

## 6 Diskussion

### 6.1 Verbesserung der Sensitivität des Western Blot Nachweises von PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30

Ein entscheidender Faktor bei der Untersuchung von Proben auf Anwesenheit von TSE-Erregern ist die Sensitivität der verwendeten Systeme zum Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>. Mit dem anfänglich in unserem Labor verwendeten Blotsystem konnte PrP<sup>Sc</sup> bis zu einer Menge nachgewiesen werden, die  $10^{-5}$  HÄ, und damit ca.  $10^4$  infektiösen Erregereinheiten entspricht.

Durch umfangreiche technische Optimierungen konnte die Sensitivität zum Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 im Western Blot somit von ca.  $10^{-5}$  HÄ auf  $6 \cdot 10^{-8}$  HÄ, also um das ca. 200fache gesteigert werden.

Die methodischen Fortschritte dieser Arbeit, PrP<sup>Sc</sup> mittels (Collagenase-Verdau) auch aus Geweben zu isolieren, für die das bisher nicht möglich war (Darmgewebe) und in wesentlich sensitiveren Western-Blot Verfahren nachzuweisen, stellen eine wesentliche Grundlage für den Nachweis von Prion-Proteinen in der Muskulatur dar (Thomzig et al, 2003, 2004b, 2006). In diesen Veröffentlichungen wurden die in im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Blotverfahren ebenso wie die Aufschlussverfahren und Aufreinigungsverfahren eingesetzt, die eine wesentliche Voraussetzung für die Resultate der Arbeiten darstellen.

### 6.2 Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Rektumproben nach oraler Infektion von Hamstern mit Scrapie (Versuchsreihe 1)

Die Untersuchungen des Rektums von Scrapie-infizierten Hamstern auf Gewebeeinlagerungen von PrP<sup>Sc</sup> zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Infektion sollten ein Beitrag zur Beantwortung der Frage leisten, ob für eine frühzeitige Diagnose von Scrapie an lebenden Tieren und von vCJK beim Menschen relativ leicht zugängliches Biopsiematerial aus dem Rektum geeignet sein könnte. Bei den Untersuchungen des Rektummaterials, das zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurde, konnten jedoch nur bei Tieren im terminalen Stadium der Krankheit (d.h. bei ca. 160 dpi) Gewebeeinlagerungen von PrP<sup>Sc</sup> nachgewiesen werden. Die Abbildungen 8 und 9 belegen, dass nur das biochemisch aufgearbeitete Rektum der terminal kranken Tiere das für pathologisches Prion-Protein charakteristische Bandenmuster im Bereich von 27-30 kD zeigte.

Sehr schwache Banden (Schatten), die bei einigen Proben in den Blots zu erkennen waren, lagen in einem leicht versetzten Molekulargewichtsbereich und stammten offenbar nicht von PrP<sup>Sc</sup>, da sie auch bei Proben des Rektums von nicht infizierten Tieren zu erkennen waren.

Beekes und McBride (2000) hatten mittels Immunhistochemie festgestellt, dass bereits nach 69 Tagen vereinzelt PrP<sup>Sc</sup> Ablagerungen im Dünndarm von oral infizierten Hamstern beobachtet werden konnten. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch das Rektum der Tiere bereits vor dem terminalen Krankheitsstadium nachweisbar infiziert sein könnte. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, wobei nicht auszuschließen ist, dass sensitivere Nachweismethoden diesen diagnostischen Ansatz doch noch realisieren könnten. In laufenden Untersuchungen am Hamster mit nochmals verbesserten Nachweismethoden wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht, ob PrP<sup>Sc</sup> auch bereits im späten präklinischen Stadium, ab ca. 130 dpi, im Rektum nachgewiesen werden kann (Krüger et al., Manuskript in Vorbereitung).

Insgesamt stehen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen am Schaf, bei denen die ersten PrP<sup>Sc</sup> Ablagerungen im Dünndarm fünf Monate nach peroraler Infektion, also im präklinischen Krankheitsstadium, festgestellt werden konnten (Andréoletti et al., 2000; van Keulen et al., 2000). Das Rektum jedoch konnte auch in diesen Untersuchungen erst im terminalen Stadium als infiziert nachgewiesen werden. Diese kongruenten Ergebnisse weisen nochmals auf die Signifikanz des Hamstermodells in Bezug auf die Pathogenese und die Erregerausbreitung im Organismus auch bei natürlich erworbenen TSEs wie z.B. Schafsscrapie hin.

Die biopsische Untersuchung des Rektums bringt also nach den hier berichteten Befunden keinen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie etwa der Untersuchung der Nickhaut von Schafen bei denen so, bereits im präklinischen Stadium, eine Infektion mit PrP<sup>Sc</sup> nachgewiesen werden konnte (O'Rourke et al., 2000). Jedoch war auch diese Untersuchungsmethode der post mortem Diagnostik mit Hirnmaterial unterlegen, da bei der Untersuchung der Nickhaut nicht alle in der immunhistochemischen Untersuchung des Gehirns als positiv getesteten Tiere ebenfalls als positiv identifiziert werden konnten.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Biopsiematerial aus dem Rektum ist die Tatsache, dass das PrP<sup>Sc</sup> nicht homogen im Gewebe abgelagert wird (Sigurdson et al., 1999; Schulz-Schaeffer et al., 2000; Tuo et al., 2001; McBride et al., 2001; Thomzig et al., 2003). Dadurch kann es sein, dass bei der Probenentnahme ein Bereich ausgesucht

wird, der aufgrund zufälliger Verteilung keine solchen Ablagerungen enthält, wobei aber in einem benachbarten Bereich möglicherweise durchaus Ablagerungen vorhanden sein können.

Aus den vorliegenden Untersuchungen ist somit zu schließen, dass eine Rektumbiopsie als Untersuchungsmethode für eine Frühdiagnose von TSE in vivo nicht vielversprechend erscheint, da das Rektum in frühen Stadien der Inkubation nicht genügend PrP<sup>Sc</sup> Gewebeeinlagerungen enthält, um diese sicher nachweisen zu können. Im terminalen Stadium ist eine Diagnose-Absicherung durch eine Rektumbiopsie möglich, bringt allerdings keine zurzeit erkennbare Vorteile gegenüber der post mortem Untersuchung des Gehirns.

## **6.3 Entwicklung und Nutzung eines neuen Verfahrens zur Extraktion von PrP<sup>Sc</sup> aus Fäzes (Versuchsreihe 2)**

In der Versuchsreihe 2 wurden Fäzesproben der in der Versuchsreihe 1 oral infizierten Hamster auf nachweisbare Mengen an PrP<sup>Sc</sup> untersucht.

In der Literatur gab es bislang keine Berichte zum Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Fäzesproben von Hamstern, die mit Scrapie infiziert wurden. Die vorliegende Arbeit sollte zur Beseitigung dieses Defizites beitragen. Für diesen Zweck musste eine geeignete Untersuchungsmethode entwickelt werden. Bisher verwendete Protokolle zur Extraktion von PrP<sup>Sc</sup> ließen sich nicht auf Fäzesproben anwenden, da diese aus einer im Vergleich zu Hirnmaterial völlig andersartigen Matrix bestehen (mikrobielle Bestandteile, unverdaute Futterreste, Pflanzenfasern, usw.), deren Komponenten sich nicht ohne weiteres von der PrP-haltigen Phase abtrennen ließen. Mit der Einführung eines neuen Zwischenschrittes in den Zentrifugationsablauf konnte in unseren Untersuchungen die PrP-Fraktion von unerwünschten Fäzes-Kontaminationen befreit werden. Das PrP blieb bei einer Zentrifugation mit 25.000 x g bei Raumtemperatur und Detergenz-Zusatz in Lösung. Ein Großteil der störenden Kontamination sedimentierte jedoch unter diesen Bedingungen. Dadurch wurde eine deutliche Verbesserung des Blotsignals erreicht und eine Untersuchung der Fäzesproben auf PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 überhaupt erst möglich.

### **6.3.1 Standard- und Kontrollproben**

Für die Herstellung der Standard- und Kontrollproben wurden Fäzesproben auf die gleiche Weise gewonnen wie die zu untersuchenden Fäzes. Für die Standardproben der Versuchsreihe 2 wurden sie aus dem Darm von gesunden Tieren entnommen und mit

Hirnhomogenat terminal kranker Tiere in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Durch die Zugabe von Hirnmaterial terminal kranker Tiere bereits vor der ersten Zentrifugation dieser Standards sollte sichergestellt werden, dass sich das zugegebene PrP<sup>Sc</sup> in der anschließenden Aufreinigung identisch verhalten sollte wie das PrP<sup>Sc</sup>, das ggf. endogen in den Fäzes infizierter Tiere vorhanden ist. Das Verwenden von gleichaltrigen Kontroll- und Versuchstieren sollte artifizielle Befunde aufgrund altersabhängiger Veränderungen der Zusammensetzung der Fäzes ausschließen. Allerdings zeigten Proben der Kontrolltiere keine erkennbaren Unterschiede, unabhängig davon, wie alt die Tiere zum Zeitpunkt der Tötung waren.

Zu den zu untersuchenden Proben wurden stets parallel Standardproben aufgearbeitet. Da das zu erwartende Ergebnis dieser Standardproben bekannt war, konnte jederzeit überprüft werden, ob die Aufarbeitung optimal durchgeführt wurde. Genauso wurde bei den Blotanalysen jeweils ein externer Standard einbezogen, der zeigen sollte, ob der Blotvorgang reproduzierbar ausgeführt wurde.

Die Auswertung der Blotfolien gestaltete sich zunächst schwierig, da die Fäzes-Extrakte trotz der Aufreinigung noch viele andere Proteine neben dem PrP<sup>Sc</sup> enthielten, die ebenfalls mit dem verwendeten Antikörper reagierten und dann auf der Blotmembran als Banden erschienen. Durch genauen Vergleich mit den bei jedem Versuch mitlaufenden negativen Kontrollproben (Fäzes von gesunden Tieren) konnten jedoch sichere Aussagen über das Vorhandensein bzw. das Nicht-Vorhandensein von PrP<sup>Sc</sup> in den entsprechenden Proben getroffen werden, indem die bei Referenzproben auftretenden Banden als unspezifisch unberücksichtigt blieben (Abbildung 14). Wie in Abb. 14 zu erkennen ist, trat bei allen untersuchten Proben eine Protein-Bande auf, die sich etwas unterhalb des Molekulargewichtsbereichs für PrP 27-30 befand. Bei den untersuchten Fäzesproben war diese etwas stärker ausgeprägt, da diese Proben im Vergleich zu Standardproben aufkonzentriert worden waren.

Ein weiterer wichtiger Punkt war das Laufverhalten der Proben, die nur dann als positiv gewertet wurden, wenn die resultierenden Blotsignale genau im gleichen Molekulargewichtsbereich lagen wie die der PrP 27-30 Positivkontrollen (Vgl. Abb. 13).

Während man bei der Untersuchung von Hirnmaterial auf Gewebeproben von terminal kranken Tieren als Vergleichs- und Standardmaterial zurückgreifen konnte, gab es für Untersuchungen an Fäzes kein solches endogenes PrP<sup>Sc</sup> enthaltendes Referenzmaterial. Als Standard für derartige Untersuchungen wurden daher dotierte Fäzesproben verwendet, bei denen durch die Zugabe einer definierten Menge von Hirngewebe eines terminal scrapiekranken Hamsters Vergleichswerte erreicht werden

konnten. Das Verfahren des Dotierens für Vergleichszwecke wird auch bei anderen Geweben wie z.B. Muskeln durchgeführt (Thomzig et al., 2003). Durch den Vergleich der zu untersuchenden Proben mit den dotierten Referenzproben, konnte abgeschätzt werden, wie viel PrP<sup>Sc</sup>/ 27-30 sich in diesen Fäzesproben befand. Derartige Abschätzungen stehen unter dem Vorbehalt, dass das PrP<sup>Sc</sup> bei den Standardproben aus zugesetztem Hirnhomogenat stammt und es nicht bekannt ist, ob sich dieses PrP<sup>Sc</sup> bei der Fäzes-Aufarbeitung anders verhält als dasjenige, das möglicherweise endogen in Fäzes vorhanden ist. Dass PrP<sup>Sc</sup> aus Fäzes mit dieser Methode aber nachgewiesen werden kann, zeigen die Ergebnisse der Versuchsreihe 3 eindeutig (s. Abb. 16).

Durch die Entnahme von Fäzesproben aus toten Tieren könnte es potentiell zu einer Verunreinigung des Probenmaterials mit Darmgewebe gekommen sein, wenn die Fäzes aus dem Darm herausgedrückt wurden. Auch das Aufschneiden bzw. das Abschneiden des Darmes könnte dazu geführt haben, dass unbemerkt kleine Stücke des Darmes in die Fäzesproben gelangten. Da die terminalen Rektumproben stark positiv waren, ist es vorstellbar, dass solche Artefakt-Verunreinigungen vereinzelt zu einem positiven Signal in einer Fäzesuntersuchung führen könnten und in zwei untersuchten Proben höchstwahrscheinlich geführt haben (548/16 und 548/17).

## **6.4 Extraktion von PrP<sup>Sc</sup> aus Fäzesproben, die in Stoffwechselkäfigen gesammelt wurden (Versuchsreihe 3)**

Die Ausscheidung von PrP<sup>Sc</sup> variierte hinsichtlich ihrer zeitlichen Dauer geringfügig von Tier zu Tier. Sie stimmte jedoch gut mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die die Ausscheidung anderer Stoffwechselprodukte über den Darm beim Hamster untersucht haben. (Hunter und Klaasson, 1975; Mikami et al., 1996). Hunter und Klaasson haben in ihren Untersuchungen eine Halbwertszeit der Ausscheidung von Colchizin, dem Hauptalkaloid der Herbstzeitlosen, von unter zwei Tagen beobachtet und Mikami und Kollegen haben die Ausscheidung von einer anderen Verbindung (bishomoCDC-sul, einem Sulfonat-Analogon einer natürlichen Gallensäure) untersucht und eine Halbwertszeit der Ausscheidung von 1,6 Tagen gefunden.

In unseren Untersuchungen wurden die Tiere erst in Stoffwechselkäfige gesetzt, nachdem sie das gesamte erregerehaltige Pellet aufgefressen hatten. In der Regel wurden die Tiere nach 16 h Futterentzug am nachfolgenden Morgen mit dem präparierten Futterpellet gefüttert und am gleichen Tag in die Stoffwechselkäfige gesetzt. Bei einigen Tieren verzögerte sich jedoch die Futteraufnahme, so dass diese Hamster

erst am nächsten Morgen in die Stoffwechsellkäfige gesetzt werden konnten, jedoch bereits vorher mit der Ausscheidung des PrP<sup>Sc</sup> begonnen hatten. Es ist daher möglich, dass bei diesen Tieren inokuliertes PrP<sup>Sc</sup>, das mit den Fäzes ausgeschieden wurde, nicht berücksichtigt wurde (Tier 4). Ebenso ist es möglich, dass durch die langsamere Aufnahme des PrP<sup>Sc</sup> die Ausscheidung über einen längeren Zeitraum, aber in einer niedrigeren Konzentration stattfand, die unterhalb der Nachweisgrenze lag. (Tier 4)

Um diese Fehlermöglichkeiten zu minimieren wurden bei der dritten Versuchsreihe, im Teilversuch 3c auch Fäzes aus den Käfigen gesammelt, in denen die Tiere bei der Verfütterung gesessen hatten.

Des Weiteren konnte auch beobachtet werden, dass durch den Aufbau der Stoffwechsellkäfige einzelne Kotpellets verloren gingen, da diese in den Urin-Sammelbehälter fielen, oder an der Wand des Käfigs hängen blieben und so mit Urin und Futterkrümeln in Kontakt kamen. Da die Fäzesproben einmal pro Tag gesammelt wurden, kann auch die individuelle Darmaktivität der Tiere die Ergebnisse beeinflusst haben. Zusammengenommen könnten diese Effekte die beobachtete Variation der Ausscheidungsdauer bei den einzelnen Tieren erklären. Grundsätzlich wurde der Kot eines Tages gesammelt und in Suspension gebracht; von dieser homogenen Suspension wurde dann eine definierte Menge untersucht.

Die Standardproben der Versuchsreihe 3 wurden aus Fäzes erstellt, die von jungen gesunden Hamstern gesammelt wurden. Dieselben Hamster wurden später infiziert. Aus den Untersuchungen der Versuchsreihe 2 war bekannt, dass sich die Fäzes mit zunehmendem Alter der Tiere nicht erkennbar veränderten.

Die Menge des ausgeschiedenen PrP<sup>Sc</sup> variierte dabei von Tier zu Tier. Dies ist in Abb. 18 zu erkennen. Während Tier 3 am 2. Tag noch relativ viel PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 ausscheidet (in etwa entsprechend  $10^{-5}$  HÄ in den untersuchten 4 ml) (vgl. Bande 4 und 2) scheidet das Tier 4 in 4 ml untersuchter Fäzessuspension PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 in einer Menge aus, die weniger als  $10^{-6}$  HÄ entspricht (vgl. Bande 5 und 6). Auch in der Versuchsreihe 3c variiert die Ausscheidungsdauer zum Teil deutlich zwischen ein und zwei Tagen.

In den Abbildungen 19 und 20 sind jeweils die Ergebnisse von zwei Tieren zum Zeitpunkt 2 bzw. 3 dpi zu sehen, bei denen jeweils nur noch ein Tier PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 ausscheidet (Bahn 5 und 6). Auch hier spiegelt sich die natürliche Varianz der Tiere wider.

Es ist erstaunlich, dass die Tiere keinerlei endogen gebildetes PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 auszuschleiden scheinen, obwohl im terminalen Stadium der Erkrankung im gesamten Darm der Tiere etliche Ablagerungen von PrP<sup>Sc</sup> zu finden sind, und der Dünndarm bereits viel früher prominent infiziert ist (Krüger et al., Manuskript in Vorbereitung). Die

Epithelzellen der Darmwand werden laufend erneuert und die abgestorbenen Zellen werden mit den Fäzes ausgeschieden. Da aber Fäzesproben sogar im terminalen Stadium konsistent negativ getestet wurden, scheint das abgeschilferte Epithel keine signifikante Menge PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 aufzuweisen, zumindest nicht so viel, dass es mit der hier angewendeten Methodik hätte nachgewiesen werden könnte.

Vor dem Hintergrund der skizzierten Befunde aus dem Hamstermodell erscheint es fraglich, ob eine horizontale Übertragung von einem Tier auf ein anderes über die Fäzes möglich ist, wie es z.B. für die natürliche Schafsscrapie (Maignien et al., 1999; van Keulen et al., 2000; Andréoletti et al., 2000) und CWD (Sigurdson et al., 1999; Spraker et al., 2002) vermutet wurde, auch wenn Untersuchungen von Miller (2004a) zeigten, dass Maultierhirsche, die in einem Gehege gehalten worden waren, in dem sich ca. 2 Jahre zuvor oral mit CWD infizierte Tiere (Williams und Miller, 2002, Sigurdson et al., 1999) aufhielten, ebenfalls an CWD erkrankten, ohne dass diese gesunden Tiere mit infizierten Tieren oder infiziertem Futter in Kontakt gekommen wären. In dem Bericht wird allerdings nicht ausgeführt, wann die Tiere nach der Infektion in das Gehege gebracht wurden. So würden die CWD-Ergebnisse gut mit unseren Befunden konsistent erscheinen, wenn die Maultierhirsche kurz nach ihrer peroralen Infektion auf das betreffende Gehege gebracht worden wären. Wenn nämlich diese Tiere signifikante Mengen des Inokulums mit den Fäzes ausgeschieden haben, könnte infektiöses Agens auf diese Weise in die Gehegeumwelt gelangt, und dort später von den gesunden Tieren mit dem Futter aufgenommen worden sein. Auch bei Untersuchungen an Schafen konnte eine Scrapie-Erkrankung zuvor gesunder Tiere festgestellt werden, wenn sie auf Weiden gebracht wurden, auf denen Jahre zuvor an Scrapie erkrankte Tiere gestanden hatten (Pálsson 1979). Bei Verfütterung von aufgereinigten Fäzesproben konnte dagegen keine Erkrankung der Empfängertiere festgestellt werden (Cunningham et al., 2004). Daher scheint bei Schafen im Feld eine Übertragung über die Plazenta, die nach der Geburt von der Mutter und anderen Schafen gefressen wird, und die PrP<sup>Sc</sup> enthält (Post et al., 1999; Tuo et al., 2001), wahrscheinlicher als eine Übertragung über Fäzes zu sein. Da bei einigen Versuchen in den Blots von Fäzesproben Banden auftraten, die den gesuchten Banden des PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 ähnlich schienen, wurden mehrere derartiger Proben von verschiedenen Zeitpunkten nach der Aufarbeitung mit PNGase F, einer Endoglykosidase, behandelt.

PNGase F baut die Zuckerreste des di- und monoglykolisierten PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 ab, so dass sich eine Bandenverschiebung auf die Höhe des nichtglykosilierten PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 ergibt. Mit diesem Versuch konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den

positiv bewerteten Banden der untersuchten Fäzesproben der ersten Tage nach der Verfütterung tatsächlich um PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 handelte (Abb. 22 Bahn 6 und 7).

Bei den in den Abbildungen 21 und 22 auftretenden distinkten Banden oberhalb des MG-Bereichs des PrP 27-30 handelte es sich um Proteinbanden des eingesetzten Enzyms, PNGase F. Diese Versuche bestätigten noch einmal die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihen. In keiner der terminalen Proben konnte PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 nachgewiesen werden (Abb. 21 Bahn 2/3 und 4/5 und Abb. 22 Bahn 4/5).

## **6.5 Extraktion von PrP<sup>Sc</sup> aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechselkäfigen nach Inokulation mit ME7-H und BSE (H) (Versuchsreihe 4)**

Da Hamster nach peroraler Erregerinokulation des Scrapie Stammes ME7-H bzw. des Hamster-adaptierten BSE-Stammes BSE-H nicht erkranken (Thomzig et al., 2004a), stellte sich die Frage, ob das PrP<sup>Sc</sup> dieser beiden Stämme vielleicht im Verdauungstrakt der Tiere vollständig abgebaut und somit inaktiviert werden. Nach Untersuchungen von Prusiner (1997) und Telling et al. (1996) scheinen die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften der verschiedenen Prionstämme in ihrer räumlichen Konformation, Aggregation und Glykosylierung verschlüsselt zu sein. Durch Variationen in der Sekundär- und Aggregatsstruktur könnte die unterschiedlich ausgeprägte Resistenz gegenüber Proteasen erklärt werden. Sollten die PrP<sup>Sc</sup> Moleküle der Stämme ME7-H und BSE-H leichter im Verdauungstrakt abgebaut werden, würden diese TSE-Isolate dementsprechend weniger infektiös sein. Die Infektionsdosis würde also bei oralem Übertragungsweg im Vergleich zum Scrapie-Stamm 263 K wesentlich höher sein. Da die Inkubationszeit u.a. von der Infektionsdosis abhängt (Kimberlin und Walker, 1977) könnte sich also bei Verfütterung der gleichen Menge an Hirnhomogenat die Inkubationszeiten für ME7-H und BSE-H im Vergleich zum 263 K wesentlich verlängern. Zur Überprüfung der gastrointestinalen Abbaukinetik verschiedener TSE-Isolate wurden die Versuche der Versuchsreihe 3 mit den Stämmen ME7-H und BSE-H teilweise wiederholt.

In den Abb. 23 und 24 ist allerdings kein signifikanter Unterschied in der Menge der Ausscheidung von PrP<sup>Sc</sup> über Fäzes zwischen Hamstern, die mit dem Scrapie-Stamm ME7-H inokuliert wurden, und denen, die mit dem Scrapie-Stamm 263 K infiziert wurden, zu erkennen. Ebenso scheiden die Hamster nach der Verfütterung des Stammes BSE-H in den ersten Stunden nach der Inokulation PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 aus (Abb. 25).



Die Menge des ausgeschiedenen PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 lag dabei offenbar sowohl bei ME7-H als auch bei BSE-H noch etwas höher als die des PrP<sup>Sc</sup>/PrP 27-30 beim Stamm 263K. Da bei allen Versuchen eine identische Menge an infektiösem Hirnmaterial zur oralen Infektion verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass bei den beiden zuletzt untersuchten Stämmen nicht wesentlich mehr PrP<sup>Sc</sup> im Verdauungstrakt abgebaut wurde als bei 263K.

Es ist daher davon auszugehen, dass die Nicht-Pathogenität der Stämme BSE-H und ME7-H nach peroraler Erregerverabreichung im Hamster, nicht auf einem verstärkten Abbau des PrP<sup>Sc</sup> im Verdauungstrakt der Tiere beruht, sondern auf bisher unbekannte zelluläre oder molekulare Mechanismen der Erregeraufnahme oder –replikation im Organsimus.

## 6.6 Immunhistochemische und PET-Blot Untersuchungen

Der Gastrointestinaltrakt hat eine sehr große Oberfläche, mit der er mit Antigenen und teilweise pathogenen Erregern in Kontakt steht. Neben unspezifischen Abwehrmechanismen (Schleimschicht der Mukosa, peristaltische Kontraktionen, Makrophagen) verfügt der Darmtrakt über ein eigenes Immunsystem, das so genannte „gut associated lymphatic tissue“ (GALT). Bestandteile des GALT sind u.a. die Peyer´schen Plaques, die im Ileum auftreten und aus aggregierten Lymphfollikeln bestehen (Gebbers und Laissue, 1989). Die Peyer´schen Plaques bestehen aus den Lymphfollikeln, die unter der Lamina muscularis mucosa liegen, und aus einem Keimzentrum und einer Korona, die das Keimzentrum umhüllt. Über den Lymphfollikeln befindet sich lumenseitig das „Dome-Areal“, das mit dem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) bedeckt ist (Abe und Ito, 1977). Charakteristisch für das FAE sind die M-Zellen, wobei das „M“ für „microfold bearing“ oder „membranous“ steht (Owen und Jones, 1974; Owen, 1977). Diese M-Zellen haben eine Schleusenfunktion. Sie nehmen Makromoleküle aus dem Darmlumen mittels Endozytose auf, transportieren diese in Vesikeln durch die Zelle und geben sie durch Exozytose weitgehend unverändert an der basolateralen Seite in den Interzellularraum wieder ab (Landsverk, 1981; Owen, 1982; Egberts et al., 1985; Owen et al., 1986; Wolf et al., 1987; Walker et al., 1988; Jones et al., 1994). Die Art und die Geschwindigkeit der Aufnahme hängen dabei von den aufzunehmenden Partikeln ab (Nicoletti, 2000). Auch für PrP<sup>Sc</sup> wird eine Aufnahme über das FAE vermutet (Andréoletti et al., 2000; Heggebø et al., 2000; 2003a). Ob dies über die M-Zellen (Ghosh, 2004) oder auf anderem Wege (Huang und MacPherson, 2004) geschieht ist noch unklar. So konnten auch im Zotten Epithel bei Affen (Lemuren), in dem es keine M-

Zellen gibt, PrP<sup>Sc</sup> Ablagerungen nachgewiesen werden (Bons et al., 1999). In Zellkultur konnte jedoch die Aufnahme von PrP<sup>Sc</sup> durch M-Zellen bereits nachgewiesen werden (Heppner et al., 2001). Der Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> im FAE ist dabei der einzige Nachweis für die transepitheliale Route.

Die Peyer'schen Plaques scheinen für eine Infektion mit Prion-Proteinen wichtig zu sein, denn Mäuse mit einer reduzierten Anzahl an Peyer'schen Plaques sind relativ resistent gegen eine Prion-Infektion (Prinz et al., 2003). Und auch bei Schafen konnte eine starke Ansammlung von PrP<sup>Sc</sup> in den Peyer'schen Plaques beschrieben werden (Andréoletti et al. 2000; van Keulen et al., 2002). Da in den Peyer'schen Plaques und im GALT von natürlich infizierten Scrapie-Schafen Ablagerungen von PrP<sup>Sc</sup> schon früh nachgewiesen werden konnten (Andréoletti et al., 2000; Heggebø et al., 2000), noch bevor der Erreger im ZNS auftrat (van Keulen et al., 1999), ist anzunehmen, dass die Erregeraufnahme oral erfolgte.

Bei Schafen wurde nicht nur im GALT und im ZNS, sondern auch im enterischen Nervensystem PrP<sup>Sc</sup> gefunden (van Keulen et al., 1999).

Eine frühe Ablagerung findet dabei in den Keimzentren der Follikulär dendritischen Zellen (FDCs, follicular dendritic cells) bei Menschen mit vCJK (Hill et al., 1999) und Mäusen mit CJK (Kitamoto et al., 1991), Schafen mit natürlicher Scrapie (van Keulen et al., 1996; Andréoletti et al., 2000) und Nagern, die über periphere Routen mit Scrapie infiziert wurden (McBride et al., 1992; Brown et al., 1999), statt. Während McBride 1992 aus dem Befund, dass in FDCs PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen zu finden sind, folgerte, dass dort auch viel PrP exprimiert werden müsse, zeigten andere Arbeitsgruppen in neueren Untersuchungen, dass dies weder bei Schafen (Austbø et al., 2006) noch bei Mäusen (Ford et al., 2002a) der Fall ist. Austbø folgerte daraus, dass entweder das PrP<sup>Sc</sup> im Dome gebildet und dann in die FDCs transportiert wird die Replikationsrate von PrP<sup>C</sup> so niedrig ist, dass es nicht nachgewiesen werden kann, oder dass, am unwahrscheinlichsten, die Replikationsrate von PrP<sup>C</sup> bei infizierten Tieren steigt (Austbø et al., 2006). Auch Makrophagen oder makrophagenähnliche Zellen wurden als Orte für eine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> identifiziert (van Keulen et al., 1996; Andréoletti et al., 2000; Beekes und McBride, 2000; Jeffrey et al., 2000).

Es ist bekannt, dass dendritische Zellen (DC, dendritic cells), ursprünglich im Knochenmark gebildete Zellen, in den Transport von Proteinen in die Peyer'schen Plaques und zu den mesenterischen Lymphknoten beteiligt sind (Liu und MacPherson, 1993; Banchereau et al., 2000). Bei Ratten konnte sogar schon gezeigt werden, dass dendritische Zellen PrP<sup>Sc</sup> aus dem Darmlumen ins Lymphgewebe transportieren (Huang et al, 2002).

Da DCs selbst PrP<sup>C</sup> exprimieren (Burthem et al., 2001), kommen sie, ebenso wie die FDCs auch als Ort für die Replikation und Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in Betracht (Aucouturier und Carnaud, 2002). Die DCs stehen dabei in engem Kontakt zu den M-Zellen (Halleraker et al., 1990; Press et al., 1992; Kelsall und Strober, 1996).

Die beobachteten Ablagerungen im myenterischen und submucosalen Plexus können mit der hohen PrP<sup>C</sup>-Expressionsrate zusammenhängen, die für Mäuse (Ford et al., 2002b) und Schafe (Heggebø et al., 2003b) beschrieben wurde.

Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob die an der Aufnahme des PrP<sup>Sc</sup> beteiligten Zellen, das aufgenommene PrP<sup>Sc</sup> auch wieder an das Darmlumen abgeben. Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Kenntnissen, lässt sich jedoch der Schluss ziehen, dass kein PrP<sup>Sc</sup> mehr, oder zumindest nicht in einer detektierbaren Menge, abgeben wird. Obwohl das PrP<sup>Sc</sup> an vielen Orten repliziert und akkumuliert wird, reichen die dabei ins Darmlumen gelangten abgeschilferten Zellen oder ggf. von M-Zellen wieder abgegebenes PrP<sup>Sc</sup> nicht aus, mit den vorhandenen Untersuchungsmethoden nachgewiesen zu werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Dünndarm der Hamster im terminalen Stadium untersucht. Die dabei festgestellten Befunde decken sich gut mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen von Beekes und McBride (McBride und Beekes, 1999; Beekes und McBride, 2000; McBride et al., 2001). Wie bereits in diesen Arbeiten für Hamster beschrieben, treten Ablagerungen des PrP<sup>Sc</sup> dabei vor allem am enterischen Nervensystem, in lymphoiden Follikeln und dem Follikel-assoziierte Epithel auf. Dass im Rahmen dieser Arbeit in den M-Zellen PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen gefunden wurde, ist ein Beleg dafür, dass diese Zellen in Kontakt mit dem PrP<sup>Sc</sup> gekommen sein müssen, da sie das PrP<sup>Sc</sup> vermehrt haben. Hingegen konnte in den Epithelzellen des Darms kein PrP<sup>Sc</sup> detektiert werden.

Da die PrP<sup>Sc</sup>-positiven Zellkomponenten tief im Darmgewebe liegen und nicht durch einfaches „Abschilfern“ in das Darmlumen gelangen können, ist so zu erklären, dass die Fäzes, abgesehen von dem Originalinokulum ca. 1-2 Tage nach der Erregervergabe, kein PrP<sup>Sc</sup> enthalten bzw. reichen die eventuell von M-Zellen wieder abgegebenen Mengen an PrP<sup>Sc</sup> nicht aus, um sie mit den vorhandenen Untersuchungsmethoden nachweisen zu können.

Nach diesen vorliegenden Erkenntnissen ist daher eine Übertragung mittels der Fäzes als sehr unwahrscheinlich einzustufen, so lange es keine Verletzung der Darmwand oder entzündliche Prozessen im Darm gibt. Bei Verletzungen der Darmwand, z.B. durch Verschlucken eines scharfkantigen Gegenstandes könnten Gewebe mit PrP<sup>Sc</sup>

Ablagerungen in die Fäzes und damit in die Umwelt gelangen. Je weiter die Infektion dabei schon fortgeschritten ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass bereits ein kleines Stück Darmgewebe dabei eine für eine Infektion ausreichende Menge an PrP<sup>Sc</sup> enthält. Auch entzündliche Prozesse im Darm könnten dazu führen, dass durch die erhöhte Immunaktivität mehr PrP<sup>Sc</sup> ins Darmlumen abgegeben wird.