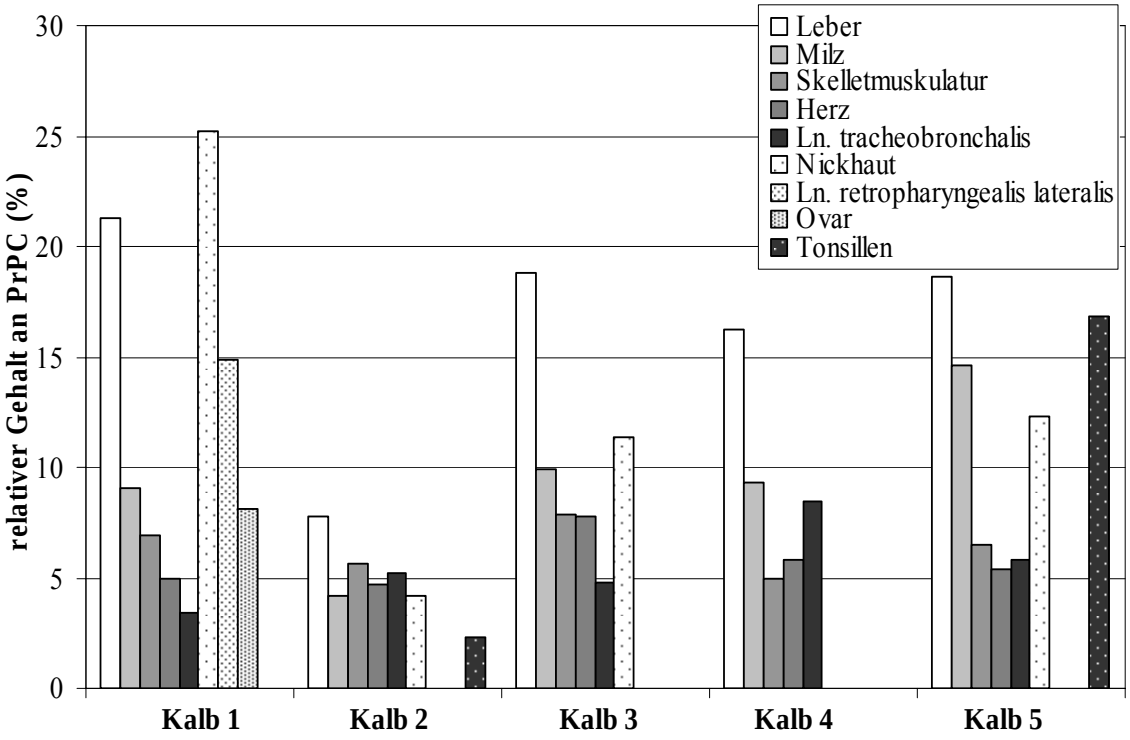

Abbildung 28: Relative Reaktivität von Organen mit mittlerem bis mäßigem Gehalt an PrP^C (PrP^C-Gehalt des Stammhirns wurde gleich 100 % gesetzt).

Bei der Untersuchung der lymphatischen Organe (Milz, Thymus, Tonsillen, Lymphknoten), ebenso wie Muskelgewebe wurden insgesamt gesehen relativ geringe Extinktionswerte erhalten. Kein PrP^C konnte bei zwei von fünf Darmlymphknoten sowie in der Maulschleimhaut nachgewiesen werden (Untersuchung einer 5 %igen Organsuspension).

3.2.6 Nachweisbarkeit von PrP^C in Milch

Eine wesentliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob mit dem entwickelten Sandwich-EIA (3.2.1) PrP^C auch in Rohmilch verschiedener Tierarten nachweisbar ist. Dazu wurde zunächst in orientierenden Versuchen Verdünnungsreihen von Rohmilch verschiedener Wiederkäuer in den EIA eingesetzt. Zur Absicherung der erhaltenen Ergebnisse wurden parallel mit homogenisiertem Rinderhirnhomogenat versetzte Proben (matrixassistierter Kontrollansatz) bzw. Ansätze nach Proteinase K-Verdau (Negativkontrolle) untersucht. Die Durchführung des EIA erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben. Zur Überprüfung des Testsystems wurde bei jeder Untersuchung ein antigenfreier Kontrollansatz (1 % BSA/PBS), sowie eine Verdünnungsreihe eines frisch hergestellten Rinderhirnhomogenates (3.2.2.1) eingesetzt.

3.2.6.1 Etablierung der Methodik

Zur grundsätzlichen Überprüfung der Nachweisbarkeit von PrP^C wurde unbehandelte Schaf-, Ziegen-, Kuh-, und Kamelmilch untersucht. Dazu wurden jeweils drei Ansätze à 500 µl Vollmilch in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorbereitet. Ein Ansatz wurde mit jeweils 2 µl Proteinase K (5 mg/ml) versetzt und danach alle Proben für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Proteinase K-Ansatz und je einer der anderen Ansätze für 5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach Anlegen von Verdünnungsreihen in 1 % BSA/PBS wurden alle Ansätze mittels EIA untersucht. Die Ergebnisse dieser Vorversuche für Schaf- und Kuhmilch sind in Abb. 29 zusammengefasst.

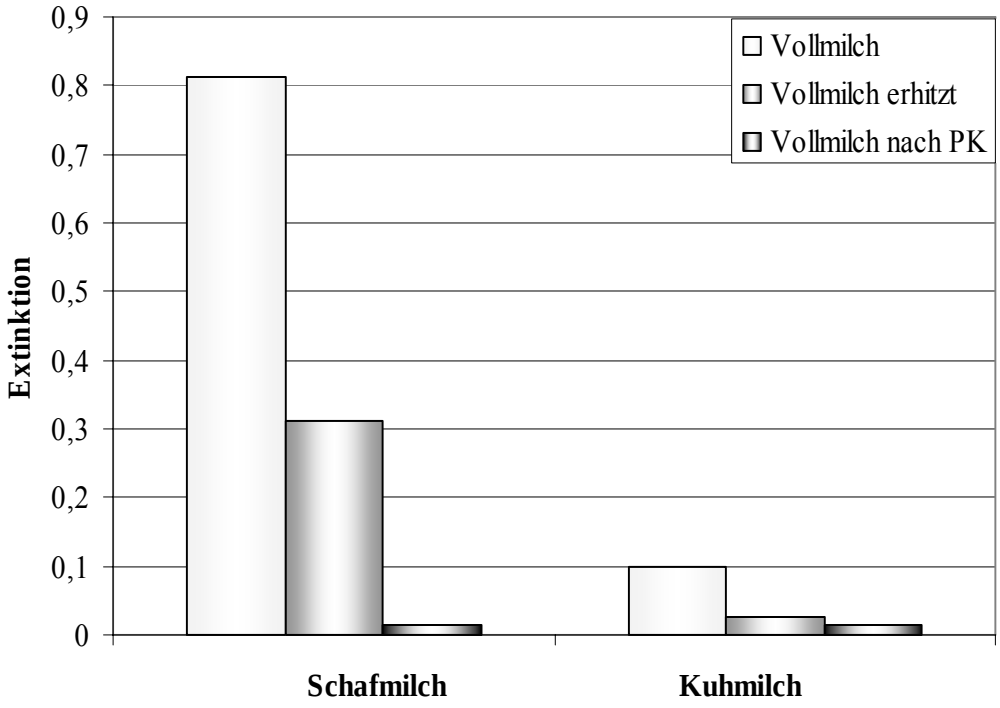

Abbildung 29: Signalreduktion nach Erhitzen und nach PK-Verdau von Schaf-, und Kuhmilch.

Bedingt durch die Spezifität der verwendeten Antikörper war mittels EIA in Kamelmilch kein PrP nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Die höchste Reaktivität zeigte Schafmilch, gefolgt von Ziegenmilch, mit einer Extinktion von 0,325 (nicht dargestellt) und Kuhmilch. Nach dem Erhitzungsschritt wurde bei allen untersuchten Proben deutlich reduzierte Messwerte erhalten, nach PK-Verdau reagierten alle Proben negativ.

Die relativ niedrigen Messwerte für mit Hirnhomogenat versetzte Kuhmilch (Kontrollansatz) waren Anlass zu überprüfen, ob durch die Matrix „Milch“ bzw. deren Inhaltsstoffe die Nachweisbarkeit von PrP^C behindert wird. Dazu wurden verschiedene Milchtrockenerzeugnisse in PBS rekonstituiert [3 % (w/v) Casein; 10 % (w/v) Sprühsüß-molkenpulver; 10 % (w/v) Sprühmagermilchpulver] und davon Aliquote vor der bereits beschriebenen Schüttelinkubation mit Hirnhomogenat (Rind) versetzt, so dass eine 2,5 %ige Hirnsuspension resultierte. Als Kontrolle diente 1 % BSA/PBS mit/ohne Zusatz von Homogenat. In den EIA wurden jeweils 50 µl eingesetzt. Die Verdünnungsreihe wurde im EIA in 1 % BSA/PBS angelegt. Der Ablauf des EIAs fand wie unter 3.2.1 beschrieben statt.

Bei Vergleich der Hirnhomogenate verdünnt in 1 % BSA/PBS bzw. in verschiedenen Milchfraktionen, wie sie kommerziell erhältlich sind, konnte eine deutliche Hemmung (um ca. 50 %) der Reaktivität durch Milch festgestellt werden (Abb. 30). Wie dargestellt, war dieser Effekt für die Milchfraktionen Magermilch, Molke, Casein ähnlich stark ausgeprägt und blieb auch bei höheren Verdünnungsstufen erhalten.

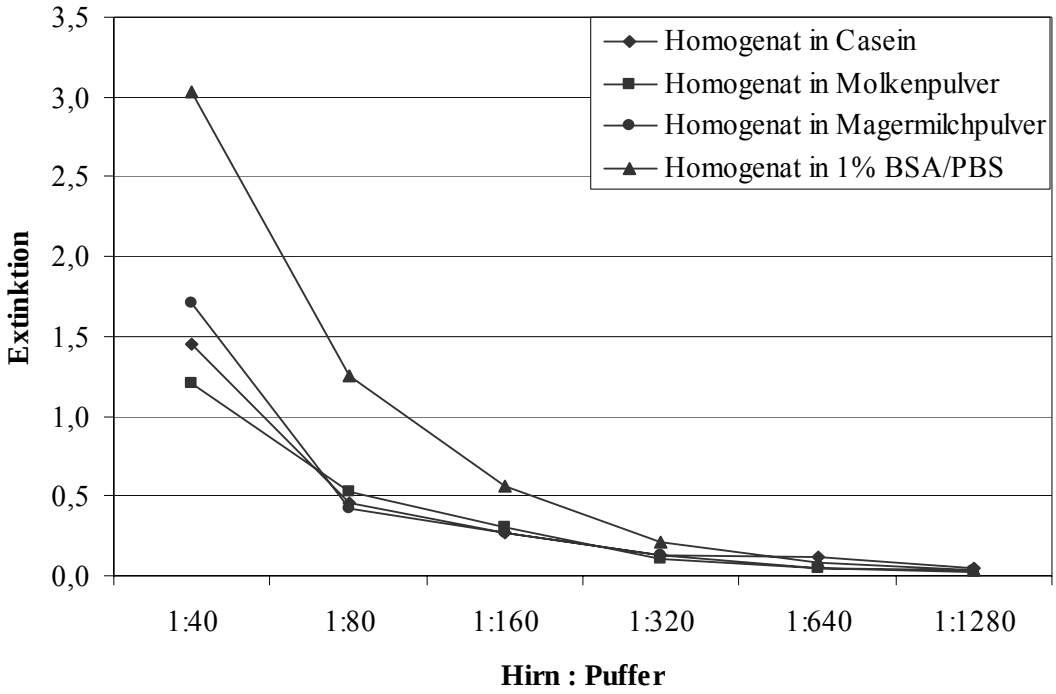

Abbildung 30: Hemmung der Nachweisbarkeit von PrP^C bei Verdünnung von Hirnhomogenaten in verschiedenen Milchtrockenprodukten.

3.2.6.2 PrP^C in Schafmilch

Da sich in ersten Versuchen zeigte, dass Schafmilch vergleichsweise hohe Messsignale für PrP^C aufweist, wurden 10 Einzelgemelke eutergesunder Schafe mit der oben skizzierten Methode mehrfach mittels EIA analysiert, um Hinweise auf die physiologische Streubreite des PrP^C-Gehaltes der Schafmilch zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 zusammengefasst. Bei den untersuchten Tieren zeigten sich im Hinblick auf den PrP^C-Gehalt der Milch deutliche Unterschiede. Bei der Analyse einer 1:2 verdünnten Mich mittels EIA lag die Spannbreite der resultierenden Extinktionswerte bei 0,35 bis 2,27.

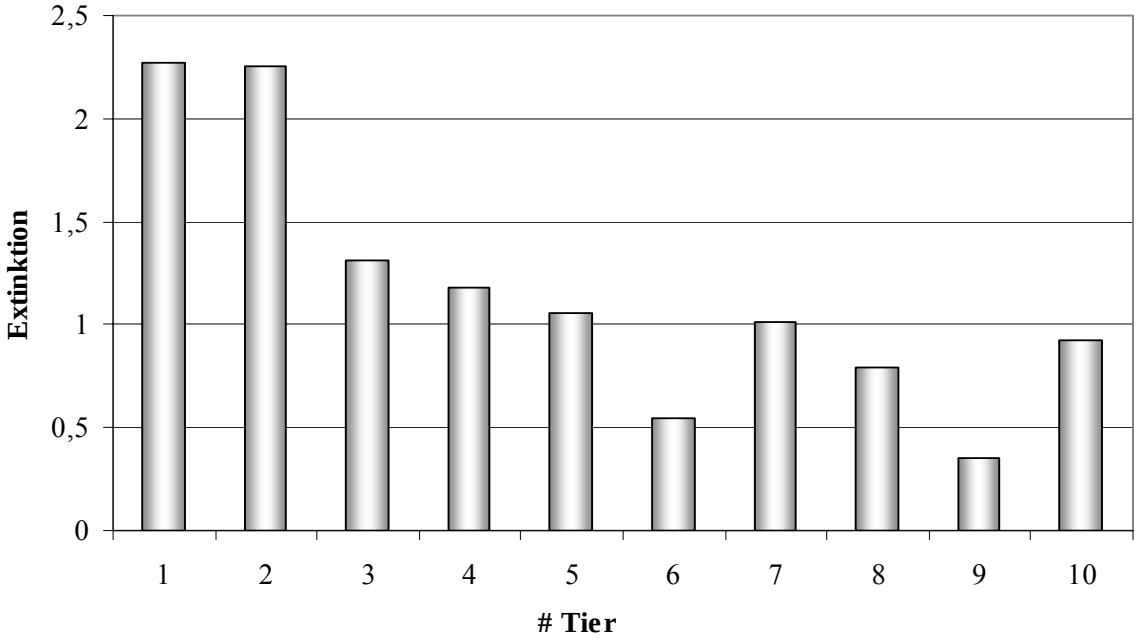

Abbildung 31: Nachweis von PrP^C in 50 %iger Schafvollmilch von 10 Tieren.

Für Kuh- und Ziegenmilch bestätigte sich in weiteren Versuchen die relativ geringe EIA-Reaktivität, so dass entsprechende Untersuchungen für diese Milchen aufgrund der geringen Aussagekraft nicht durchgeführt wurden.

3.2.6.3 Verteilung von PrP^C bei Fraktionierung von Milch

Auch hier konzentrierten sich die Untersuchungen auf Schafmilch, da bei Kuh- und Ziegenmilch der analytische Spielraum detailliertere Erhebungen nicht zuließ.

Untersucht wurden zehn Einzelgemelke (Rohmilch) eutergesunder ostfriesischer Milchschafe, gewonnen sechs Wochen nach Laktationsbeginn. Folgende Fraktionen wurden in den EIA eingesetzt: Vollmilch, Magermilch, Süßmolke bzw. durch Labfällung gewonnene Bruchmasse, sowie Sauermolke bzw. durch Säurefällung gewonnenes Casein. Zur Gewinnung der Magermilch wurden jeweils 20 ml Vollmilch in 50 ml Röhrchen verbracht und bei 4 °C zentrifugiert (2.500 x g; 15 min). Mittels einer Pasteurpipette wurde die Magermilch entnommen und in drei Teile portioniert. Ein Teil wurde direkt in den EIA eingesetzt, die anderen Aliquote wurden weiter fraktioniert. Ein Teil (5 ml) wurde mit 0,5

mol/l HCl auf pH 4,6 eingestellt und dann zur Gewinnung der Sauermolke bzw. des Caseins für 15 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Die Molke wurde vor Einsatz in den EIA mittels NaOH (0,5 mol/l) auf pH 6,8 eingestellt, das Pellet in 1 % BSA/PBS entsprechend dem Ausgangsvolumen resuspendiert. Einem weiterem Aliquot der Magermilch wurden 5 µl Rennin (5 mg/ml) zugesetzt, bis zur Dicklegung der Milch bei 37 °C inkubiert und dann wie oben beschrieben zentrifugiert.

Ergebnisse

Abb. 32 zeigt einen Vergleich der bei der Untersuchung der Voll- bzw. Magermilch erhaltenen Ergebnisse.

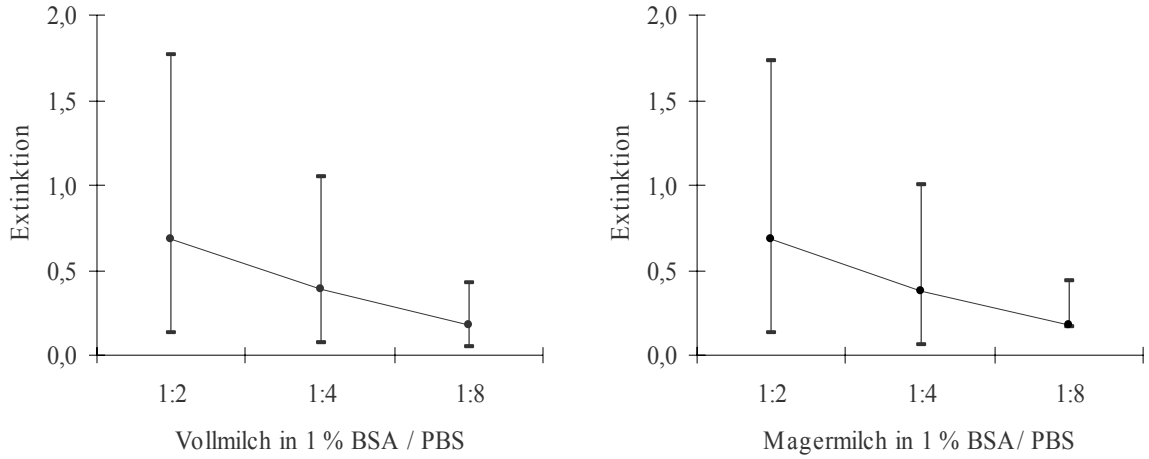

Abbildung 32: PrP^C-Gehalt in Einzelgemelksproben von 10 Schafen. Dargestellt sind die Minimal-, Maximal- und Mittelwerte der Untersuchungen.

Demnach weist die Magermilch praktisch den gleichen PrP^C- Gehalt wie die Vollmilch auf. Da eine Untersuchung der Fettfraktion im EIA technisch nicht möglich ist, beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf die durch Fraktionierung der Magermilch gewonnenen Komponenten. Daneben wurde teilweise auch das bei der Zentrifugation gewonnene Zellpellet untersucht. Hierbei lagen einer Anreicherung um ca. Faktor 10 und einem anschließendem RiboLyser-Aufschluß die Messwerte für die konzentrierten Proben nur im Bereich des für die Magermilch festgestellten PrP^C-Gehaltes.

Um eine Vergleichbarkeit von durch Säurefällung gewonnenem Casein bzw. Molke mit „unverdünnten“ Proben sicherzustellen, wurden die aus dem Zusatz an HCl bzw. NaOH resultierende Verdünnung der Molke entsprechend berücksichtigt. Die nach Säure- bzw. Labfällung beobachtete Verteilung von PrP^C auf die so erhaltenen Milchfraktionen ist in den Abb. 33 und 34 für die 10 Einzelgemelke dargestellt. Tendenziell war in den Untersuchungen der überwiegende Anteil des nachweisbaren PrP^C in den Molkefraktionen enthalten, wobei zwischen Süß- und Sauermolke keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden konnten. Die bereits bei der Vollmilch beobachteten Unterschiede bei den Einzeltieren (Abb. 31), setzten sich analog für die Molke- und Caseinfraktionen fort.

Setzt man den gemessenen Wert für die 1:2 verdünnte Schafvollmilch gleich 100 %, dann lässt sich zusammenfassend anhand der Mittelwerte der 1:2 verdünnten Proben folgende prozentuale Verteilung von PrP^C in Schafmilch bilanzieren: in Magermilch ist den Messungen zu Folge noch das gesamte PrP^C enthalten; bei Fraktionierung der Magermilch sind 55-60 % des Gesamt PrP^C`s in den jeweiligen Molkefraktionen und weitere 15 % in den caseinhaltigen Fraktionen nachweisbar (Abb. 35).

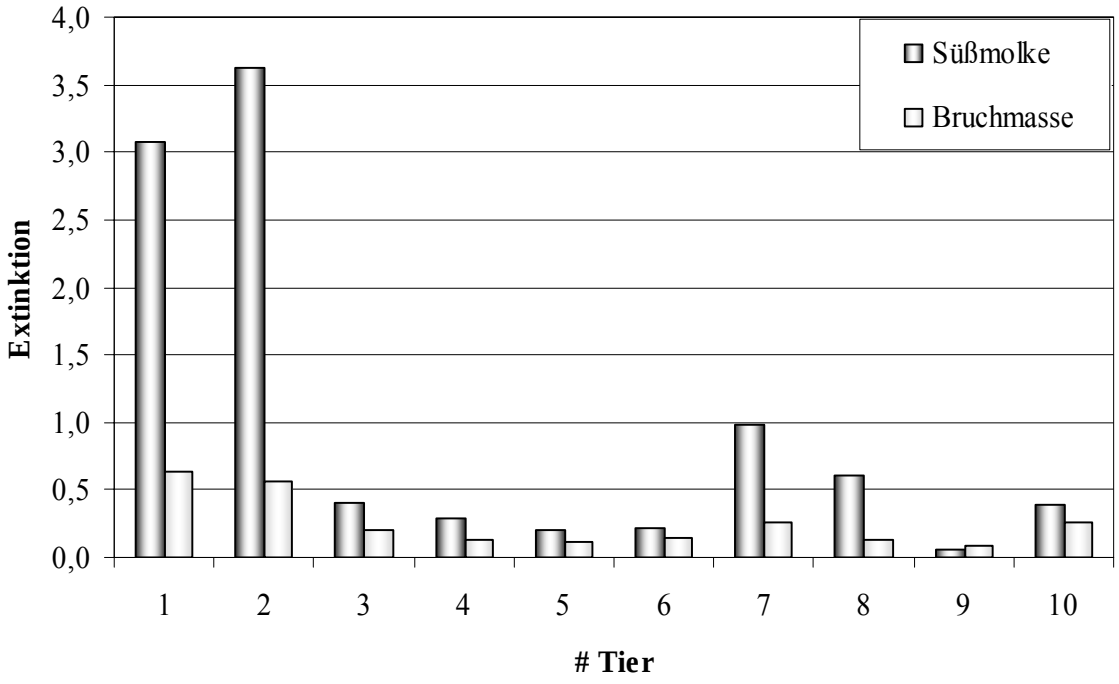

Abbildung 33: Verteilung von PrP^C auf durch Labfällung gewonnene Süßmolke bzw. die Bruchmasse bei Untersuchung von 10 Schafmilchproben.

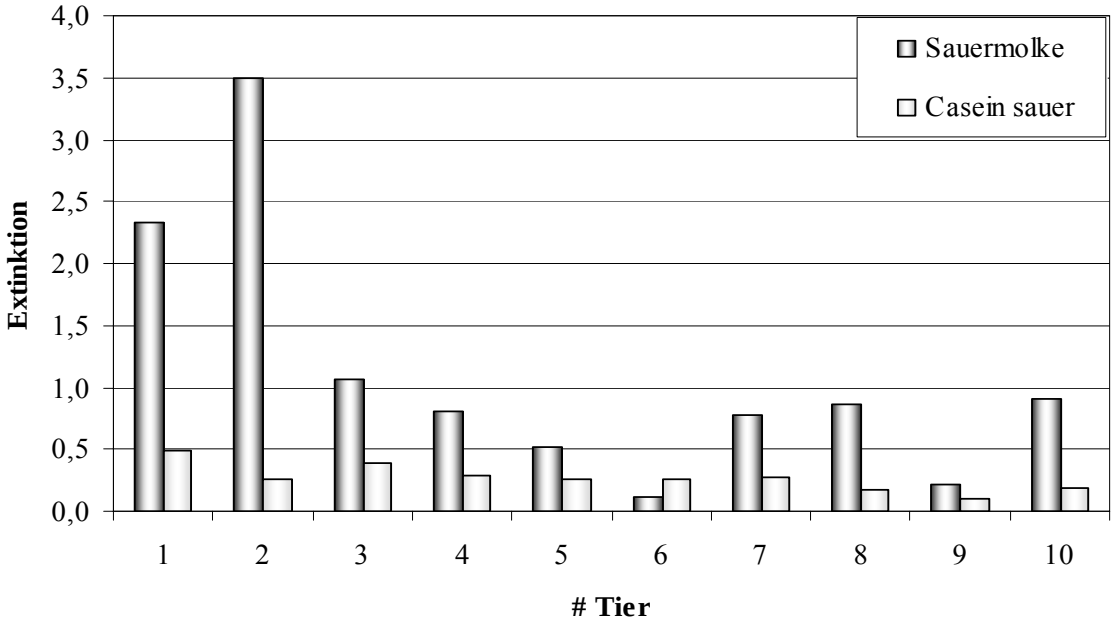

Abbildung 34: Verteilung von PrP^C auf durch Säurefällung gewonnene Molke bzw. Casein bei Untersuchung von 10 Schafmilchproben

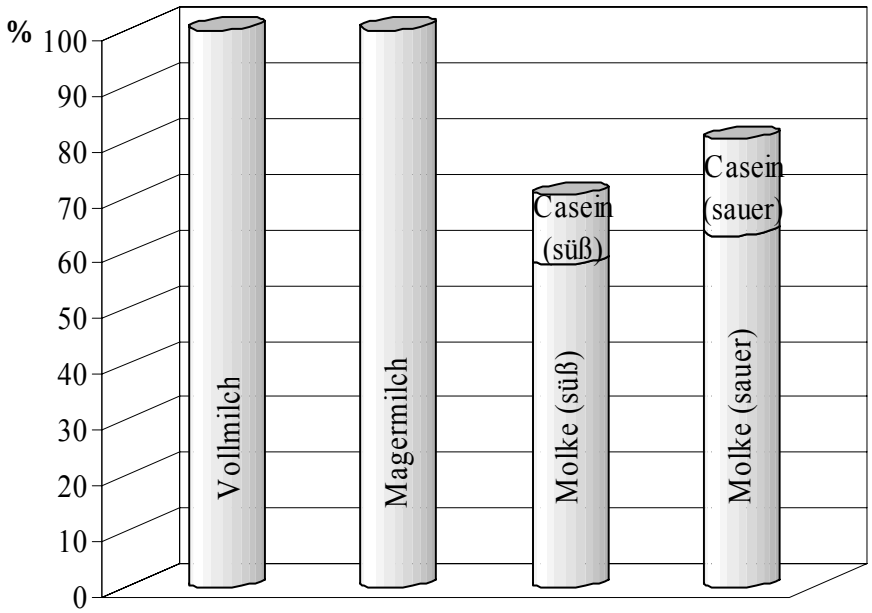

Abbildung 35: Verteilung von PrP^C in den verschiedenen Milchfraktionen beim Schaf.

Ähnliche Versuche wurden im orientierenden Maßstab auch mit Milch eutergesunder Kühe und Ziegen durchgeführt. Verglichen wurden hier Rohmilch, Magermilch (gewonnen durch Zentrifugation für 2 min bei 9.000 x g) und Sauermolke. Letztere wurde durch Säurefällung des Caseins vor der oben beschriebenen Zentrifugation erhalten. Hierfür wurde Vollmilch mit 0,1 mol/l HCl auf einen pH-Wert von 4,6 eingestellt. Pellet und die obere feste Phase wurden verworfen und die Molke mit 0,2 mol/l NaOH auf pH 6,8 eingestellt. Es folgte eine Schüttelinkubation über 40 min bei 37 °C im Thermomixer. Eine 1:2 Verdünnungsreihe in 1 % BSA/PBS wurde direkt in der Platte angelegt. Die weitere Inkubation und EIA-Ablauf fand wie unter 3.2.1 beschrieben statt.

Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Abb. 36. Aufgrund der generell niedrigeren Extinktionen, die sich bei der Untersuchung der Caseinfraktion sogar im Leerwertbereich bewegten, konnten anders als für die Schafmilchfraktionen hier keine genaueren Aussagen hinsichtlich der Verteilung von PrP^C gemacht werden. Während Ziegenmilch sich ähnlich wie die Schafmilch verhielt, resultierte die Entfettung der Kuhmilch in einer deutlichen Reduktion der Extinktionswerte.

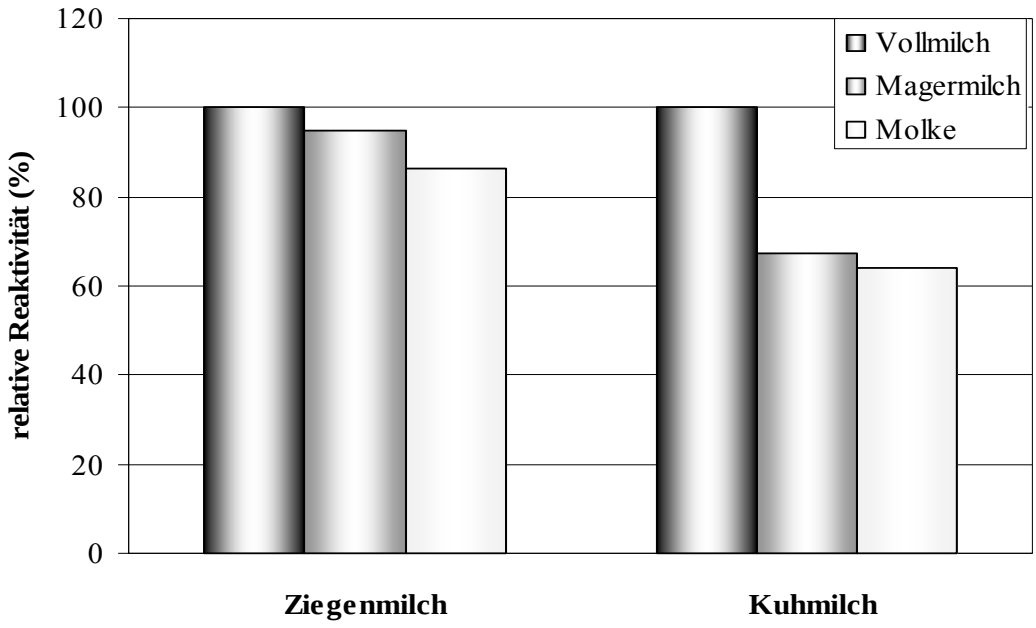

Abbildung 36: Verteilung von PrP^C in Ziegen- und Kuhmilch (Messwerte der Vollmilch wurden jeweils gleich 100 % gesetzt). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Der prozentuale PrP^C-Gehalt der Molke liegt bei der Kuhmilch mit ca. 64 % im ähnlichen Bereich wie der bei der Schafmilch festgestellte, während bei der Ziegenmilch mit ca. 86 % ein deutlich höherer Prozentsatz des PrP in der Molke verblieb.

4 Diskussion

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien sind bei Tieren seit über 200 Jahren bekannt, 1732 wurden beispielsweise die ersten Scrapiefälle bei Schafen in England beobachtet. Auch bei Menschen sind ähnliche Erkrankungsformen, mit zentralnervöser Symptomatik, wie beispielsweise CJD und Kuru schon seit längerer Zeit bekannt (CREUTZFELDT, 1920; JAKOB, 1921; GAJDUSEK und ZIGAS, 1957). Durch das massenhafte Auftreten der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie in England Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts und der Identifizierung des Erregers als kausale Ursache der beim Menschen auftretenden nvCJD (BRADLEY, 2004), rückten diese Erkrankungsformen in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses.

Prinzipiell wurde die Erforschung dieser Erkrankungen lange Zeit dadurch erschwert, dass in den infizierten Organismen keiner der klassischen Krankheitserreger, wie Bakterien und Viren, nachgewiesen werden konnte. Basierend auf einer Hypothese von PRUSINER (1982a) wird mittlerweile allgemein akzeptiert, dass eine neuartige „Erregerform“ die Ursache dieser Erkrankungen darstellt. Dabei handelt es sich um ein körpereigenes Glykoprotein, das konformationsabhängig zum krankheitsauslösenden Agens wird und deswegen mittels herkömmlicher bakteriologischer und virologischer Verfahren nicht hinreichend charakterisiert werden konnte.

Bisherige Untersuchungen zur Risikoeinschätzung verschiedener Körpergewebe stützen sich in erster Linie auf den Nachweis von PrP^{res} bzw. auf Bioassayversuche (EU-DIREKTORAT FÜR VERBRAUCHER-POLITIK UND GESUNDHEITSSCHUTZ, 2002). Da PrP^{C} als Vorläufer von PrP^{Sc} fungiert, sind auch unter dem Aspekt des vorbeugenden Verbraucherschutzes fundierte Daten zur Verteilung dieses Eiweißes im Tier (Risikomaterial) und damit zur potentiellen Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit dem Erreger von grundlegender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit ein hochaffiner, auf monoklonalen Antikörper basierender Enzymimmunoassay entwickelt, um die Verteilung des zellulären Prion Proteins in verschiedenen Körpergeweben und der Milch von Rind und Schaf untersuchen zu können.

4.1 Entwicklung eines Nachweisverfahrens

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, ein möglichst einfaches, schnelles und auf viele Körpergewebe anwendbares Extraktions- und Nachweisverfahren zu entwickeln. Dabei zeichnete sich bereits frühzeitig ab, dass die üblicherweise zur besseren Löslichkeit des Membranproteins PrP^C eingesetzten Detergenzien mit dem entwickelten EIA-Verfahren nicht kompatibel sind. Damit konnten Verfahren, wie sie beispielsweise von MOUDJOU et al. (2001) bzw. SAFAR et al. (1998) beschrieben worden waren, nicht eingesetzt werden, da die im Extraktionspuffer enthaltenen Detergenzien eine Denaturierung des als Fangantikörper eingesetzten mAk P4 bewirkten. Am geeignetsten zeigte sich letztendlich die Extraktion mittels eines Glucosepuffers, ähnlich dem von BONS et al. (2002) beschriebenen Verfahren.

Auch wenn bei der Entwicklung des EIAs der Nachweis von zellulärem Prion Protein im Vordergrund stand, war doch die mangelnde Reaktivität des Testverfahrens mit PrP^{Sc} sowie mit rekombinantem PrP überraschend. Ersteres umso mehr, als der Nachweisantikörper lt. Herstellerangaben in der Immunhistochemie sogar spezifisch für die CJD-assoziierte Form sein soll. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die propagierte Spezifität durch die bei immunhistologischen Untersuchungen verwendeten Präparationstechniken positiv unterstützt wird (ŠERBEC et al., 2004), während - wie auch die vorliegende Arbeit zeigte - unter EIA-Bedingungen eine deutliche Reaktivität des mAk mit PrP^C festzustellen ist. Im Hinblick auf die geringe Reaktivität des PrP^{Sc} im EIA ist auch zu berücksichtigen, dass die Extraktionsmethode und Probenaufarbeitung für den Nachweis von PrP^C optimiert wurde und hierbei insbesondere durch den Verzicht auf den Einsatz von Detergenzien die Löslichkeit und somit die Nachweisbarkeit von PrP^{Sc} nicht sichergestellt war. Ganz abgesehen davon sind in beiden Fällen, sowohl bei PrP^{Sc} (MERZ et al., 1981; PRUSINER et al., 1983; CAUGHEY et al., 1991; PAN et al., 1993; SAFAR et al., 1993; HARRIS, 1999) als auch bei rPrP, welchem neben der Glykosylierung auch der GPI-Anker fehlt (WEISSMANN, 2004), deutliche strukturelle Unterschiede zum zellulären Prion Protein vorhanden. So kommt das natürliche Prion überwiegend zweifach glykosyliert (MÜLLER et al., 2005), aber teilweise auch unglykosyliert vor. Beim mAk P4 ist zwar bekannt, dass er überwiegend an die diglykosylierte Form bindet (GROSCHUP et al., 1997; HARMEYER et al., 1998), unter Immunoblot-Bedingungen allerdings auch in der Lage ist, rekombinantes bovines PrP zu detektieren. Nach STACK (2004) ist es bei Verwendung bestimmter Probenaufarbeitungs-verfahren jedoch nicht möglich mit diesem Antikörper den BSE-Erreger bei natürlich

infizierten Kühen bzw. bei experimentell infizierten Schafen nachzuweisen. Zusammenfassend weisen die verfügbaren Daten darauf hin, dass die fehlende EIA-Reaktivität von PrP^{Sc} v.a. auf den als Fangantikörper eingesetzten mAk P4 zurückzuführen ist, während die für rPrP erhaltenen negativen Ergebnisse durch den als Nachweisantikörper verwendeten V5B2 verursacht wurden, da dieser mAk weder in einen indirekten EIA noch im Immunoblot mit rekombinantem bovinem PrP reagiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch ŠERBEC et al. (2004) konnten demonstrieren, dass der V5B2-Antikörper im Dot-Blot nicht mit humanem rPrP reagiert.

Ein weiteres Phänomen, welches an verschiedener Stelle beobachtet werden konnte, war ein deutliches Absinken der Signalmeßwerte im EIA bei Einsatz von kurzfristig auf 100 °C erhitzten Proben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es im Zuge der Erhitzung zu einer Eiweißdenaturierung kommt, wobei neben einer möglichen Strukturveränderung von PrP^{C} selbst, evtl. auch Aggregate des PrP^{C} mit anderen in der Präparation vorhandenen Proteinen entstehen könnten. Beide Varianten resultierten in einer verringerten Epitopexponierung. Für PrP^{Sc} hingegen ist eine höhere Hitzestabilität beschrieben als für rPrP (APPEL et al., 2001). Hierbei wird angenommen, dass das Zuckergerüst, das die SAF's umgibt, die Tertiärstruktur des Proteins stabilisiert (APPEL et al., 1999; RIESNER, 2003). Demzufolge führen Temperaturen um 100 °C bei diesem Eiweiß zu keinen nennenswerten Strukturveränderungen, so dass in BSE-Tests, welche auf den Nachweis von PrP^{Sc} zielen, dieser Erhitzungsschritt kein Problem darstellt. Möglicherweise wird, für das Testergebnis störend wirkendes PrP^{C} sogar in seiner Reaktivität minimiert.

Ein deutlicher Anstieg der Reaktivität der Hirnhomogenate war nach Inkubation des Probenmaterials bei 37 °C zu verzeichnen, während dieser Effekt bei niedrigeren Temperaturen nur in geringerem Umfang zu beobachten war. Wie durch die gleichzeitige Zugabe von Proteinaseblockern demonstriert werden konnte, ist dieses bislang in der verfügbaren Literatur nicht beschriebene Phänomen möglicherweise auf die Aktivität körpereigener Proteasen zurückzuführen. Dabei wird entweder ein Teil des membrangebundenen PrP's in Lösung gebracht oder die Verfügbarkeit der für die Antikörperbindung wesentlichen Epitope wird durch einen limitierten proteolytischen Abbau des PrP verbessert.

Aufgrund der fehlenden Reaktivität des rekombinanten bovinen PrP sind Angaben zur Sensitivität des entwickelten EIA-Verfahrens nur bedingt möglich. Bei der Untersuchung von Schaf- bzw. Rinderhirn zeigte sich, dass in diesen Proben PrP^C noch bei relativen Probenäquivalenten von 0,6 mg Hirn/ml (Schaf) bzw. 1,5 mg Hirn/ml (Rind) nachweisbar war. Die niedrigeren Nachweisgrenzen für Schaf-PrP sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der mAk P4 gegen ein von der ovinen PrP-Sequenz abgeleitetes Peptid entwickelt wurde, das im Vergleich zur bovinen Sequenz zwei Aminosäureunterschiede aufweist (HARMEYER et al., 1998).

Die für Hirnmaterial ermittelten Nachweisgrenzen ermöglichen jedoch zumindest eine orientierende Einschätzung der Testempfindlichkeit. MEYER et al. (1999) konnten in der Medulla oblongata von gesunden Rindern etwa 0,2 - 0,3 µg PrP^C/g nachweisen, wobei allerdings Verluste von durchschnittlich 49 % bei der zur Klärung des Extraktes notwendigen Zentrifugation auftraten. Basierend auf diesen Angaben liegt die rechnerische Nachweisgrenze des EIA's für bovines PrP bei ca. 0,4 ng/ml bzw. unter Berücksichtigung der Verluste bei etwa 0,8 ng/ml und damit im unteren Bereich der mit klassischen Sandwich-EIA's erreichbaren Nachweisempfindlichkeiten. Deutlich höhere PrP^C-Gehalte von 3,8 - 4,5 µg/g wurde hingegen von MOUDJOU et al. (2001) für Schafhirn ermittelt, wobei der von den Autoren entwickelte EIA rekombinantes ovines PrP im unteren ng-Bereich nachweisen konnte. Für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Testverfahren lägen bei Zugrundelegung dieser Daten die Nachweisgrenzen für ovines PrP bei 2,2 - 2,7 ng. Beide Rechenbeispiele zeigen, dass trotz des Verzichtes auf Detergenzien in der Probenaufarbeitung ein hochsensitives Testverfahren entwickelt werden konnte.

4.2 Körperverteilung von PrP^C in Rind und Schaf

Das etablierte Testverfahren wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für die Untersuchung verschiedener Gewebe von Rind, Kalb und Lamm sowie der Milch verschiedener Tierarten verwendet.

Möchte man die hierbei erzielten Ergebnisse, mit Daten aus der Literatur vergleichen, so fällt es schwer, entsprechende Arbeiten, bei denen ein ähnlich umfangreiches Organspektrum von Rind und Schaf untersucht wurde, zu finden. Die meisten Arbeiten in diesem Bereich

beschäftigen sich mit dem Nachweis von PrP^{Sc} (RACE et al., 1992; SOMERVILLE et al., 1997; BOSQUE et al., 2002; SHAKED et al., 2001; ERSDAL et al., 2003; VALDEZ et al., 2003; ANDRÈOLETTI et al., 2004), wobei zumeist Hirnmaterial von typischen Labortieren wie Hamster, Maus oder Kaninchen untersucht wurden (BENDHEIM et al., 1992; BOSQUE et al., 2002; THOMZIG et al., 2003; MULCAHY et al., 2004) oder sich die Analysen nur auf Einzelorgane beschränkten (IKEGAMI et al., 1991; MURAMATSU et al., 1993; PAMMER et al., 1999; SCHMERR et al., 1999; SHAKED et al., 1999; O'ROURKE et al., 2000; HEGGEBØ et al., 2003; TERRY et al., 2003; ANDRÈOLETTI et al., 2004).

In den eigenen Untersuchungen wiesen neben Stammhirn auch Lungengewebe und Nierengewebe vergleichbar hohe Gehalte an zellulärem PrP auf. Im Hinblick auf das Nierengewebe war auffällig, dass bei Rindern und in schwächerem Maß auch bei Kälbern die Nierenrinde deutlich höhere Gehalte an PrP^{C} aufwies als das Nierenmark. Bei den Lämmern verhielt es sich genau umgekehrt: hier konnte in der Nierenrinde praktisch kein PrP^{C} gemessen werden, während im Nierenmark zumindest ein geringer Anteil PrP^{C} vorhanden zu sein schien. MOUDJOU et al. (2001), die sich mit dem EIA-Nachweis von PrP^{C} in unterschiedlichen Geweben bei erwachsenen Schafen befassten, konnten hingegen kein PrP^{C} im Nierengewebe nachweisen. TICHOPAD et al. (2003), die sich auf den PrP^{C}-spezifischen mRNA-Nachweis in Geweben von Rindern und Kälbern konzentrierten, konnten in diesem Gewebe auch nur wenig entsprechende mRNA finden, während HORIUCHI et al. (1995) bei Schafen zumindest teilweise eine schwache Reaktivität im Westernblot, sowie den Nachweis entsprechender mRNA beschrieben. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen verschiedene Erklärungsansätze zu. Von bedeutendem Einfluss scheinen neben dem Alter des Tieres insbesondere auch der Ort der Probennahme sowie die Probenaufarbeitung zu sein. Organe junger Tiere haben einen um 7-11 % höheren Wassergehalt als die älterer, was bei gleichem PrP^{C}-Gehalt (bezogen auf Trockenmasse) zu niedrigeren Gehalten bezogen auf das Gesamtgewicht führt. Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch der Ort der Probennahme. Wobei in den meisten der genannten Arbeiten keine Differenzierung in Nierenrinde und Nierenmark vorgenommen wurde. Eine undifferenzierte Probennahme führt jedoch möglicherweise zu bevorzugter Beprobung der Nierenrinde, welche den größten Anteil des Nierengewebes darstellt und bei den in dieser Arbeit untersuchten Lämmern beispielsweise kein PrP^{C} beinhaltete. Allerdings sind damit die Ergebnisse von TICHOPAD et al. (2003) nicht zu erklären. Ein weiterer Faktor, der die Nachweisbarkeit des PrP^{C} aus einzelnen Organen maßgeblich beeinflusst, ist die Art der Probenaufarbeitung. Diese wird aus Gründen

der Vergleichbarkeit üblicherweise für alle Gewebetypen gleichermaßen durchgeführt, ist aber zwangsweise für manche Gewebearten geeigneter als für andere. Dies trifft insbesondere für den mRNA-Nachweis zu.

In der Leber konnte in dieser Arbeit vor allem bei Rindern und Lämmern, sowie in geringerem Maße auch bei Kälbern zelluläres PrP nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von TICHOPAD et al. (2003), nicht jedoch mit den der beiden anderen o.a. Veröffentlichungen, bei denen jeweils kein Prion Protein bzw. entsprechende mRNA in Schaflebern nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt wiederum im Alter der untersuchten Tiere: Die Lämmer der vorliegenden Arbeit waren durchweg sechs Monate alt, während MOUDJOU et al. (2001) zweijährige Schafe untersuchte. Über das Alter der Tiere in dem Versuch von HORIUCHI et al. (1995) wurden keine Angaben gemacht. Unter Umständen wird auch je nach Zellwachstums- bzw. –aktivierungsgrad PrP^C in unterschiedlichem Maße exprimiert. So gibt es beispielsweise Berichte, dass die PrP^C-Expression auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten mit der Zell-Aktivierung im Zusammenhang steht (CASHMAN et al., 1990; MABBOTT et al., 1997). Dies konnte jedoch von ANTOINE et al. (2000) für entsprechende humane Zellen nicht bestätigt werden.

In diesem Kontext sind möglicherweise auch die Ergebnisse zu den lymphatischen Organen zu betrachten. Thymus und Lymphknoten wiesen in dieser Arbeit bei den jungen Tieren in der Regel signifikant höhere PrP^C-Gehalte auf als die Organe der erwachsenen Tiere. Für die Milz konnte lediglich bei den Kälbern eine schwache Reaktivität festgestellt werden, bei Lämmern und Rindern hingegen nicht. Diese Daten decken sich weitgehend mit denen der erwähnten Veröffentlichungen, wobei eine Vergleichbarkeit insofern schwer fällt, als in diesen Arbeiten nicht auf den Altersunterschied eingegangen wird. Insbesondere die diesbezüglichen Ergebnisse von TICHOPAD et al. (2003) beziehen sich ausschließlich auf Organe juveniler Tiere. Als Ursache für den relativ höheren Gehalt an PrP^C bei den Jungtieren ist auch eine Hochregulierung der PrP^C-Expression im Rahmen von unspezifischen (Abwehr-) Reaktionen der lymphatischen Organe denkbar, so dass je nach Abwehrlage der im EIA gemessene PrP^C-Gehalt stark differieren kann. Auch IKEGAMI et al. (1991), welche in Milz und Lymphknoten gesunder Schafe zelluläres PrP nachweisen konnten, machen keine genauen Altersangaben zu den Tieren.

Die relativ hohen Gehalte an PrP^C in der Nickhaut von Lämmern weisen darauf hin, dass zu Recht verschiedentlich vorgeschlagen wurde, dieses Gewebe im Rahmen der Scrapie-Diagnostik auf PrP^{SC} zu screenen (O´ROURKE et al., 1998a; O`ROURKE et al., 2000). Bei den Kälbern, und insbesondere bei den beiden Rindern war hingegen das erhaltene Signal für das dritte Augenlid deutlich schwächer. Mit den verfügbaren Literaturdaten übereinstimmende Ergebnisse wurden auch für Lungen- und Muskelgewebe erhalten. In Lungengewebe konnten vergleichsweise hohe, in Herz- und Skelettmuskulatur hingegen nur sehr geringe PrP^C-Gehalte festgestellt werden.

Bisherige Untersuchungen zur Infektiosität von Milch zeigten lediglich, dass Milch im Vergleich zu Hirngewebe eine mindestens 100.000-fach niedrigere Infektiosität aufweist (TAYLOR et al., 1995). Im wesentlichen basierend auf diesen Versuchen und epidemiologischen Erhebungen, kamen verschiedene Expertengremien [EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2000; INTERNATIONAL FORUM FOR TSE AND FOOD SAFETY (TAFS), 2003], sowie HEESCHEN (2002) zu dem Schluß, dass durch Milchkonsum kein direktes Risikopotential festzustellen ist. Bislang ist es nicht gelungen, Prionen in der Milch nachzuweisen. Daten zum Gehalt an zellulärem Prion Protein stehen auch nicht zur Verfügung. Allerdings konnten in dieser Arbeit insbesondere bei den kleinen Wiederkäuern (Schaf und Ziege) vergleichsweise hohe PrP^C-Gehalte in der Milch gemessen werden. Dies kann zum einen an der höheren Affinität des mAk P4 für das Schaf-PrP liegen, zum anderen möglicherweise auch an der im Vergleich zum Rind erhöhten Zellzahl in der Milch. Wie bereits erwähnt, war der mAk P4 originär zum Nachweis von ovinem Prion Protein entwickelt worden und zeigt dementsprechend für das ovine PrP^C im Hirngewebe eine 2-3 fach höhere Sensitivität als für das bovine PrP^C. Dieser Faktor wird jedoch in der Milch bei weitem übertroffen (Faktor 7-10). Dass hierfür nicht die höhere Zellzahl der Schafmilch verantwortlich gemacht werden kann, zeigen die hohen PrP^C-Gehalte der Molkefraktion (60 % des Gesamt-PrP^C in der Milch). Diese wird durch Zentrifugation gewonnen, wobei die Zellen im Pellet und damit in der Caseinfraktion enthalten sein müssten. Die Caseinfraktion wiederum weist aber nur 15 % des Gesamt-PrP^C auf. Bei der Kuhmilch sind die erhaltenen Ergebnisse aufgrund der generell niedrigeren Extinktionswerte mit Vorsicht zu bewerten. Auffallend war jedoch der im Vergleich zur Schafmilch deutliche Abfall der Messwerte nach Entfetten der Milch. So enthielt Magermilch lediglich noch ca. 67 % des Ausgangsgehaltes an PrP^C. Dieser Wert blieb auch nach Caseinfällung relativ konstant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Testverfahrens weitgehend das Verteilungsmuster von PrP^C in unterschiedlichen Körpergeweben bei Wiederkäuern skizziert werden konnte. Nach einer wünschenswerten Absicherung der Ergebnisse durch weitere analytische Verfahren wie z.B. Immunoblot oder RT-PCR könnten diese Daten für die Risikobewertung einzelner Organe im Zusammenhang mit BSE-Fällen Verwendung finden. Außerdem stellen sie eine Hilfe für die Ermittlung möglicher Infektionswege im Organismus dar. Hierfür wäre allerdings eine Ausdehnung der Versuche auf weitere Gewebe, wie beispielsweise verschiedene Darmabschnitte, sinnvoll. Der erstmalige Nachweis von zellulärem PrP in der Milch eröffnet zudem neue Fragestellungen, die im Rahmen weiterer Arbeiten geklärt werden sollten.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Enzymimmuntests (EIA) zum Nachweis von zellulärem PrP (PrP^C), sowie dessen Anwendung zur Untersuchung diverser Gewebe von Rindern, Kälbern und Lämmern. Mit dem Testverfahren wurde auch Milch von Rindern, Ziegen und Schafen auf das Vorkommen von PrP^C und dessen Verteilung auf die einzelnen Milchfraktionen untersucht.

Im Hinblick auf die Erstellung eines Sandwich-EIA's wurde die Eignung verschiedener monoklonaler Antikörper überprüft. Mit dem Ziel ein möglichst schnelles und einfaches Extraktionsverfahren für den Nachweis von PrP^C in Geweben zu etablieren, wurden Stammhirnhomogenate von Rindern und Schafen unter Verwendung verschiedener Extraktionspuffer hergestellt und anschließend mit dem optimierten EIA-System analysiert.

Nach Optimierung weiterer Parameter wurde standardmäßig folgendes Verfahren für die Untersuchung von Gewebsproben verwendet. Die Extraktion erfolgte im RiboLyser unter Verwendung von 3 % (w/v) Glucose in PBS, anschließend wurde der Extrakt noch für 40 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten mit Proteinase K verdaute Ansätze.

Bei der Untersuchung der Gewebsproben zeigte sich, dass Prion Proteine in nahezu jedem Gewebe nachweisbar sind. Neben dem Stammhirn sind auch andere Organe bzw. Gewebe, wie beispielsweise die Nickhaut der Lämmer oder die Lunge von Kälbern und Lämmern sowie die Nierenrinde von Rindern und Kälbern reich an PrP^C. Vergleichsweise geringe Konzentrationen an Prion Proteinen konnten in der Muskulatur sowie den lymphatischen Organen der Tiere nachgewiesen werden. Auffällig war, dass bei einigen Organen, wie z.B. der Rinderleber, eine hohe Schwankungsbreite bei den untersuchten Einzeltieren festzustellen war.

Auch in der Milch bzw. deren Fraktionen (Magermilch, Molke und Caseinfraktion), die ohne weitere Probenaufarbeitung in den EIA eingesetzt werden konnten, war PrP^C detektierbar. PrP^C konnte dabei in Schaf- Ziegen- und Kuhmilch nachgewiesen werden. Die Untersuchung von fraktionierter Schafmilch ergab zum einen, dass die Entfettung der Proben keinen Einfluss auf den nachweisbaren PrP^C-Gehalt der Milch hat, und zum anderen, dass sich der überwiegende PrP^C-Anteil in der Molkefraktion befindet.

Summary

Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of cellular prion protein in ruminants

This paper deals with the development of an enzyme-immunosorbent-assay (EIA) for the detection of cellular PrP (PrP^C) as well as its application for the analysis of diverse tissues derived from cattle, calves and lambs. Additionally, milk from cows, goats and sheep was analysed by using this test system for the occurrence of PrP^C and its distribution in milk fractions.

With respect to the establishment of a sandwich-EIA, the suitability of several monoclonal antibodies was tested. Aiming at the development of a rapid and simple extraction procedure for the detection of PrP^C in tissues, brainstem homogenates of cattle and sheep were produced by using different extraction buffers and subsequently analysed by the optimized EIA-system.

After optimization of further parameters, the following standard procedure was used for the examination of the tissue samples. By using a RiboLyser, tissues were homogenized in PBS containing 3 % (w/v) glucose and subsequently incubated at 37 °C for 40 min to improve the detectability of PrP^C. Proteinase K digested samples served as negative controls.

During analysis of the tissue samples it turned out that prion proteins are detectable in nearly every tissue. Besides brainstem other organs and tissues, respectively, are rich in PrP^C. Particularly, the third eyelid of lambs, lungs of calves and lambs as well as the cortex of kidneys of adult and juvenile cattle contained high amounts of PrP^C. Comparatively low concentrations of prion protein could be detected in muscles and lymphatic organs of the animals. For some organs, such as the liver, high variability of the PrP^C content was found between the examined individuals.

Detectable amounts of PrP^C were also found in milk and its fractions (skimmed milk, whey and casein-fraction), which could be applied to the EIA without further treatment. PrP^C could be detected in milk from sheep, goats and cows. The analysis of fractionated ewes' milk showed that defatting of the samples had no influence on the detectable PrP^C-content and that the predominant PrP^C-portion is found in the whey-fraction.

6 Literaturverzeichnis

ALPER, T., W. A. CRAMP, D. A. HAIG, M. C. CLARKE (1967):
Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?
Nature 214, 764-766

ANDRÉOLETTI, O., S. SIMON, C. LACROUX, N. MOREL, G. TABOURET, A. CHABERT, S. LUGAN, F. CORBIÈRE, P. FERRÉ, G. FOUCRAS, H. LAUDE, F. EYCHENNE, J. GRASSI und F. SCHELCHER (2004) :
PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie
Nat. Med. 10, 591-593

ANONYM (2003a):
Produktinformation zu "Antibodies to PrP" der Firma PRIONICS AG
http://www.prionics.ch/PDF/Catalogue.PDF

ANONYM (2003b):
Produktinformation zu "Enzyme Immunoassay Kit for the determination of PrPc" der Firma SPI-BIO (Katalog-Nummer A05201)
http://www.caymanchem.com/neptune/pdfs/589751.pdf

ANTOINE, N., J.-Y. CESBRON, B. COUMANS, O. JOLOIS, W. ZORZI und E. HEINEN (2000):
Differential expression of cellular prion protein on human blood and tonsil lymphocytes
Haematologica 85, 475-480

APPEL, T. R., C. DUMPITAK, U. MATTHIESEN und D. RIESNER (1999):
Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold
Biol. Chem. 380, 1295-1306

APPEL, T. R., M. WOLFF, F. von RHEINBABEN, M. HEINZEL und D. RIESNER (2001):
Heat stability of prion rods and recombinant prion protein in water, lipid and lipid-water mixtures
J. Gen. Virol. 82, 465-473

ARONOFF-SPENCER, E., C. S. BURNS, N. I. AVDIEVICH, G. J. GERFEN, J. PEISACH, W. E. ANTHOLINE, H. L. BALL, F. E. COHEN, S. B. PRUSINER und G. L. MILLHAUSER (2000):
Identification of the Cu^{2+} binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy
Biochemistry 39, 13760-13771

BARBIERI, I., E. BROCCHI, R. MEYER, S. PELETTO, M. MORETTI, A. BORRÈ, G. PEZZONI, M. SALMONA, D. GELMETTI und L. CAPUCCI (2003):
Differential recognition of scrapie and BSE associated prion protein by new monoclonal antibodies
Kurzfassung zur Tagung: Prion diseases: from basic research to intervention concepts; TSE-forum (München), p. 89

BARCLAY, G. R., J. HOPE, C. R. BIRKETT und M. L. TURNER (1999):
Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry
Br. J. Haematol. 107, 804-814

BARRY, R. A. und S. B. PRUSINER (1986):
Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins
J. Infect. Dis. 154, 518-521

BEEKES, M., P. A. McBRIDE und E. BALDAUF (1998):
Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie
J. Gen. Virol. 79, 601-607

BENDHEIM, P. E., R. A. BARRY, S. J. DeARMOND, D. P. STITES und S. B. PRUSINER (1984):
Antibodies to a scrapie prion protein
Nature 310, 418-421

BENDHEIM, P. E., H. R. BROWN, R. D. RUDELLI, L. J. SCALA, N. L. GOLLER, G. Y. WEN, R. J. KASCSAK, N. R. CASHMAN und D. C. BOLTON (1992):
Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein
Neurology 42, 149-156

BERINGUE, V., G. MALLINSON, M. KAISAR, M. TAYEBI, Z. SATTAR, G. JACKSON, D. ANSTEE, J. COLLINGE und S. HAWKE (2003):
Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain
Brain 126, 2065-2073

BETEMPS, D., und T. BARON (2001):
Molecular specificities of antibodies against ovine and murine recombinant prion proteins
Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 101-108

BIESCHKE, J., A. GIESE, W. SCHULZ-SCHÄFFER, I. ZERR, S. POSER, M. EIGEN und H. KRETZSCHMAR (2000):
Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5468-5473

BIFFIGER, K., D. ZWALD, L. KAUFMANN, A. BRINER, I. NAYKI, M. PÜRRO, S. BÖTTCHER, T. STRUCKMEYER, O. SCHALLER, R. MEYER, R. FATZER, A. ZURBRIGGEN, M. STACK, M. MOSER, B. OESCH und E. KÜBLER (2002):
Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP^{Sc} in brain homogenate
J. Virol. Methods 101, 79-84

BLÄTTLER, T., S. BRANDNER, A. J. RAEBER, M. A. KLEIN, T. VOIGTLÄNDER, C. WEISSMANN und A. AGUZZI (1997):
PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain
Nature 389, 69-73

BONS, N., S. LEHMANN, N. MESTRE-FRANCÈS, D. DORMONT und P. BROWN (2002):
Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*
Transfusion 42, 513-516

BOSQUE, P. J., C. RYOU, G. TELLING, D. PERETZ, G. LEGNAME, S. J. DeARMOND und S. B. PRUSINER (2002):
Prions in skeletal muscle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3812-3817

BRADLEY, R. (2004):
Bovine spongiform encephalopathy and its relationship to the variant form of Creutzfeld-Jakob-Disease
Contrib. Microb. 11, 146-185

BRANDNER, S., M. A. KLEIN und A. AGUZZI (1999):
A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie
Transfus. Clin. Biol. 6, 17-23

BROWN, P., L. CERVENÁKOVÁ und H. DIRINGER (2001):
Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease
J. Lab. Clin. Med. 137, 5-13

BROWN, D. R., B.-S. WONG, F. HAFIZ, C. CLIVE, S. J. HASWELL und I. M. JONES (1999):
Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase
Biochem. J. 344, 1-5

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 und H. KRETZSCHMAR (1997):
The cellular prion protein binds copper in vivo
Nature 390, 684-687

CASHMAN, N. R., R. LOERTSCHER, J. NALBANTOGLU, I. SHAW, R. J. KASCSAK, D. C. BOLTON und P. E. BENDHEIM (1990):
Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation
Cell 61, 185-192

CAUGHEY, B. W., A. DONG, K. S. BHAT, D. ERNST, S. F. HAYES und W. S. CAUGHEY (1991):
Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP $^{27-30}$ in water by infrared spectroscopy
Biochemistry 30, 7672-7680

CERVENAKOVA, L., P. BROWN, S. SOUKHAREV, O. YAKOVLEVA, H. DIRINGER, E. L. SAENKO und W. N. DROHAN (2003):
Failure of immunocompetitive capillary electrophoresis assay to detect disease-specific prion protein in buffy coat from humans and chimpanzees with Creutzfeldt-Jakob disease
Electrophoresis 24, 853-859

CREUTZFELDT. H. G. (1920):
Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems
Z. Gesamte Neurol. Psychiatrie 57, 1-18

DESLYS, J. P., E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI und J. MOYNAGH (2001):
Screening slaughtered cattle for BSE
Nature 409, 476-478

DONNE, D. G., J. H. VILES, D. GROTH, I. MEHLHORN, T. L. JAMES, F. E. COHEN, S. B. PRUSINER, P. E. WRIGHT und 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. USA 94, 13452-13457

ENARI, M., E. FLECHSIG und C. WEISSMANN (2001):
Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9295-9299

ENDO, T., D. GROTH, S. B. PRUSINER und A. KOBATA (1989):
Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein
Biochemistry 28, 8380-8388

ERSDAL, C., M. J. ULVUND, S. L. BENESTAD und M. A. TRANULIS (2003): Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical Scrapie
Vet. Pathol. 40, 164-174

EU-DIREKTORAT FÜR VERBRAUCHERPOLITIK UND GESUNDHEITSSCHUTZ (2002):
Opinion on TSE infectivity distribution in ruminant tissues
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out241_en.pdf

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2000):
Safety of milk with regard to TSE: State of affairs
Statement of March 2000 of the Scientific Steering Committee.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out175_en.html

FARQUHAR, C. F., R. A. SOMERVILLE and L. A. RITCHIE (1989):
Post-mortem immunodiagnosis of scrapie and bovine spongiform encephalopathy
J. Virol. Methods 24, 215-222

FISCHER, M. B., C. Roeckl, P. PARIZEK, H. P. SCHWARZ und A. AGUZZI (2000):
Binding of disease-associated prion protein to plasminogen
Nature 408, 479-483

GAJDUSEK, D. C. und V. ZIGAS (1957):
Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea
N. Engl. J. Med. 257, 974-978

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GARCIA, L. F., R. ZAHN, R. RIEK und K. WÜTHRICH (2000):
NMR structure of the bovine prion protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8334-8339

GARSSEN, G. J., L. J. M. VanKEULEN, C. F. FARQUHAR, M. A. SMITS, J. G. JACOBS, A. BOSSERS, R. H. MELOEN und J. P. M. LANGEVELD (2000):
Applicability of three anti-PrP peptide sera including staining of tonsils and brainstem of sheep with scrapie
Microsc. Res. Tech. 50, 32-39

GILCH, S., F. WOPFNER, I. RENNER-MÜLLER, E. KREMMER, C. BAUER, E. WOLF, G. BREM, M. H. GROSCHUP und H. M. SCHÄTZL (2003):
Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrP^{Sc} propagation in prion-infected cells
J. Biol. Chem. 278, 18524-18531

GRASSI, J. (2003):
Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests
Transfus. Clin. Biol. 10, 19-22

GRATHWOHL, K.-U. D., M. HORIUCHI, N. ISHIGURO und M. SHINAGAWA (1997):
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice
J. Virol. Methods 64, 205-216

GROSCHUP, M. H., S. HARMEYER und E. PFAFF (1997):
Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species
J. Immunol. Meth. 207, 89-101

GROSCHUP, M. H., B. HÖRNLIMANN und A. BUSCHMANN (2001):
Die „natürliche“ und iatrogene Übertragbarkeit der Prionkrankheiten
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionerkrankungen, p. 361-370
Walter De Gruyter, Berlin

HARAGUCHI, T., S. FISHER, S. OLOFSSON, T. ENDO, D. GROTH, A. TARENTINO, D. R. BORCHELT, D. TEPLOW, L. HOOD, A. BURLINGAME, E. LYCKE, A. KOBATA und S. B. PRUSINER (1989):
Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion protein
Arch. Biochem. Biophys. 274, 1-13

HARDT, M., T. BARON und M. H. GROSCHUP (2000):
A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies
J. Comp. Pathol. 122, 43-53

HARMEYER, S., E. PFAFF und M. H. GROSCHUP (1998):
Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants
J. Gen. Virol. 79, 937-945

HARRIS, D.A. (1999):
Cellular biology of prion diseases
Clin. Microbiol. Rev. 12, 429-444

HEESCHEN, W. H. (2002):
BSE: Milch und Risikopotential?
Dtsch. Tierärtl. Wschr. 109, 350-353

HEGGEBØ, R., C. McL. PRESS, G. GUNNES, M. J. ULVUND, M. A. TRANULIS und T. LANDSVERK (2003):
Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent
J. Comp. Pathol. 128, 172-181

HETZELT, H. (2005):
Entwicklung eines Biosensors zum simultanen Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen
Diss. med. vet., München

HILLS, D., S. COMINCINI, J. SCHLAEPFER, G. DOLF, L. FERRETTI und J. L. WILLIAMS (2001):
Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region
Anim. Genet. 32, 231-233
Sequenz bei NCBI: CAC37367

HÖRNLIMANN, B., H. KRETZSCHMAR, O. WINDL und A. AGUZZI (2001):
Die Überwachung der Prionkrankheiten des Menschen
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionerkrankungen, p. 239-246
Walter De Gruyter, Berlin

HORIUCHI, M., N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO und M. SHINAGAWA (1995):
A cellular form of prion protein (PrP^{C}) exists in many non-neuronal tissues of sheep
J. Gen. Virol. 76, 2583-2587

HOUSTON, F., J. D. FOSTER, A. CHONG, N. HUNTER und C. J. BOSTOCK (2000):
Transmission of BSE by blood transfusion in sheep
Lancet 356, 999-1000

HSICH, G., K. KENNEY, C. J. GIBBS, K. H. LEE und M. G. HARRINGTON (1996):
The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies
N. Engl. J. Med. 335, 924-930

HUTTER, G., F. L. HEPPNER und A. AGUZZI (2003):
No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo
Biol. Chem. 384, 1279-1285

IKEGAMI, Y., M. ITO, H. ISOMURA, E. MOMOTANI, K. SASAKI, Y. MURAMATSU, N. ISHIGURO und M. SHINAGAWA (1991):
Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep
Vet. Rec. 128, 271-275

INTERNATIONAL FORUM FOR TSE AND FOOD SAFETY; TAFS (2003):
TAFS position paper on the safety of milk and milk products
http://www.tseandfoodsafety.org/position_papers/position_paper_on_the_safety_o/tafs_position_paper_on_the_2.pdf

JAKOB, A. (1921):
Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde
Z. Gesamte Neurol. Psychiatrie 64, 147-228

JAMES, T. L., H. LIU, N. B. ULYANOV, S. FARR-JONES, H. ZHANG, D. G. DONNES, K. KANEKO, D. GROTH, I. MEHLHORN, S. B. PRUSINER und F. E. COHEN (1997):
Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10086-10091

JOHNSON, C. T. und C. J. WHITAKER (1988):
Bovine spongiform encephalopathy
Vet. Rec. 122, 142

KALUZ, S., M. KALUZOVA und A. P. F. FLINT (1997):
Sequencing analysis of prion genes from red deer and camel
Gene 199, 283-286

KANEKO, K., M. VEY, M. SCOTT, S. PILKUHN, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER (1997):
COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2333-2338

KASCSAK, R. J., R. FERSKO, D. PULGIANO, R. RUBENSTEIN und R. I. CARP (1997):
Immunodiagnosis of prion disease
Immunol. Invest. 26, 259-268

KIRBY, L., C. R. BIRKETT, H. RUDYK, I. H. GILBERT und J. HOPE (2003):
In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrP^{res} as a model for conversion
J. Gen. Virol. 84, 1013-1020

KOCISKO, D. A., J. H. COME, S. A. PRIOLA, B. CHESEBRO, G. J. RAYMOND, P. T. LANSBURY und B. CAUGHEY (1994):
Cell-free formation of protease-resistant prion protein
Nature 370, 471-474

KORNBLATT, J. A., S. MARCHAL, H. REZAEI, M. J. KORNBLATT, C. BALNY, R. LANGE, M.-P. DEBEY, G. HUI BON HOA, M. C. MARDEN und J. GROSCLAUDE (2003):
The fate of the prion protein in the prion/plasminogen complex
Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 518-522

KORTH, C., B. STIERLI, P. STREIT, M. MOSER, O. SCHALLER, R. FISCHER, W. SCHULZ-SCHAEFFER, H. KRETZSCHMAR, A. RAEBER, U. BRAUN, F. EHRENSPERGER, S. HORNEMANN, R. GLOCKSHUBER, R. RIEK, M. BILLETER, K. WÜTHRICH und B. OESCH (1997):
Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody
Nature 390, 74-77

KRASEMANN, S., M. GROSCHUP, G. HUNSMANN und W. BODEMER (1996):
Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of $PrP^{0/0}$ mice
J. Immunol. Meth. 199, 109-118

KRETZSCHMAR, H. A. (2002):
Ätiologie, Pathologie und Diagnostik der Prionkrankheiten des Menschen
Internist 43, 716-730

KRETZSCHMAR, H. A., S. B. PRUSINER, L. E. STOWRING und S. J. De ARMOND (1986):
Scrapie prion proteins are synthesized in neurons
Am. J. Pathol. 122, 1-5

KUCZIUS, T. und M. H. GROSCHUP (1999):
Differences in Proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains
Mol. Med. 5, 406-418

KUCZIUS, T., I. HAIST und M. H. GROSCHUP (1998):
Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation
J. Infect. Dis. 178, 693-699

LAFFLING, A. J., A. BAIRD, C. R. BIRKETT und H. A. JOHN (2001):
A monoclonal antibody that enables specific immunohistological detection of prion protein in bovine spongiform encephalopathy cases
Neurosci. Lett. 300, 99-102

LUCASSEN, R., K. NISHINA und S. SUPATTAPONE (2003):
In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups
Biochemistry 42, 4127-4135

MABBOTT, N. A., K. L. BROWN, J. MANSON und M. E. BRUCE (1997):
T-lyphocyte activation and the cellular form of the prion protein
Immunology 92, 161-165

MATSUSHITA, K., H. HORIUCHI, S. FURUSAWA, M. HORIUCHI, M. SHINAGAWA und H. MATSUDA (1998):
Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide
J. Vet. Med. Sci. 60, 777-779

McKINLEY, M. P., D. C. BOLTON und S. B. PRUSINER (1983):
A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion
Cell 35, 57-62

MEHLHORN, I., D. GROTH, J. STÖCKEL, B. MOFFAT, D. REILLY, D. YANSURA, W. S. WILLET, M. BALDWIN, R. FLETTERICK, F. E. COHEN, R. VANDLEN, D. HENNER und S. B. PRUSINER (1996):
High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein
Biochemistry 35, 5528-5537

MERZ, P. A., R. A. SOMERVILLE, H. M. WISNIEWSKI und K. IQBAL (1981):
Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol. 54, 63-74

MEYER, R. K., B. OESCH, R. FATZER, A. ZURBRIGGEN und M. VANDEVELDE (1999):
Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP^{Sc} by treatment with heat and guanidine thiocyanate
J. Virol. 73, 9386-9392

MIURA, T., A. HORI-I, H. MOTOTANI und H. TAKEUCHI (1999):
Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence
Biochemistry 38, 11560-11569

MORONCINI, G., N. KANU, L. SOLFOROSI, G. ABALOS, G. C. TELLING, M. HEAD, J. IRONSIDE, J. P. BROCKES, D. R. BURTON und R. A. WILLIAMSON (2004):
Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrP^{Sc}
Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 10404-10409

MOUDJOU, M., Y. FROBERT, J. GRASSI und C. LaBONNARDIÈRE (2001):
Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures
J. Gen. Virol. 82, 2017-2024

MOUILLET-RICHARD, S., M. ERMONVAL, C. CHESBASSIER, J. L. LAPLANCHE, S. LEHMANN, J. M. LAUNAY und O. KELLERMANN (2000) :
Signal transduction through prion protein
Science 289, 1925-1928

MOUSSAVIAN, M., S. POTOLICCHIO, R. JONES (1997):
The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy
N. Engl. J. Med. 336, 873-874

MOYNAGH, J., H. SCHIMMEL und G. N. KRAMER (1999):
The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines
http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.pdf

MÜLLER, H., A. STROM, G. HUNSMANN und A. W. STUKE (2005):
Separation of native prion protein (PrP) glycoforms by copperbinding using immobilised metal affinity chromatography (IMAC)
Biochem. J.; Immediate Publication. Published on 19 Jan 2005 as manuscript BJ20041291

MULCAHY, E. R., J. C. BARTZ, A. E. KINCAID und R. A. BESSEN (2004):
Prion infection of skeletal muscle cells and papillae in the tongue
J. Virol. 78, 6792-6798

MURAMATSU, Y., A. ONODERA, M. HORIUCHI, N. ISHIGURO und M. SHINAGAWA (1993):
Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection
Arch. Virol. 134, 427-432

NAKAMURA, N., A. SHUYAMA, A. HOJYO, M. SHIMOKAWA, K. MIYAMOTO, T. KAWASHIMA, M. AOSASA, H. HORIUCHI, S. FURUSAWA und H. MATSUDA (2004):
Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein
J. Vet. Med. Sci. 66, 807-814

NISHINA, K., N. R. DELEAULT, R. W. LUCASSEN und S. SUPATTAPONE (2004):
In vitro prion protein conversion in detergent-solubilized membranes
Biochemistry 43, 2613-2621

OESCH, B., D. WESTAWAY, M. WÄLCHLI, M. P. McKINLEY, S. B. H. KENT, R. AEBERSOLD, R. A. BARRY, P. TEMPST, D. B. TEPLOW, L.E. HOOD, S. B. PRUSINER und C. WEISSMANN (1985):
A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein
Cell 40, 735-746

O`ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, S. M. PARISH, D. P. KNOWLES (1998a):
Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep
Vet. Rec. 142, 489-491

O`ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, J. M. MILLER, T. R. SPRAKER, I. SADLER-RIGGLEMAN und D. P. KNOWLES (1998b):
Monoclonal antibody F89/106.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein
J. Clin. Microbiol. 36, 1750-1755

O`ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, T. E. BESSER, J. M. MILLER, R. C. CUTLIP, G. A. H. WELLS, S. J. RYDER, S. M. PARISH, A. N. HAMIR, N. E. COCKETT, A. JENNY und D. P. KNOWLES (2000):
Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue
J. Clin. Microbiol. 38, 3254-3259

PAMMER, J., A. SUCHY, M. RENDL und E. TSCHACHLER (1999):
Cellular prion protein expressed by bovine squamous epithelia of skin and upper gastrointestinal tract
Lancet 354, 1702-1703

PAN, K.-M., M. BALDWIN, J. NGUYEN, M. GASSET, A. SERBAN, D. GROTH, I. MEHLHORN, Z. HUANG, R. J. FLETTERICK, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER (1993):
Conversion of α–helices into β–sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10962-10966

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. HAGHIGHAT, S. J. SPATZ, M. HEAD, R. WILL, J. IRONSIDE, K. O`ROURKE, Q. TONELLI, H. C. LEDEBUR, A. CHAKRABARTTY und N. R. CASHMAN (2003):
A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation
Nat. Med. 9, 893-899

PERETZ, D., R. A. WILLIAMSON, K. KANEKO, J. VERGARA, E. LECLERC, G. SCHMITT-ULMS, I. R. MEHLHORN, G. LEGNAME, M. R. WORMALD, P. M. RUDD, R. A. DWEK, D. R. BURTON und S. B. PRUSINER (2001):
Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity
Nature 412, 739-743

PICCARDO, P., J. P. M. LANGEVELD, A. F. HILL, S. R. DLOUHY, K. YOUNG, G. GIACCONE, G. ROSSI, M. BUGIANI, O. BUGIANI, R. H. MELOEN, J. COLLINGE, F. TAGLIAVINI und B. GHETTI (1998):
An antibody raised against a conserved sequence of the prion protein recognizes pathological isoforms in human and animal prion diseases, including Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy
Am. J. Pathol. 152, 1415-1420

PRUSINER, S. B. (1982a):
Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie
Science 216, 136-144

PRUSINER, S. B., D. C. BOLTON, D. F. GROTH, K. A. BOWMAN, S. P. COCHRAN und M. P. McKINLEY (1982b):
Further purification and characterization of scrapie prions
Biochemistry 21, 6942-6950

PRUSINER, S. B., M. P. McKINLEY, K. A. BOWMANN, D. C. BOLTON, P. E: BENDHEIM, D. F. GROTH und G. G. GLENNER (1983):
Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods
Cell 35, 349-358

PRUSINER, S. B., D. GROTH, A. SERBAN, R. KOEHLER, D. FOSTER, M. TORCHIA, D. BURTON, S.-L. YANG und S. J. DeARMOND (1993):
Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10608-10612

PRUSINER, S. B., M. SCOTT, D. FOSTER, K.-M. PAN, D. GROTH, C. MIRENDA, M. TORCHIA, S.-L. YANG, D. SERBAN, G. A. CARLSON, P. C. HOPPE, D. WESTAWAY und S. J. DeARMOND (1990):
Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication
Cell 63, 673-686

RACE, R., D. ERNST, A. JENNY, W. TAYLOR, D. SUTTON und B. CAUGHEY (1992):
Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep
Am. J. Vet. Res. 53, 883-889

RIEK, R., S. HORNEMANN, G. WIDER, R. GLOCKSHUBER und K. WÜTHRICH (1997):
NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231)
FEBS Lett. 413, 282-288

RIEK, R., G. WIDER, M. BILLETER, S. HORNEMANN, R. GLOCKSHUBER und K. WÜTHRICH (1998):
Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11667-11672

RIESNER, D. (2003):
Biochemistry and structure of PrP^{C} and PrP^{Sc}
Br. Med. Bull. 66, 21-33

RITCHIE, D. L., M. W. HEAD und J. W. IRONSIDE (2004):
Advances in the detection of prion protein in peripheral tissues of variant Creutzfeldt-Jakob disease patients using paraffin-embedded tissue blotting
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 30, 360-368

ROBEY, W. G., R. JACKSON, R. L. WALTERS, J. M. BRACKETT, C. A. HARRINGTON und W. R. KILLIAN (1998):
Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle
Vet. Rec. 143, 50-51

RUBENSTEIN, R., R. J. KASCSAK, P. A. MERZ, M. C. PAPINI, R. I. CARP, N. K. ROBAKIS und H. M. WISNIEWSKI (1986):
Detection of scrapie-associated fibril (SAF) proteins using anti-SAF antibody in non-purified tissue preparations
J. Gen. Virol. 67, 671-681

RUDD, P. M., T. ENDO, C. COLOMINAS, D. GROTH, S. F. WHEELER, D. J. HARVEY, M. R. WORMALD, H. SERBAN, S. B. PRUSINER, A. KOBATA und R. A. DWEK (1999):
Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13044-13049

SABORIO, G. P., B. PERMANNE und C. SOTO (2001):
Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding
Nature 411, 810-813

SAFAR, J., P. P. ROLLER, D. C. GAJDUSEK und C. J. GIBBS (1993):
Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein
J. Biol. Chem. 268, 20276-20284

SAFAR, J., H. WILLE, V. ITRI, D. GROTH, H. SERBAN, M. TORCHIA, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER (1998):
Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations
Nat. Med. 4, 1157-1165

SCHAARSCHMIDT, H., H. W. PRANGE und H. REIBER (1994):
Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases
Stroke 25, 558-565

SCHÄTZL, H. M. (2001):
Spezies-Barriere und Prion–Erkrankungen
BIOforum 24, 406-409

SCHALLER, O., R. FATZER, M. STACK, J. CLARK, W. COOLEY, K. BIFFIGER, S. EGLI, M. DOHERR, M. VANDEVELDE, D. HEIM, B. OESCH und M. MOSER (1999):
Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)
Acta Neuropathol. 98, 437-443

SCHMERR, M. J., R. C. CUTLIP und A. JENNY (1998):
Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein
J. Chromatogr. 802, 135-141

SCHMERR, M. J., A. L. JENNY, M. S. BULGIN, J. M. MILLER, A. N. HAMIR, R. C. CUTLIP, K. R. GOODWIN (1999):
Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy
J. Chromatogr. 853, 207-214

SCHREUDER, B. E. C., L. J. M. van KEULEN, M. E. W. VROMANS, J. P. M. LANGEVELD und M. A. SMITS (1998):
Tonsillar biopsy and PrP^{Sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie
Vet. Rec. 142, 564-568

SCHULZ-SCHAEFFER, W. J., R. FATZER, M. VANDEVELDE und H. A. KRETZSCHMAR (2000):
Detection of PrP^{Sc} in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot
Arch. Virol. Suppl. 16, 173-180

SCIENTIFIC PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS OF THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004):
Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority on BSE risk from bovine tonsil and consumption of bovine tongue
EFSA Journal 41, 1-4

SCOTT, P. R., C. D. PENNY und N. D. SARGISON (1995):
Bovine spongiform encephalopathy in a Holstein cow born in the United Kingdom during September 1989
Can. Vet. J. 36, 310-311

SCOTT, P. R., B. M. ALDRIDGE, M. CLARKE und R. WILL (1989):
Bovine spongiform encephalopathy in a cow in the United Kingdom
J. Am. Vet. Med. Assoc. 195, 1745-1747

ŠERBEC, V. C., M. BRESJANAC, M. POPOVIĆ, K. P. HARTMAN, V. GALVANI, R. RUPREHT, M. ČERNILEC, T. VRANAC, I. HAFNER und R. JERALA (2004):
Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's Disease-affected and normal brain tissue
J. Biol. Chem. 279, 3694-3698

SHAKED, Y, H. ROSENMANN, G. TALMOR und R. GABIZON (1999):
A C-terminal-truncated PrP isoform is present in mature sperm
J. Biol. Chem. 274, 32153-32158

SHAKED, G. M., Y. SHAKED, Z. KARIV-INBAL, M. HALIMI, I. AVRAHAM und R. GABIZON (2001):
A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases
J. Biol. Chem. 276, 31479-31482

SHINAGAWA, M., E. MUNEKATA, S. DOI, K. TAKAHASHI, H. GOTO und G. SATO (1986):
Immunoreactivity of a synthetic pentadecapeptide corresponding to the N-terminal region of the scrapie prion protein
J. Gen. Virol. 67, 1745-1750

SIGURDSSON, E. M., M.-S. SY, R. LI, H. SCHOLTZOVA, R. J. KASCSAK, R. KASCSAK, R. CARP, H. C. MEEKER, B. FRANGIONE und T. WISNIEWSKI (2003):
Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice
Neurosci. Lett. 336, 185-187

SOMERVILLE, R. A., C. R. BIRKETT, C. F. FARQUHAR, N. HUNTER, W. GOLDMANN, J. DORNAN, D. GROVER, R. M. HENNION, C. PERCY, J. FOSTER und M. JEFFREY (1997):
Immunodetection of PrP^{Sc} in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows
J. Gen. Virol. 78, 2389-2396

STACK, M. J. (2004):
Western Immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies
In: LEHMANN, S. und J. GRASSI (Hrsg.): Techniques in prion research, p. 97-116
Birkhäuser-Verlag, Basel-Boston-Berlin

STAHL, N., D. R. BORCHELT, K. HSIAO und S. B. PRUSINER (1987):
Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid
Cell 51, 229-240

STAHL, N., M. A. BALDWIN, D. B. TEPLOW, L. HOOD, B. W. GIBSON, A. L. BURLINGAME und S. B. PRUSINER (1993):
Structural studies of the Scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing
Biochemistry 32, 1991-2002

STIMSON, E., J. HOPE, A. CHONG und A. L. BURLINGAME (1999):
Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestion
Biochemistry 38, 4885-4895

STÖCKEL, J., J. SAFAR, A. C. WALLACE, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER (1998):
Prion protein selectively binds copper(II) ions
Biochemistry 37, 7185-7193

TAKAHASHI, K., M. SHINAGAWA, S. DOI, S. SASAKI, H. GOTO und G. SATO (1986):
Purification of scrapie agent from infected animal brains and raising antibodies to the purified fraction
Microbiol. Immunol. 30, 123-131

TARABOUJLOS, A., M. SCOTT, A. SEMENOV, D. AVRAHAM, L. LASZLO und S. B. PRUSINER (1995):
Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform
J. Cell Biol. 129, 121-132

TAYLOR, D. M., C. E. FERGUSON, C. J. BOSTOCK, M. DAWSON (1995):
Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy
Vet. Rec. 136, 592

TERRY L. A., S. MARSH, S. J. RYDER, S. A. C. HAWKINS, G. A. H. WELLS, Y. I. SPENCER (2003):
Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy
Vet. Rec. 152, 387-392

THACKRAY, A. M., J.-Y. MADEC, E. WONG, R. MORGAN-WARREN, D. R. BROWN, T. BARON und R. BUJDOSO (2003):
Detection of bovine spongiform encephalopathy, ovine scrapie prion-related protein (PrP^{Sc}) and normal PrP^{C} by monoclonal antibodies raised to copper-refolded prion protein
Biochem. J. 370, 81-90

THOMZIG, A., C. KRATZEL, G. LENZ, D. KRÜGER und M. BEEKES (2003):
Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie
EMBO reports 4, 530-533

TICHOPAD, A., M. W. PFAFFL und A. DIDIER (2003):
Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR
Mol. Cell. Probes 17, 5-10

TURK, E., D. B. TEPLOW, L. E. HOOD und S. B. PRUSINER (1988):
Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins
Eur. J. Biochem. 176, 21-30

VALDEZ, R. A., M. J. ROCK, A. K. ANDERSON und K. I. O'ROURKE (2003):
Immunohistochemical detection and distribution of prion protein in a goat with natural scrapie
J. Vet. Diagn. Invest. 15, 157-162

VEY, M., S. PILKUHN, H. WILLE, R. NIXON, S. J. DeARMOND, E. J. SMART, R. G. W. ANDERSON, A. TARABOULOS und S. B. PRUSINER (1996):
Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14945-14949

VILES, J. H., F. E. COHEN, S. B. PRUSINER, D. B. GOODIN, P. E. WRIGHT und H. J. DYSON (1999):
Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites
Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 2042-2047

WAGGONER, D. J., B. DRISALDI, T. B. BARTNIKAS, R. L. B. CASARENO, J. R. PROHASKA, J. D. GITLIN und D. A. HARRIS (2000):
Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level
J. Biol. Chem. 275, 7455-7458

WEISSMANN, C. (1994):
Molecular biology of prion diseases
Trends Cell Biol. 4, 10-14

WEISSMANN, C. (2004):
The state of the prion
Nat. Rev. Microbiol. 2, 861-871

WHITE, A. R., P. ENEVER, M. TAYEBI, R. MUSHENS, J. LINEHAN, S. BRANDNER, D. ANSTEE, J. COLLINGE und S. HAWKE (2003):
Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease
Nature 422, 80-83

WILL, R. G. (2001):
Porträt der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD)
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionerkrankungen, p. 152-157
Walter De Gruyter, Berlin

WILLIAMSON, R. A., D. PERETZ, N. SMORODINSKY, R. BASTIDAS, H. SERBAN, I. MEHLHORN, S. J. DeARMOND, S. B. PRUSINER und D. R. BURTON (1996):
Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7279-7282

WILLIAMSON, R. A., D. PERETZ, C. PINILLA, H. BALL, R. B. BASTIDAS, R. ROZENSHTEYN, R. A. HOUGHTEN, S. B. PRUSINER und D. R. BURTON (1998):
Mapping the prion protein using recombinant antibodies
J. Virol. 72, 9413-9418

YOKOYAMA, T., K. KIMURA, Y. TAGAWA und N. YUASA (1995):
Preparation and characterization of antibodies against mouse prion protein (PrP) Peptides
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2, 172-176

ZAHN, R., A. LIU, T. LÜHRS, R. RIEK, C. von SCHROETTER, F. L. GARCIA, M. BILLETER, L. CALZOLAI, G. WIDER und K. WÜTHRICH (2000):
NMR solution structure of the human prion protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 145-150

ZANUSSO, G., D. LIU, S. FERRARI, I. HEGYI, X. YIN, A. AGUZZI, S. HORNEMANN, S. LIEMANN, R. GLOCKSHUBER, J. C. MANSON, P. BROWN, R. B. PETERSEN, P. GAMBETTI und M.-S. SY (1998):
Prion protein expression in different species: Analysis with a panel of new mAbs
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8812-8816

ZERR, I. und S. POSER (2001):
Die Epidemiologie und Risikofaktoren der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionerkrankungen, p. 299-305
Walter De Gruyter, Berlin

ZERR, I., M. BODEMER und T. WEBER (1997):
The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy
N. Engl. J. Med. 336, 874

Ein herzliches Dankeschön geht an

Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas, die stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für seine Mithilfe bei der Erlangung des „Stipendiums zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses“.

Herrn Dr. Richard Dietrich für die hervorragende Betreuung, seine schier grenzenlose Geduld, die auch hartnäckiger Unwissenheit standhielt, und seine Bemühungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Hartmut G. Eisgruber für dessen Unterstützung bei der Beantragung des Stipendiums.

Frau Dr. Andrea Stockmaier-Didier, für ihre Hilfe bei der Probennahme am Schlachthof sowie ihre fachliche und seelische Unterstützung.

Herrn Maximilian Moravek für die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Tätigkeiten und die praxisnahe Schulung in Laborsicherheit.

Frau Bruni Minich und Frau Marion Lorber für die vielen kleinen und großen Tipps die einem den Laboralltag erleichtern.

alle Mitarbeiter des Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima.

Frau Ingrid Ellinger-Hauber, die mich der Veterinärmedizin näher brachte, als mir heute manchmal lieb ist.

meine Eltern, dafür dass sie es mir ermöglicht haben diesen Beruf zu ergreifen sowie für die moralische und finanzielle Unterstützung die sie mir all die Jahre entgegengebracht haben.

Lebenslauf

Melanie Boesen

Geboren am 28. September 1976 in München

Eltern:	Marianne Boesen, geb. Blindauer Wilhelm Boesen	
Schulbildung:	1983-1987	Grundschule an der Rotbuchenstraße in München
	1987-1996	Städtisches Theodolinden Gymnasium in München
Studium:	1996-2001	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen:	19. Dezember 2001	
Approbation:	16. Januar 2002	
Promotionsstudium:	seit 1. April 2002	am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Förderung:	2003-2004	Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der LMU

Anstellung als praktische Tierärztin seit 1.1.2005 in der Praxis von Frau I. Ellinger-Hauber