

***In vitro* - Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-
assoziertem Prionprotein: Eine Alternative zu
Tierversuchen bei Desinfektionsstudien an Prionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sandra Pritzkow

Mai 2011

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter der Betreuung von PD Dr. Michael Beekes
in der Zeit vom 1. Juni 2007 bis 15. September 2011

Erster Gutachter: PD Dr. Michael Beekes, Robert Koch-Institut, Berlin
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup, Freie Universität Berlin

Disputation am: 14.07.2011

Paschtunisches Sprichwort:

„Die Geduld ist bitter, doch ihre Frucht schmeckt süß.“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Prionkrankheiten.....	8
1.1.2. Menschliche und tierische Prionerkrankungen	9
1.2. Die Natur des infektiösen Agens.....	12
1.3. Das Prionprotein.....	13
1.3.1. Aufbau und Biosynthese	13
1.3.2. Mögliche Funktionen des zellulären Prionproteins.....	19
1.3.3. Modelle zur Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc}	21
1.4. Verfahren zum Nachweis von Prionen und Prioninfektionen.....	23
1.4.1. Tiermodelle: Maus und Hamster	23
1.4.2. Zellbasierte Assays	24
1.4.3. Zellfreie Amplifikation von fehlgefaltetem, aggregiertem Prionprotein mittels „ <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i> “	25
1.5. Desinfektion von TSE-Erregern.....	28
1.6. Zielstellung	30
2. Materialien und Methoden	31
2.1. Materialien	31
2.1.1 Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel	31
2.1.2. Chemikalien	32
2.1.3. Lösungen und Puffer	34
2.1.4. Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, Immunokits und Enzyme	35
2.1.5. Medien.....	36
2.1.6. Antibiotika, Zusätze und Farbstoffe	38
2.1.7. Verbrauchsmaterialien.....	38
2.2. Methoden.....	40
2.2.1. Tierexperimentelle Methoden	40
2.2.1.1. Perfusion und Entnahme normaler Hamsterhirne für die PMCA	40
2.2.1.2. Herstellung von 10 %igem Hirnhomogenat uninfizierter Hamster.....	40
2.2.1.3. Herstellung von 10 %igem 263K Scrapie-Hamster-Hirnhomogenat.....	41
2.2.2. Biochemische Methoden	41
2.2.2.1. <i>In vitro</i> Stahlstift-Assay zur Priondesinfektion	41

2.2.2.2. Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA).....	43
2.2.2.2.1. Verfahren I - Basisprotokoll.....	43
2.2.2.2.2. Verfahren II - Optimierte zur Verwendung mit Stahlstiftprüfkörpern.....	44
2.2.2.2.3. Proteinase K - Verdau von PMCA Proben.....	45
2.2.2.3. SDS-PAGE und Western Blotting zum Nachweis des Prionproteins	46
2.2.3. Quantitative Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiften	48
2.2.3.1. Densitometrische Blot-Auswertung	48
2.2.4. Zellbiologische Methoden.....	48
2.2.4.1. Isolation von primären Gliazellen aus Hamstern	48
2.2.4.1.1. Beschichten von Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin	48
2.2.4.1.2. Präparation und Aussaat der primären Zellen	49
2.2.4.1.3. Passagieren primärer Gliazellkulturen	50
2.2.4.2. Isolation von primären Neuronenkulturen aus pränatalen Hamstern	50
2.2.4.3. Isolation von Neurosphären aus Hamstern.....	51
2.2.4.3.1. Präparation und Aussaat.....	51
2.2.4.3.2. Passage	51
2.2.4.4. Inokulation und nachfolgende Kultivierung.....	52
2.2.4.4.1. Primäre Gliazellen.....	52
2.2.4.4.2. Primäre Neuronen	52
2.2.4.4.3. Neurosphären	53
2.2.4.5. Zellernte	53
2.2.4.6. Proteinase K-Verdau von Zelllysaten	53
2.2.4.7. Deglykosylierung von PrP in Zelllysaten.....	54
2.2.4.8. Kern- und Immunfluoreszenzfärbung von Astrozyten und Mikroglia.....	54
3. Ergebnisse	56
3.1. Verfahrenstechnische PMCA-Optimierung im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der keiminduzierten Amplifikation von PrPres	56
3.1.1. Leistungsfähigkeit der PMCA vor verfahrenstechnischer Optimierung.....	56
3.1.2. Verbesserung der Keimfragmentierung zur Steigerung der PMCA-Qualität	58
3.1.3. Leistungsfähigkeit der PMCA nach verfahrenstechnischer Optimierung.....	61

3.2. Korrelation der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein mit biologischer Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion.....	64
3.2.1. Quantitative Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiftprüfkörpern	64
3.2.3. <i>In vitro</i> -Abschätzung und Bioassay-Validierung der Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion.....	69
3.3. Zellkultur.....	73
3.3.1. Entwicklung eines zellbasierten Assays zum biologischen Nachweis der Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins <i>in vitro</i>	73
3.3.1.1. Identifizierung eines für Scrapie-Keimaktivität suszeptiblen Zellkultursystems.....	73
3.3.1.2. Nachweis der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein in primären Gliazellkulturen aus Hamstern	75
3.3.1.2.1 Einfluss der Zelldichte	75
3.3.1.2.2 Einfluss der Kultivierungsdauer.....	76
3.3.1.2.2 Einfluss der Keimmenge	77
3.3.1.5. Nachweis der Keimaktivität von PMCA-Produkten im Zellkulturassay	78
3.3.1.6. Validierung der Identität des in der Gliazellkultur durch Scrapie-Keimaktivität amplifizierten Proteinase K-resistenten Proteins.....	79
4. Diskussion	82
4.1. Quantitativer PMCA-Assay zur Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion... ..	82
4.2. Abschätzung der Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion mittels quantitativer Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein	85
4.3. Zellbasierter Assay zum biologischen Nachweis Scrapie-assoziiertes Keimaktivität <i>in vitro</i>	88
4.4. Fazit und Ausblick.....	91
5. Zusammenfassung	93
6. Summary	95
7. Literaturverzeichnis.....	96

8. Anhang	106
8.1. Abkürzungsverzeichnis	106
8.2. Publikationsliste	111
8.3. Danksagung	112
8.4. Erklärung	113

1. Einleitung

1.1. Prionkrankheiten

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind übertragbare, tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen, die bei Menschen und Säugetieren vorkommen und durch Prionen verursacht werden (Prusiner, 1998b; Collinge, 2001).

Zu den bekanntesten tierischen TSE gehören die bei Rindern auftretende bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Scrapie bei Schafen und Ziegen und die chronische Auszehrung bei Zerviden (engl.: *Chronic Wasting Disease*, CWD). Die am häufigsten auftretende humane TSE ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK). Kennzeichnend für diese Erkrankungen sind eine monate- bis jahrelange symptomfreie Inkubationszeit und ein progressiver Krankheitsverlauf mit zentralnervösen Störungen wie unter anderem Ataxie und voranschreitende Demenz beim Menschen. Die Gehirne von betroffenen Individuen weisen histopathologische Veränderungen, insbesondere eine mehr oder weniger stark ausgeprägte schwammartige (spongiöse) Degeneration des Neuropils und Astrogliose, auf. Daneben treten pathologische Ablagerungen des Prionproteins (teilweise in Form von amyloiden Plaques) vor allem im Hirngewebe auf (Belay, 1999; Budka, 2003).

Typische histopathologische Merkmale einer sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK) sind in Abbildung 1 dargestellt. Eine eindeutige Diagnose der Krankheit erfolgt „*post mortem*“, also nach dem Tod, durch feingewebliche Untersuchungen (Kretzschmar *et al.*, 1996).

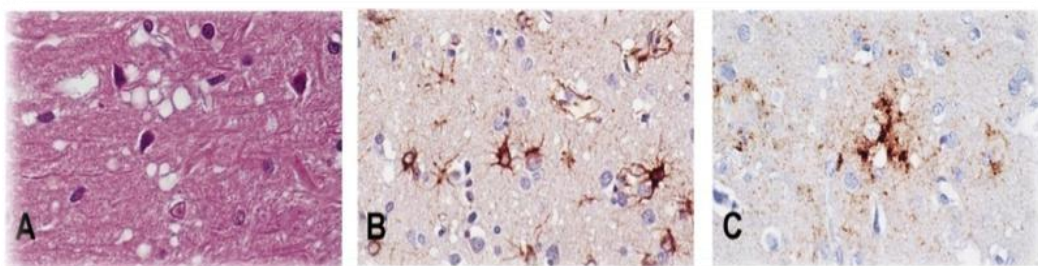


Abb. 1: Neuropathologische Merkmale einer sCJK: (A) Schwammartige Vakuolisierungen des Neuropils (Hämatoxylin-Eosin Färbung), (B) Aktivierung und Proliferation von Astrozyten (Astrogliose; GFAP-Färbung [engl.: *Glial Fibrillary Acidic Protein*]) sowie (C) Akkumulationen des pathologischen Prionproteins (PrP^{Sc}; Markierung mit einem anti-Prionprotein Antikörper) (aus: Glatzel & Aguzzi, 2001).

1.1.2. Menschliche und tierische Prionerkrankungen

Die Geschichte der Prionen und ihre Entdeckung begann, wie von McGowan (1922) beschrieben, im 18. Jahrhundert mit der erstmaligen Beschreibung einer TSE bei Schafen in Großbritannien (McGowan, 1922). Betroffene Individuen zeigten pathologische Verhaltensmuster, unter anderem ein exzessives „Kratzen“ des Felles und einen schwankend und trabend wirkenden Gang. Davon leitet sich auch die Bezeichnung „Scrapie“ (engl.: *to scrape* = kratzen) bzw. die im deutschsprachigen Raum gebräuchliche Bezeichnung „Traberkrankheit“ ab (Hörnlimann *et al.*, 2007). Durch Infektionsversuche mit Hirnmaterial von infizierten Schafen wurde die Infektiosität und Übertragbarkeit von Scrapie 1936 durch Cuillé und Chelle experimentell belegt (Cuillé & Chelle, 1936).

In den 1980er Jahren erlangte die bei Rindern vor allem im Vereinigten Königreich (VK) vorkommende bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) große Aufmerksamkeit, da es zu einer europaweiten epidemieartigen Ausbreitung dieser neuartigen Form von Prionerkrankung kam. Ihren Höhepunkt erreichte die auch als „Rinderwahnsinn“ bezeichnete BSE 1992 mit allein über 37.000 Neuerkrankungen im VK (Wells *et al.*, 1987). Bis Ende September 2010 wurden 184.611 bestätigte BSE Fälle im VK und bis Ende 2010 413 Fälle in Deutschland beobachtet (*World Organisation for Animal Health*, [OIE], 2010). Ursache der BSE-Epidemie war die Verfütterung von kontaminiertem Rinderkraftfutter. Dieses enthielt unzureichend behandeltes Tiermehl, welches möglicherweise von Scrapie-infizierten Schafen (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991) oder von spontan BSE entwickelnden Rindern stammte (Philipps *et al.*, 2000). Durch ein generelles Verbot der Verfütterung von Tiermehlen konnte die BSE-Epidemie kontinuierlich zurückgedrängt und eingedämmt werden ([OIE], 2010).

Das „*Chronic Wasting Disease*“ (CWD) ist eine Prionkrankheit bei Hirschartigen (Zerviden) und besitzt bei zunehmender Verbreitung in Nordamerika ein potentiell, bisher nicht abschließend zu beurteilendes Infektionsrisiko für den Menschen (Miller & Williams, 2004; Sigurdson *et al.*, 2006). Verschiedene Studien legen jedoch eine zumindest hohe Speziesbarriere für den Übergang von CWD auf den Menschen nahe (Kurt *et al.*, 2009; Barria *et al.*, 2011). Die Höhe der Speziesbarriere bestimmt die Effizienz der Übertragung einer TSE von einer Spezies auf die andere, wobei die Inkubationszeit und der symptomatische Verlauf der Erkrankung sich teilweise erheblich verändern können (DeArmond & Prusiner, 1996; Telling *et al.*, 1996; Asante & Collinge, 2001).

Die erste humane TSE wurde 1920/1921 von Hans Creutzfeldt und Alfons Jakob bei Patienten mit „Spastischer Pseudosklerose“ beschrieben. Sie wurde nach ihren Entdeckern als

Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) bezeichnet (Creutzfeld, 1920; Jakob, 1921). Man unterscheidet erworbene, spontane und erbliche Formen der CJK.

Die ohne erkennbare äußere Ursache auftretende spontane CJK (sCJK) zeigt eine Inzidenz von ca. 1 – 1,5 Fälle pro 1 Million Einwohner und Jahr und ist mit 85 % die am häufigsten auftretende CJK-Form (Collinge, 2001). Als Ursache für sCJK sind unter anderem sporadische somatische Mutationen im Gen für das Prionprotein (*PRNP* im Menschen, *Prnp* in der Maus) oder spontane Umfaltungen des zellulären Prionproteins denkbar (Aguzzi *et al.*, 2008). Die sCJK ist weltweit verbreitet und betrifft in der Regel Personen im fortgeschrittenen Lebensalter (≥ 60 Jahre).

Die familiäre CJK (fCJK) ist hereditär bedingt und beruht auf autosomal dominant vererbten Mutationen im Gen für das Prionprotein (Knight & Will, 2004; Hörnlimann *et al.*, 2007).

Fälle der erworbenen CJK sind auf medizinische Eingriffe, wie beispielsweise Hornhaut (Cornea)- und Hirnhaut (*Dura mata*)-Transplantationen von Spendern, die unerkannt eine CJK entwickelten, zurückzuführen (Duffy *et al.*, 1974). Außerdem verursachten aus Leichenhypophysen extrahierte Prion-kontaminierte Wachstumshormone und unzureichend sterilisierte chirurgische Instrumente weitere Fälle von erworbener, iatrogener CJK (iCJK) (Brown *et al.*, 1992; Brown, 2000; Knight & Will, 2004).

Seit Mitte der neunziger Jahre ist ferner eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) bekannt (Will *et al.*, 1996). Sie kommt im Gegensatz zur sporadischen Form vor allem in jungen Patienten vor (Median des Sterbealters: 28 Jahre) und ist mit einer im Vergleich zur sCJK relativ langen klinischen Phase von zum Teil mehr als 2 Jahren verbunden. Hirne von an vCJK Erkrankten weisen Ablagerungen des Prionproteins in Form von auffälligen floriden Plaques auf (Ironside, 1998; Belay, 1999). Weltweit wurden 224 vCJK-Fälle beschrieben, wovon allein im Vereinigten Königreich 175 (davon drei infolge von Bluttransfusionen) auftraten (*National CJD Surveillance Unit* [NCJDSU]; Edinburgh, Stand: März 2010). Dagegen wurde in Deutschland bisher noch kein Fall von vCJK gesehen (Beekes, 2010).

Für einen kausalen Zusammenhang BSE-kontaminierter Nahrungsmittel mit vCJK beim Menschen sprechen experimentelle Übertragungen von BSE auf Makaken (Lasmezaz *et al.*, 1996). Des Weiteren zeigten experimentelle Untersuchungen in Wildtyp- und transgenen Mäusen gleichartige PrP^{Sc}-Charakteristika, Inkubationszeiten, und histopathologische Befunde nach Infektion mit BSE- und vCJK-Erregern (Collinge *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Dies belegt, dass BSE und vCJK vom gleichen Prionstamm verursacht werden.

Eine weitere humane Prionerkrankung ist Kuru, welche 1957 von Gajdusek und Zigas bei Fore-Eingeborenen im östlichen Hochland von Papua-Neuguinea beobachtet wurde (Gajdusek & Zigas, 1957). Neuropathologische Ähnlichkeiten zwischen Kuru und Scrapie sowie zwischen CJK und Kuru deuteten auf eine grundsätzliche Verwandtschaft der Erreger dieser Krankheiten hin (Hadlow, 1959; Klatzo *et al.*, 1959). Kuru bedeutet „Muskelzittern“ und bezeichnet eine Erkrankung, die durch rituellen Kannibalismus, vor allem durch den Verzehr von Gehirnen Verstorbener, übertragen wurde. Ein epidemieartiger Ausbruch von Kuru wurde durch eine Rezirkulation des Erregers in der relativ kleinen Population der Fore begünstigt. Allerdings konnte die Übertragung von Kuru durch ein Verbot der kannibalistischen Riten durch die damaligen australischen Kolonialbehörden nachhaltig unterbrochen werden. Trotzdem gab es bis in die jüngste Vergangenheit noch vereinzelte Krankheitsfälle aufgrund extrem langer Inkubationszeiten von bis zu 50 Jahren (Collinge *et al.*, 2006).

Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) werden durch verschiedene Punkt-, Deletions- oder Insertionsmutationen des humanen Prionprotein-Gens (*PRNP*) hervorgerufen (Gerstmann, 1936; Lugaresi *et al.*, 1986). Sie weisen eine nur sehr geringe Inzidenz auf und werden autosomal dominant vererbt (Hsiao *et al.*, 1989).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten beim Menschen und bei Tieren vorkommenden Prionerkrankungen.

Tab. 1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tiere und Menschen.

Spezies	TSE-Erkrankung	Literatur
Mensch	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK); vier Formen: sCJK, fCJK, iCJK und vCJK	Creutzfeld, 1920 & Jakob, 1921; Knight & Will, 2004; Will <i>et al.</i> , 1996
	Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	Lugaresi <i>et al.</i> , 1986
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS)	Gerstmann, 1936
	Kuru	Gajdusek & Zigas, 1957
Rind	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Wells <i>et al.</i> , 1987
Schaf, Ziege	Scrapie	McGowan, 1922
Hirschartige (Zerviden)	Chronische Auszehrung bei Zerviden (CWD)	Williams & Young, 1980
Nerze	Übertragbare Enzephalopathie der Nerze (TME)	Burger & Hartsough, 1965
Hauskatze, Großkatze	Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Leggett <i>et al.</i> , 1990; Wyatt <i>et al.</i> , 1991; Willoughby <i>et al.</i> , 1992

1.2. Die Natur des infektiösen Agens

Über die Natur des infektiösen Agens transmissibler spongiformer Enzephalopathien gingen die Meinungen in der wissenschaftlichen Diskussion lange Zeit weit auseinander. Zunächst wurde aufgrund der langen Inkubationszeit der Krankheiten von einem „*Slow Virus*“ als möglichem Erreger ausgegangen (Sigurdsson, 1954; Diringer *et al.*, 1988; Diringer *et al.*, 1994). Andererseits zeigten Inaktivierungsversuche mit ionisierender und ultravioletter Strahlung, welche eine Modifikation oder Zerstörung von Nukleinsäuren hervorrufen, keine oder nur eine geringe inaktivierende Wirkung auf TSE-Erreger und widersprachen der Virus-Hypothese. Alper vermutete aufgrund der gegen Strahlung anscheinend resistenten Infektiosität einen Erreger ohne genomische Erbinformation (Alper *et al.*, 1967). Theoretische Überlegung von Griffith (1967) mutmaßten ferner, dass es sich bei dem infektiösen Agens um ein selbst-replizierendes Protein handeln könnte (Griffith, 1967). Mit Hilfe einer neuartigen biochemischen Isolationsmethode gelang es Prusiner und Kollegen aus Hirnextrakten experimentell Scrapie-infizierter Hamster ein Protein als Hauptkomponente des Erregers zu identifizieren (Prusiner *et al.*, 1982a). Auffälligerweise führten Behandlungen mit Substanzen,

welche Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung beeinflussen zur weitgehenden oder vollständigen Inaktivierung des infektiösen Agens (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1982b). Daraufhin postulierte Prusiner 1982 die Prion-Hypothese, wonach der Erreger von Scrapie keine Nukleinsäure besitzt und überwiegend, wenn nicht ausschließlich, aus einem Protein besteht. Er prägte den Begriff „Prion“ als Abkürzung für „*proteinaceous infectious particle*“ um diesen neuartigen unkonventionellen Erreger von Viren oder Bakterien abzugrenzen (Prusiner, 1982). Das den Hauptbestandteil von Prionen bildende Protein wurde als Prionprotein (PrP) bezeichnet.

Das in Hirnhomogenaten von Scrapie-infizierten Hamstern identifizierte pathologische Prionprotein bildet schwer lösliche Aggregate, die als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder "Prion-Rods" im Elektronenmikroskop erkennbar sind (siehe Abbildung 2) (Merz *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1983).

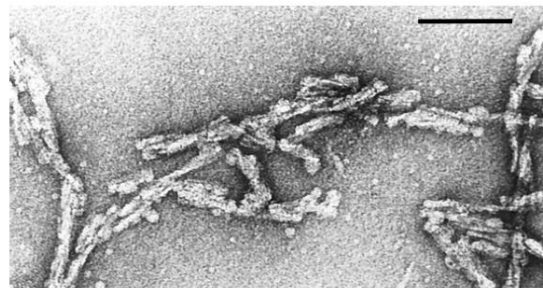


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Darstellung von „Prion-Rods“ (Prusiner *et al.*, 1998). Amyloide Fibrillen des pathologischen Prionproteins. Der Balken entspricht 100 nm.

1.3. Das Prionprotein

1.3.1. Aufbau und Biosynthese

Bei der Suche nach einer für das Prionprotein kodierenden Nukleinsäure wurde ein wirtseigenes chromosomales Gen identifiziert. Dieses wird sowohl in gesunden Lebewesen wie auch in Individuen mit prä- oder subklinischer sowie klinisch manifester TSE exprimiert (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985).

Man unterscheidet apathogenes, zelluläres Prionprotein (PrP^C), welches in verschiedenen Spezies von höheren Säugetieren (Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999; van Rheede *et al.*, 2003) aber auch in Vögeln (Gabriel *et al.*, 1992), Reptilien (Simonic *et al.*, 2000), Amphibien (Strumbo *et al.*, 2001) oder sogar bei Fischen vorkommt (Gibbs & Bolis, 1997;

Suzuki *et al.*, 2002) von pathologischem TSE-assoziiertem Prionprotein (PrP^{Sc}, Abkürzung abgeleitet von PrP-Scrapie) (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985). Eine schematische Darstellung des humanen PrP^C mit seinen posttranslationalen Modifikationen ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Das zelluläre Prionprotein ist innerhalb der Säugetiere evolutionär hoch konserviert (Basler *et al.*, 1986). Ein Aminosäurevergleich zwischen Mensch, Maus und Rind weist eine Sequenzidentität von über 90 % auf (Schätzl *et al.*, 1995). Es wird ab dem frühen Embryonalstadium in fast allen Geweben exprimiert, wobei die höchste Expression in Neuronen und Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) sowie im lymphatischen Gewebe zu finden ist (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986; Kretzschmar *et al.*, 1986a; Bendheim *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1995).

Das PrP^C ist ein 33 – 35 kDa schweres monomeres Glykoprotein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verknüpft ist (Stahl *et al.*, 1987). Das Protein besteht je nach Spezies aus 253 – 273 Aminosäuren (AS), wobei das humane PrP 253 AS umfasst (Kretzschmar *et al.*, 1986b). Über eine Signalerkennungssequenz erfolgt der kotranslationale Transport ins Endoplasmatische Retikulum (ER), wo molekulare Modifizierungen des Proteins erfolgen. Dort wird das PrP über zwei Asparaginreste glykosyliert und die Proteinfaltung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke stabilisiert (Turk *et al.*, 1988; Haraguchi *et al.*, 1989). Nach Abspaltung der Signalsequenz wird am C-Terminus ein GPI-Anker verknüpft (Stahl *et al.*, 1987; Choi *et al.*, 2006). Im Golgi Apparat werden die Kernglykane in komplexe Glykane modifiziert und es erfolgt ein vesikulärer Transport des PrP^C zur Zelloberfläche. Von dort aus kommt es zu einer Re-Internalisierung und einem nachfolgenden Abbau des PrP^C. Infolge seiner beiden Glykosylierungsstellen findet man un-, mono- und diglykosylierte Formen des PrP^C (Endo *et al.*, 1989). Des Weiteren weist PrP^C aminoterminal eine Oktarepeat-Region auf, welche aus mehreren hintereinander liegenden hoch konservierten glycinreichen Oktapeptidsequenzen besteht und vier Kupfer-Bindungsstellen enthält (Hornshaw *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997a; Aronoff-Spencer *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006). Zwei weitere Kupfer-Bindungsstellen befinden sich an carboxyterminal der Repeat-Region folgenden Histidin-Resten (Burns *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Thompsett *et al.*, 2005; Viles *et al.*, 2008).

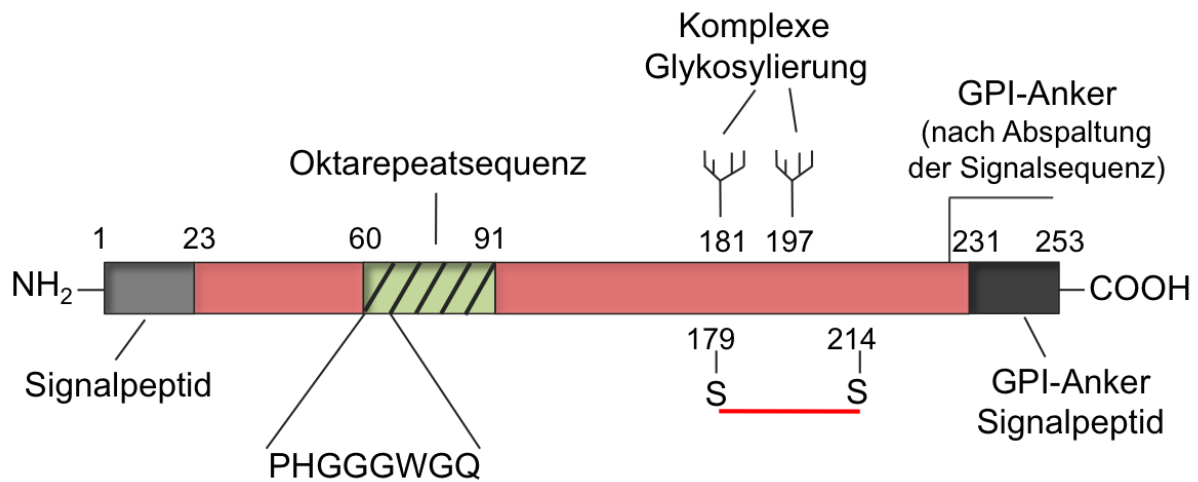


Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen zellulären Prionoproteins mit posttranslationalen Modifikationen. Das humane PrP^C besteht aus 253 AS und besitzt N- und C-terminale Signalsequenzen, die nach der Translation abgespalten werden. In der Folge kommt es zur Ausbildung eines GPI-Ankers am C-Terminus (Stahl *et al.*, 1987). Die in der Nähe des N-Terminus liegende Oktarepeat-Region (AS 60-91) enthält vier Wiederholungen einer glycinreichen Sequenz (PHGGGWGQ) (Burns *et al.*, 2003). Zwei Glykosylierungsstellen befinden sich an den Asparaginen 181 und 197. Zwischen den Cysteinen 179 und 214 wird eine Disulfidbrücke (S) ausgebildet (Choi *et al.*, 2006).

Die chemische Zusammensetzung von PrP^C und PrP^{Sc} ist bezüglich der Aminosäuresequenz und der posttranslationalen Modifikationen (GPI-Anker, Glykosylierungen) identisch (Stahl *et al.*, 1993; Rudd *et al.*, 1999). PrP^C und PrP^{Sc} weisen dennoch auffällige Unterschiede in biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften auf, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Beim PrP^C handelt es sich um ein monomer in der Zelle vorliegendes nicht-pathogenes Protein, welches in milden Detergenzien löslich ist und sensitiv auf den Verdau mit Proteinase K (PK) reagiert (Prusiner, 1998b; Riesner, 2003). Im Gegensatz dazu bildet das PrP^{Sc} Aggregate, die zum Teil als amyloide Fibrillen in den Gehirnen von TSE-befallenen Individuen nachgewiesen werden können (Merz *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1998). Des Weiteren ist PrP^{Sc} mit Prion-Infektiosität assoziiert, unlöslich in milden Detergenzien und partiell resistent gegenüber Proteinase K. Die Behandlung von PrP^{Sc} mit PK führt zur Freisetzung eines PK-resistenten PrP-Kerns mit einem Molekulargewicht von 27 – 30 kDa der als PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet wird (McKinley *et al.*, 1983; Barry *et al.*, 1986; Prusiner *et al.*, 1987). Auch PrP²⁷⁻³⁰ ist mit TSE-Infektiosität assoziiert (McKinley *et al.*, 1983; Prusiner *et al.*, 1987; Fischer *et al.*, 1996). In biochemischer Hinsicht wird PK-sensitives PrP auch als „PrPsen“ und PK-resistentes PrP als „PrPres“ bezeichnet (siehe Abb. 4).

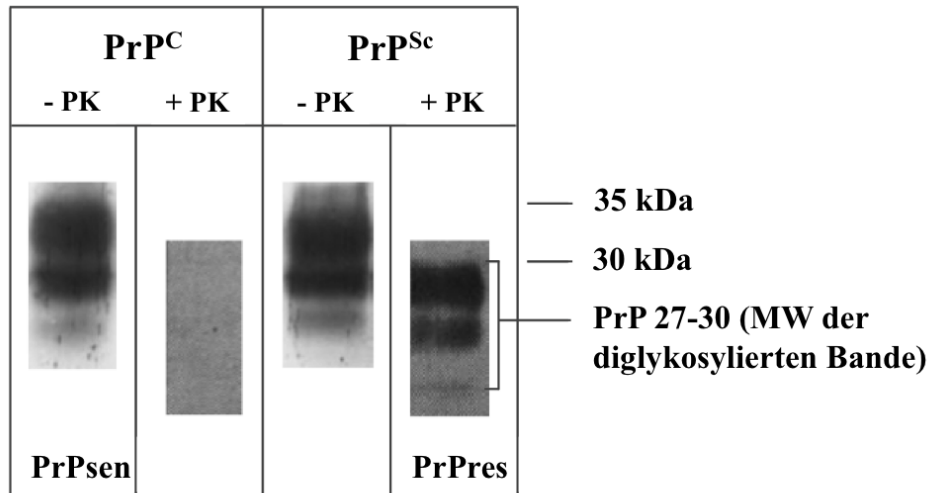


Abb. 4: Nachweis von zellulärem und pathologischem Prionprotein aus gesunden bzw. Scrapie-infizierten Syrischen Hamstern im Western Blot. Western Blot Befunde von Proteinase K verdautem (+ PK) und unverdautem (- PK) PrP^C (links) und PrP^{Sc} (rechts). PrP^C ist gegenüber einem Proteinase K Verdau sensitiv (PrPsen) und wird vollständig abgebaut, wohingegen PrP^{Sc} gegen PK partiell resistent ist und nach PK-Verdau im Western Blot ein PK-resistenter Kern mit einem Molekulargewicht von 27 – 30 kDa (PrPres) nachgewiesen wird.

Ferner weisen die normalen und pathologischen Formen des Prionproteins erhebliche Unterschiede in ihrer Raumstruktur auf, wie unter anderem infrarotspektroskopische Messungen zeigten. Danach besteht das Proteinase-sensitive Prionprotein aus 42 % α -Helix- und lediglich 3 % β -Faltblattanteil. PrP^{Sc} und PrP₂₇₋₃₀ besitzen hingegen ca. 30 % bzw. 21 % α -Helix- und 43 % bzw. 54 % β -Faltblattanteil (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993).

Tabelle 2: Übersicht über Unterschiede in biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von PrP^C, PrP^{Sc} und PrP27-30.

Eigenschaft	PrP^C	PrP^{Sc}	PrP27-30	Literatur
Sekundärstruktur	42 % α -Helix, 3 % β -Faltblatt	30 % α -Helix, 43 % β -Faltblatt	21 % α -Helix, 54 % β -Faltblatt	Pan <i>et al.</i> , 1993
Löslichkeit	löslich in milden Detergenzien	Unlöslich	unlöslich	Prusiner, 1998b; Riesner, 2003
Stabilität	thermo- und drucklabil, denaturierbar	sehr stabil, resistent gegen Hitze, UV- und γ -Strahlen	sehr stabil, resistent gegen Hitze, UV- und γ -Strahlen	Gibbs <i>et al.</i> , 1978; Brown <i>et al.</i> , 1990; Prusiner, 1998b
Proteinase K Sensitivität	vollständig abbaubar	partielle Resistenz	resistent gegen hohe PK- Konzentrationen	McKinley <i>et al.</i> , 1983; Prusiner <i>et al.</i> , 1987
Infektiosität	nicht infektiös	mit Infektiosität assoziiert	mit Infektiosität assoziiert	Riesner, 2007; Fischer <i>et al.</i> , 1996
Aggregat- zustand	Monomer	oligomere/ polymere Aggregate	oligomere/ polymere Aggregate	Prusiner <i>et al.</i> , 1998; Riesner, 2003

Mittels der Magnet-Kernresonanz-Spektroskopie (engl.: *Nuclear Magnetic Resonance [NMR-spectroscopy]*) konnte 1996 die Tertiärstruktur von murinem PrP^C im Detail aufgeklärt werden. Wie Abb. 5 zeigt, weist sie eine C-terminale globuläre Domäne mit drei α -Helices (rot/gelb gezeichnet) und zwei kleine antiparallele β -Faltblätter (hellgrün) sowie eine hoch flexible ungeordnete aminoternale Domäne auf (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997).

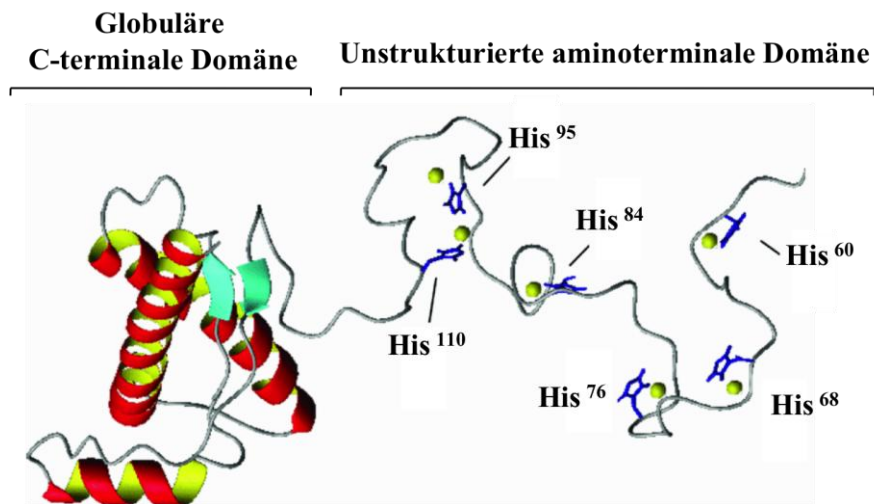


Abb. 5: Tertiärstruktur von PrP^C mit sechs Kupferbindungsstellen. NMR-Studien mit murinem PrP^C zeigten einen aus drei α -Helices und zwei kleinen antiparallelen β -Faltblättern bestehenden globulären Bereich und eine N-terminale unstrukturierte Domäne. Dort befinden sich sechs Histidine, die Kupferionen binden können (nach Viles *et al.*, 2008).

Die Strukturen von PrP^C aus weiteren Säugerspezies wie z.B. dem Goldhamster (Donne *et al.*, 1997), dem Rind (Lopez Garcia *et al.*, 2000), dem Schaf und dem Schwein (Calzolari *et al.*, 2005; Gossert *et al.*, 2005; Lysek *et al.*, 2005) sowie aus dem Menschen konnten inzwischen ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Zahn *et al.*, 2000). Die dreidimensionale Struktur der globulären Domäne des ovinen PrP war die erste PrP-Struktur, die durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde (Haire *et al.*, 2004).

Aufgrund der Unlöslichkeit der beiden pathologischen PrP-Formen PrP^{Sc} und PrP²⁷⁻³⁰ liegen für diese keine hochaufgelösten NMR-Strukturdaten vor. Wegen ihrer schlechten Kristallierbarkeit sind PrP^{Sc} und PrP²⁷⁻³⁰ auch einer hochauflösenden Röntgenstrukturanalytik nicht zugänglich. Allerdings konnten anhand von 2D-Kristallen des pathologischen Prionproteins elektronenmikroskopische Daten erhoben werden, aus denen mit Hilfe computergestützter Berechnungen dreidimensionale Strukturmodelle abgeleitet werden konnten. Danach wird eine Struktur, bestehend aus mehreren parallelen β -Faltblättern und zwei α -Helices angenommen. Diese Modellvorstellung und die daraus resultierende Fibrillogeneese sind schematisch in Abb. 6 dargestellt (Govaerts *et al.*, 2004).

Im mutmaßlich konversionsrelevanten Bereich des zellulären Prionproteins sind bei verschiedenen Spezies lokale Variationen der PrP-Struktur zu beobachten, die als mögliche Determinanten der Übertragbarkeit von Prion-Erkrankungen zwischen verschiedenen Spezies angesehen werden (Billeter *et al.*, 1997; Prusiner, 1998a). Dies scheint nicht zuletzt im

Kontext der Übertragbarkeit von BSE auf den Menschen von Bedeutung, da die PrP-Strukturen von Mensch und Rind hier nur geringe Unterschiede aufweisen (Lopez Garcia *et al.*, 2000).

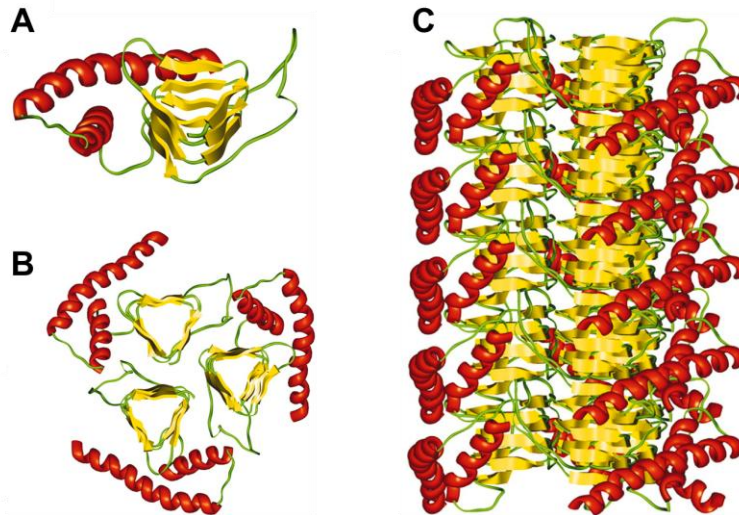


Abb. 6: Strukturmodell von PrP₂₇₋₃₀. Schematische Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur von monomerem PrP₂₇₋₃₀ (A), bestehend aus mehreren parallelen β -Faltblättern und zwei α -Helices. Durch Zusammenlagerung von drei Monomeren entstehen Trimere (B), die durch Stapelung unter Ausprägung intermolekularer Wasserstoffbrücken amyloide Fibrillen (C) ausbilden können (nach Govaerts *et al.*, 2004).

1.3.2. Mögliche Funktionen des zellulären Prionproteins

Für das PrP^C wurden inzwischen zahlreiche mögliche zelluläre Funktionen vorgeschlagen, von denen aber bisher keine definitiv bewiesen werden konnte. Für ein besseres Verständnis der Entstehung von Prionkrankheiten wären gesicherte Erkenntnisse zur physiologischen Funktion des Prionproteins möglicherweise hilfreich, da die pathologische Konformationsänderung von PrP^C einen Funktionsverlust des zellulären Proteins zur Folge haben könnte (Harris, 1999).

PrP⁻-,*knock-out*“-Mäuse (*Prnp*^{0/0}-Mäuse), die kein funktionsfähiges Priongen besitzen, zeigten in verschiedenen Studien keine atypische Verhaltensweisen oder Funktionsstörungen (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). In vertiefenden Untersuchungen wurden jedoch geringe Abnormalitäten bezüglich des Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *et al.*, 1996), des Geruchssinns (Le Pichon *et al.*, 2009) sowie bei der neuronalen Reizweiterleitung und

elektrischen Aktivität festgestellt (Collinge *et al.*, 1994; Whittington *et al.*, 1995; Colling *et al.*, 1996). Zusammengefasst deuten diese Befunde auf zelluläre Funktionen des PrP^C hin, welche durch andere Proteine kompensiert werden können (Premzl *et al.*, 2004; Hajj *et al.*, 2007).

Experimentelle Beobachtungen zur Kupferbindung des zellulären Prionproteins lassen eine mögliche Funktion als Cu²⁺-Transportprotein oder Regulator im Kupfermetabolismus vermuten (Brown, 2001; Cereghetti *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2001). Das PrP^C-Monomer besitzt mehrere Bindungsstellen für zweiwertige Kupfer-Ionen, die bei der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} verloren gehen. Dadurch kommt es zu einem Ausfall der Cu²⁺-Bindung des PrP, was möglicherweise zu einer verringerten Toleranz gegen oxidativen Stress führt. Experimentelle Untersuchungen mit PrP-defizienten Mäusen bestätigten diese Annahmen. Die betreffenden Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für oxidative Zellschäden bei hohen Cu²⁺-Konzentrationen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Unter anderem wird vermutet, dass die anti-oxidative Funktion der zellulären Cu/Zn-Superoxid-Dismutase infolge der fehlenden Kupferbindung bei PrP-defizienten Mäusen gestört ist (Brown *et al.*, 1997b; Brown *et al.*, 1999; Brown, 2001; Klamt *et al.*, 2001; Brown, 2002).

Des Weiteren wird eine Funktion von PrP^C bei der Signal-Transduktion angenommen, wodurch das Protein eventuell eine neuroprotektive Aktivität entfaltet (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Hugel *et al.*, 2004). Dabei wird gemutmaßt, dass das PrP^C als zellulärer Rezeptor für neuroprotektive Signale fungiert und somit durch direkte Inhibierung der Bax-induzierten Apoptose vor dem Zelltod schützen könnte (Chiarini *et al.*, 2002).

Darüber hinaus vermittelt das PrP^C die Aufnahme und den Transport von Eisen und könnte demzufolge eine wichtige Rolle für den Sauerstofftransport durch Hämoglobin im Körper spielen (Singh *et al.*, 2009).

Bemerkenswerterweise könnte das PrP^C gegebenenfalls auch eine Rolle bei der Alzheimer-Krankheit spielen. Nach Lauren *et al.*, (2009) kann es als zellulärer Rezeptor für Amyloid β -Oligomere fungieren, welche in erhöhten Konzentrationen im Gehirn eine synaptische Dysfunktion induzieren können und als eine mögliche Ursache der Alzheimer-Krankheit angesehen werden (Lauren *et al.*, 2009).

1.3.3. Modelle zur Konversion von PrP^C in PrP^{Sc}

Nach dem Protein-Only-Konzept der Prion-Hypothese ist die primäre Ursache für TSE die posttranslationale Konformationsänderung des wirtseigenen Prionproteins in die partiell Protease-resistente Isoform PrP^{Sc} (Prusiner *et al.*, 1990). Zwei der wichtigsten Modelle zur Erklärung dieses Umfaltungsprozesses werden im Folgenden vorgestellt und sind in Abb. 7 schematisch dargestellt.

Nach dem „*Heterodimer-Modell*“ von Prusiner (Prusiner *et al.*, 1990) erfolgt die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} in einem kinetisch kontrollierten Prozess. Spontane Umfaltungen finden demzufolge nur selten statt, da dazu eine sehr hohe Aktivierungsenergie nötig ist.

Im weiteren Verlauf werden Heterodimere aus von *de novo* entstandenem (bei sporadischen oder familiären TSE) oder exogen über Infektionen zugeführtem PrP^{Sc} mit PrP^C, mutmaßlich über einen metastabilen Übergangszustand (PrP*), ausgebildet. Im Ergebnis kommt es zur Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc}. Im weiteren Verlauf erfolgen, ähnlich wie bei einer Autokatalyse, weitere Rekrutierungen und Konversionen von PrP^C-Molekülen durch das neugebildete PrP^{Sc} (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994). Im Jahre 1998 wurde dieses Modell zum „*Template Associated Attachment-Model*“ erweitert, bei dem eine Stabilisierung des Übergangszustandes durch die Bindung eines zellulären Faktors (Faktor X) angenommen wird (Cohen & Prusiner, 1998).

Das alternative Modell der keimindizierten PrP-Polymerisation von Jarret und Lansbury (1993) geht zunächst von einem Gleichgewichtszustand zwischen PrP^C und PrP^{Sc} aus. PrP^{Sc} besitzt dabei in monomerer Form allerdings eine thermodynamisch ungünstigere Konformation, welche aber durch Bindung an einen Nukleationskeim stabilisiert werden kann. Die initiale Bildung dieses aus aggregierten PrP^{Sc}-Molekülen bestehenden „Keimes“ (primäre Nukleation) ist nach dem Modell ein spontan nur sehr selten auftretendes Ereignis.

Nach externer Zugabe eines PrP-Keimes durch Infektionen (bei erworbenen TSE) oder spontaner Entstehung von PrP^{Sc}-Keimen (spontane oder familiäre TSE) erfolgt jedoch eine schnelle Anlagerung weiterer PrP^{Sc}-Monomere unter Ausbildung polymerer PrP-Aggregate (Elongation). Durch Fragmentierung solcher Aggregate bei Erreichen einer kritischen Größe entstehen neue Polymerisationskeime (sekundäre Nukleation), die weitere Umwandlungen von PrP^C in fehlgefaltetes, aggregiertes PrP induzieren können.

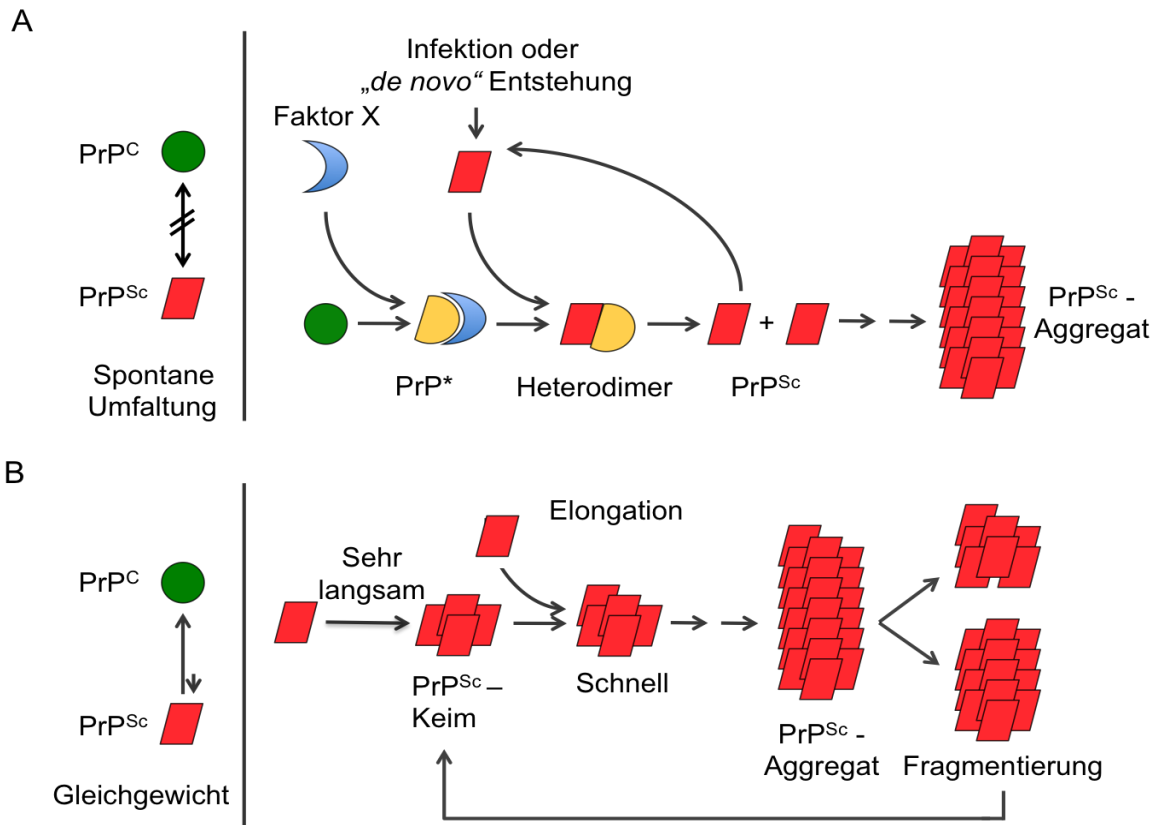


Abb. 7: Modelle zur Konversion von PrP^C in PrP^{Sc}.

- A. Das „Template Associated Attachment-Model“ nach Cohen & Prusiner (1998).** Bei diesem Modell treten sehr selten spontane Umfaltungen von PrP^C (grüner Kreis) in PrP^{Sc} (rotes Rechteck) auf, da dafür hohe Aktivierungsenergien nötig sind. PrP^{Sc} aus Infektionsereignissen oder *de novo* entstandenes bildet mit PrP^C Heterodimere. Dies erfolgt mutmaßlich über eine von einem unbekanntem zellulären Faktor X (blaue Sichel) stabilisierte, teildenaturierte Übergangsform (PrP*, gelber Halbkreis). Neugebildetes PrP^{Sc} kann weitere Umfaltungen von PrP^C-Monomeren induzieren und schließlich die Bildung amyloider Aggregate bewirken.
- B. Das Modell der keiminduzierte PrP-Polymerisation nach Jarrett & Lansbury (1993).** PrP^C (grüner Kreis) und PrP^{Sc} (rotes Rechteck) befinden sich als Monomere in einem Gleichgewicht, wobei PrP^C thermodynamisch stabiler ist. Infolgedessen kommt es nur sehr selten zur spontanen Entstehung eines stabilen Polymerisationskeims (primäre Nukleation). Durch Bindung an einen PrP^{Sc}-Nukleationskeim (*de novo* entstanden oder infolge einer Infektion zugeführt) wird zuvor monomeres PrP^{Sc} stabilisiert und weitere, schnelle Anlagerung von PrP^{Sc}-Monomeren werden induziert (Elongation). Ab Erreichen einer kritischen Größe der PrP^{Sc}-Aggregate kommt es zur Fragmentierung und somit zur Entstehung von Tochterkeimen (sekundäre Nukleation).

1.4. Verfahren zum Nachweis von Prionen und Prioninfektionen

Tiermodelle dienen seit Jahrzehnten dem Nachweis von TSE-Erregern sowie der Erforschung und Charakterisierung von TSE-Erkrankungen. Eine sinnvolle Ergänzung zu diesem „Goldstandard“ können hinsichtlich Schnelligkeit, Präzision und Probendurchlauf Zellkulturmodelle und *in vitro*-Amplifikationsassays für das pathologische Prionprotein sein.

1.4.1. Tiermodelle: Maus und Hamster

Die Entwicklung von Nagetiermodellen für Scrapie-Infektionen gelang durch experimentelle Übertragung von Scrapie-Isolaten aus kleinen Wiederkäuern auf die Maus 1961 durch Chandler (Chandler, 1961), sowie auf den syrischen Hamster (Goldhamster) 1975 durch Marsch und Kimberlin (Marsh & Kimberlin, 1975).

Unter Nutzung dieser Nagetiermodelle konnten erhebliche Fortschritte in der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese von TSE gewonnen werden (Kimberlin & Walker, 1988). Außerdem wurden diese Modelle in zahlreichen Studien zum qualitativen Nachweis von TSE-Infektionen sowie zur quantitativen Bestimmung infektiöser Prion-Dosen verwendet (Prusiner *et al.*, 1980; Dawson *et al.*, 1991). Das Tiermodell „Syrischer Hamster“ zeichnet sich gegenüber Wildtyp-Mausmodellen durch höhere Erreger-Titer im Gehirn sowie relativ kurze Inkubationszeiten aus (Kimberlin & Walker, 1988).

Nach der Übertragung infektiöser Prion-Isolate wurden unterschiedliche Prionstämme in der Maus identifiziert. Diese sind durch die Ausbildung charakteristischer Krankheits-Phänotypen bei gleicher PrP-Aminosäuresequenz gekennzeichnet (Fraser & Dickinson, 1973; Bruce & Fraser, 1991; Bruce, 1993).

In neueren Untersuchungen wurden biochemische und physikalische Eigenschaften der Prion-Stämme systematisch analysiert und kategorisiert. Biochemische Charakterisierungen basieren heute vor allem auf dem elektrophoretischen Migrationsverhalten des PrP²⁷⁻³⁰, seiner Glykosylierung (Bessen & Marsh, 1994; Collinge *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1996), und seiner relativen Proteinase K-Resistenz (Kascsak *et al.*, 1985; Kuczius & Groschup, 1999).

Zur Klärung der Funktion des PrP^C sowie für Transmissions- und Pathogenesestudien wurden zunehmend auch transgene Mausmodelle eingesetzt, die Modifikationen des PrP-Genes aufweisen. Dabei kommen transgene Mausmodelle ohne funktionsfähiges Prionprotein, (PrP^{0/0}-Mäuse) (Bueler *et al.*, 1993), wie auch solche die beispielsweise ovines (Crozet *et al.*,

2001), bovines (Scott *et al.*, 1997; Buschmann & Groschup, 2005), humanes (Telling *et al.*, 1995) oder Hamster PrP (Race *et al.*, 1995) exprimieren, sowie PrP-überexprimierende Mäuse zum Einsatz (Fischer *et al.*, 1996).

Trotz des großen wissenschaftlichen Wertes von Tiermodellen erscheint es wünschenswert, Tierversuche im Hinblick auf den erheblichen Pflegeaufwand, die hohen Kosten, den großen Zeitaufwand, den begrenzten Probendurchlauf und nicht zuletzt aus ethischen Gründen möglichst weitgehend zu ersetzen. Erst kürzlich wurde eine neue europäische Richtlinie zum Schutz von für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tieren erlassen, die dem Wohl von Tieren als ein Wert der Union weitergehend Rechnung trägt (Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, 2010) Daher kommt der Entwicklung von zellbasierten und zellfreien Modellsystemen *in vitro* zukünftig noch erheblichere Bedeutung zu.

1.4.2. Zellbasierte Assays

In der experimentellen Forschung stehen bisher nur relativ wenige für Prioninfektionen empfängliche Zellkulturmodelle zur Verfügung, die die Propagation von Prion-Stämmen unterstützen. Erste erfolgreiche Infektionsversuche an Maus-Neuroblastoma (N2a)-Zelllinien wurden Ende der 1980er Jahre von den Arbeitsgruppe von Chesebro und Prusiner durchgeführt (Race *et al.*, 1987; Butler *et al.*, 1988). N2a-Zellen unterstützten die Replikation von maus-adaptierten RML-Prionen und sind die bis heute am häufigsten in der Prionforschung verwendeten Zelllinien. Durch gentechnische Modifikationen von N2a-Zellen ist es auch gelungen, eine PrP^C-überexprimierende Zelllinie mit erhöhter Prionsuszeptibilität zu etablieren (Nishida *et al.*, 2000). Die neuronale GT1-Zelllinie konnte ebenfalls persistierend mit RML-Prionen infiziert werden und stellt ein weiteres *in vitro* Modell der Prionreplikation dar (Schätzl *et al.*, 1997). Im Jahre 2004 entwickelten Cronier *et al.* ein Infektionsmodell für ovine 127S-Scrapie-Prionen unter Verwendung von primären Zellen einer Schaf-PrP exprimierenden transgenen Maus (Cronier *et al.*, 2004).

Die genannten Zellkultursysteme bieten neue Möglichkeiten für die Erforschung von Prionen und Prionkrankheiten, allerdings im wesentlichen nur für mausadaptierte TSE-Erreger. Für Infektionsversuche mit Hamsterprionen wie beispielsweise dem häufig verwendeten 263K Scrapie-Stamm stehen nach nur einer bereits lange zurückliegenden Publikation auf diesem

Gebiet (Taraboulos *et al.*, 1990) bisher keine allgemein zugänglichen Zellkultursysteme zur Verfügung.

1.4.3. Zellfreie Amplifikation von fehlgefaltetem, aggregierten Prionprotein mittels „*Protein Misfolding Cyclic Amplification*“

Zum sensitiven *in vitro* Nachweis von PrP^{Sc}-Keimen sowie zum besseren Verständnis des Konversionsmechanismus des Prionproteins und der chemischen Zusammensetzung infektiöser Prionen wurde eine Technik entwickelt, die die Prionreplikation zellfrei im Reagenzgefäß nachstellt. Bei dieser Reaktion, der „*Protein Misfolding Cyclic Amplification*“ (PMCA), wird PrP^C durch die Keimaktivität von pathologischem Prionprotein in fehlgefaltetes, aggregiertes und Proteinase K-resistentes Prionprotein (PrPres) umgewandelt (Saborio *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2002). Die PMCA-Reaktion besteht aus einem sich wiederholenden zweiphasigen Zyklus, der sich aus einer bei 37 °C ablaufenden Inkubations- und Beschallungsphase zusammensetzt. Das Prinzip der PMCA ist in Abbildung 8 dargestellt. PrP^{Sc}-Polymerisationskeime werden in einem Überschuss an PrP^C (Hirnhomogenat uninfizierter Tiere) inkubiert. Dabei lagern sich strukturkonvertierte PrP^C-Monomere an PrP^{Sc}-Keime an. Durch Ultrabeschallung werden die so „gewachsenen“ PrPres-Aggregate fragmentiert, wodurch in der nachfolgenden Inkubation eine erhöhte Zahl von Keimen für die PrP-Konversion vorliegt. (Saborio *et al.*, 2001). Durch die mehrmalige Wiederholung dieser Zyklen in einem manuellen oder programmierbaren Ultraschallgerät wird PrP^C im Verlauf der PMCA effektiv in PrPres überführt, welches dann als Amplifikationsprodukt im Western Blot nachgewiesen werden kann.

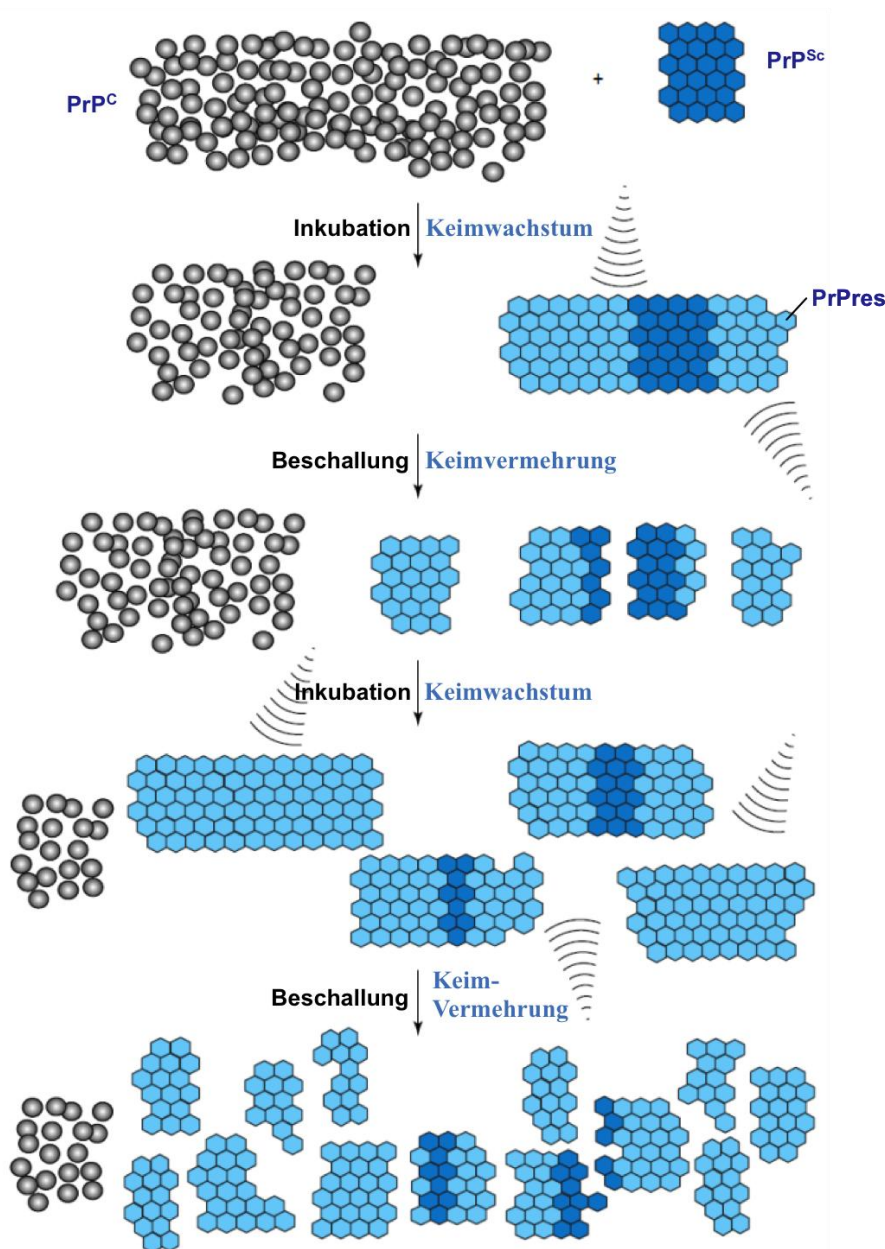


Abb. 8: Schematische Darstellung des Prinzips der PMCA (nach Soto *et al.*, 2002). Bei der PMCA werden PrP^{Sc}-Keime in einem Überschuss an PrP^C zyklischen Abfolgen von Inkubations- und Beschallungsphasen unterzogen. Dabei erfolgt in der Inkubationsphase das Wachstum PK-resistenter PrP-Aggregate durch Anlagerung von strukturkonvertierten PrP^C-Molekülen. In der darauf folgenden Ultraschallphase werden die Aggregate fragmentiert und neue Amplifikationskeime freigesetzt, die dann ihrerseits wieder unter Anlagerung von konvertiertem PrP^C zu größeren PrPres-Aggregaten heranwachsen.

Durch technische Verbesserungen wurde die PMCA in den vergangenen Jahren zur seriellen PMCA weiterentwickelt (Abbildung 9). Dabei wird ein Aliquot des PMCA-Reaktionsansatzes nach einer spezifischen Anzahl von Inkubation- und Beschallungsphasen in frisches

Hirnhomogenat von uninfizierten Spendertieren überführt und weiteren PMCA-Zyklen unterzogen.

In der seriellen PMCA kann der Ursprungskeim schließlich so stark verdünnt werden, dass das im Western Blot nachweisbare PK-resistente Prionprotein ausschließlich aus neugebildetem PrPres besteht. Auf diese Weise war es möglich eine zellfreie autokatalytische *in vitro*-Vermehrung von PrPres nachzuweisen (Bieschke *et al.*, 2004).

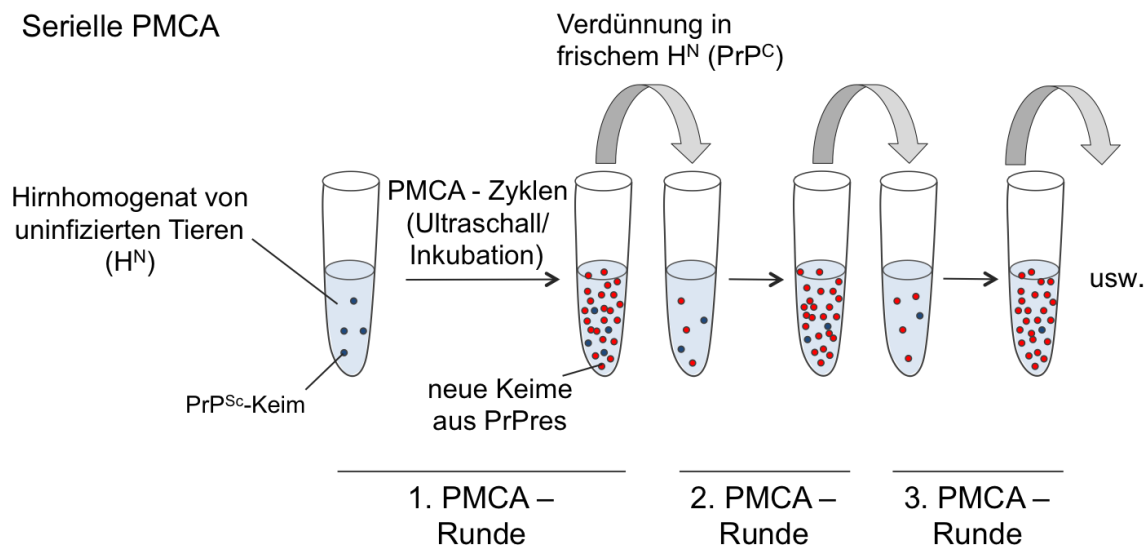


Abbildung 9: Schematische Darstellung der seriellen PMCA (nach Bieschke *et al.*, 2004, Caughey *et al.*, 2009). Ein Aliquot einer PMCA-Probe, welche bereits mehrere PMCA-Zyklen (Inkubation/Ultraschall) durchlaufen hat wird bei der seriellen PMCA in frischem PrP^C -haltigem Hirnhomogenat verdünnt und anschließend weiteren PMCA-Zyklen unterzogen. Dies kann im Prinzip unter „Herausverdünnung“ des Ursprungskeimes beliebig häufig durchgeführt werden.

Neuere Untersuchungen mit Hilfe der PMCA haben inzwischen gezeigt, dass für eine effiziente Amplifikation von $PrP^{Sc}/PrPres$ -Keimen neben PrP^C noch andere zelluläre Faktoren im Normalhirnsubstrat wie Nukleinsäuren, Lipide oder Glykosaminoglykane von Bedeutung sind bzw. sein können (Deleault *et al.*, 2003; Deleault *et al.*, 2007; Goggin *et al.*, 2007). So konnte beispielsweise durch Zusatz von RNA die Effizienz der PMCA in verschiedenen Studien deutlich gesteigert werden (Deleault *et al.*, 2003; Deleault *et al.*, 2005).

Anhand tierexperimenteller Studien konnte gezeigt werden, dass in der PMCA generiertes PrPres infektiös ist und in Reportertieren eine TSE-Erkrankung auslöst (Castilla *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006).

Im Prinzip lässt sich mit der automatisierten seriellen PMCA die Keimaktivität (engl.: *seeding activity*) von TSE-assoziiertem Prionprotein mit einer Sensitivität nachweisen, die der Erregertitration im Tierversuch um mehrere Größenordnungen überlegen ist (Bieschke *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006). Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch noch kein Verfahren publiziert, mit dessen Hilfe es möglich gewesen wäre, die Keimaktivität von TSE-assoziiertem Prionprotein mengenmäßig zu bestimmen und als quantitativen biochemischen Indikator für die biologische Prioninfektiosität zu nutzen.

1.5. Desinfektion von TSE-Erregern

TSE-Erreger zeichnen sich durch eine ungewöhnlich hohe Toleranz gegenüber konventionellen Verfahren zur chemischen und physikalischen Erregerinaktivierung aus (Taylor, 2000). Sie besitzen eine ausgeprägte Thermostabilität bei trockener Hitze und sind weitgehend resistent gegen ionisierende und ultraviolette Bestrahlungen (Brown *et al.*, 1990). Herkömmliche Desinfektionsmittel wie Formalin, Ethanol oder Aceton sind für die Inaktivierung ungeeignet. Alkohole haben sogar einen stabilisierenden und fixierenden Effekt auf TSE-Erreger (Taylor, 2000; Prior *et al.*, 2004). Dem gegenüber zeigen Reagenzien, welche Proteine degradieren oder denaturieren wie z.B. Natriumhydroxid (NaOH), Natriumhypochlorit (NaOCl) oder Guanidiniumthiocyanat (GdnSCN) eine starke Aktivität gegen Prionen (Brown *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1994; Manuelidis, 1997).

Humane TSE können zwar nicht durch bloßen Kontakt zwischen Menschen übertragen werden. Es besteht jedoch ein potentiell Risiko für Erregerübertragungen etwa durch kontaminierte chirurgische Instrumente (Lemmer *et al.*, 2008; Beekes *et al.*, 2010). In Deutschland werden jährlich ca. 14 Millionen Operationen und mehr als 3 Millionen diagnostische endoskopische Untersuchungen in Krankenhäusern durchgeführt. Hinzu kommen Operationen und invasive Eingriffe der ambulanten Chirurgie sowie Untersuchungen mit flexiblen Endoskopen in den Praxen niedergelassener Ärzte. Die dabei verwendeten Medizinprodukte werden im Sinne minimalinvasiver Chirurgie immer komplexer, mit schwer zu reinigenden und zum Teil nicht einsehbaren Oberflächen. Zudem nimmt die Zahl thermolabiler Medizinprodukte, die z. B. auch in der Neurochirurgie zum Einsatz kommen, zu. Die praktische Erfahrung zeigt, dass der Verdacht auf eine Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

oder andere potentiell übertragbare Krankheit nicht immer im Vorfeld von invasiven medizinischen Eingriffen geäußert wird bzw. werden kann.

Insgesamt stellt die Entwicklung materialverträglicher und für die Routineanwendung geeigneter Anti-Prion Desinfektionsmittel mit möglichst gleichzeitiger Wirkung auch gegen Bakterien, Viren und Pilze eine erhebliche Herausforderung dar. Bisher für Desinfektionszwecke eingesetzte Verfahren haben u. a. folgende Einschränkungen: Begrenztes Wirkungsspektrum, lange Einwirkzeiten/Prozesszeiten, proteinfixierende Eigenschaften, Belastungen für den Anwender, mangelhafte Materialverträglichkeit sowie begrenzte Stabilität der Formulierung. Wünschenswert wäre daher die Entwicklung von Formulierungen bzw. Verfahren, die diese Einschränkungen nicht, oder zumindest in deutlich geringerem Maße, aufweisen.

Mehrere Untersuchungen zeigten hohe Bindungsaffinitäten von Prionen an Stahl (Zobeley *et al.*, 1999; Flechsig *et al.*, 2001). Daher wurde in mehreren Dekontaminationsstudien mit Hilfe von Prüfkörper-Assays (in denen Stahlstifte die Oberfläche chirurgischer Instrumente simulierten) die Wirkung diverser Desinfektionsmittel gegen Anreicherungen des pathologischen Prionoproteins PrP^{Sc} getestet (Fichet *et al.*, 2004; Lemmer *et al.*, 2004; Fichet *et al.*, 2007). Am Robert Koch-Institut wurden von Lemmer *et al.*, (2004) bei diesen Untersuchungen 5 mm lange Stahlstifte durch Inkubation in 263K Scrapie-haltigem Hamsterhirnhomogenat kontaminiert, mit unterschiedlichen Dekontaminationsmitteln behandelt und dann auf die Ablösung, Degradation und Destabilisierung von PrP^{Sc} untersucht (Lemmer *et al.*, 2004). In einer Folgestudie wurden anschließend die Restinfektiositäten an den Stahlstift-Prüfkörpern im Hamster-Bioassay bestimmt (Lemmer *et al.*, 2008). Dabei zeigte sich, dass eine sehr effektive Dekontamination der Prüfkörper mit detergentenhaltigen alkalischen Lösungen (pH-Wert: 13) erzielt werden konnte. Aufbauend auf diese und andere Desinfektionsstudien an Prionen ist es vor kurzem gelungen, hamster-adaptierte Scrapie-Erreger erfolgreich als Modellpathogene für die Entwicklung neuer Formulierungen zur hochwirksamen Desinfektion auch von Bakterien, Viren und Pilzen zu nutzen (Lehmann *et al.*, 2009; Beekes *et al.*, 2010).

1.6. Zielstellung

Der sicheren Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten und Medizinprodukten kommt in Krankenhäusern und Arztpraxen sowohl für den vorsorgenden Patientenschutz als auch im Hinblick auf Kosteneffizienz eine herausragende Bedeutung zu. Dabei weisen Prionen aufgrund ihrer ungewöhnlichen Resistenz gegenüber herkömmlichen Inaktivierungsmethoden eine Sonderstellung unter den Krankheitserregern auf. Sie stellen deshalb einerseits hohe Anforderungen an die Desinfektion chirurgischer Instrumente, eignen sich andererseits aber gerade aus diesem Grunde auch als potentiell aussagekräftige Testerreger bei der Suche nach neuen Breitspektrumdesinfektionsmitteln mit gleichzeitiger Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze.

Vor diesem Hintergrund sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu leisten, die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Prioninfektiosität an praxisnahen Stahlstiftprüfkörpern ohne den Rückgriff auf Tierversuche zuverlässig bestimmen zu können. Zentrales Ziel war es, *in vitro*-Ersatzmethoden für Prion-Bioassays in Nagetieren bei Desinfektionsstudien an Prionen zu entwickeln und zu validieren.

Auf unterschiedlichen Wirkprinzipien beruhende Desinfektionsverfahren sollten zunächst *in vitro* auf ihre Wirksamkeit gegen die Keimaktivität (engl.: *seeding activity*) von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Prion-kontaminierten Stahlstiftprüfkörpern getestet werden. Mit Hilfe der *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) sollte die nach der Desinfektion an den Prüfkörpern verbleibende Keimaktivität des pathologischen Prionproteins mengenmäßig bestimmt und als möglicher quantitativer biochemischer Indikator für die Prioninfektiosität geprüft werden. Zusätzlich war beabsichtigt, ein Zellkultursystem zum biologischen *in vitro*-Nachweis residualer Keimaktivität des Prionproteins an Stahlstiftprüfkörpern aufzubauen.

Die nachgewiesene Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins sollte schließlich mit bereits früher erhobenen Bioassay-Daten zur Reduktion infektiöser Priontiter durch die verwendeten Desinfektionsverfahren verglichen werden, um auf diese Weise die Äquivalenz bzw. Überlegenheit der in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Verfahren im Vergleich zum Tierversuch abzuschätzen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel

Tabelle 3: Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel.

Gerät	Hersteller
Blotapparatur <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fast Blot 	Biometra (Göttingen, D)
CO ₂ -Inkubator <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hera Cell 150i 	Thermo Scientific (Langenselbold, D)
Elektrophoresesystem <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mini Protean III™ 	Bio-Rad (München, D)
Film-Entwickler <ul style="list-style-type: none"> ▪ Curix 60 	Agfa (Düsseldorf, D)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META (cLSM)	Carl Zeiss (Oberkochen, D)
HBSI Heizband	Roth (Karlsruhe, D)
Horizontalschüttler <ul style="list-style-type: none"> ▪ GFL 3016 ▪ Polymax 1040 ▪ Gyro Rocker SSL3 	Karow (Berlin, D) Heidolph (Schwabach, D) Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
pH-Meter <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH 211 Mikroprozessor 	Hanna Instruments (Aachen, D)
PMCA-Gerät <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sonicator 3000-MPD 	Misonix (Farmingdale, USA)
Potter Homogenisierer	BBraun (Melsungen, D)
Schüttelwasserbad <ul style="list-style-type: none"> ▪ Typ WNB22 + SV 1422 	Memmert (Schwabach)
Stabsonicator <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sonopuls HD 2070 	Bandelin (Berlin, D)

Gerät	Hersteller
Sterilbank <ul style="list-style-type: none"> ▪ Herasafe KSP 12 ▪ Herasafe KS 18 	Thermo Scientific (Langensfeld, D) Thermo Scientific (Langensfeld, D)
Sterilisationsapparatur <ul style="list-style-type: none"> ▪ Resistometer HP 	MMM Münchener Medizin Mechanik (Planegg, D)
Thermomixer <ul style="list-style-type: none"> ▪ Thermomixer Comfort ▪ Thermomixer Compact 	Eppendorf (Hamburg, D) Eppendorf (Hamburg, D)
Vortexgerät <ul style="list-style-type: none"> ▪ Model VF2 	Janke & Kunkel (Freiburg, D)
Waagen <ul style="list-style-type: none"> ▪ Model Excellent ▪ Model PC 4400 Delta Range 	Sartorius Research (Göttingen, D) Mettler-Toledo (Giessen, D)
Wärmeschränke <ul style="list-style-type: none"> ▪ Model T 5042 	Heraeus (Osterode, D)
Wasserbadsonicator <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sonorex RK 102 P 	Bandelin (Berlin, D)
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> ▪ Heraeus Labofuge 400 ▪ Heraeus Sepatech Varifuge 3.0R ▪ Heraeus Biofuge pico ▪ Optima max Ultrazentrifuge 	Thermo Scientific (Langensfeld, D) Heraeus (Osterode, D) Thermo Scientific (Langensfeld, D) Beckman Coulter (Fullerton, USA)

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien.

Reagenz	Hersteller
Acrylamid: Rotiphorese® 40 [37,5:1]	Roth, (Karlsruhe, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, D)
Cidex® OPA	Johnson & Johnson (Gargrave, UK)

Reagenz	Hersteller
D-(+)-Glucose; 99,5 % GC	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Guanidiniumthiocyanat (GndSCN)	Merck (Darmstadt, D)
Glutardialdehyd (25 %)	Merck (Darmstadt, D)
Glycin	Serva (Heidelberg, D)
Magermilchpulver	Sucofin
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Neodisher [®] Septo Clean (alkalischer Reiniger)	Dr. Weigert (Hamburg, D)
Paraffin Roti [®] Plast	Roth (Karlsruhe, D)
Peraclean [®] (Peressigsäure)	Evonik Degussa (Essen, D)
Phenylmethanesulfonylfluorid 0,1 M (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Poly-L-Lysin hydrobromid (MW70000-15000)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
1-Propanol	Merck (Darmstadt, D)
N-Lauroylsarcosin, 30 % (Sarcosyl)	Serva (Heidelberg, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tween 20 [®]	Serva (Heidelberg, D)

Die Chemikalien wurden in *pro analysis*-Qualität verwendet.

2.1.3. Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer.

Lösung/Puffer	Bestandteile
Assaypuffer	100 mM NaCl 100 mM Tris pH 9,5 mit HCl eingestellt
Blockierungspuffer	3 % (w/v) Magermilchpulver 0,05 % (w/v) Tween 20 ad TBS
Konversionspuffer	4 mM EDTA 1 % (v/v) Triton X-100 1 Tbl. Protease Inhibitor Cocktail Mini Mix auf 10 ml Puffer ad PBS pH 7,4 mit NaOH eingestellt
Laemmli-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin pH 8,3 – 8,7
2 x Laemmli-Probenpuffer (LPP)	125 mM Tris 4 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Glycin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) Mercaptoethanol pH 6,8 mit HCl eingestellt
PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 7,4 mit HCl eingestellt
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8 mit HCl eingestellt

Lösung/Puffer	Bestandteile
SDS/NaOH zur Desinfektion	0,3 % (w/v) NaOH 0,2 % (w/v) SDS pH \approx 13
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4 mit HCl eingestellt
TBST	0,05 % (w/v) Tween 20 [®] in 1 x TBS
Transferpuffer	48 mM Tris 38 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS pH 9,0 – 9,2 20 % (v/v) Methanol (vor Gebrauch zugesetzt)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 mit HCl eingestellt

Alle Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt.

2.1.4. Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, Immunokits und Enzyme

Tabelle 6: Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, Immunokits und Enzyme.

Reagenz	Hersteller
Alexa Fluor [®] 594 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen (Eugene, USA)
Alexa Fluor [®] 488 Goat Anti-Rat IgG	Invitrogen (Eugene, USA)
Goat Anti-Mouse IgG/AP	Dako (Hamburg, D)
CDP-Star [®] Tropix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
3F4 IgG	Eigene Hybridomazelllinie
Isolectin GS-IB ₄ aus <i>Griffonia simplicifolia</i> , Alexa Fluor [®] 488 conjugate	Invitrogen (Eugene, USA)
ICSM-18 IgG	D-Gen (London, UK)

Reagenz	Hersteller
Rat Anti-Mouse F4/80 IgG	AbD Serotec (Oxford, UK)
Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Dako (Hamburg, D)
Normal Goat Serum (NGS)	Dako (Hamburg, D)
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Roche (Mannheim, D)
PNGaseF	New England Biolabs (Beverly, USA)

2.1.5. Medien

Tabelle 7: Medien.

Zellmedium	Zusammensetzung
DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose	Biochrom AG (Berlin, D)
DMEM/HAM's F12 (1:1)	Biochrom AG (Berlin, D)
Gliazellen Isolation Medium (GIM)	10 % (v/v) FKS-Superior 0,6 % (v/v) D-Glukose 3 mM Natriumhydrogencarbonat 2 mM Glutamin Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
Gliazellen Wachstums Medium (GWM)	10 % (v/v) FKS-Superior 2 mM Glutamin Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin ad DMEM
Neurobasal™ Medium	Invitrogen (Eugen, USA)

Zellmedium	Zusammensetzung
Neuronenmedium	2 % (v/v) B27 2 mM Glutamin Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin ad Neurobasal Medium
Neurosphären-Medium (NSPM)	2 % (v/v) B27 10 mM HEPES 20 µg/ml Insulin (50 g in 4 mM HCl gelöst) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin 20 ng/ml EGF 20 ng/ml bFGF ad DMEM/Ham´s F12
PBS/Glukose	0,6 % (v/v) D-Glucose Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin ad PBS
PBS/Glukose/FKS	10 % (v/v) FKS-Superior 0,6 % (v/v) D-Glucose Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) 0,5 µg/ml Partrizin ad PBS

2.1.6. Antibiotika, Zusätze und Farbstoffe

Tabelle 8: Antibiotika, Zusätze und Farbstoffe.

Reagenz	Hersteller
B27	Invitrogen (Eugen, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roth (Karlsruhe, D)
Fötiales Kälberserum (FKS-Superior)	Biochrom AG (Berlin, D)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG (Berlin, D)
Partrizin (50 µg/ml)	Biochrom AG (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom AG (Berlin, D)
Rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF [0,1 µg/µl])	PAN Biotechnologie (Aidenbach, D)
Rekombinanter humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor - Basis (bFGF [0,1 µg/µl])	PAN Biotechnologie (Aidenbach, D)
Trypanblau 0,5 %	Biochrom AG (Berlin, D)
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom AG (Berlin, D)
TrypLE™ Select	Invitrogen (Eugen, USA)

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Edelstahldraht, ø 0,25 mm	Forestadent (Pforzheim, D)
PMCA <ul style="list-style-type: none"> ▪ Einmal Injektions-Kanüle, 20 G ▪ Einmalspritze Omnifix®-F, 1 ml ▪ Glasperlen, ø 0,75 – 1 mm 	Braun (Emmenbrücke, CH) Braun (Bad Arolsen, D) Roth (Karlsruhe, D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Reaktionsgefäße <ul style="list-style-type: none"> ▪ Safe Lock ▪ 1,5 ml ▪ 2 ml ▪ Ultrazentrifugen Gefäße 	Eppendorf (Hamburg, D) Brand (Wertheim, D) Roth (Karlsruhe, D) Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Röntgenfilme <ul style="list-style-type: none"> ▪ Amersham Hyperfilm™ ECL 	GE Healthcare Limited (Buckinghamshire, UK)
Transfermaterial <ul style="list-style-type: none"> ▪ Filterpapier ▪ PVDF-Transfermembran (Porengröße 0,45 µm) Development-Folder	Schleicher Schuell (Kent, UK) Millipore (Neu-Isenburg, D) Applied Biosystems (Foster City, USA)
Zellkultur <ul style="list-style-type: none"> ▪ 12 Well-Plates ▪ Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) ▪ Zellkulturflasche (175 cm², 75 cm²) ▪ Zellsieb, 40 µm Porengröße ▪ Deckplättchen rund, 20 mm ▪ Objektträger 76 x 26 mm 	TPP (Trasadingen, CH) TPP (Trasadingen, CH) Nunc (Roskilde, DK) BD Falcon (Bedford, USA) Roth (Karlsruhe, D) Engelbrecht (Edermünde, D)

2.2. Methoden

2.2.1. Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Arbeiten oder die Verwendung von Materialien aus Tieren erfolgten auf der Grundlage genehmigter Tierversuche bzw. registrierter Tötungsanzeigen und nach Maßgabe der Vorschriften und Richtlinien zum Tierschutz. Syrische Hamster beiderlei Geschlechts wurden von Charles River Laboratories erworben.

2.2.1.1. Perfusion und Entnahme normaler Hamsterhirne für die PMCA

Hirnhomogenate von nicht infizierten syrischen Hamstern dienten als PrP^C-haltiges Substrat für die PMCA. Die Hirnpräparation erfolgte in der Regel aus Hamstern im Alter von 12 – 15 Wochen. Da Blutreste in den Hirnen möglicherweise die PMCA-Reaktion beeinflussen können, wurde eine transkardiale Perfusion euthanasierter Spendertiere mit 30 ml einer 5 mM EDTA/PBS-Lösung (pH 7,4) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Hirne entnommen, mittels eines Einmalskalpells zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -70 °C.

2.2.1.2. Herstellung von 10 %igem Hirnhomogenat uninfizierter Hamster

Das Substrat für die PMCA-Reaktionen wurde immer frisch angesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten zügig und auf Eis, um eventuell im Homogenat ablaufende Abbauprozesse zu inhibieren. Zur Vermeidung von Prionkontaminationen aus der Laborumgebung wurden gestopfte Spitzen und Pipetten verwendet und das Potterbesteck vor der Nutzung 5 min in 0,2 % SDS/0,3 % NaOH behandelt. Die vorbereiteten Hirne wurden auf Eis aufgetaut und in 5 ml eiskaltem Konversionspuffer mittels des Potter Homogenisierers zu einer homogenen Lösung verarbeitet. Durch Auffüllen mit Konversionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 ml (1 Hamsterhirn hat eine Masse von ca. 1 g) wurde ein 10 %iges (w/v) Hirnhomogenat hergestellt, welches in einer Heraeus Varifuge 3.0 R für 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand der

Hirnhomogenate wurde gepoolt und anschließend in gebrauchsfertige Aliquots abgefüllt. Die Lagerung des Normalhirnhomogenates (H^N) erfolgte bis zur Nutzung bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.1.3. Herstellung von 10 %igem 263K Scrapie-Hamster-Hirnhomogenat

Syrische Hamster wurden intrazerebral (i.c) mit dem Hamster adaptierten Scrapie Stamm 263K inokuliert. Dabei wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ eines 10 %igen (w/v) Hirnhomogenats von an 263K Scrapie erkrankten Tieren verimpft. Nach durchschnittlich ca. 80 – 90tägiger Inkubationszeit *post infectionem* wurden die Hirne im klinischen präterminalen Erkrankungsstadium isoliert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Herstellung von 10 %igem (w/v) Hirnhomogenat aus an 263K Scrapie erkrankten Hamstern als Keimmateriale für die PMCA erfolgte unter einer Sicherheitsbank der Stufe 2. Die bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Hirne wurden aufgetaut, in 4 ml TBS mittels eines Stabsonicators beschallt bis eine homogene Lösung entstanden war. Das Homogenat wurde mit TBS auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt und anschließend aliquotiert. Die Lagerung des Scrapie-Hirnhomogenats (H^S) erfolgte bis zum Gebrauch bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Zur Mengenangabe wurde die Einheit „Hirnäquivalent“ (HÄ) definiert. 1 HÄ entspricht 1 g Hamster-Hirngewebe, welches bei einem terminal an Scrapie erkrankten Tier etwa $100\text{ }\mu\text{g}$ PrP^{Sc} enthält (Beekes *et al.*, 1996). Entsprechend des Molekulargewichtes von PrP sind dies circa 2×10^{15} PrP^{Sc}-Moleküle.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. *In vitro* Stahlstift-Assay zur Priondesinfektion

Für die Testung der Wirksamkeit von Desinfektionsmittelformulierungen wurden Prüfkörper aus Edelstahl zur Simulation der Oberfläche chirurgische Instrumente verwendet.

Der Edelstahldraht wurde in 5 mm lange Stifte geschnitten und in 2 %igem (v/v) Triton X-100 für 15 min zur Reinigung mittels eines Wasserbadsonicators ultrabeschallt. Im Anschluss wurden die Prüfkörper mit destilliertem Wasser mehrfach gewaschen, getrocknet und in einem Dampfautoklaven bei $121\text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min sterilisiert.

Die nachfolgenden Arbeiten fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt. Um eine Kontamination von chirurgischen Instrumenten mit Prionen im Prüfkörper-Assay zu

simulieren wurden die Stahlstifte mit H^S inkubiert. Gruppen von 15 Test-Stahlstiften wurden jeweils in 100 μ l 10 %igem H^S für 2,5 h bei 37 °C und 700 rpm in einem Thermomixer geschüttelt. Kontroll-Stifte wurden in 10 %igem H^N , und Referenz-Stifte in seriellen 1:10-Verdünnungen von H^S (mit 10^{-1} bis 10^{-9} HÄ/ml) wie oben genannt inkubiert. Nach Entfernung des Homogenats wurden die Test-, Kontroll- und Referenzstifte in Petrischalen überführt, vereinzelt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Teststifte mit den zu prüfenden Desinfektionsmittelformulierungen behandelt. Die Desinfektion erfolgte in einem Volumen von 1,5 ml und wurde entsprechend der in Tabelle 10 aufgeführten Temperaturen und Inkubationszeiten in einem Thermomixer bei 700 rpm durchgeführt. Im Anschluss wurden die Stahlstifte unter ständigem Schütteln mit destilliertem H_2O gewaschen. Dies erfolgte einmal für 1 min und weitere viermal für 10 min in einem Volumen von 45 ml. Danach erfolgte eine erneute Vereinzelung in Petrischalen und Trocknung der Stifte über Nacht unter der Sterilbank. Zur Untersuchung der Keimaktivität wurden die Test-, Kontroll- und Referenzstifte in mit Glaskügelchen vorbereitete PMCA Reaktionsgefäße einsortiert und bei -70 °C bis zum Start der PMCA gelagert.

Tabelle 10: Überblick über die Desinfektionsverfahren, denen die mit 263K Scrapie Hirnhomogenat kontaminierten Prüfkörper unterzogen wurden.

Reagenz	Konzentration	Zeit (min)	Temperatur (°C)
NaOH	1 M	60	23
NaOCl	2,5 % (v/v)	60	23
Guanidiniumthiocyanat	4 M	10	23
SDS/NaOH	0,2 %/0,3 % (w/v)	5	23
		10	23
SDS/NaOH/Propanol	0,2 %/0,3 % (w/v)/ 20 % (v/v)	10	23
Alkalischer Reiniger	1 % (v/v)	60	23
	0,5 % (v/v)	5	55
		10	55
SDS	5 % (w/v)	60	90
		60	23
Glutardialdehyd (pH 7,0), mit 0,1 M Phosphatpuffer	2 % (v/v)	10	55
Glutardialdehyd (pH 4,6)	2 % (v/v)	10	23
Cidex® OPA	100 % (v/v)	10	23
Peressigsäure	0,25 % (v/v)	60	23

2.2.2.2. Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)

2.2.2.2.1. Verfahren I – Basisprotokoll

Als Grundlage für die PMCA dienten publizierte Arbeiten von Saborio *et al.*, (2001), Soto *et al.*, (2002), Bieschke *et al.*, (2004) und Weber *et al.*, (2006). Das Substrat der PMCA, 10 %iges Hamster-Hirn-Homogenat (H^N), wurde für das Basisprotokoll aus frisch perfundierten und auf Eis gelagerten Hirnen hergestellt. Die in 10 ml Konversionspuffer homogenisierten Hirne wurden für 10 sec bei 1000 rpm zentrifugiert und vereinigt. Um identisches PMCA-Substrat für mehrere Experimente zur Verfügung zu haben wurden H^N -Pools aus bis zu 100 Hirnen hergestellt.

Eine PMCA-Reaktion bestand aus repetitiven Zyklen von 59 min Inkubation und 40 sec Beschallung. 48 Zyklen bildeten eine PMCA-Runde, in deren Anschluss eine 1:5 Verdünnung

der Probe in frischem 10 %igem H^N und somit ein Herausverdünnen des ursprünglichen Keimmaterials bewirkt wurde. Pro PMCA-Experiment wurden in der Regel jeweils 7 – 10 Runden à 48 Zyklen durchgeführt. Die Beschallung bei 160 Watt erfolgte in einem Probenhalter im Misonix 3000 Beschallungsgerät. Dabei befanden sich die Proben in einem auf 37 °C temperiertem Wasserbad, in dem der Ultraschallkopf des Beschallungsgerätes montiert war. Die Temperaturkontrolle erfolgte hier über einen Wasserkreislauf, bei dem das Wasser mittels einer Pumpe kontinuierlich zwischen dem Ultraschallgerät und einen Thermostaten umgewälzt wurde.

Die initialen Probenansätze in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen bestanden zu Beginn der PMCA aus 10 µl einer seriellen Verdünnung von H^S mit 10^{-6} bis 10^{-10} HÄ Keimmaterial und 90 µl eines 10 %igen H^N .

2.2.2.2.2. Verfahren II – Optimierte zur Verwendung mit Stahlstiftprüfkörpern

Bei der aus dem Basisprotokoll zur Verwendung mit Stahlstiftprüfkörpern weiterentwickelten PMCA wurden vier Amplifikationsrunden mit jeweils 24 seriellen Zyklen – bestehend aus 59 min Inkubationszeit und 40 Sekunden Beschallung bei 180 Watt – durchgeführt.

Das 10 %ige H^N wurde wie unter Punkt 2.2.1.2. beschrieben, hergestellt. Während der PMCA wurden die Proben in einer Halterung in einem mit 4 M Guanidiniumthiocyanat gefüllten Beschallungszyylinder fixiert. Ein um den Zylinder gewickeltes Heizband mit Thermostat, und die Verwendung der Ultraschallgeräte ausschließlich in klimatisierten Räumen sorgten für eine gleichbleibende Temperatur von 37 °C.

Autoklavierte 0,5 ml Safe Lock-Tubes dienten als Reaktionsgefäße und wurden mit Glaskügelchen (\varnothing 0,75 – 1 mm), die einem Volumen von 30 µl entsprachen, befüllt. Diese waren zuvor fünfmal mit doppelt destilliertem H_2O gewaschen und bei 121 °C für 20 min autoklaviert worden.

Als Amplifikationskeim fungierten die im Stahlstift-Assay beladenen Test-, Kontroll- und Referenzstahlstifte. Diese wurden in 150 µl 10 %igem H^N aufgenommen und der PMCA unterworfen. Für die Beladung der Referenzstifte wurde H^S , welches vorher 40 sec beschallt wurde, in seriellen 1:10-Verdünnungen (mit 10^{-1} bis 10^{-8} HÄ/ml) verwendet. Dabei bestand der Probenansatz der Referenzstifte aus jeweils 10 µl „Keim“ (H^S) und 140 µl Substrat (H^N). Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Prionen aus der Laborumgebung wurden die Proben mit Parafilm umwickelt und mit geschmolzenem Paraffin-Wachs versiegelt. Nach

Aushärtung des Wachses wurden die Probengefäße in 0,2 % SDS/0,3 % NaOH-Lösung für 5 min inkubiert.

Weitere Maßnahmen zur Vermeidung von Probenkontaminationen mit Prionen aus der Laborumgebung waren die Verwendung von gestopften Pipettenspitzen und das Wechseln der Handschuhe jeweils vor der Bearbeitung einer neuen Probe.

Nach jeweils 24 Zyklen wurde die PMCA-Ansätze 1:5 in frischem 10 %igem H^N verdünnt. Die Probengefäße wurden dabei erneut mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH-Lösung desinfiziert und anschließend für 10 sec in einer Heraeus Labofuge 400 zentrifugiert. Nach Punktierung des Probengefäßdeckels mit einer sterilen 20 Gauge Einmal-Kanüle wurden 30 μ l Probenflüssigkeit abgenommen und in ein neues mit Glaskügelchen und 120 μ l 10 %igem H^N gefülltes Safe-lock Gefäß überführt. Weitere 30 μ l dienen zum Nachweis des neu gebildeten PrPres und wurden einem PK-Verdau unterzogen. Für weitere PMCA-Zyklen wurden die Probengefäße erneut mit Parafilm und Paraffin versiegelt und wiederum 5 min mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH behandelt.

2.2.2.2.3. Proteinase K - Verdau von PMCA Proben

Um zwischen zellulärem und fehlgefalteten, aggregierten und Protease-resistenten PrP unterscheiden zu können wurde eine Proteinase K Behandlung durchgeführt. Dabei wird PrP^C vollständig abgebaut, während PrPres nach der PK-Behandlung im Western Blot mit einer Hauptbande im Molekulargewichtsbereich von 27 – 30 kDa detektiert werden kann.

Für den PK-Verdau wurden PMCA Proben für 1 h bei 55 °C und 450 rpm im Thermomixer unter Anwesenheit von 1 % (v/v) Sarcosyl, 0,06 % SDS und 150 μ g PK (30 μ l PMCA-Probe, 6 μ l PK [1 mg/ml], 3 μ l 13 % Sarcosyl, 0,6 μ l 4 % SDS) inkubiert, und im Anschluss 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert um störende Aggregate zu entfernen.

Zur Inaktivierung der Proteinase K und Denaturierung des Prionproteins wurden 30 μ l der PK-verdauten Ansätze mit 30 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 99 °C und 450 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 2,5 mM PMSF (1,5 μ l einer 0,1 M Lösung) zur Probe gegeben und diese bei -20 °C bis zur Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting eingefroren.

2.2.2.3. SDS-PAGE und Western Blotting zum Nachweis des Prionproteins

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche, denaturierende SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Die Elektrophorese wurde mit einem 5 %igen Sammelgel und einem 12,5 %igen Trenngel durchgeführt.

Tabelle 11: Gelzusammensetzung für 2 Gele der SDS-PAGE

Bestandteile	12,5 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel
H₂O	4,3 ml	6,15 ml
Acrylamid (40 % [w/v])	3,1 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	
Sammelgelpuffer		2,5 ml
SDS (20 % [w/v])	50 µl	50 µl
APS	30 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 11 aufgezeigt. APS und TEMED wurden erst kurz vor dem Gießen dazugegeben, um die Polymerisationsreaktion zu starten. Das Trenngel wurde vorsichtig mit ddH₂O überschichtet und bei 60 °C im Wärmeschrank für 30 min auspolymerisiert. Das im Anschluss gegossene Sammelgel wurde im Wärmeschrank für 10 min verfestigt. Die Gele wurden sofort verwendet oder im Kühlschrank in feuchte Tücher gehüllt bis zum nächsten Tag gelagert.

Die Laufkammern wurden mit Elektrophoresepuffer befüllt, 10 µl der Proben in Laemmli-Probenpuffer in die Geltaschen pipettiert und die Auftrennung bei 15 mA pro Gel gestartet. Nachdem die blaue Bromphenol-Lauffront das Sammelgel passiert hatte, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Der Lauf wurde beendet sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Zusätzlich zu den Proben wurden eine Positivkontrolle (Scrapie-Hirnhomogenat mit 1×10^{-6} HÄ/ml Keimaktivität) und ein Proteingrößenstandard (Low Molecular Weight-SDS Marker, GE Healthcare) mitgeführt.

Zum Western Blot-Nachweis wurden die Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel über Elektroelution mit Hilfe des „semi-dry“ Verfahrens auf aktivierte PVDF Membranen mit einer Porengröße von 0.45 µm übertragen. Dazu wurde die PVDF

Membran zunächst kurz mit Methanol behandelt und anschließend zusammen mit den Filterpapieren in Transferpuffer getränkt. Für das Blotverfahren wurde ein „Sandwich“ aufgebaut, der aus folgenden Lagen bestand. Unterste Lage in der Blotkammer war eine Filterpapierschicht, gefolgt von der aktivierten Membran, auf die das in Transferpuffer kurz gewaschene Gel gelegt wurde. Den oberen Abschluss des „Sandwichs“ bildete eine weitere Filterpapierlage. Blasen wurden aus den Filterpapierlagen herausgedrückt und anschließend der Lauf gestartet. Der Protein-Transfer erfolgte je nach Blotting-Kammer bei einer Stromstärke von 180 mA (8 Watt Kammer) bzw. 200 mA (10 Watt Kammer) für 25 bzw. 20 min. Im Anschluss wurden die Membranen für 1 h in Blockierungspuffer unter ständigem Schwenken inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Der monoklonale anti-PrP-Antikörper 3F4 wurde 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Blotmembran gegeben. Am nächsten Tag wurde nichtgebundener Antikörper durch dreifaches kurzes Waschen mit TBST und dreimaliges Waschen für 10 min in Blockierungspuffer entfernt. Der 1:5000 in Blockierungspuffer verdünnte Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte Sekundärantikörper Goat Anti-Mouse IgG wurde für 1,5 h bei RT auf die Blotmembranen inkubiert. Im Anschluss wurde nicht gebundener sekundärer Antikörper durch dreimaliges kurzes Waschen mit TBST, gefolgt von einmaligem Waschen für 1 h mit Blockierungspuffer entfernt. Durch zweimaliges Schwenken der Membranen in Assaypuffer für jeweils 5 min wurde ein pH von 9,5 für die CDP-Star-Reaktion eingestellt. CDP-Star wurde 1:100 in Assaypuffer verdünnt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 5 min darauf belassen. Nach Entfernung der CDP-Star-Lösung und Trocknung der Membran mit Hilfe eines Blattes Zellstoff wurde die Membran zunächst für 1 h in einer Filmkassette inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt, für 35 – 45 min exponiert und dieser in der Entwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa) entwickelt. Wurde der anti-PrP-Antikörper ICSM-18 anstelle des Antikörpers 3F4 verwendet, so erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen für 1 h mit TBST. Der monoklonale Antikörper ICSM-18 wurde 1:10.000 in TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Blotmembran gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde am nächsten Morgen durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem 1:10.000 in TBST verdünnten Sekundärantikörper Goat Anti-Mouse IgG/AP für 1,5 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen und zweimal für 5 min in Assaypuffer inkubiert. Die weiteren Schritte zur Blotfärbung nach PrP-Markierung mit dem Antikörper ICSM-18 erfolgten wie oben für den Antikörper 3F4 beschrieben.

2.2.3. Quantitative Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiften

2.2.3.1. Densitometrische Blot-Auswertung

Die Röntgenfilme wurden mittels des HP ScanJet G4050-Scanners digitalisiert und in ein BMP-Format umgewandelt. Die anschließende densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software „Image J“, dabei wurde der Bild Typ als „8 bit“ definiert.

Für die densitometrische Auswertung wurden die Western Blot Bilder invertiert, die Signale der un-, mono- und diglykosylierten Banden des PrPres im Molekulargewichtsbereich von ca. 20 – 30 kDa mit einem Rahmen umschrieben, und die umschriebenen Färbeintensitäten bestimmt. Unspezifische Hintergrundfärbung der Blotmembran wurde mit einem gleich großen Messrahmen ermittelt und vom Ergebnis der PrPres-Messung subtrahiert. Im Anschluss wurden die relativen Färbeintensitäten der PrPres-Signale der 1 – 4 PMCA-Runde relativ, d. h. prozentual, zum Western Blot Signal der jeweils mitgelaufenen Blotkontrolle (Positivkontrolle) bestimmt. Zur grafischen Darstellung von Ergebnissen der densitometrischen Blotauswertung wurde das Programm Excel (Microsoft Office) verwendet. Fehlerbalken markieren die Standardabweichungen mehrfacher Messungen bzw. Versuchsdurchführungen. Die residualen Keimaktivitäten an mit Desinfektionsmitteln behandelten Teststiften (KA_{TS}) wurden wie von Pritzkow *et al.* (2011) beschrieben durch einen Vergleich mit der Keimaktivität an Referenzstiften (KA_{RS}) bestimmt. Die Referenzstifte waren dabei mit seriell verdünntem H^S , das 10^{-1} -, 10^{-2} -, 10^{-3} -, 10^{-4} -, 10^{-5} -, 10^{-6} -, 10^{-7} -, oder 10^{-8} HÄ Scrapie-Hirngewebe pro 1 ml enthielt, kontaminiert worden und wiesen bekannte Infektiositätstiter auf. Auf dieser Grundlage wurden die bestimmten Keimaktivitäten in mutmaßliche residuale Prioninfektiosität an den Teststiften umgerechnet.

2.2.4. Zellbiologische Methoden

2.2.4.1. Isolation von primären Gliazellen aus Hamstern

2.2.4.1.1. Beschichten von Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin

Durch Beschichtung der Polystyrol-Oberflächen der Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin wurde eine verbesserte Anheftung von primären Zellkulturen erreicht (Huang *et al.*, 1983).

Pro 25 cm^2 Wachstumsfläche wurden 0,5 ml Poly-L-Lysin so auf dem Boden der Zellkulturflasche verteilt, dass die gesamte Fläche benetzt wurde. Nach einer Inkubation von

mindestens 5 min unter gelegentlichem Schwenken wurden die Flaschen zweimal mit autoklaviertem ddH₂O gewaschen, um überschüssige Reste des Poly-L-Lysins zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellkulturflaschen für mindestens 1 h bei RT unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.4.1.2. Präparation und Aussaat der primären Zellen

Die Isolation der Gliazellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Lima *et al.*, (2007). Neugeborene uninfizierte Hamster im Alter von 2–3 Tagen wurden durch Dekapitation getötet und deren Gehirne entnommen. Die Hirne wurden bis zur Isolation der Gliazellen in eiskalter PBS/Glucose-Lösung aufbewahrt. Das Kleinhirn und die Meningen wurden entfernt und das Hirn mittels eines Einmalskalpells zerkleinert. Die Hirnmasse wurde zweimal in Gliazell-Isolations-Medium (GIM) gewaschen und bei 1000 rpm für 3 min in einer Heraeus Varifuge 3.0 R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gehirn durch Auf- und Abpipettieren in 5 ml GIM mit 5 ml- und 1 ml-Pipetten mechanisch zerkleinert bis eine homogene Lösung entstanden war. Um verbliebene Zelltrümmer zu beseitigen wurde die Lösung durch ein Zellsieb mit der Porengröße von 40 µm gegeben und im Anschluss 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Gliazellen-Wachstums-Medium (GWM) resuspendiert und die Zelldichte durch Auszählen mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau wurden die lebenden Zellen bestimmt und die Zellzahl ermittelt. Tote Zellen weisen eine für Trypanblau durchlässige Membran auf, wodurch eine Blaufärbung der Zelle sichtbar wird. Bei lebenden Zellen ist die Membran intakt, sodass der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren kann.

Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl (N) pro ml:

$$N = \frac{\left(\frac{n_1 + n_2}{2}\right)}{4} * V * 10^4$$

n = Zellzahl in vier Großquadraten

V = Verdünnungsfaktor

10⁴ = Kammerfaktor

Im Anschluss wurden 3×10^6 Zellen in mit Poly-L-Lysin beschichteten 175 cm^2 Zellkulturflaschen in 25 ml GWM ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert.

Durch das Waschen der Zellen mit PBS am nächsten Tag wurden Zelltrümmer und tote Zellen entfernt. Danach wurden die isolierten Kulturen bis zur Passagierung weitere 7 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.4.1.3. Passagieren primärer Gliazellkulturen

Für die Inokulation mit PrPres wurden die primären Kulturen passagiert, um eine Zelldichte zu erhalten, bei der eine verminderte Teilungsrate stattfindet. Die Zellen wurden zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin enzymatisch vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Der Verdau erfolgte für ca. 10 min im Brutschrank bis sich die Zellen selbstständig gelöst hatten. Durch Zugabe von 20 ml GWM wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml GWM gelöst und zur besseren Vereinzelnung durch ein Zellsieb gegeben (eine Einzelzellsuspension ist für die Suszeptibilität der gegenüber PrPres-assoziiierter Keimaktivität von entscheidender Bedeutung). Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2.4.1.2.). In der Regel wurden dann $1,25 \times 10^5$ Zellen in Poly-L-Lysin-beschichteten 75 cm^2 Zellkulturflaschen in 12 ml GWM ausgesät und im Brutschrank bis zur Infektion kultiviert.

2.2.4.2. Isolation von primären Neuronenkulturen aus pränatalen Hamstern

Die Isolation von Neuronen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Lima *et al.*, (2007). Dazu wurden fötale Hamster 2 – 3 Tage vor der Geburt aus der Gebärmutter des Muttertieres entnommen und mittels Dekapitation getötet. Die Gehirne der pränatalen Hamster wurden präpariert und bis zur Isolation der Zellen in eiskalter PBS/Glucose/FKS-Lösung aufbewahrt. Das Kleinhirn und die Meningen wurden entfernt, und das Hirn mittels eines Einmalskalpells zerkleinert. Die dreimal in PBS/Glucose/FKS gewaschene Hirnmasse wurde anschließend 20 – 30 Minuten bei 37°C mit Trypsin behandelt (3,5 ml Waschlösung und 500 μl 2,5 %iges Trypsin). Durch eine Zugabe von 2 ml FKS zu der Gewebesuspension

wurde der Trypsin-Verdau gestoppt, und die Suspension erneut dreimal in PBS/Glucose/FKS sowie anschließend in Neuronenmedium gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 900 rpm für 3 min in einer Heraeus Varifuge 3.0 R zentrifugiert und der Überstand bis auf 2 ml verworfen. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Schaumbildung kam. Im Anschluss wurde die Suspension ad 10 ml mit Neuronenmedium aufgefüllt und durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gegeben. Anschließend wurden die Zellen wie für die Gliakulturen beschrieben gezählt. $7,5 \times 10^6$ Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen (75 cm²) in 12 ml Neuronenmedium (NM) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein halber Medienwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.4.3. Isolation von Neurosphären aus Hamstern

2.2.4.3.1. Präparation und Aussaat

Die Präparation von Neurosphären aus 2–3 Tage alten Hamstern erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Giri *et al.*, 2006 und Milhavet *et al.*, 2006. Die Hirne wurden wie für die Gliazellkultur beschrieben entnommen und die subventrikuläre Zone (SVZ), in der sich die Stammzellen befinden, präpariert. Das mit einem Skalpell zerkleinerte Gewebe wurde in PBS/Glucose gewaschen und anschließend bei 900 rpm 3 min in einer Heraeus Varifuge 3.0 R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml TrypLE für 10 min bei 37 °C zum Gewebeaufschluss inkubiert. Durch 30maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Pipette wurde eine homogene Lösung hergestellt, die durch ein Zellsieb mit der Porengröße von 40 µm gegeben wurde. Danach wurde die Lösung mit DMEM/HAM's F12 ad 10 ml aufgefüllt und die Zellzahl wie oben beschrieben ermittelt. Es wurden $1 - 3 \times 10^5$ Zellen pro ml NSPM (Neurosphärenmedium) in 175cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.4.3.2. Passage

Die Neurosphärensuspension wurde alle 8–12 Tage passagiert. Dazu wurde die Lösung zunächst bei 900 rpm und 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Zellpellet in 1 ml TrypLE für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch 30maliges Auf- und Abpipettieren mittels einer 1 ml Pipette werden die Zellverbände aufgelöst, und die resultierende Einzelzellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben (40 µm). Die Suspension wurde danach mit DMEM/HAM's F12 auf 10 ml aufgefüllt, die Zellzahl bestimmt, und 1×10^5 Zellen pro 1 ml NSPM in einer 175cm² Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.4.4 Inokulation und nachfolgende Kultivierung

2.2.4.4.1. Primäre Gliazellen

Ab dem 10. Tag nach der Isolation wurden die passagierten Gliazellkulturen für 3 Tage mit dem Inokulum inkubiert. Dieses bestand entweder aus H^N, H^S oder PMCA-Produkten. Verimpft wurden in der Regel $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ des jeweiligen Hirnhomogenats (in 12 ml GWM). 70 µl der Lösung aus PMCA Ansätzen wurden vor der Inokulation für 2,5 h bei 45000 rpm und 4 °C mit einem Beckman Rotor Model TLA-45 ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde mittels Ultraschallbehandlung in 100 µl PBS resuspendiert, und 10 µl der resultierenden Suspension wurden in 12 ml GWM zu den Zellen gegeben.

3 Tage nach der initialen Exposition (DPE) der Zellen gegenüber H^N, H^S oder PMCA-Produkten wurde das Inokulum abgenommen. Die Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen, mit 12 ml frischem GWM versetzt und dann in der Regel für weitere 37 bzw. 57 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel fand einmal wöchentlich statt.

2.2.4.4.2. Primäre Neuronen

Die kultivierten Neuronen wurden für 3 Tage mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^N oder $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inkubiert (in 12 ml NM). 3 Tage nach der initialen Exposition (DPE) der Zellen gegenüber H^N oder H^S wurde das Inokulum abgenommen. Die Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen, mit 12 ml frischem NM versetzt und dann für weitere 37 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurde einmal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.4.4.3. Neurosphären

Nach der ersten Passage wurden die Neurosphären-Kulturen für 3 Tage mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^N oder $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inkubiert. Am 3. Tage nach der initialen Exposition (DPE) der Zellen gegenüber H^N bzw. H^S wurde das Inokulum abgenommen indem die Zellsuspension 3 min bei 900 rpm zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, in ausreichend frischem NSPM-Medium resuspendiert und erneut ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für weitere 37 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂, wobei die Zellen alle 8 – 12 Tage passagiert wurden.

2.2.4.5. Zellernte

Zur Analyse der biologisch wirksamen Keimaktivität in den Zellkulturen wurde die PrPres-Menge am Ende der Expositionsphase (d.h. nach Entfernung des Inokulums und Waschung der Zellen bei 3 DPE) in der Regel mit der PrPres-Menge nach 40 DPE oder 60 DPE verglichen.

Dazu wurden die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen durch Zugabe von 800 µl 1 %igem Sarcosyl lysiert und mittels eines Zellschabers abgelöst (bei Neurosphären: Zentrifugation der Zellsuspension und Zellyse des Pellets in 1 %igem Sarcosyl). Die Zellsuspensionen wurden 2,5 h bei 45000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um PrPres zu pelletieren. Das Pellet des Zellysats wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Aliquots dieser Suspension wurden mit Proteinase K verdaut und im Western Blot auf PrPres untersucht.

2.2.4.6 Proteinase K-Verdau von Zellysaten

Die Zellysate aus den Infektionsversuchen wurden im Gegensatz zu den PMCA-Proben für 1 h bei 37 °C zusammen mit 1 % Sarcosyl und 150 µg PK inkubiert (50 µl Probe, 10 µl PK [1 mg/ml] und 5 µl 13 % Sarcosyl). Der Proteinase-Inhibitor PMSF wurde in einer Konzentration von 2,5 mM (3,25 µl einer 0,1 M Lösung) zugesetzt und die Proben bis zur Analyse mittel SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung der monoklonalen anti-PrP-Antikörper 3F4 und ICSM-18 (s. 2.2.2.3) bei -20 °C eingefroren.

2.4.4.7 Deglykosylierung von PrP in Zelllysaten

Um die Identität des in der Zellkultur akkumulierten Prionproteins weiter abzusichern, wurde eine enzymatische Deglykosylierung durchgeführt.

Für die Deglykosylierung wurden die Zelllysate-Proben zunächst Proteinase K verdaut (siehe oben). 20 µl von PK-verdauten Proben wurden mit 2,2 µl Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 99 °C inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 3 µl 10 x G7-Puffer, NP-40 und PNGaseF zur denaturierten Probe gegeben. Die Ansätze wurden 2 h bei 37 °C und 450 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1:2 mit 2 x LPP verdünnt und 10 min bei 99 °C inkubiert. Der Proteinase-Inhibitor PMSF wurde in einer Konzentration von 2,5 mM zugesetzt und die Proben bis zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP-Antikörper 3F4 (s. 2.2.2.3) bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.8. Kern- und Immunfluoreszenzfärbung von Astrozyten und Mikroglia

Astrozyten wurden durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung spezifisch markiert. Das "Saure Gliafaserprotein" (engl. *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP) ist ein Intermediärfilament im Zytoplasma von Astrozyten und wird als Markerprotein für diese verwendet. Primäre Gliazellkulturen (5×10^3 Zellen) wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen ausgesät und in 12 Well Plates für zwei Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ in 1 ml GWM kultiviert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen zunächst dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 %igem Paraformaldehyd für 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels 10 minütiger Inkubation in 0,5 %igem Triton-X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen und mit 10 %igem Normal Goat Serum (NGS) für 30 min blockiert. Der primäre Antikörper Rabbit Anti-GFAP wurde 1:1000 in 1 % NGS verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem 1:500 in 1 %igem NGS verdünnten rot fluoreszierenden Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 594 Goat Anti-Rabbit behandelt. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und die DNA mittels 4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) spezifisch angefärbt. Dazu wurde eine DAPI-Stammlösung (1 µg/ml in H₂O) 1:5000 in Methanol verdünnt und für 15 min auf den Zellen gegeben. Zum Abschluss wurden die angefärbten Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen

und dann mit Immu-Mount (Thermo Elektron Corporation, Pittsburgh, USA) eingedeckelt. Dabei wurde ein Tropfen Immu-Mount auf einen Objektträger gegeben und die Plättchen mit den Zellen wurden nach unten luftblasenfrei fixiert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Bei einer Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C bleiben die Färbungen bis zu zwei Monate sichtbar.

Die Färbung von Mikrogliazellen erfolgte mit Alexa Fluor[®] konjugiertem Isolectin B₄. Dazu wurden lebende Gliazellkulturen für 15 min in 500 µl Medium mit dem 1:1000-verdünnten Fluorophor behandelt. Im Anschluss wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen, in 4 %igem Paraformaldehyd für 30 min fixiert und der oben beschriebenen GFAP-Färbung unterzogen. Alternativ wurden Mikrogliazellen mit aus Ratten stammenden Anti-Mouse F4/80 IgG (1:200 verdünnt) markiert. In diesem Falle erfolgte die Mikroglia-Markierung zusammen mit der GFAP-Markierung nach Paraformaldehydfixierung und Zellpermeabilisierung analog zur obigen Beschreibung in 1 %igem NGS. Als Sekundärantikörper für die Mikroglia Darstellung nach Markierung mit F4/80 IgG aus der Ratte wurde ein Alexa Fluor[®] 488 konjugierter Goat Anti-Rat IgG (1:300 verdünnt) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Verfahrenstechnische PMCA-Optimierung im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der keiminduzierten Amplifikation von PrPres

Mit Hilfe der PMCA lässt sich die Keimaktivität von pathologischem Prionprotein nutzen, um PrP^C *in vitro* zellfrei in fehlgefaltetes, aggregiertes und Proteinase K-resistentes PrPres zu überführen und dieses anschließend autokatalytisch zu vermehren.

Für die Entwicklung eines quantitativen PMCA-Assays zur mengenmäßigen Bestimmung unbekannter PrP^{Sc}-Keimaktivität war es im Rahmen dieser Arbeit erforderlich, eine standardisierte und experimentell zuverlässig kontrollierbare PMCA mit hoher Sensitivität und Spezifität zu etablieren. Ausgangspunkt für diese Methodenentwicklung war ein in unserem Labor bereits etablierter PMCA-Assay, mit dessen Hilfe zwar bereits ein qualitativer Nachweis, jedoch noch keine quantitative Bestimmung der Keimaktivität möglich war.

3.1.1. Leistungsfähigkeit der PMCA vor verfahrenstechnischer Optimierung

Im Vorfeld der verfahrenstechnischen Optimierung wurde zunächst die Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der vorhandenen PMCA-Technik untersucht.

Dazu wurden Hirnhomogenate gesunder Hamster (10 %iges H^N) mit seriellen Verdünnungen von Hirnhomogenaten aus Scrapie-kranken Hamstern (H^S) beimpft. Die PMCA-Probenansätze bestanden aus 10 µl einer seriellen Verdünnung von H^S mit 10⁻⁶ bis 10⁻¹⁰ HÄ Keimmaterial und 90 µl eines 10 %igen H^N. Alle Keimmengen wurden in Dreifachansätzen untersucht. Nach jeder PMCA-Runde (48 Zyklen aus Inkubation und Beschallung) wurden die Proben 1:5 in frischem 10 %igem H^N verdünnt, bevor eine neue PMCA-Runde begonnen wurde. Insgesamt wurden 10 PMCA Runden durchgeführt. Aus jeder Runde wurden Proben-Aliquots mit PK verdaut und anschließend im Western Blot auf die Anwesenheit und Menge von PrPres untersucht. Die Menge an 263K Scrapie-Infektiosität (intrazerebrale letale Dosen [LD_{50i.c.}]) pro Gramm bzw. Äquivalent Scrapie-Hirngewebe ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Scrapie-Infektiosität (LD_{50i.c.}) pro Gramm bzw. Äquivalent Scrapie-Hirngewebe

Masse [g] bzw. Äquivalent (HÄ) Hirngewebe	LD _{50i.c.}
1×10^0	1×10^9
1×10^{-1}	1×10^8
1×10^{-2}	1×10^7
1×10^{-3}	1×10^6
1×10^{-4}	1×10^5
1×10^{-5}	1×10^4
1×10^{-6}	1×10^3
1×10^{-7}	1×10^2
1×10^{-8}	1×10^1
1×10^{-9}	1×10^0
1×10^{-10}	1×10^{-1}
1×10^{-11}	1×10^{-2}
1×10^{-12}	1×10^{-3}

Die Abbildungen 10 A + B zeigen beispielhaft Ergebnisse aus zwei verschiedenen PMCA-Ansätzen dieser Versuchsserie. Dort sind mit 5×10^{-9} HÄ bzw. 5×10^{-8} HÄ beimpfte Proben dargestellt, da diese Keimmengen im Bereich der Nachweisgrenze des damaligen PMCA-Assays lagen. Mit geringeren Keimmengen ließen sich in keiner PMCA-Runde PrPres-Signale nachweisen.

Wie aus Abb. 10 erkennbar, variierte die PrPres-Amplifikation stark zwischen den Dreifachbestimmungen der beiden Keimansätze und zeigte auch Inkonsistenzen bei einem Vergleich zwischen beiden Keimmengen. So lieferte beispielsweise die Probe 1 des 5×10^{-8} HÄ-Keimes trotz der größeren Menge an Keimmaterial eine geringere PrPres-Amplifikation als die Probe 1 des 5×10^{-9} HÄ-Keimes. Zusätzlich war zu beobachten, dass die PrPres-Menge in einigen Proben nach zwischenzeitlichem Erreichen von Maximalwerten mit einer weiter steigenden Zahl von PMCA-Runden wieder abnahm.

Wurde die PMCA nur mit uninfiziertem Hirnhomogenat (H^N) ohne Keimmaterial durchgeführt, war kein PrPres in den PMCA-Proben zu detektieren (nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab sich somit, dass die Nachweisgrenze der ursprünglich im Labor vorhandenen PMCA-Technik bei einer Keimmenge von 5×10^{-8} bis 5×10^{-9} HÄ H^S lag. Zusätzlich zu dieser relativ geringen Sensitivität war die Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikation für einen quantitativen Assay zur Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein unzureichend. Es war daher erforderlich, die Leistungsfähigkeit der PMCA systematisch zu verbessern.

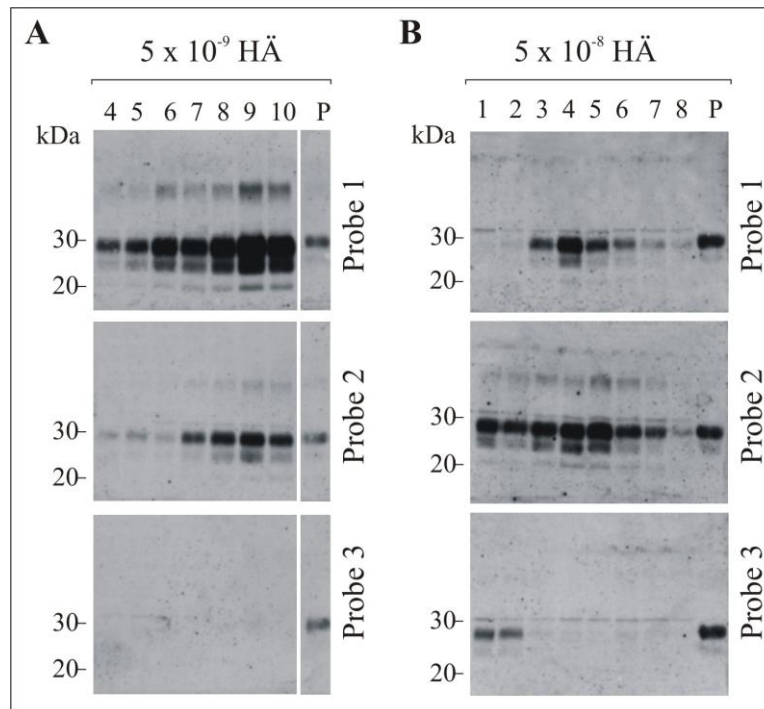


Abbildung 10: Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der ursprünglich vorhandenen PMCA-Technik vor verfahrenstechnischer Optimierung. Western Blot-Nachweis von PrPres nach PMCA mit Scrapie-Hirnhomogenat mit einem Keim von 5×10^{-9} HÄ (A) bzw. 5×10^{-8} HÄ (B) H^S . Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen (Probe 1 – 3) durchgeführt. In (A) sind die Befunde nach 4 – 10 PMCA-Runden (A) und in (B) die Befunde nach 1 – 8 PMCA-Runden gezeigt. Bei den im oberen Teil der Blots detektierten Signalen, handelt es sich um PrPres-Dimere mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S , 1×10^{-7} HÄ.

3.1.2. Verbesserung der Keimfragmentierung zur Steigerung der PMCA-Qualität

Zur Verbesserung der PMCA-Qualität im Hinblick auf die Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikation erschien eine verfahrenstechnische Optimierung der Keimfragmentierung als konzeptionell vielversprechendster Ansatz. Ferner waren auch in der Literatur Beobachtungen berichtet worden, die die Keimfragmentierung durch Ultraschallung als wahrscheinlichste Ursache für die oben beschriebenen Unzulänglichkeiten bei der PMCA-vermittelten Amplifikation von PrPres nahelegten (Atarashi *et al.*, 2008). Daher untersuchten wir zunächst, ob sich die PMCA-Qualität durch eine veränderte Keimfragmentierung verbessern ließe, bei der die PMCA-Probenansätze nicht mit Ultraschall behandelt sondern mit Glaskügelchen geschüttelt würden. Dazu wurden

Glaskügelchen direkt zur PMCA-Probe gegeben die im Thermomixer geschüttelt wurde. Dabei wechselten sich Schüttel- und Inkubationsphasen kontinuierlich ab. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes wurde wegen des durch die Glaskügelchen verursachten Totvolumens auf 150 μl erhöht. Anschließend wurde der Einfluss unterschiedlicher Versuchsparameter wie Schüttelzeit, Schüttelintensität, Temperatur, Verdünnungsfaktor und Größe der Glaskügelchen systematisch getestet.

Das beste Ergebnis im Hinblick auf die PrPres-Amplifikation erzielten Proben, welche alternierend 30 min bei 37 °C inkubiert und 30 min bei 1400 rpm und 37 °C geschüttelt wurden. Ein Verdünnungsfaktor von 1:2 (das heißt 75 μl Probe wurden mit 75 μl 10 %igem H^{N} vermischt) und Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,75 – 1 mm erwiesen sich als die vorteilhaftesten Bedingungen. Dennoch war es nicht möglich, eine kontinuierliche autokatalytische Amplifikation von PrPres zu erzielen (Abb. 11). Zwar trat nach der ersten PMCA-Runde zunächst eine Zunahme der PrPres-Signalintensität auf. Diese nahm danach jedoch bis zur dritten Runde wieder ab. Die initiale Zunahme des PrPres-Signales beruhte hier wahrscheinlich weniger auf einer Neubildung von PrPres, sondern lediglich auf der Fragmentierung großer Keime im Inokulum wodurch mehr Bindungsstellen für den anti-PrP-Antikörper zugänglich wurden.

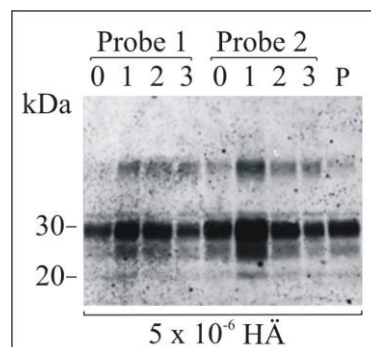


Abbildung 11: Untersuchung der PrPres-Amplifikationen durch PMCA bei Keimfragmentierung durch Schütteln mit Glaskügelchen. Western Blot-Nachweis von PrPres nach PMCA mit periodischen Inkubations- und Schüttelphasen (30 min, 37 °C bzw. 30 min, 1400 rpm, 37 °C) mit einem Keim von 5×10^{-6} HÄ H^{S} . Es wurden Doppelbestimmungen (Probe 1 und 2) durchgeführt. Nach jeder Runde wurden die Proben 1:2 in 10 %igem H^{N} verdünnt. 0 = Befund vor Beginn der PMCA, 1 – 3 = Befunde nach der 1. – 3. PMCA-Runde (jeweils 48 Zyklen von Inkubations- und Schüttelphase pro Runde). P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^{S} , 1×10^{-6} HÄ.

Im Ergebnis ergab sich aus den beschriebenen Untersuchungen, dass Schütteln mit Glaskügelchen die Ultraschallbehandlung bei der PMCA nicht ersetzen konnte. Es lag nun nahe, den Effekt einer kombinierten Einwirkung von Glaskügelchen und Ultraschall auf die

PMCA zu prüfen. Durch den Ultraschall sollten die Glaskügelchen in Bewegung versetzt werden, und dadurch die Probe zusätzlich durchmischen. Zum anderen war zu erwarten, dass die sich bewegenden Glaskügelchen Scherkräfte entfalten, welche additiv oder synergistisch mit dem Ultraschall zu einer gleichmäßigeren Fragmentierung von PrPres-Aggregaten beitragen.

Für die PMCA-Experimente dieser Versuchsreihe wurde Normalhirnhomogenat mit einer Keimmenge von 10^{-10} HÄ H^S versetzt. Als Kontrollproben dienten PMCA-Ansätze ohne zugegebenes Keimmateriale. Nach jeder PMCA-Runde wurden Aliquots in frischem H^N 1:5 zur Durchführung der nächsten PMCA-Runde verdünnt, bzw. mit PK verdaut und im Western Blot auf PrPres untersucht. Abb. 12 zeigt Befunde nach der ersten bis neunten PMCA-Runde.

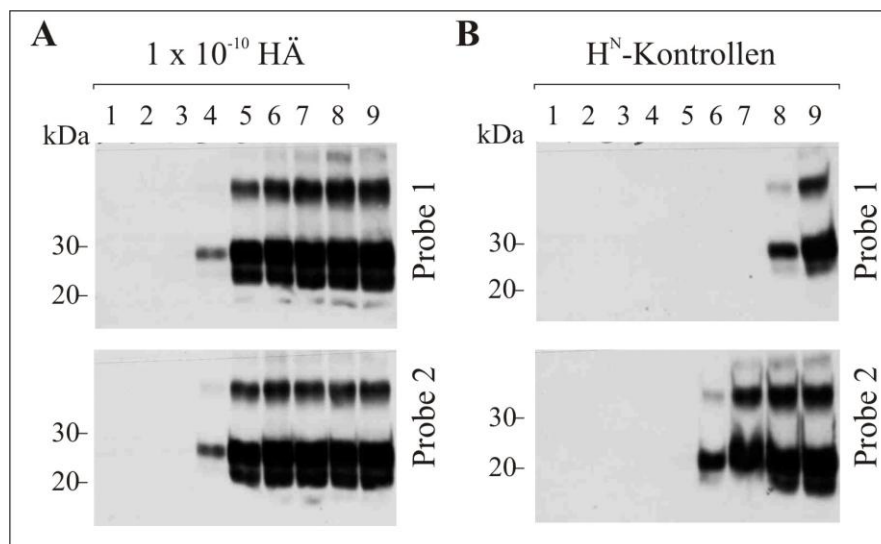


Abbildung 12: Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikationen durch PMCA bei Keimfragmentierung mit Glaskügelchen und Ultraschall. Western Blot-Nachweis von PrPres nach der 1. – 9. PMCA-Runde (jeweils 48 Zyklen von Inkubation und Ultraschall pro Runde) mit einem Keim von 1×10^{-10} HÄ H^S (A). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (Probe 1/Probe 2). H^N-Kontrollen = Gleichbehandeltes unbeimpftes Hamsterhirnhomogenat (B).

Durch die Kombination von Glaskügelchen und Ultraschall konnte die Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit des Nachweises der Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins erheblich verbessert werden. Eine PrPres-Amplifikation ließ sich ab der vierten Runde in den 10^{-10} HÄ H^S versetzten PMCA-Proben nachweisen. Gleichzeitig zeigte die PrPres-Amplifikation über die PMCA-Runden 4 – 9 einen konsistenten Anstieg sowie gleiche bzw. zumindest sehr ähnliche Ergebnisse für die Doppelbestimmung.

Mit der deutlichen Sensitivitätssteigerung ging allerdings auch das Auftreten von falsch positiven Befunden in PMCA-Proben einher, die ohne Dotierung mit Keimmateriale zum Teil bereits nach der sechsten, spätestens aber nach der achten PMCA-Runde PrPres-Signale aufwiesen. Grundsätzlich kommen für diese falsch positiven Befunde zwei Erklärungen in Betracht: Eine *de novo*-Erzeugung von PrPres durch die PMCA-Behandlung von Normalhirnhomogenat, und/oder unerkannte Kontaminationen mit Prionen aus der Laborumgebung. Es war daher erforderlich, im Rahmen weiterer Verfahrensoptimierungen zusätzliche Maßnahmen zur Verbesserung der PMCA-Spezifität zu ergreifen.

3.1.3. Leistungsfähigkeit der PMCA nach verfahrenstechnischer Optimierung

Zusätzlich zu den vorgestellten Modifizierungen zur Verbesserung der Keimfragmentierung rundeten weitere Maßnahmen die verfahrenstechnischen Optimierungen zur Verbesserung der Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit bei der PMCA-vermittelten PrPres-Amplifikationen ab (Einzelbefunde nicht gezeigt). Dazu zählten eine zusätzliche Hemmung von Degradationsprozessen im PMCA-Substrat (H^N), eine stringenter Kontrolle der Reaktionstemperatur (durch außen an den Ultraschallbädern angebrachte Thermostatgesteuerte Heizschlangen anstelle der Verwendung von Wasserumlaufsystemen), sowie die Reduktion der Zyklenzahl von 48 auf 24 pro PMCA-Runde.

Außerdem wurden zur Steigerung der PMCA-Spezifität verschiedene Schutzmaßnahmen gegen die Amplifikation von Kreuzkontaminationen aus der Laborumwelt umfangreichen systematischen Einzelprüfungen unterzogen (nicht gezeigt) und auf dieser Grundlage zweckmäßig kombiniert. Wesentliche Bestandteile dieses Paketes von Schutzmaßnahmen waren:

- Die Verwendung von 0,5 ml Reaktionsgefäßen im Austausch gegen die 0,2 ml PCR-Gefäße.
- Das Versiegeln der Reaktionsgefäße mit Parafilm und Paraffin-Wachs.
- Der Zusatz von gegen Prionen wirksamem 4 M Guanidiniumthiocyanat zum Wasserbad des Ultraschallgerätes.
- Die Behandlung der Reaktionsgefäße vor und nach jeder PMCA-Runde in 0,2 % SDS/0,3 % NaOH zur Prion-Desinfektion.
- Die Probenentnahme aus desinfizierten PMCA-Reaktionsgefäßen durch Punktierung mit sterilen Einmalkanülen.

- Die Verwendung gestopfter Pipettenspitzen.
- Das Wechseln der Schutzhandschuhe jeweils vor der manuellen Prozessierung einer neuen Probe.
- Die Begrenzung der PMCA auf 4 Runden.

In Abb. 13 A sind Befunde unter Verwendung der so weiter optimierten PMCA-Technik gezeigt. In diesen Experimenten wurde die PMCA mit Keimmengen von 10^{-8} bis 10^{-11} HÄ H^S durchgeführt. Als Kontrollproben dienten wieder PMCA-Ansätze ohne zugegebenes Keimmaterial. Bereits ab der 3. Runde ließ sich eine PrPres-Amplifikation in PMCA-Proben nachweisen, die mit lediglich 10^{-11} HÄ H^S (bzw. 10^{-12} HÄ H^S, nicht gezeigt [Pritzkow *et al.*, 2011]) dotiert worden waren. Ferner zeigte die PrPres-Amplifikation für die verschiedenen Keimmengen über die zunehmenden PMCA-Runden einen konsistenten und für die jeweiligen Doppelbestimmungen gleichartigen Anstieg. Für die mit 10^{-8} HÄ und 10^{-9} HÄ H^S beimpften Proben ließ sich eine PrPres-Amplifikation bereits nach der ersten PMCA-Runde nachweisen. Keine dieser PrPres-Keimmengen könnte unmittelbar, d. h. ohne Amplifikation, im Western Blot detektiert werden (Thomzig *et al.*, 2003).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen produzierte keine der Negativ-Kontrollproben falsch positive Befunde.

Im Vergleich zum Stand der Technik vor der Optimierung wurde die Sensitivität der PMCA um mindestens zwei Zehnerpotenzen erhöht. Die gelang unter Erreichung einer hohen Spezifität bei guter Kontrollier- und Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Ferner wurde der Zeitverbrauch durch eine Halbierung der Zyklen pro Runde und die Begrenzung der PMCA auf vier Runden deutlich herabgesetzt.

Bei der densitometrischen Auswertung der Blotbefunde aus Abb. 13 A zeigte sich eine konsistente quantitative Korrelation zwischen der Menge an Keimmaterial, der Anzahl von PMCA-Runden und der Färbeintensität des amplifizierten PrPres für die neu etablierte PMCA-Technik (Abb. 13 B). Im Folgenden sollte diese Technik zur quantitativen Bestimmung der Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion angewandt und validiert werden.

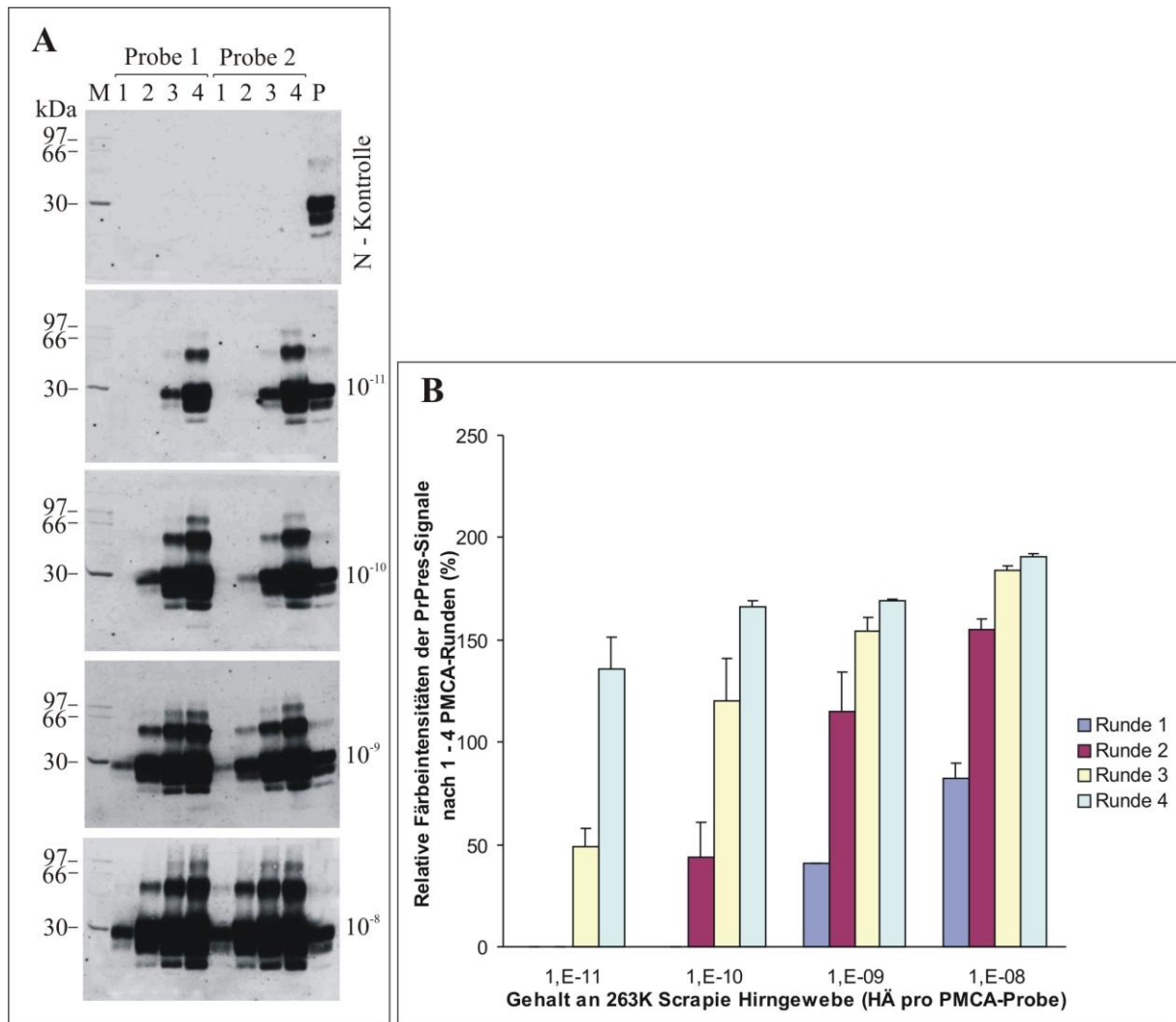


Abbildung 13: Sensitivität, Spezifität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikationen nach verfahrenstechnischer PMCA-Optimierung. (A) Western Blot-Nachweis von PrPres nach 1, 2, 3 und 4 Runden PMCA (jeweils 24 Zyklen von Inkubation und Ultrabeschallung pro Runde) mit einem Keim von 1×10^{-8} HÄ, 1×10^{-9} HÄ, 1×10^{-10} HÄ und 1×10^{-11} HÄ H^S. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. N = Kontrolle, gleichbehandeltes Normalhirnhomogenat ohne Keim. M = Molekulargewichtsmarker. P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S, 1×10^{-6} HÄ. (B) Densitometrische Auswertung der in (A) gezeigten Western Blot Befunde.

3.2. Korrelation der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein mit biologischer Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion

3.2.1. Quantitative Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiftprüfkörpern

Damit die Wirkung von Desinfektionsverfahren gegen die Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiften mit Hilfe der PMCA quantitativ erfasst werden kann, muss eine quantitative Korrelation zwischen der an den Prüfkörpern vorhandenen Keimmenge, der Anzahl von PMCA-Runden und der Färbeintensität des im Western Blot nachzuweisenden amplifizierten PrPres bestehen. Zur Validierung dieser Korrelation wurden Stahlstifte in seriell 1:10 im Bereich von 10^{-1} - bis 10^{-9} verdünntem H^S inkubiert und auf diese Weise mit unterschiedlichen Mengen von Keimaktivität beladen. Anschließend wurden Gruppen von jeweils 15 Stahlstiften 4 PMCA-Runden unterzogen und Aliquots der PMCA-Proben nach jeder Runde im Western Blot auf die Amplifikation von PrPres untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 14 zusammengefasst. Sie zeigen, dass sich Keimaktivität (ab der 3. PMCA Runde) noch an Prüfkörpern nachweisen lässt, die mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminiert worden waren, während auch nach der 4. PMCA-Runde keine Keimaktivität mehr an Stahlstiften nachweisbar war, die mit 10^{-9} -verdünntem H^S beladen worden waren. Ferner induzierten die verschiedenen Keimmengen an den Stahlstiften in der PMCA eine über die zunehmenden PMCA-Runden konsistente und für die jeweiligen Doppelbestimmungen gleichartige PrPres-Amplifikation. Damit bot sich an, die Keimaktivität an Testprüfkörpern nach der Behandlung mit unterschiedlichen Desinfektionsverfahren durch einen quantitativen Vergleich mit der Keimaktivität an definierten Referenz-Stahlstiften mengenmäßig zu bestimmen. Entsprechend der in Abb. 14 gezeigten Befunde sollten die Referenzstahlstifte für einen solchen Assay zweckmäßigerweise wie oben beschrieben kontaminiert werden, dass heißt mit seriell 1:10 im Bereich von 10^{-1} - bis 10^{-9} verdünntem H^S .

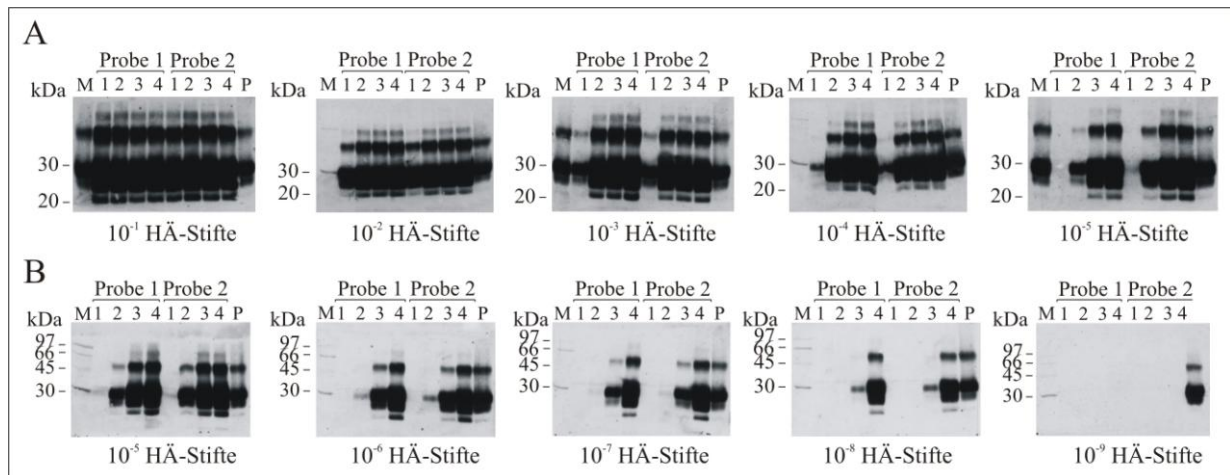


Abbildung 14: Sensitivität, Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikationen bei Durchführung der PMCA mit Scrapie-kontaminierten Stahlstiftprüfkörpern. Western Blot-Nachweis von PrPres nach 1, 2, 3 und 4 Runden PMCA (1 – 4) mit folgendem Keimmateriale: Jeweils 15 Stahlstifte, die mit 10^{-1} -, 10^{-2} -, 10^{-3} -, 10^{-4} -, 10^{-5} -, 10^{-6} -, 10^{-7} -, 10^{-8} - und 10^{-9} -verdünntem H^S kontaminiert waren. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (Proben 1 und 2). M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S, 1×10^{-6} HÄ.

Zur quantitativen Bestimmung der Wirkung unterschiedlicher Desinfektionsbehandlungen auf die Scrapie-Keimaktivität wurden Test-Stahlstifte mit 10^{-1} -verdünntem H^S kontaminiert, mit verschiedenen Desinfektionsverfahren behandelt und schließlich einer PMCA unterzogen. In dieselbe PMCA wurden jeweils auch Referenz-Stifte, die wie oben beschrieben mit definierten Verdünnungen von H^S kontaminiert waren sowie Negativ-Kontrollstifte, die nur mit 10 %igem H^N beladen waren, einbezogen. Die Bestimmung der residualen Keimaktivität an den Teststiften wurde für die in Tabelle 14 aufgeführten Desinfektionsverfahren jeweils in Doppelbestimmungen in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten vorgenommen. Dabei wurde die von Test-, Referenz- und Kontroll-Stiften induzierte PrPres-Amplifikation nach 1, 2, 3 und 4 Runden PMCA im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Durch einen Vergleich der PrPres-Amplifikation der Teststifte mit derjenigen der Referenzstifte bekannter H^S-Beladung ließ sich die verbliebene Keimaktivität an Teststiften im Vergleich zu derjenigen an Referenzstiften quantifizieren.

Die Western Blots in Abbildung 15 zeigen Ergebnisse nach Behandlung von Teststiften mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH, einem 0,5 %igen alkalischen Reiniger, 2 %igem Glutardialdehyd (GDA; neutralisiert, pH-Wert: 7,0) und 0,25 %iger Peressigsäure (Peraclean®) bei den angegebenen Temperaturen und Inkubationszeiten.

Die Doppelbestimmungen lieferten für die jeweils zusammen prozessierten Test- und Referenzstifte konsistente Ergebnisse. Für Negativ-Kontrollstifte wurde in keinem Fall eine PrPres-Amplifikation detektiert.

Die mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH (10 min, RT) behandelten Teststahlstifte zeigten im Western Blot keine PrPres-Amplifikation nach 1 – 4 PMCA-Runden (Abb. 15 A, Teststifte, oberer Blot). Im Gegensatz dazu wurde für in 10^{-8} - verdünntem H^S kontaminierte Referenzstifte bereits nach der dritten PMCA-Runde eine PrPres-Amplifikation beobachtet. Dementsprechend war die Keimaktivität an den so behandelten Teststahlstiften (KA_{TS} [0.2 % SDS/0.3 % NaOH, 10 min, 23 °C]) geringer als die Keimaktivität an Referenzstiften, die mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminiert waren (KA_{RS} [10^{-8}]). Zunehmend höhere residuale Keimaktivitäten fanden sich an Teststiften, die mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH (5 min, RT; Abb. 15 A, Teststifte, unterer Blot), dem alkalischen Reiniger (Abb. 15 B, Teststifte), 2 %igem Glutardialdehyd (pH 7,0; Abb. 15 C, Teststifte, oberer Blot) oder 0,25 %iger Peressigsäure (Abb. 15 C, Teststifte, unterer Blot) behandelt wurden.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Befunde ist in Abb. 16 exemplarisch für Behandlungen von Teststiften mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH (10 min und 5 min, RT) sowie 2 %igem Glutardialdehyd (pH 7,0) dargestellt. Die relativen Färbeintensitäten der PrPres-Signale von Test- und Referenzstiften nach 1, 2, 3 und 4 PMCA-Runden wurden densitometrisch im Verhältnis zur Färbeintensität des jeweils mitgeführten Blotstandards (Abb. 15, Probe P) bestimmt und wie in Abb. 16 gezeigt aufgetragen. Dabei bestätigte die densitometrische Auswertung, dass die residuale Keimaktivität an Teststiften, die mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH für 10 min bei RT behandelt wurden kleiner war als die Keimaktivität an mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminierten Referenzstiften (d. h. KA_{TS} [0.2 % SDS/0.3 % NaOH, 10 min, 23 °C] < KA_{RS} [10^{-8}]; Abb. 16, obere Grafik). Nach Behandlung mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH für 5 min bei RT und 2 %igem Glutardialdehyd (pH 7,0) fanden sich an den Teststiften noch Keimaktivitäten im Bereich von $\leq KA_{RS}$ [10^{-8}] bzw. $> KA_{RS}$ [10^{-4}] bis $\leq KA_{RS}$ [10^{-3}].

Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 16 Desinfektionsverfahren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Testprüfkörpern untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

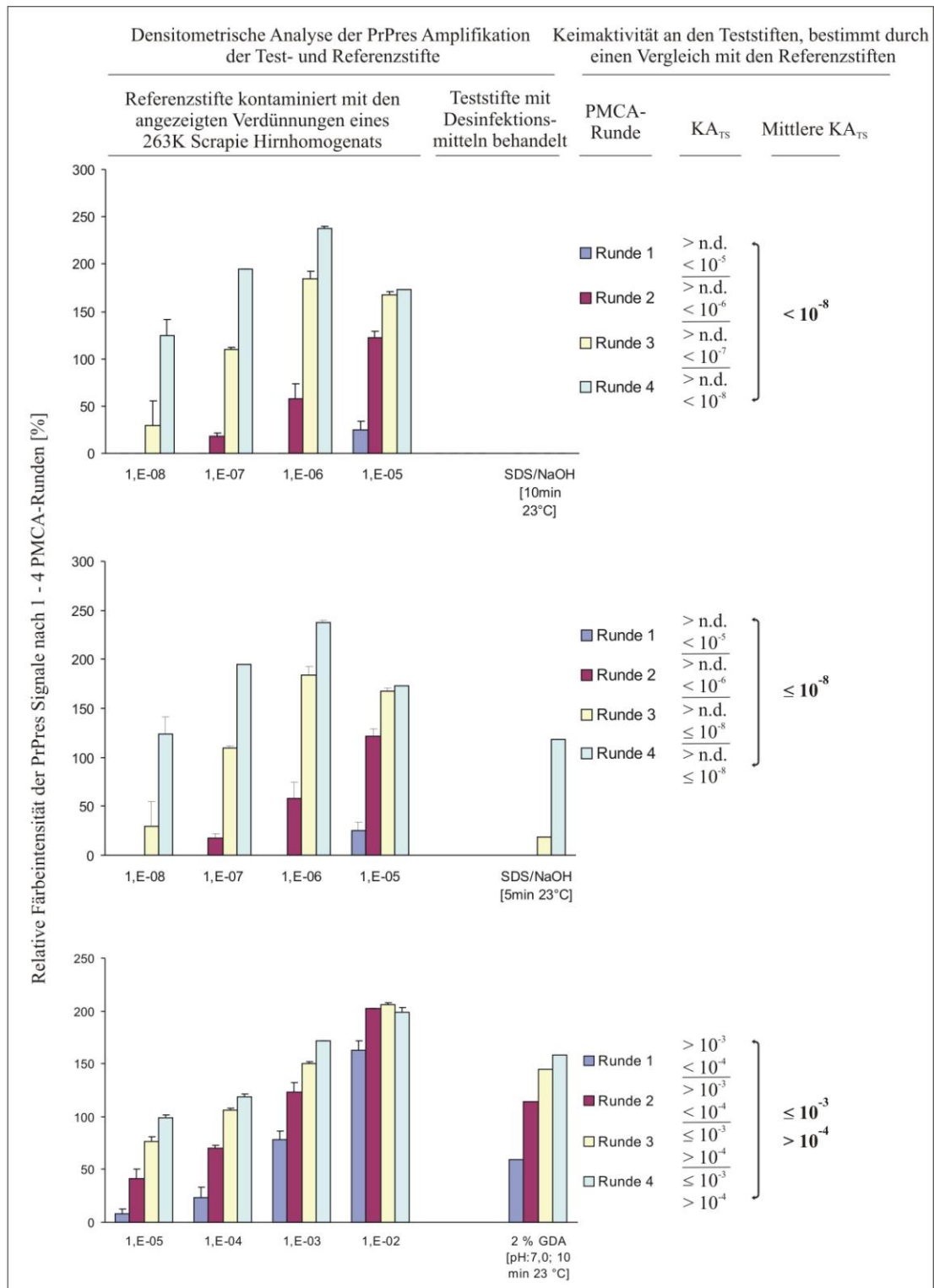


Abbildung 16: Quantifizierung der verbleibenden Keimaktivität an Prionkontaminierten Teststiften nach Behandlung mit verschiedenen Desinfektionsmitteln. Densitometrische Analyse der PrPres Amplifikation von Test- und Referenzstiften für verschiedene Desinfektionsverfahren nach 1, 2, 3 und 4 PMCA-Runden (Runde 1 – 4). Die horizontalen Achsen der Graphen geben die Verdünnungen des H^S an den Referenzstifte und das jeweilige Desinfektionsmittel der Teststifte an. Die vertikalen Achsen des Graphen bezeichnen die relativen Färbintensitäten der PrPres Signale von Referenz- und Teststiften. Rechts sind die abgeleiteten residualen Keimaktivitäten der Teststifte angegeben. Erklärung: n. d. = nicht detektierbar.

3.2.3. *In vitro*-Abschätzung und Bioassay-Validierung der Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion

Die Scrapie-Infektiositätstiter an Stahlstiften, die identisch zu den im Keimaktivitätsassay verwendeten Referenzstiften mit 10^{-1} – 10^{-9} verdünntem H^S kontaminiert wurden, sind bereits in vorangegangenen Untersuchungen anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe P24 am Robert Koch-Institut per Endpunkttitration bestimmt worden (Lemmer *et al.*, 2008; Tabelle 13).

Tabelle 13: Endpunkt-Titration der Scrapie-Infektiosität an mit 10^{-1} – 10^{-9} -verdünntem Scrapie-Hirnhomogenat kontaminierten Stahlstiften (nach Lemmer *et al.* [2008]).

263K Scrapie-Hirnhomogenat	Stahlstift-Bioassay in Hamstern		
	Verdünnungsstufe	Infektiosität pro Stahlstift [LD _{50i.c.imp.}]	An Scrapie erkrankte Hamster pro Tiergruppe
1×10^{-1}	3×10^5	6/6	94 ± 4
1×10^{-2}	3×10^4	6/6	100 ± 6
1×10^{-3}	3×10^3	6/6	113 ± 7
1×10^{-4}	3×10^2	6/6	134 ± 17
1×10^{-5}	3×10^1	6/6	161 ± 64
1×10^{-6}	3×10^0	5/6	231 ± 80; 502
1×10^{-7}	3×10^{-1}	1/6	198; 503
1×10^{-8}	3×10^{-2}	0/6	503
1×10^{-9}	3×10^{-3}	0/6	503

Erklärungen: SA = Standardabweichung; LD_{50i.c.imp.} = 50 % letale Dosen (LD₅₀) nach intrazerebraler (i.c.) Stahlstiftimplantation (imp.).

Die somit bekannten Erregertiter an den Referenzstiften des Keimaktivitätsassays erlaubten es, die im Rahmen dieser Arbeit an Teststiften ermittelten Keimaktivitäten (Tabelle 14, fünfte Spalte) versuchsweise in Titer biologischer Prioninfektiosität zu „übersetzen“ (Tabelle 14/ sechste Spalte). Zur Validierung dieser Titerabschätzungen dienten wiederum Daten aus Bioassays, die veröffentlicht (Lemmer *et al.*, 2008; Beekes *et al.*, 2010), bzw. zur Veröffentlichung akzeptiert sind (Pritzkow *et al.*, 2011). In diesen Bioassays sind Stahlstifte, die den gleichen Behandlungen zur Priondesinfektion wie die in dieser Arbeit verwendeten

Teststifte unterzogen wurden, von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe in Hamstern quantitativ auf Prioninfektiosität getestet worden. Dies ermöglichte es, die Titerabschätzungen aus dem Keimaktivitätsassay (Tabelle 14/ sechste Spalte) direkt mit den in Hamstern für die verschiedenen Desinfektionsverfahren bestimmten Infektiositätstitern (Tabelle 14/ achte Spalte) zu vergleichen.

Nach dem Keimaktivitätsassay sollte der Reduktionsfaktor (RF) für Infektiosität an Teststiften, die mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH (10 min, 23 °C) behandelt wurden größer als 10^7 (d.h. $> 7 \log_{10}$ -Einheiten [logs; Tabelle 14/ siebte Spalte]) sein. In Übereinstimmung mit dieser *in vitro*-Abschätzung wurde im Bioassay keine Restinfektiosität an entsprechend behandelten Teststiften gefunden. Der Bioassay zeigte für die Stiftbehandlung mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH (10 min, 23 °C) einen Reduktionsfaktor für Infektiosität von $\geq 5,5$ logs (Tabelle 14/ neunte Spalte) an. Dies war die im Bioassay maximal nachweisbare Titerreduktion, da die Teststifte eine Erreger-Ausgangslast von 3×10^5 LD_{50i.c.imp.} aufwiesen (Lemmer *et al.*, 2008). Nach Behandlung mit 0,2 % SDS/0,3 % NaOH für 5 min bei RT und 2 %igem Glutaraldehyd (pH 7,0) legten die residualen Keimaktivitäten an den Teststiften eine Reduktion der Infektiosität um ≥ 7 logs bzw. ≥ 2 bis < 3 logs nahe.

Wie in Tabelle 14 zusammengefasst dargestellt, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 16 verschiedene Desinfektionsverfahren mit Titerreduktionen von weniger als 1 log bis zu größer oder gleich 5,5 logs untersucht. Dabei stimmten die mit Hilfe des Keimaktivitätsassays *in vitro* abgeschätzten Restinfektiositäten und Reduktionsfaktoren in allen Fällen mit den im Tierversuch, d. h. *in vivo*, ermittelten Titerdaten überein.

Tabelle 14: Keimaktivitätsassay und Hamster-Bioassay von mit unterschiedlichen Desinfektionsmitteln behandelten Prion-kontaminierten Stahlstiftprüfkörpern (Bioassaydaten nach Lemmer *et al.*, 2008 und Beekes *et al.*, 2010 sowie Pritzkow *et al.*, 2011).

Desinfektionsverfahren	Konzentration	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Keimaktivitätsassay von Teststiften			Bioassay der Teststifte	
				Residuale Keimaktivität der Teststifte	Erwartete residuale Infektiosität pro Stift [$LD_{50i.c.imp.}$]	Erwartete Reduktion der Infektiosität (logs)	Residuale Infektiosität pro Stift [$LD_{50i.c.imp.}$]	Reduktion der Infektiosität (logs)
NaOH	1 M	60	23	$< K_{ARS} (10^{-8})$	$< 3 \times 10^{-2}$	> 7	ND	$\geq 5,5 \dagger$
NaOCl	2,5 %	60	23	$\leq K_{ARS} (10^{-8})$	$\leq 3 \times 10^{-2}$	≥ 7	ND	$\geq 5,5 \dagger$
GndSCN	4 M	10	23	$\leq K_{ARS} (10^{-8})$	$\leq 3 \times 10^{-2}$	≥ 7	ND	$\geq 5,5 *$
SDS/NaOH	0,2 %/0,3 %	5	23	$\leq K_{ARS} (10^{-8})$	$\leq 3 \times 10^{-2}$	≥ 7	ND	$\geq 5,5 \dagger$
		10	23	$< K_{ARS} (10^{-8})$	$< 3 \times 10^{-2}$	> 7	ND	$\geq 5,5 \dagger$
SDS/NaOH/ n-Propanol	0,2 %/0,3 %/ 20 %	10	23	$< K_{ARS} (10^{-8})$	$\leq 3 \times 10^{-2}$	≥ 7	ND	$\geq 5,5 \ddagger$
Alkalischer Reiniger	1 %	60	23	$< K_{ARS} (10^{-8})$	$< 3 \times 10^{-2}$	> 7	ND	$\geq 5,5 \dagger$
	0,5 %	5	55	$> K_{ARS} (10^{-6})$ bis $\leq K_{ARS} (10^{-5})$	$> 3 \times 10^0$ bis $\leq 3 \times 10^1$	≥ 4 bis < 5	> 0 bis $\leq 3 \times 10^0$ $> 3 \times 10^0$ bis $\leq 3 \times 10^1$	≥ 5 bis $\leq 5,5 \dagger$ ≥ 4 bis $< 5 \dagger$
		10	55	$> K_{ARS} (10^{-7})$ bis $\leq K_{ARS} (10^{-6})$	$> 3 \times 10^{-1}$ bis $< 3 \times 10^0$	≥ 5 bis < 6	> 0 bis $\leq 3 \times 10^0$	≥ 5 bis $\leq 5,5 \dagger$
SDS (pH 7,6 – 8)	5 %	60	90	$\geq K_{ARS} (10^{-6})$ bis $< K_{ARS} (10^{-5})$	$\geq 3 \times 10^0$ bis $< 3 \times 10^1$	> 4 bis ≤ 5	$> 3 \times 10^0$ bis $\leq 3 \times 10^1$	≥ 4 bis $< 5 \dagger$
		60	23	$\approx K_{ARS} (10^{-2})$	$\approx 3 \times 10^4$	≈ 1	$> 3 \times 10^3$ bis $\leq 3 \times 10^4$	≥ 1 bis $< 2 \dagger$

Desinfektionsverfahren	Konzentration	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Keimaktivitätsassay von Teststiften			Bioassay der Teststifte	
				Residuale Keimaktivität der Teststifte	Erwartete residuale Infektiosität pro Stift [$LD_{50 \text{ i.c. imp.}}$]	Erwartete Reduktion der Infektiosität (logs)	Residuale Infektiosität pro Stift [$LD_{50 \text{ i.c. imp.}}$]	Reduktion der Infektiosität (logs)
Glutardialdehyd (pH 7,0)	2 %	10	55	$> KA_{RS} (10^{-4})$ bis $\leq KA_{RS} (10^{-3})$	$> 3 \times 10^2$ bis $\leq 3 \times 10^3$	≥ 2 bis < 3	$\approx 3 \times 10^3$	≈ 2 *
Glutardialdehyd (pH 4,6)	2 %	10	23	$\geq KA_{RS} (10^{-3})$ bis $< KA_{RS} (10^{-2})$	$\geq 3 \times 10^3$ bis $< 3 \times 10^4$	> 1 bis ≤ 2	$> 3 \times 10^3$ bis $< 3 \times 10^4$	> 1 bis < 2 *
Cidex® OPA	100 %	10	23	$> KA_{RS} (10^{-3})$ bis $< KA_{RS} (10^{-2})$	$> 3 \times 10^3$ bis $< 3 \times 10^4$	> 1 bis < 2	$> 3 \times 10^3$ bis $< 3 \times 10^4$	> 1 bis < 2 *
Peressigsäure	0,25 %	60	23	$> KA_{RS} (10^{-2})$ bis $< KA_{RS} (10^{-1})$	$> 3 \times 10^4$ bis $< 3 \times 10^5$	> 0 bis < 1	$> 3 \times 10^4$ bis $\leq 3 \times 10^5$	≥ 0 bis < 1 †
		10	55	$\geq KA_{RS} (10^{-2})$ bis $< KA_{RS} (10^{-1})$	$\geq 3 \times 10^4$ bis $< 3 \times 10^5$	> 0 bis ≤ 1	$> 3 \times 10^4$ bis $\leq 3 \times 10^5$	≥ 0 bis < 1 †

Erklärungen: ND = nicht detektierbar; KA_{RS} = Keimaktivität an den Referenzstiften; $LD_{50 \text{ i.c. imp.}}$ = 50 % letale infektiöse Dosis, nach intrazerebraler Implantation von Teststiften.

Symbole: † = publiziert in Lemmer *et al.*, 2008; ‡ = publiziert in Beekes *et al.*, 2010; * Daten aus akzeptierter Publikation von Pritzkow *et al.*, 2011

3.3. Zellkultur

3.3.1. Entwicklung eines zellbasierten Assays zum biologischen Nachweis der Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins *in vitro*

3.3.1.1. Identifizierung eines für Scrapie-Keimaktivität suszeptiblen Zellkultursystems

Um die Keimaktivität des Prionproteins ergänzend zur biochemischen Quantifizierung, qualitativ auch als biologisch aktives Prinzip zu validieren ohne auf Tierversuche zurückgreifen zu müssen, sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit ein geeignetes Zellkulturmodell für den hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K aufgebaut werden. Hierfür schienen Zellen aus dem Gehirn von Syrischen Hamstern am potentiell vielversprechendsten, da Neuronen, aber auch Astrozyten und Mikrogliazellen sowohl PrP^C exprimieren als auch eine deutliche PrP^{Sc}-Ablagerung in Scrapie-infizierten Hamstern zeigen (Kretzschmar *et al.*, 1986a; Moser *et al.*, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Typen primärer Zellkulturen – Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia), Neuronen und Neurosphären – anhand spezifischer Protokolle isoliert und in getrennten Ansätzen kultiviert.

Morphologische Untersuchungen der verschiedenen Zellkulturen im Licht-Mikroskop zeigten je nach verwendetem Präparationsprotokoll charakteristische sternförmige Astrozyten (Abb. 17 A; modifizierte Präparation nach Lima *et al.*, 2007), mit zahlreichen Dendriten versehene Zellkörper von Neuronen (Abb. 17 B; modifizierte Präparation nach Lima *et al.*, 2007), und die typisch ballförmige Morphologie aneinander gelagerter Vorläuferzellen in Neurosphären (Abb. 17 C; modifizierte Präparation nach Giri *et al.*, 2006 und Milhavet *et al.*, 2006).

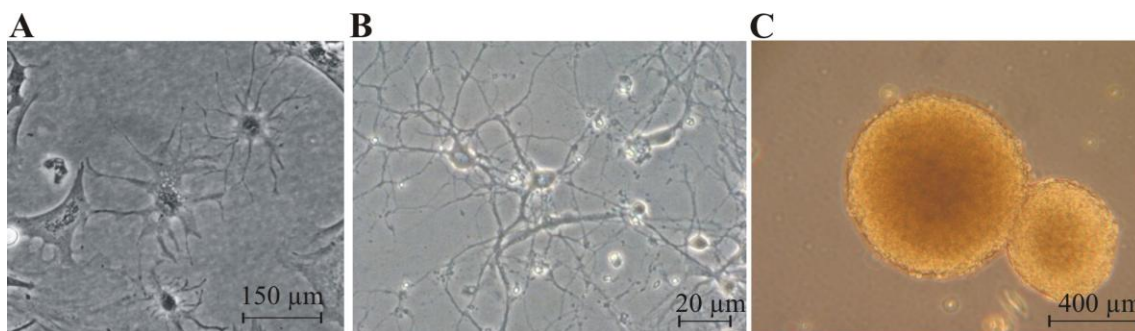


Abbildung 17: Zellmorphologie in primären Glia-, Neuronen- und Neurosphären-Kulturen syrischer Hamster. Lichtmikroskopische Aufnahmen isolierter Gliazellen (Astrozyten; A), Neuronen (B) und Neurosphären (C).

Zur Prüfung der Suszeptibilität gegenüber PrP^{Sc}-assoziiierter Keimaktivität wurden die verschiedenen primären Zellkulturen mit H^S in einer Gesamtmenge von $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ inkubiert. Anschließend wurde die Amplifikation von PrPres in den Zellkulturen im Western Blot untersucht. Dazu wurde am 3. Tag nach initialer H^S-Exposition (3 DPE) das Inokulum abgenommen und die Zellen gewaschen. Zellkulturlysate, die bei 3 DPE gewonnen wurden, wurden dann mit Zellkulturlysaten vom 40. Tag nach initialer Exposition (40 DPE) verglichen. Die Ergebnisse dieser ersten Expositionsversuche der drei verschiedenen Zelltypen sind in Abbildung 18 dargestellt.

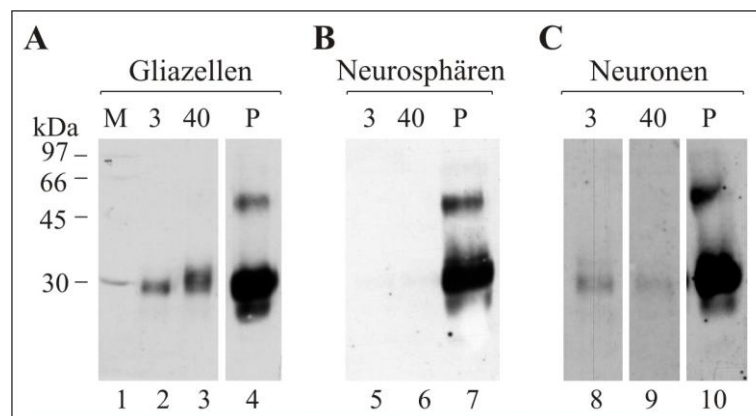


Abb. 18: Untersuchung unterschiedlicher zerebraler Hamsterzellkulturen auf PrPres-Amplifikation nach Inkubation mit Scrapie-Hirnhomogenat (H^S). Western Blot-Nachweis von PrPres in Lysaten von 3 DPE und 40 DPE in Kulturen von (A) Gliazellen, (B) Neurosphären und (C) Neuronen nach Inkubation mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S. M = Molekulargewichtsmarker, P = Positivkontrolle, PK-verdaute H^S, 1×10^{-6} HÄ.

Wie in Abb. 18 gezeigt, konnte nur in primären Gliakulturen, nicht aber in Neuronen- oder Neurosphärenkulturen eine erkennbare, geringfügige Vermehrung von PK-resistentem Prionprotein nachgewiesen werden. Zudem waren die Gliazellen relativ einfach und stabil zu kultivieren, während die Neuronen- und Neurosphärenkulturen eine anspruchsvollere Pflege mit diversen kostenintensiven Wachstumsfaktoren und Spezialmedien benötigten. Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich daher auf die Weiterentwicklung der Gliazellkultur.

Zur genaueren Bestimmung der Zelltypen in den isolierten Gliazellkulturen wurden immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis des Astrozytenmarkerproteins GFAP (engl.: *Glial fibrillary acidic protein* = „Saures Gliafaserprotein“) sowie Mikroglia-Färbungen mit Isolectin IB4 und dem Antikörper F4/80 durchgeführt. Die Auswertung mit Hilfe konfokaler Laser Scanning Mikroskopie zeigte typische

Intermediärfilamente der Astrozyten (Abb. 19, rote Färbung) sowie markierte Mikroglia (Abb. 19 A, grüne Färbung). Dementsprechend handelt es sich bei den isolierten Präparationen um Mischkulturen aus mindestens zwei unterschiedlichen Zelltypen, Astrozyten und Mikrogliazellen.

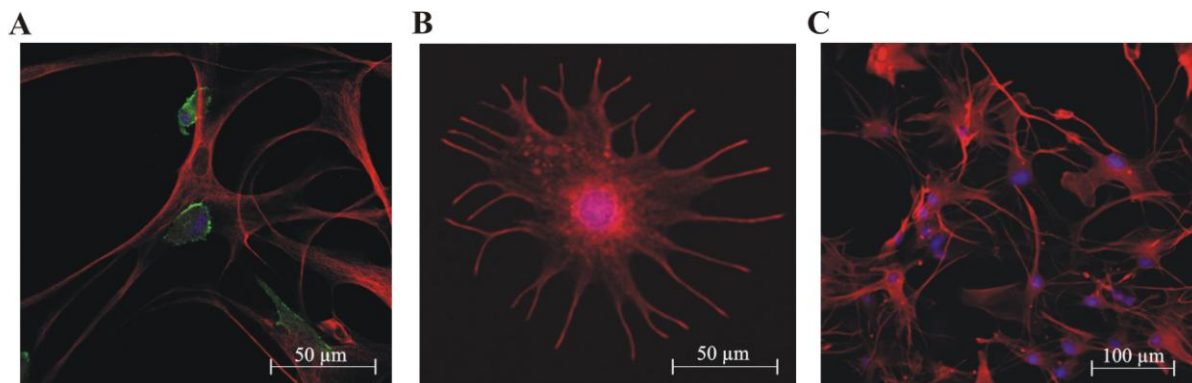


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung primärer Gliazellkulturen (Darstellung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie). (A) Anfärbung mit einem GFAP-spezifischen Antikörper (rot) und einem an Mikroglia bindenden Antikörper (F4/80 grün); (B) Mit einem GFAP-spezifischen Antikörper markierte Astrozytenzelle; (C) Übersichtsdarstellung nach Markierung mit einem GFAP-spezifischen Antikörper und Kernfärbung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI).

3.3.1.2. Nachweis der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein in primären Gliazellkulturen aus Hamstern

3.3.1.2.1 Einfluss der Zelldichte

Für die Weiterentwicklung des Zellkulturassays wurde zunächst der Einfluss der Zelldichte auf die PrPres-Amplifikation untersucht.

Um möglichst zuverlässig reine Gliazellkulturen mit reproduzierbarer Zusammensetzung zu erhalten, wurden isolierte Zellen 10 Tage in speziellem Gliazellmedium kultiviert. Anschließend wurden die primären Kulturen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen im Bereich von $7,5 \times 10^4$ bis 5×10^5 Zellen pro Kulturflasche (75 cm^2) ausgesät und mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inkubiert. Die Versuchsauswertung ist in Abbildung 20 wiedergegeben.

Negativkontrollen, in denen Gliazellkulturen nur mit uniniziertem Hamsterhirnhomogenat (H^N) inokuliert wurden wiesen nach 3 und 40 DPE kein PrPres im Western Blot auf (Daten nicht gezeigt).

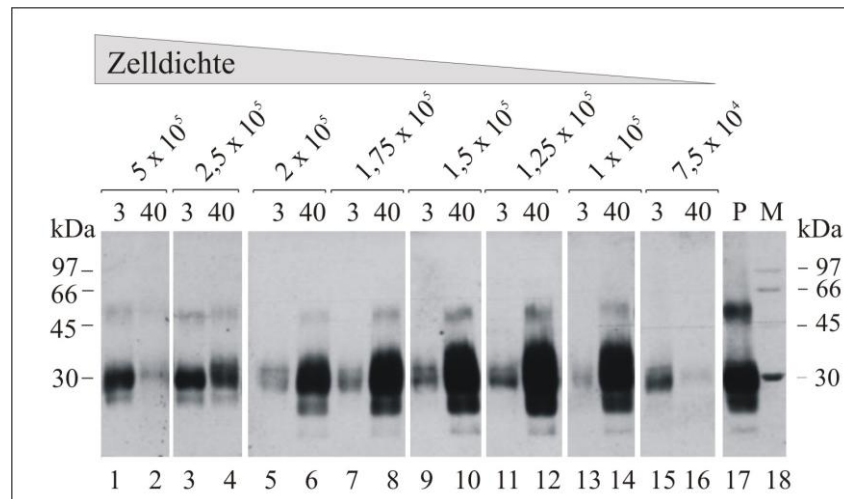


Abbildung 20: PrPres-Amplifikation in primären Gliazellkulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte. Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3 und 40 DPE in Lysaten von Kulturen, die nach Einstellung der angegebenen Zelldichten im Bereich von $7,5 \times 10^4$ bis 5×10^5 Zellen pro Kulturflasche mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inokuliert wurden. M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S, 1×10^{-6} HÄ.

Die vorgestellten Befunde zeigen, dass die Zelldichte von entscheidender Bedeutung für die Effizienz der PrPres-Amplifikation in Gliazellkulturen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der gewonnenen Befunde für alle weiteren Zellkulturversuche eine Zelldichte von $1,25 \times 10^5$ Zellen pro 75 cm^2 -Flasche verwendet.

3.3.1.2.2 Einfluss der Kultivierungsdauer

Um den Einfluss der Dauer der Zellkultivierung auf die PrPres-Amplifikation zu untersuchen wurden primäre Gliazellkulturen mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inokuliert, und die PrPres-Mengen in Zellkulturlysaten, die bei 3, 20, 31, 40, 52 und 60 DPE geerntet worden waren, im Western Blot bestimmt (Abb. 21). Während bei 3 DPE (und möglicherweise auch bei 20 DPE) vermutlich nicht vollständig entferntes PrPres aus dem Inokulum gefunden wurde, war ab 31 DPE eine Amplifikation von PrPres nachweisbar, die dann kontinuierlich bis 60 DPE zunahm.

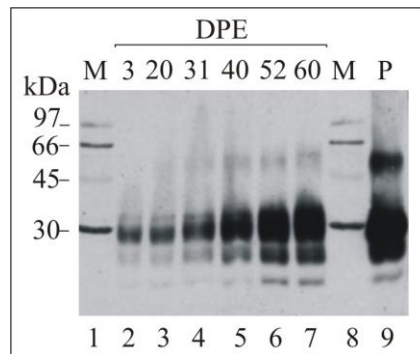


Abbildung 21: PrPres-Amplifikation in primärer Gliazellkultur in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3, 20, 31, 40, 52 und 60 DPE in Lysaten von Kulturen, die mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inokuliert wurden (Spuren 2 – 7). M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S , 1×10^{-6} HÄ.

3.3.1.2.2 Einfluss der Keimmenge

Zur Untersuchung des Einflusses der Keimmenge auf die Amplifikation von PrPres im Zellkulturassay wurden primäre Gliazellkulturen mit $2,5 \times 10^{-5}$ bis 1×10^{-6} HÄ sowie 1×10^{-8} HÄ und 1×10^{-9} HÄ H^S inokuliert. Anschließend wurde die Menge an PrPres in Zellkulturlysaten bei 3 und 40 DPE (Abb. 22 A) bzw. bei 3, 40, 60 und 80 im Western Blot (Abb. 22 B) untersucht.

Die PrPres-Amplifikation zeigt beim Vergleich der H^S -Inokulate mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ und $2,5 \times 10^{-6}$ HÄ H^S nach 40 Tagen eine deutliche Abhängigkeit von der initialen Keimmenge (Abb. 22 A, Spur 3 vs. Spur 15). Nach Beimpfung mit 1×10^{-6} HÄ H^S war bei 3 DPE kein residuales PrPres aus dem Inokulum mehr nachweisbar, wohl aber bei 40 DPE noch amplifiziertes PrPres. Demgegenüber konnte in Lysaten aus Zellkulturen, die mit 1×10^{-8} oder 1×10^{-9} HÄ H^S inokuliert worden waren weder bei 40 DPE, noch bei 60 oder 80 DPE PrPres nachgewiesen werden. Demnach liegt die Grenze zum Nachweis der biologischen Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein im optimierten Gliakulturassay zwischen 10^{-6} und 10^{-8} HÄ Scrapie-Hamsterhirnhomogenat (H^S).

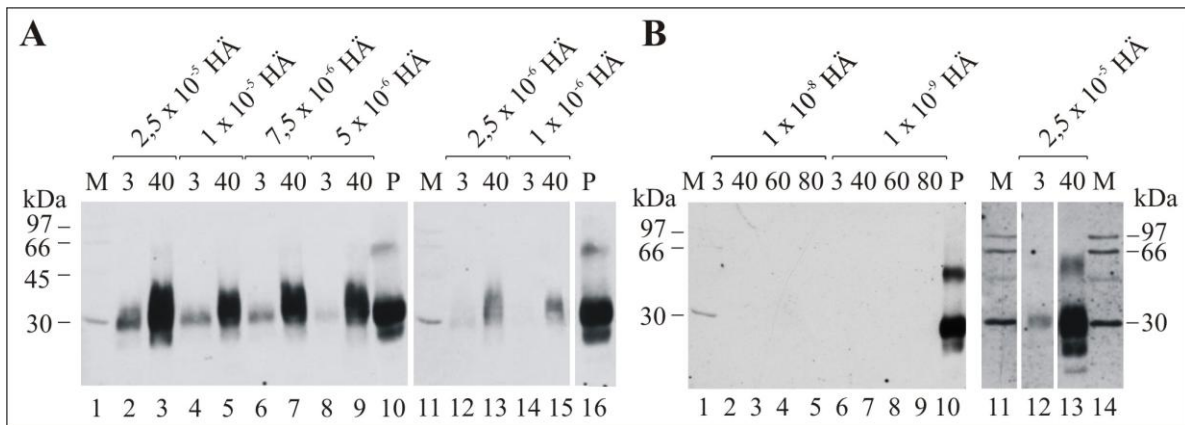


Abbildung 22: PrPres-Amplifikation in primären Gliazellkulturen in Abhängigkeit von der Keimmenge. Western Blot-Nachweis von PrPres in Lysaten von Kulturen die mit den angegebenen Keimmengen H^S beimpft und bei 3 und 40 DPE (A) bzw. 3, 40, 60 und 80 DPE (B) geerntet wurden. M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdaute H^S , 1×10^{-6} HÄ.

3.3.1.5. Nachweis der Keimaktivität von PMCA-Produkten im Zellkulturassay

Neben der biologischen Keimaktivität von H^S sollte auch diejenige von PMCA-Produkten im Zellkulturassay geprüft bzw. nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden primäre Gliazellkulturen mit PMCA-Proben inokuliert, die nach vier PMCA-Runden gesammelt worden waren und aus Ansätzen stammten, die entweder 10^{-10} HÄ H^S oder mit H^S kontaminierte Stahlstifte als initiales Keimmaterial enthielten. PMCA-Produkte, die ausgehend von H^S (PMCA-Produkt^{H^S}) oder ausgehend von mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminierten Stahlstiften (PMCA-Produkt^{Stift^{10E-8}}) gewonnen worden waren induzierten eine deutlich erkennbare PrPres-Akkumulation in der Gliazellkultur (Abb. 23 A, 3 vs. 60 DPE). Demgegenüber war nach Inokulation mit PMCA-Produkten, die mit H^N (PMCA-Produkt^{H^N}) oder H^N -kontaminierten Stahlstiften als Keimmaterial gewonnen wurden, bei 3 und 60 DPE kein PrPres in der Gliazellkultur nachzuweisen (in Abb. 23 A nur für PMCA-Produkt^{H^N} gezeigt). Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch eine Zellkultur, die mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inokuliert worden war und erwartungsgemäß bei 60 DPE eine Amplifikation von PrPres aufwies (Abb. 23 B).

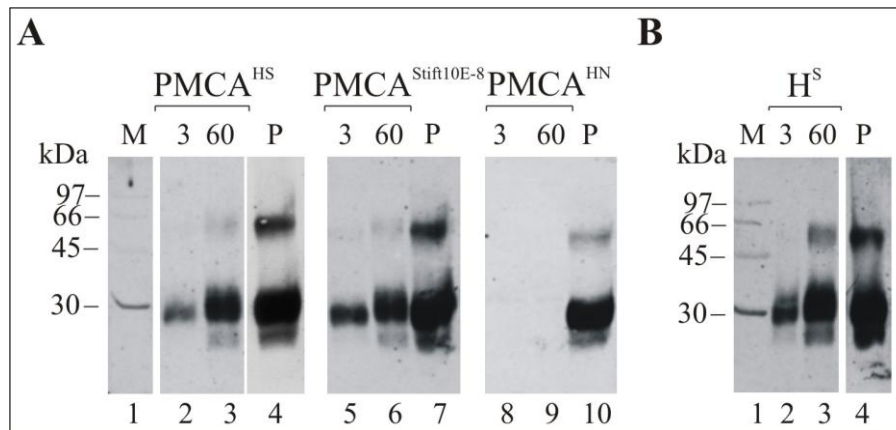


Abbildung 23: PrPres-Amplifikation in primären Gliakulturen nach Inokulation mit PMCA-Produkten. (A) Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3 und 60 DPE in Lysaten von Kulturen die mit PMCA-Produkten welche ausgehend von 10^{-10} HÄ H^S (PMCA-Produkt^{HS}), von mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminierten Stahlstiften (PMCA-Produkt^{Stift10E-8}), oder von H^N (PMCA-Produkt^{HN}) als Keimmaterial gewonnen worden waren, inokuliert wurden. (B) Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3 und 60 DPE in Lysaten von Kulturen, die mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S inokuliert wurden. M = Molekulargewichtsmarker, P = Positivkontrolle, PK-verdaute H^S , 1×10^{-6} HÄ.

Zusammenfassend konnte also sowohl die biologische Keimaktivität von H^S wie auch diejenige von PMCA-Produkten, die ausgehend von H^S oder von mit H^S kontaminierten Stahlstiften gewonnen worden waren, mit Hilfe des etablierten Gliazellassays *in vitro* belegt werden.

3.3.1.6. Validierung der Identität des in der Gliazellkultur durch Scrapie-Keimaktivität amplifizierten Proteinase K-resistenten Proteins

Um die Identität des in der Gliazellkultur amplifizierten Proteinase K-resistenten Proteins als PrPres abzusichern, wurden PK-behandelte pelletierte Zellkulturlysate bei 3 und 41 DPE nach Inokulation mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S im Western Blot mit zwei unterschiedlichen anti-PrP-Antikörpern, den monoklonalen Antikörpern 3F4 und ICSM-18, markiert (Abb. 24). Dabei binden die Antikörper an unterschiedliche Epitope des Proteins, nämlich die Aminosäuren 109 – 112 (3F4; Lowenstein *et al.*, 1990; Bolton *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1991) bzw. die Aminosäuren 146 – 159 (ICSM-18; Beringue *et al.*, 2004). Mit beiden Antikörperfärbungen zeigte sich das für PrP typische Bandentriplett von di-, mono- und unglykosyliertem Protein,

wobei die diglykosylierte Form, wie vom 263K-assoziierten PrPres bekannt, die relativ stärkste Färbeintensität aufwies.

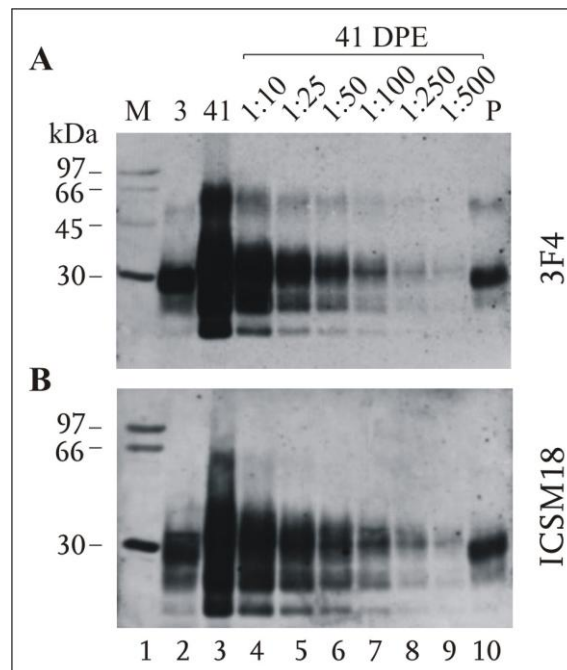


Abbildung 24: Färbung des in primären Gliazellkulturen nach Inokulation mit Scrapie-Keimaktivität amplifizierten Proteinase K-resistenten Proteins mit unterschiedlichen anti-PrP - Antikörpern. Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3 und 41 DPE in Lysaten von Kulturen nach Inokulation mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S und Markierung mit den monoklonalen anti-PrP-Antikörpern 3F4 (A) und ICSM-18 (B). 1:10 – 1:500-Verdünnungen des bei 41 DPE geernteten Zelllysats dienen zur besseren Charakterisierung (Reihen 4 – 9). M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S, 1×10^{-6} HÄ

Zur weiteren Absicherung der Identität des in der Zellkultur amplifizierten PK-resistenten Proteins wurde dieses enzymatisch deglykosyliert. Dies erfolgte mit Hilfe von PNGaseF, einer Endoglykosidase, die N-Glykan-Bindungen von Glykoproteinen zwischen Asparagin und der Kohlenhydratkette spaltet. Zur Analyse wurden Zelllysate aus Gliazellkulturen, die bei 3 und 60 DPE geerntet worden waren, mit Proteinase K verdaut und anschließend mit PNGaseF behandelt. Die für die Deglykosylierungsuntersuchungen verwendeten Zelllysate stammten aus Kulturen die mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S, oder mit PMCA-Produkten inokuliert worden waren, für die 10^{-10} HÄ H^S (PMCA-Produkt^{HS}) oder mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminierte Stahlstifte (PMCA-Produkt^{Stift10E-8}) als Keimmaterial diente.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, bewirkte die Deglykosylierung eine Reduktion des Molekulargewichtes des amplifizierten PK-resistenten Proteins auf ca. 20 kDa (Abb. 25A – C,

Spalte 2 – 5). Diese Molekulargewichtsverschiebung war für deglykosyliertes PrPres zu erwarten (Thomzig *et al.*, 2003).

Somit konnte die Identität des in den Gliazellkulturen amplifizierten PK-resistenten Proteins als PrPres durch Anfärbung mit unterschiedlichen anti-PrP-Antikörpern und enzymatische Deglykosylierung bestätigt werden.

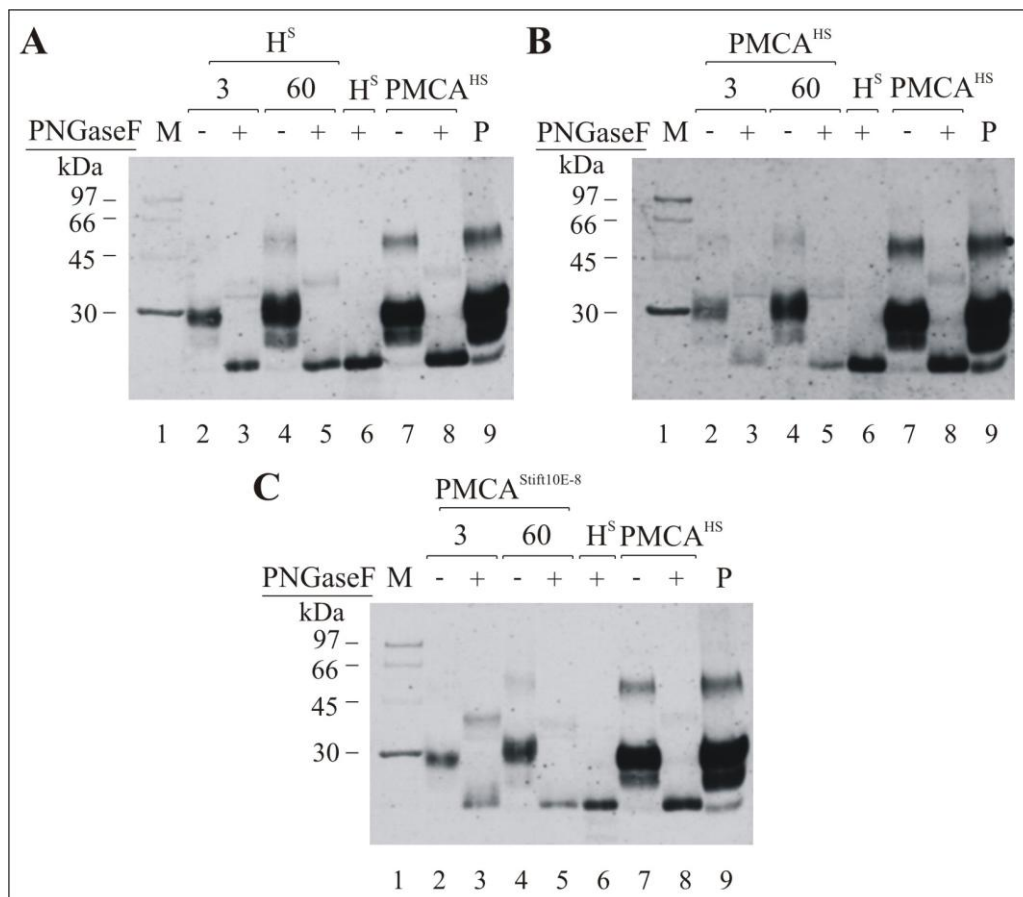


Abbildung 25: Deglykosylierung des in Gliazellkulturen durch Scrapie-assoziierte Keimaktivität amplifizierten PK-resistenten Proteins. Western Blot-Nachweis von PrPres bei 3 und 60 DPE in Lysaten von Kulturen die zunächst mit PK und anschließend mit PNGaseF behandelt wurden. Die Gliazellkulturen waren mit $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ H^S (A), oder mit PMCA-Produkten inokuliert worden, für die 10^{-10} HÄ H^S (PMCA-Produkt^{HS}) (B) bzw. mit 10^{-8} -verdünntem H^S kontaminierte Stahlstiften (PMCA-Produkt^{Stift10E-8}) (C) als Keimmateriale diente. H^S (Spur 6 in A – C): Deglykosyliertes Scrapie-Hirnhomogenat, 10^{-6} HÄ. PMCA-Produkt^{HS} (Spuren 7 + 8 in A – C): Deglykosyliertes PMCA-Produkt für das 10^{-11} HÄ H^S als Keimmateriale diente. Die 60 DPE-Proben ohne PNGaseF-Behandlung wurden vor dem Probenauftrag in $2 \times$ LPP 1:4 verdünnt. M = Molekulargewichtsmarker; P = Positivkontrolle, PK-verdautes H^S , 1×10^{-6} HÄ; + = deglykosylierte Proben; – = nicht-deglykosylierte Proben.

4. Diskussion

Prionen sind bekannt für ihre hohe Toleranz gegen Inaktivierung (Taylor *et al.*, 2000, Taylor *et al.*, 2004) und stellen daher große Herausforderungen an die sichere Aufbereitung chirurgischer Instrumente und Medizinprodukte (Beekes *et al.*, 2004). Andererseits ist es in neueren Studien gelungen, Prionen erfolgreich als aussagekräftige Modellpathogene bei der Suche nach neuen Desinfektionsmitteln mit breiter Wirksamkeit auch gegen Bakterien, Viren und Pilze zu nutzen (Lehmann *et al.*, 2009; Beekes *et al.*, 2010). Um die Aktivität von Desinfektionsmitteln gegen Prionen an praxisnahen Stahlstiftprüfkörpern zukünftig weitgehend ohne Tierversuche prüfen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit Ersatzmethoden für Prion-Bioassays in Nagetieren entwickelt und validiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe neuer Ansätze zur quantitativen biochemischen Bestimmung und zum qualitativen biologischen Nachweis der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein *in vitro*.

4.1. Quantitativer PMCA-Assay zur Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion

Die quantitative Bestimmung unbekannter Keimaktivitäten von PrP^{Sc} bzw. PrPres setzt eine standardisierte und experimentell zuverlässig kontrollierbare PMCA mit hoher Sensitivität und Spezifität voraus. Von Murayama *et al.* (2006) und Suyama *et al.* (2007) wurden bereits qualitative Ansätze zur Nutzung der PMCA-Technik für die Untersuchung der Desinfektion von Prionen beschrieben, aber quantitative PMCA-Verfahren sind erstmals 2010 (Chen *et al.*) bzw. 2011 (Wilham *et al.*) publiziert worden. Auch in unserem Labor war zu Beginn dieser Arbeit lediglich ein PMCA-Assay für den qualitativen Nachweis von Keimaktivität verfügbar. Die Sensitivität dieses Assays war relativ gering, und auch im Hinblick auf die Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit der PrPres-Amplifikation erfüllte er

nicht die Voraussetzungen für einen quantitativen Assay zur Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein.

Nach dem Nukleations-Polymerisationsmodell der Prionreplikation (Come *et al.*, 1993) ist die Keimfragmentierung bei der Vermehrung von PrPres von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich legten in der Literatur berichtete Beobachtungen auch empirisch eine unzulängliche Keimfragmentierung durch Ultraschall als wahrscheinlichste Ursache für ungleichmäßige und schlecht zu reproduzierende PMCA-Befunde nahe (Atarashi *et al.*, 2008). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst geprüft, ob sich die PMCA-Qualität durch eine optimierte Keimfragmentierung verbessern ließe.

Zentrale Idee war hier zunächst, PMCA-Probenansätze zur Keimfragmentierung nicht mit Ultraschall zu behandeln, sondern mit Glaskügelchen zu schütteln. Dabei sollten PrPres-Aggregate durch Scher- und Stoßkräfte der Glaskügelchen effizienter und homogener als durch Ultraschall fragmentiert werden. Allerdings wurden mit diesem Ansatz keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt. Vermutlich waren die durch Schütteln erzeugten Scher- und Stoßkräfte der Glaskügelchen für eine effektive Keimfragmentierung zu gering.

Durch das Zusammenwirken von Ultraschallbehandlung und Glaskügelchen konnten jedoch deutlich bessere PMCA-Resultate erzielt werden. Mittels des Ultraschalls wurden die Glaskügelchen in eine deutlich erkennbare Bewegung versetzt, und die additive oder möglicherweise auch synergistische Einwirkung der physikalischen Kräfte von Ultraschall und Glaskügelchen bewirkte offenbar eine effiziente Keimfragmentierung. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht. So haben Gonzales-Montalban *et al.* (2011) kürzlich beschrieben, dass sich die Rate, Ausbeute und Robustheit der PrPres-Amplifikation durch den Zusatz von Teflonkügelchen zu PMCA-Ansätzen erheblich steigern lässt.

Durch die Ultraschallbehandlung unter Anwesenheit von Glaskügelchen wurde auch eine gleichmäßige Durchmischung der PMCA-Ansätze erzielt. Diese ist unter anderem deswegen von Bedeutung, da zusätzlich zum PrP^C noch weitere Kofaktoren im Substrat einen Einfluss auf die PMCA-Effizienz ausüben und daher ebenfalls in gleichmäßiger Verteilung vorliegen sollten. Bei diesen Kofaktoren handelt es sich um Polyanionen wie RNA, DNA oder Glykosaminoglykane (Deleault *et al.*, 2003; Deleault *et al.*, 2007; Goggin *et al.*, 2007). So zeigten Deleault *et al.* unter anderem, dass durch die Zugabe von RNA die Effizienz der PMCA deutlich gesteigert werden

konnte (Deleault *et al.*, 2003; Deleault *et al.*, 2005). Allerdings sind insbesondere Ribonukleinsäuren gegenüber einem nukleolytischen Abbau durch RNasen sehr empfindlich. Neben der unzureichenden Keimfragmentierung und ungleichmäßigen Probendurchmischung war daher auch eine nicht hinreichende Kofaktor-Konzentration im PMCA-Substrat als weitere mögliche Ursache für die ursprünglich relativ schlechte PMCA-Qualität zu vermuten. RNasen sind nahezu allgegenwärtig und auch bei 4 °C weiterhin biochemisch aktiv, so dass es erforderlich erschien, auch die Präparation des PMCA-Substrates (H^N) entsprechend zu optimieren. Diesem Zweck dienten neben dem Zusatz von Inhibitoren gegen Nukleasen und Proteinasen eine sofortige Schockgefrierung der präparierten Normal-Hamsterhirne in flüssigem Stickstoff sowie der Aliquotierung des H^N und seine Lagerung bei -70 °C bis zum Gebrauch.

Eine weitere Verbesserung der PrPres-Amplifikation ließ sich durch die Halbierung der Zyklenzahl (24 statt 48 Zyklen pro PMCA-Runde) und die stringenteren Kontrolle der Reaktionstemperatur durch Thermostat-gesteuerte Heizschlangen (anstelle von Thermostat-gesteuerte Umlauf-Wasserbädern) erreichen. Bei Steigerung der PMCA-Sensitivität konnte so die Versuchszeit im Vergleich zum Ausgangsverfahren halbiert werden. Die positive Auswirkung der Verminderung der Zyklenzahl beruhte wahrscheinlich auf einer Reduktion zeitabhängiger Alterungs- bzw. Degradationsprozesse an Kofaktoren im PMCA-Substrat. Studien unserer Arbeitsgruppe (Wellner *et al.*, 2010; Diplomarbeit) legten nahe, dass für die PrPres-Amplifikation zusätzlich zum PrP^C erforderliche Kofaktoren im PMCA-Substrat bereits nach 20 stündigen Inkubationen bei 37 °C einem kritischen Verbrauch und/oder Abbau unterliegen.

Infolge der erzielten Sensitivitätssteigerung der PMCA kam es allerdings zu einem verstärkten Auftreten falsch positiver Befunde in den PMCA-Proben. Dafür kamen grundsätzlich zwei Erklärungen in Betracht: Eine *de novo*-Erzeugung von PrPres durch die PMCA-Behandlung von Normalhirnhomogenat, und/oder unerkannte Kontaminationen mit Prionen aus der Laborumgebung. Vor diesem Hintergrund wurden zusätzlich Maßnahmen zur Vermeidung einer PrPres-Amplifikation aufgrund von Kreuz-Kontaminationen aus der Laborumwelt ergriffen. Da mit Hilfe dieser Maßnahmen falsch-positive Befunde nachhaltig unterdrückt und eine konsistente PMCA-Spezifität gewährleistet werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass die zunächst beobachteten falsch-positiven Befunde nicht auf die *de novo*-Entstehung

von PrPres, sondern auf die Amplifikation von Kreuzkontaminationen zurückzuführen waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten verfahrenstechnischen Verbesserungen eine PMCA-basierte Methode zum Nachweis der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein etabliert werden konnte, die eine hohe Sensitivität und Spezifität mit guter Kontrollier- und Reproduzierbarkeit kombiniert. Im Vergleich zum Stand der Technik vor der Optimierung wurde dabei die Sensitivität um mindestens zwei Zehnerpotenzen erhöht. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich ab der 3. PMCA-Runde (d. h. innerhalb von 3 Tagen) eine PrPres-Amplifikation in PMCA-Proben nachweisen, die eine Keimaktivität von 10^{-11} HÄ H^S (bzw. 10^{-12} HÄ H^S, nicht gezeigt [Pritzkow *et al.*, 2011]) enthalten.

Für die neu etablierte PMCA-Technik ließ sich eine konsistente quantitative Korrelation zwischen der Menge an Keimmaterial, der Anzahl von PMCA-Runden und der Färbeintensität des amplifizierten PrPres belegen. Auf dieser Grundlage sollte sie zur quantitativen Bestimmung der Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins an Stahlstiftprüfkörpern herangezogen und validiert werden.

4.2. Abschätzung der Scrapie-Infektiosität an Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion mittels quantitativer Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein

Stahlstiftprüfkörper wie sie seit längerem in unserem Labor (Lemmer *et al.*, 2004; 2008; Beekes *et al.*, 2010) und von anderen Forschergruppen (Fichet *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2009) für Desinfektionsstudien mit Prionen verwendet werden, binden PrP^{Sc} und Scrapie-Infektiosität mit hoher Affinität (Zobeley *et al.*, 1999; Flechsig *et al.*, 2001). Die Bindung von PrP^{Sc} an die Oberflächen der verwendeten Prüfkörper, die einen Gehalt von 6 – 8 % Nickel und mehr als 2 % Molybdän aufweisen, wird vermutlich durch diese in der Edelstahllegierung enthaltenen Metalle begünstigt (Luhr *et al.*, 2009). Dabei lassen sich die Stahlstifte durch Inkubation in unterschiedlich verdünntem Scrapie-

Hirnhomogenat gleichmäßig und reproduzierbar mit definierten Mengen von Scrapie-Infektiosität beladen.

Mit Hilfe unseres optimierten PMCA-Verfahrens war es möglich, an Stahlstiften Keimaktivität nachzuweisen, wenn die Prüfkörper mit 10^{-8} - oder weniger verdünntem H^S kontaminiert worden waren. Diese Nachweisgrenze der Keimaktivität an Stahlstiftprüfkörpern lag um mindestens eine Zehnerpotenz unter derjenigen für die Scrapie-Infektiosität im Tierversuch (Lemmer *et al.*, 2008). Dabei induzierten die unterschiedlichen Keimaktivitäten an den Stahlstiften nach Beladung mit $10^{-1} - 10^{-8}$ -verdünntem H^S eine über die zunehmenden PMCA-Runden konsistente und für die jeweiligen Doppelbestimmungen gleichartige PrPres-Amplifikation.

Auf dieser Grundlage sollten die Keimaktivitäten an Testprüfkörpern nach Behandlung mit unterschiedlichen Desinfektionsverfahren durch einen quantitativen Vergleich mit der Keimaktivität an definierten Referenz-Stahlstiften mengenmäßig bestimmt werden. Testprüfkörper wurden stets zusammen mit Referenzprüfkörpern und Negativ-Kontrollen in einem Probensatz gemeinsam in der gleichen PMCA-Apparatur prozessiert, um individuelle Schwankungen zwischen verschiedenen Versuchsdurchläufen durch interne Kalibrierung auszugleichen.

Die durch einen Vergleich mit den Referenzstiften bestimmten Keimaktivitäten an den untersuchten Testprüfkörpern wurden anhand der bekannten Erregermengen an den unterschiedlich kontaminierten Referenzstiften in biologische Infektiositätstiter umgerechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse dieser Abschätzung mit den tatsächlichen Scrapie-Titern, wie sie im Rahmen vorangegangener Studien von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe an gleichartig zur Desinfektion behandelten Stiften im Tierversuch bestimmt worden waren, verglichen. Dabei zeigte sich, dass anhand des PMCA-Prüfkörper-Assays die an Teststahlstiften verbliebenen Restinfektiositäten korrekt, d. h. für alle untersuchten Desinfektionsprozeduren in Übereinstimmung mit den vorliegenden Bioassay-Daten, ermittelt wurden. Die angewandten Desinfektionsverfahren beruhten zum Teil auf unterschiedlichen Wirkprinzipien und erzielten eine Reduktion der Scrapie-Infektiosität um Faktoren von $\leq 10^1$ bis $\geq 10^{5,5}$.

Bemerkenswerterweise zeigten sich bei unabhängigen Mehrfachbestimmungen eher kleinere Diskrepanzen im Bereich des Bio- als des Keimaktivitätsassays. Der angewandte Bioassay nach der Methode der Inkubationszeitvergleiche

(Prusiner *et al.*, 1982b) ist für die Bestimmung von Prionitern hoch erregerhaltiger Proben zuverlässig und genau. Unter diesen Umständen sind die Inkubationszeiten bis zum Krankheitsausbruch relativ kurz und die Varianzen zwischen Tieren, die mit gleichartigen Proben beimpft wurden, nur schwach ausgeprägt. Allerdings weisen Bioassays auf der Grundlage von Inkubationszeitvergleichen (anders als ungleich aufwendigere Endpunkttitrationen) größere Ungenauigkeiten nach Verimpfung kleiner Priondosen auf, da mit längeren Inkubationszeiten in der Regel auch eine stärkere Streuung der Ergebnisse zustande kommt (Peretz *et al.*, 2006). Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Stiftbehandlung mit 0,5 %igem alkalischen Reiniger für 5 min bei 55 °C. Hier ergab die Doppelbestimmung im Bioassay Restinfektiositäten von > 0 bis $\leq 3 \times 10^0$ LD_{50i.c.imp.} bzw. $> 3 \times 10^0$ bis $\leq 3 \times 10^1$ LD_{50i.c.imp.} pro Teststift. Demgegenüber sprach der Keimaktivitätsassay in Mehrfachbestimmungen wiederholt für eine Restinfektiosität von $> 3 \times 10^0$ bis $\leq 3 \times 10^1$ LD_{50i.c.imp.} pro Teststift. Somit zeichnet der eine Restinfektiosität von > 0 bis $\leq 3 \times 10^0$ LD_{50i.c.imp.} anzeigende Bioassay möglicherweise ein zu günstiges Bild der Desinfektionswirkung der untersuchten Formulierung. Zur abschließenden Klärung sollte daher ggf. eine weitere Wiederholung des betreffenden Bioassays erfolgen.

Ungeachtet dessen, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass sich die Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins an Prüfkörpern für die Priondesinfektion mit Hilfe der PMCA *in vitro* quantitativ erfassen und zuverlässig in Titer biologischer Scrapie-Infektiosität umrechnen lässt. Dabei ergänzt die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PMCA-Technik zur mengenmäßigen Bestimmung der Keimaktivität kürzlich publizierte Verfahren der quantitativen PMCA (qPMCA, Chen *et al.*, 2010) bzw. des „*Real-time quaking induced conversion assay*“ (RT-QuIC, Wilham *et al.*, 2010). Anders als diese Verfahren basiert unser Ansatz allerdings auf einer internen Kalibrierung für die Messung der Keimaktivität und sollte daher unabhängiger von gerätebedingten oder sonstigen Variationen der PMCA-Effizienz sein.

In Analogie zu der engen quantitativen Korrelation, die in dieser Arbeit zwischen der Keimaktivität und der Infektiosität an Scrapie-kontaminierten Stahlstiften beobachtet wurde, berichteten auch Wilham *et al.* (2010) von einem direkten quantitativen Zusammenhang zwischen der mittels RT-QuIC und Tierversuch bestimmten Keimaktivität bzw. Infektiosität des Scrapie-Agens 263K. Durch diese Übereinstimmung, die im Hinblick auf erhebliche methodischen Unterschiede

zwischen unserem PMCA-Assay und dem von Wilham *et al.* (2010) verwendeten *RT-QuIC* noch zusätzlich Gewicht erlangt, wird die Beziehung zwischen der Prion-assoziierten biochemischen Keimaktivität und biologischen Infektiosität weiter substantiiert.

4.3. Zellbasierter Assay zum biologischen Nachweis Scrapie-assoziiierter Keimaktivität *in vitro*

Um die Scrapie-assoziierte Keimaktivität ohne Tierversuche als biologisch wirksames Prinzip *in vitro* nachweisen zu können, sollte ein zellbasierter Assay für den hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K aufgebaut werden. Die überwiegende Mehrzahl der bisher für Prionen etablierten Zellkultursysteme ist lediglich für maus-adaptierte Scrapieerreger suszeptibel (Vilette, 2008). Die Infektion kultivierter Zellen mit hamster-adaptierten 263K Scrapie-Prionen wurde demgegenüber bisher nur in einer Publikation beschrieben (Taraboulos *et al.*, 1990), und die betreffenden Zellen sind nicht allgemein zugänglich.

Als für 263K Scrapie-Prionen möglicherweise empfängliche Zellkulturmodelle erschienen primäre Kulturen von Gliazellen (Astrozyten + Mikroglia), Neuronen oder Neurosphären aus Hamstern besonders vielversprechend. Nervenzellen, Astrozyten und Mikroglia weisen bekanntermaßen eine hohe PrP^C-Expressionen und im Hirn Scrapie-kranker Tiere auch deutliche Akkumulation von PrP^{Sc} auf (Kretzschmar *et al.*, 1986a, Moser *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2000).

Nach Inokulation dieser unterschiedlichen Zellkulturtypen mit Scrapie-Hirnhomogenat zeigten nur die primären Gliakulturen, nicht aber Neuronen- oder Neurosphärenkulturen unter den gewählten Versuchsbedingungen eine erkennbare Vermehrung von PK-resistentem Prionprotein.

Die Bemühungen zur Etablierung des Zellkultursystems konzentrierten sich daher zunehmend auf die Gliazellen. Dabei wurde deutlich, dass die Zelldichte ein entscheidender Parameter für die Effizienz der PrPres-Amplifikation ist. Es war zu beobachten, dass Gliakulturen mit relativ hohen (5×10^5 Zellen/Kultur) oder niedrigen ($7,5 \times 10^4$ Zellen/Kultur) Zelldichten nach Beimpfung mit H^S keine PrPres-

Akkumulation zeigten, wohl aber Gliakulturen mit mittleren Zelldichten (z. B. $1,25 \times 10^5$ Zellen/Kultur; Abb. 20). Bei mittleren Zelldichten lagen die Zellen in den Kulturflaschen zu einem erheblichen Anteil vereinzelt vor, und zeigten auch keine ausgeprägte Zellvermehrung wie sie in dicht ausgesäten Zellkulturen auftrat. Anscheinend wurden durch eine hohe Zelldichte Zellproliferationen induziert, welche sich möglicherweise hemmend auf die PrPres-Amplifikation auswirkten.

Eine proliferationsbedingte Hemmung der PrPres-Bildung könnte auf einer schnelleren Verdünnung als Neubildung des Proteins in teilungsaktiven Gliakulturen beruhen. Ein ähnliches Phänomen wurde, wenn auch in schwächerer Ausprägung, bei sich kontinuierlich teilenden Scrapie-infizierten ScN2a-Zellen nachgewiesen. Diese zeigten eine im Vergleich zu nicht proliferierenden ScN2a-Zellen um 60 % geringere PrPres-Akkumulationen (Ghaemmaghami *et al.*, 2007).

Das Unterbleiben einer nachweisbaren Akkumulation von PrPres in Gliakulturen mit relativ geringen Zelldichten andererseits, könnte auf einer unzureichenden Ausprägung von Zellkontakten beruhen. Dabei kann das Fehlen von Zellkontakten über unterschiedliche Wege eine inhibierende Wirkung auf die PrPres-Amplifikation entfalten. So ist beispielsweise vorstellbar, dass Zellkontakte für die Übertragung von PrPres oder seiner Keimaktivität zwischen Zellen erforderlich sind. Zum anderen könnten fehlende Kontakte Zellstress auslösen und zum Absterben von Astrozyten und Mikroglia führen.

Mögliche Mechanismen und Wege der Übertragung von Prionen in Zellkulturen sind in Abb. 26 dargestellt.

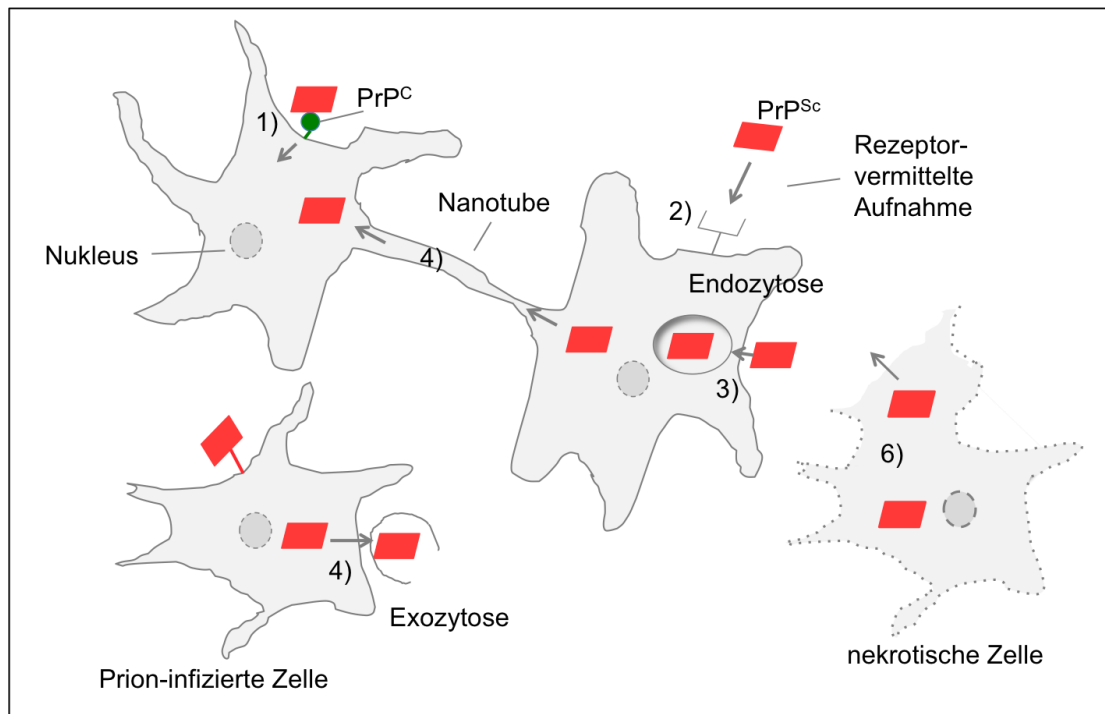


Abb. 26: Mögliche Transmissionswege von Prionen in Zellkulturen (modifiziert nach Brundin *et al.*, 2010). Aggregate des Scrapie-assoziierten Prionproteins (rotes Rechteck) interagieren mit auf der Zellmembran exponiertem zellulärem Prionprotein (grüner Kreis) oder Rezeptorproteinen, und werden durch Endozytose auf uninfizierte Zellen übertragen (1 – 3). Alternativ kann die Ausbreitung auch über „Tunnelling Nanotubes“ erfolgen, die einen Transport von PrP^{Sc} von einer Zelle zur nächsten ermöglichen (4). Weiterhin kann neugebildetes Scrapie-assoziiertes Prionprotein aktiv durch Exozytose oder passiv durch Zellyse absterbender Zellen freigesetzt und dann weiter übertragen werden (5 + 6).

Die Darstellung in Abb. 26 macht verständlich, dass neben der Zelldichte auch die Kultivierungszeit und Keimmenge einen großen Einfluss auf die PrPres-Akkumulation in Gliazellkulturen ausüben können, und zu deren Optimierung empirisch etabliert werden müssen. Nachdem auch dieses im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgt, und zusätzlich die Identität des gebildeten PK-resistenten Proteins als PrPres abgesichert worden war, ließ sich nicht nur die Keimaktivität von H^S, sondern auch diejenige von PMCA-Produkten in unserem Zellkulturassay prüfen. Dabei war es möglich, sowohl die biologische Keimaktivität von H^S wie auch die von PMCA-Produkten, welche ausgehend von H^S oder von mit H^S kontaminierten Stahlstiften amplifiziert worden war, mit Hilfe des neuen Gliazellassays *in vitro* zu belegen. Die Induktion einer PrPres-Akkumulation in Zellkulturen durch ein PMCA-

Produkt ist erstmals vor kurzem berichtet worden (Wang *et al.*, 2010). Dabei wurde allerdings keine Vermehrung der Keimaktivität in der betreffenden Zellkultur gezeigt. Mittels PMCA von Zellkulturlysaten ist es anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe inzwischen gelungen, nachzuweisen, dass H^S und PMCA-Produkte zusätzlich zur PrPres-Bildung auch eine Propagation von Keimaktivität in Gliazellkulturen induzieren (Pritzkow *et al.*, 2011). Demnach ist das etablierte Zellkultursystem gegenüber der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein insofern doppelt suszeptibel, als diese in der Kultur sowohl eine Amplifikation von PK-resistentem Prionprotein als auch die Vermehrung von Keimaktivität auslöst. Mit unserem Zellkulturassay steht nunmehr ein geeignetes Testsystem zur Verfügung, um die Keimaktivität *in vitro* als biologisch aktives (Induktion der PrPres-Bildung) und replikatives (Vermehrung der Keimaktivität) Prinzip zu belegen. Die vorliegenden Befunde legen den Schluss nahe, dass in den Zellkulturen auch eine Replikation von Scrapie-Infektiosität erfolgt, was allerdings formal nur im Tierversuch belegt werden kann.

4.4. Fazit und Ausblick

Der hier vorgestellte PMCA-Assay mit Stahlstiftprüfkörpern für die Priondesinfektion zeigte eine konsistente quantitative Korrelation zwischen der biochemischen Keimaktivität und biologischen Infektiosität von 263K Scrapie-Prionen. Begleitend dazu wurde Scrapie-assoziierte Keimaktivität in Hirnhomogenaten oder PMCA-Produkten auf ein biologisches *in vitro*-System, nämlich Gliazellkulturen, übertragen und darin vermehrt. Im experimentellen Paradigma dieser Arbeit stellt die Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein somit *in vitro* ein biochemisch und biologisch aktives und replikatives Prinzip dar.

Durch PMCA vermehrte Keimaktivität wurde bereits in früheren Studien als für Tiere infektiös nachgewiesen (Castilla *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006). Streng genommen ist diese Kongruenz allerdings nur genau für die in den genannten Arbeiten beschriebenen experimentellen Bedingungen belegt. Im Hinblick auf ethische und praktische Aspekte (Kosten, Zeitdauer) kann die Korrelation der Keimaktivität und Infektiosität von Prionen grundsätzlich nur in Einzelfällen in Tieren validiert werden.

Mit dem hier beschriebenen Zellkulturassay steht nun perspektivisch ein praktikabler Standard zur Verfügung, um mittels PMCA nachgewiesene Keimaktivität bei Bedarf, oder auch routinemäßig, als biologisch aktives und replikatives Prinzip zu validieren.

Wenn biochemische Assays zur quantitativen Bestimmung Scrapie-assoziiertes Keimaktivität zusammen mit dem Nachweis der biologischen Wirkung und Vermehrung dieser Keimaktivität in einem Zellkultursystem geführt werden, stellt dies eine für Desinfektionsstudien und andere Zwecke der Prionforschung potentiell gleichwertige oder sogar überlegene Alternative zum Prion-Bioassay in Tieren dar. Die Gliazellkultur-gekoppelte PMCA ist schneller, kostengünstiger und in ethischer Hinsicht weniger kritisch als Priontitrationen in Tieren. Sie hat daneben auch eine höhere Sensitivität und erlaubt einen wesentlich größeren Probendurchsatz. Allerdings ist es erforderlich, die Äquivalenz oder Überlegenheit kombinierter PMCA- und Zellkulturassays beim Nachweis von Prionen im Vergleich zum Tierversuch zukünftig auf eine größere Datengrundlage zu stellen und weiter zu untermauern.

Nicht zuletzt bleibt anzumerken, dass die in dieser Arbeit dargestellten Befunde widerspruchsfrei mit dem Nukleations-Polymerisationsmodell der Prionreplikation [Come *et al.*, 1993] vereinbar sind. Sie legen die proteinöse Keimaktivität und pathogene Infektiosität von 263K Scrapie-Prionen als biochemische und biologische Manifestationen desselben replikativen Prinzips nahe.

5. Zusammenfassung

Prionen verursachen transmissible spongiforme Enzephalopathien wie Scrapie, die bovine spongiforme Enzephalopathie oder die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und bestehen aus fehlgefaltetem, aggregierten Prionprotein (PrP). Aufgrund ihrer hohen Toleranz gegenüber üblichen Desinfektionsverfahren stellen sie sowohl eine besondere Herausforderung als auch ein exzellentes Paradigma für die Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten dar. Tatsächlich haben sich Prionen bereits als aussagekräftige Modellpathogene für die Entwicklung neuer Formulierungen zur hochwirksamen Desinfektion auch von Bakterien, Viren und Pilzen bewährt. Um Prionen zukünftig in größerem Umfang als Testerreger zur Entwicklung neuer Mittel und Verfahren für die Breitspektrumdesinfektion ohne Rückgriff auf Tierversuche nutzen zu können, wurden in dieser Arbeit *in vitro*-Ersatzmethoden für Prion-Bioassays in Nagetieren aufgebaut und validiert.

Zur quantitativen biochemischen Bestimmung der PrP-konvertierenden Keimaktivität des Scrapie-assoziierten Prionproteins wurde ein spezifisch adaptierter *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA)-Assay etabliert. Mit hamster-adaptierten Scrapie-Prionen (Stamm 263K) kontaminierte Stahlstifte wurden verschiedenen Desinfektionsbehandlungen und anschließend einer quantitativen PMCA unterzogen. Die Ergebnisse des PMCA-Assays wurden dann mit bereits früher erhobenen Bioassay-Daten zur Reduktion infektiöser Priontiter durch die angewandten Desinfektionsverfahren verglichen. Zusätzlich dazu wurde ein Zellkulturassay mit primären Gliazellen aus Hamstern zum biologischen *in vitro*-Nachweis der Keimaktivität des Prionproteins entwickelt.

Der Nachweis von Scrapie-assoziierte Keimaktivität an Stahlstiftprüfkörpern in der quantitativen PMCA übertraf die Sensitivität des Nachweises von Prioninfektiosität im Tierversuch um mindestens eine Größenordnung. Dabei konnte die Reduktion der Prioninfektiosität an Stahlstiftprüfkörpern durch 16 verschiedene Desinfektionsverfahren mit Titerreduktionen von weniger als 10^1 -fach bis zu größer oder gleich $10^{5.5}$ -fach durchgängig korrekt abgeschätzt werden. Mittels PMCA biochemisch nachgewiesene Keimaktivität ließ sich auch biologisch in der Zellkultur detektieren. Konzeptionell deuten die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass die proteinöse

Keimaktivität und pathogene Infektiosität von 263K Scrapie-Prionen biochemische und biologische Manifestationen desselben molekularen Prinzips darstellen. In praktischer Hinsicht steht mit der Gliazellkultur-gekoppelten PMCA potentiell eine gleichwertige oder sogar überlegene Alternative zum Prion-Bioassay in Tieren zur Verfügung.

6. Summary

Prions are misfolded, aggregated prion proteins (PrP) and the causative agents of transmissible spongiform encephalopathies such as scrapie, bovine spongiform encephalopathy (BSE) or Creutzfeldt-Jakob disease. Prions are pathogens with an unusually high tolerance to inactivation and constitute a complex challenge as well as an informative paradigm for the re-processing of surgical instruments. They have been exploited successfully as model pathogens for the development of novel disinfectants with simultaneous activity also against bacteria, viruses and fungi. In order to further facilitate the use of prions as model agents in the search for novel broad-range disinfectants without the use of animal experiments we established and validated an experimental platform for the sensitive quantitative measurement and biological detection of scrapie seeding activity *in vitro*.

We used specifically adapted serial protein misfolding cyclic amplification (PMCA) for the quantitative biochemical detection of the seeding activity of scrapie associated prion protein. Steel wires contaminated with 263K scrapie prions were subjected to different decontamination procedures and subsequently analysed by quantitative PMCA. The results of the PMCA assay were validated by comparison to bioassay data previously established for similar treatments of steel wires. Furthermore a novel cell culture assay of cerebral glial cell cultures from hamsters was established for the biological detection of 263K scrapie seeding activity.

The detection limit for scrapie seeding activity on steel wires in the PMCA assay exceeded that for prion infectivity detected by bioassay at least tenfold. The residual scrapie infectivity's on test wires treated with 16 different disinfection procedures yielding scrapie titre reductions of $\leq 10^1$ - to $\geq 10^{5.5}$ -fold could be correctly deduced, for all examined procedures, from our quantitative seeding activity assay. In addition, we found that scrapie seeding activity biochemically detected by PMCA could be also demonstrated biologically in the cell culture assay. Conceptually, the findings from this work suggested the seeding activity and infectivity of 263K scrapie prions as corresponding biochemical and biological manifestations of the same replicative molecular principle. In practical terms, our biochemical and biological *in vitro* assays, when combined, potentially provide a coequal or even superior alternative to titrations of scrapie infectivity in animals.

7. Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., Baumann, F. & Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**, 439-477.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-766.
- Aronoff-Spencer, E., Burns, C. S., Avdievich, N. I., Gerfen, G. J., Peisach, J., Antholine, W. E., Ball, H. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Millhauser, G. L. (2000). Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 13760-13771.
- Asante, E. A. & Collinge, J. (2001). Transgenic studies of the influence of the PrP structure on TSE diseases. *Adv Protein Chem* **57**, 273-311.
- Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., Onwubiko, H. A., Priola, S. A. & Caughey, B. (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* **5**, 211-212.
- Barria, M. A., Telling, G. C., Gambetti, P., Mastrianni, J. A. & Soto, C. (2011). Generation of a new form of human PrPSc in vitro by inter-species transmission from cervids prions. *J Biol Chem* **286**, 7490-5.
- Barry, R. A., Kent, S. B., McKinley, M. P., Meyer, R. K., DeArmond, S. J., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. (1986). Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J Infect Dis* **153**, 848-854.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-428.
- Beekes, M. (2010). [Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) : Epidemiology and prevention from human to human secondary transmission]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **53**, 597-605.
- Beekes, M., Baldauf, E. & Diringer, H. (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* **77** (Pt 8), 1925-1934.
- Beekes, M., Lemmer, K., Thomzig, A., Joncic, M., Tintelnot, K. & Mielke, M. (2010). Fast, broad-range disinfection of bacteria, fungi, viruses and prions. *J Gen Virol* **91**, 580-589.
- Beekes, M., Mielke, M., Pauli, G., Baier, M. & Kurth, R. (2004). Aspects of risk assessment and risk management of nosocomial transmission of classical and variant Creutzfeldt-Jakob disease with special attention to German regulations.. *Contrib Microbiol* **11**, 117-35.
- Belay, E. D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* **53**, 283-314.
- Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudelli, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., Kasczak, R. J., Cashman, N. R. & Bolton, D. C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**, 149-156.
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaiser, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J. & Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* **126**, 2065-2073.
- Bessen, R. A. & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**, 7859-7868.
- Bieschke, J., Weber, P., Sarafoff, N., Beekes, M., Giese, A. & Kretzschmar, H. (2004). Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12207-12211.
- Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1997). Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7281-7285.
- Bolton, D. C., Seligman, S. J., Bablanian, G., Windsor, D., Scala, L. J., Kim, K. S., Chen, C. M., Kasczak, R. J. & Bendheim, P. E. (1991). Molecular location of a species-specific epitope on the hamster scrapie agent protein. *J Virol* **65**, 3667-75.
- Brown, D. R. (2001). Copper and prion disease. *Brain Res Bull* **55**, 165-173.
- Brown, D. R. (2002). Copper and prion diseases. *Biochem Soc Trans* **30**, 742-745.

- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. & Kretzschmar, H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. & Kretzschmar, H. A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**, 104-112.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. & Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344 Pt 1**, 1-5.
- Brown, P. (2000). The risk of blood-borne Creutzfeldt-Jakob disease. *Dev Biol (Basel)* **102**, 53-59.
- Brown, P., Liberski, P. P., Wolff, A. & Gajdusek, D. C. (1990). Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *J Infect Dis* **161**, 467-472.
- Brown, P., Preece, M. A. & Will, R. G. (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **340**, 24-27.
- Brown, P., Rohwer, R. G. & Gajdusek, D. C. (1986). Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J Infect Dis* **153**, 1145-1148.
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* **49**, 822-838.
- Bruce, M. E. & Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**, 125-138.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
- Brundin, P., Melki, R. & Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 301-307.
- Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull* **66**, 121-130.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguett, M. & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguett, M. & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582.
- Burger, D. & Hartsough, G. R. (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis* **115**, 393-399.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C. M., Lario, P., Avdievich, N. I., Antholine, W. E., Olmstead, M. M., Vrielink, A., Gerfen, G. J., Peisach, J., Scott, W. G. & Millhauser, G. L. (2002). Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* **41**, 3991-4001.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S. B., Antholine, W. E., Gerfen, G. J., Peisach, J. & Millhauser, G. L. (2003). Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **42**, 6794-6803.
- Buschmann, A. & Groschup, M. H. (2005). Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* **192**, 934-942.
- Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T. & Prusiner, S. B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* **62**, 1558-1564.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Perez, D. R., Guntert, P. & Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 651-655.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**, 195-206.
- Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B. & Jeffrey, M. (2009). Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem* **78**, 177-204.
- Cereghetti, G. M., Schweiger, A., Glockshuber, R. & Van Doorslaer, S. (2001). Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu(2+) to the C-terminal domain of the murine prion protein. *Biophys J* **81**, 516-525.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**, 1378-1379.
- Chen, B., Morales, R., Barria, M. A. & Soto, C. (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods* **7**, 519-520.

- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M. & *et al.* (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-333.
- Chiaroni, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R. & Linden, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* **21**, 3317-3326.
- Choi, C. J., Kanthasamy, A., Anantharam, V. & Kanthasamy, A. G. (2006). Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. *Neurotoxicology* **27**, 777-787.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. & Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* **264**, 530-531.
- Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* **67**, 793-819.
- Colling, S. B., Collinge, J. & Jefferys, J. G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* **209**, 49-52.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**, 519-550.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-690.
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D. J. & Alpers, M. P. (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**, 2068-2074.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. & Jefferys, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297.
- Come, J. H., Fraser, P.E. & Lansbury, P.T. Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5959-5963.
- Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **57**, 1-18.
- Cronier, S., Laude, H. & Peyrin, J. M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12271-12276.
- Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. & Baron, T. (2001). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* **75**, 5328-5334.
- Cuillé, J. & Chelle, P. L. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **203**.
- Dawson, M., Wells, G. A. H., B.N.J., P. & Scott, A. C. (1991). Transmission studies of BSE in cattle, hamster, pugs and domestic fowl. *Subacute spongiform Encephalopathies Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 25-32.
- DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1996). Transgenetics and neuropathology of prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* **207**, 125-146.
- Deleault, N. R., Geoghegan, J. C., Nishina, K., Kasczak, R., Williamson, R. A. & Supattapone, S. (2005). Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* **280**, 26873-26879.
- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R. & Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9741-9746.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W. & Supattapone, S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* **425**, 717-720.
- Diringer, H., Beekes, M. & Oberdieck, U. (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci* **724**, 246-258.
- Diringer, H., Braig, H. R. & Czub, M. (1988). Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. *Ciba Found Symp* **135**, 135-145.
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13452-13457.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B. & Cowen, D. (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**, 692-693.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. & Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8388.

- Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (2010).** Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt der Europäischen Union* **L 276**, 33-79.
- Ficht, G., Comoy, E., Dehen, C., Challier, L., Antloga, K., Deslys, J. P. & McDonnell, G. (2007)** Investigations of a prion infectivity assay to evaluate methods for decontamination. *J Microbiol Methods* **70**, 511-518.
- Ficht, G., Comoy, E., Duval, C., Antloga, K., Dehen, C., Charbonnier, A., McDonnell, G., Brown, P., Lasmezas, C. I. & Deslys, J. P. (2004).** Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* **364**, 521-526.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996).** Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**, 1255-1264.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Enari, M., Schwarz, P., Collinge, J. & Weissmann, C. (2001).** Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* **7**, 679-684.
- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F. & Grigoriev, V. (2000).** Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* **50**, 76-88.
- Fraser, H. & Dickinson, A. G. (1973).** Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* **83**, 29-40.
- Gabriel, J. M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. & Prusiner, S. B. (1992).** Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9097-9101.
- Gajdusek, D. C. & Zigas, V. (1957).** Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* **257**, 974-978.
- Gerstmann, J. (1936).** Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems, zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für Neurologie* **161**, 736-762.
- Ghaemmaghami, S., Phuan, P. W., Perkins, B., Ullman, J., May, B. C., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2007).** Cell division modulates prion accumulation in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17971-17976.
- Gibbs, C. J., Jr. & Bolis, C. L. (1997).** Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol Psychiatry* **2**, 146-147.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C. & Latarjet, R. (1978).** Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 6268-6270.
- Giri, R. K., Young, R., Pitstick, R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Carlson, G. A. (2006).** Prion infection of mouse neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3875-80.
- Glatzel, M. & Aguzzi, A. (2001).** The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 241-248.
- Goggin, K., Bissonnette, C., Grenier, C., Volkov, L. & Roucou, X. (2007).** Aggregation of cellular prion protein is initiated by proximity-induced dimerization. *J Neurochem* **102**, 1195-1205.
- Gonzalez-Montalban, N., Makarava, N., Ostapchenko, V. G., Savtchenko, R., Alexeeva, I., Rohwer, R. G. & Baskakov, I. V. (2011).** Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog.* **7**, e1001277.
- Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F. & Wuthrich, K. (2005).** Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 646-650.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2004).** Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8342-8347.
- Griffith, J. S. (1967).** Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-1044.
- Hadlow, W. J. (1959).** Scrapie and Kuru. *Lancet*, 289-290.
- Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G. & Bayley, P. M. (2004).** The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J Mol Biol* **336**, 1175-1183.
- Hajj, G. N., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., da Silveira, R. B., Santos, T. G., Ribeiro, K. C., Juliano, M. A., Jacchieri, S. G., Zanata, S. M. & Martins, V. R. (2007).** Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci* **120**, 1915-26.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A. & et al. (1989).** Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* **274**, 1-13.
- Harris, D. A. (1999).** Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* **12**, 429-444.

- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-450, 526.
- Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, A., Will, R. G., MacDiarmid, S. C., Wells, G. A. H. & Alpers, M. P. (2007). Historical Introduction. *Prions in Humans and Animals* **1**, 3-27.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R. & Candy, J. M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 621-629.
- Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. & Prusiner, S. B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338**, 342-345.
- Huang, W. M., Gibson, S. J., Facer, P., Gu, J. & Polak, J. M. (1983). Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry* **77**, 275-9.
- Hugel, B., Martinez, M. C., Kunzelmann, C., Blattler, T., Aguzzi, A. & Freyssenet, J. M. (2004). Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2998-3007.
- Ironside, J. W. (1998). Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**, 91-95.
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (Spastische Pseudosklerose-Enzephalomyelopathy mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitschrift der Nervenkrankheiten* **70**, 132-146.
- Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058.
- Jones, C. E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S. R., Brown, D. R. & Viles, J. H. (2005). Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and 1H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations. *J Mol Biol* **346**, 1393-1407.
- Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. & Diringer, H. (1985). Biochemical differences among scrapie-associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol* **66** (Pt 8), 1715-1722.
- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. (1988). Pathogenesis of experimental scrapie. *Ciba Found Symp* **135**, 37-62.
- Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota, M. L., Jr., Walz, R., Andrades, M. E., da Silva, E. G., Brentani, R. R., Izquierdo, I. & Fonseca Moreira, J. C. (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* **30**, 1137-1144.
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C. & Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* **8**, 799-847.
- Knight, R. S. & Will, R. G. (2004). Prion diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75** Suppl 1, i36-42.
- Kramer, M. L., Kratzin, H. D., Schmidt, B., Romer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S. & Kretzschmar, H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* **276**, 16711-16719.
- Kretzschmar, H. A., Ironside, J. W., DeArmond, S. J. & Tateishi, J. (1996). Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **53**, 913-920.
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. & DeArmond, S. J. (1986a). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**, 1-5.
- Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. & Dearmond, S. J. (1986b). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315-324.
- Kuczius, T. & Groschup, M. H. (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.
- Kurt, T. D., Telling, G. C., Zabel, M. D. & Hoover, E. A. (2009). Trans-species amplification of PrP(CWD) and correlation with rigid loop 170N. *Virology* **387**, 235-243.
- Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-744.
- Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. & Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-1132.

- Le Pichon, C. E., Valley, M. T., Polymenidou, M., Chesler, A. T., Sagdullaev, B. T., Aguzzi, A. & Firestein, S. (2009). Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**, 60-69.
- Leggett, M. M., Dukes, J. & Pirie, H. M. (1990). A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec* **127**, 586-588.
- Lehmann, S., Pastore, M., Rogez-Kreuz, C., Richard, M., Belondrade, M., Rauwel, G., Durand, F., Yousfi, R., Criquelion, J., Clayette, P. & Perret-Liaudet, A. (2009). New hospital disinfection processes for both conventional and prion infectious agents compatible with thermosensitive medical equipment. *J Hosp Infect* **72**, 342-50.
- Lemmer, K., Mielke, M., Kratzel, C., Joncic, M., Oezel, M., Pauli, G. & Beekes, M. (2008). Decontamination of surgical instruments from prions. II. In vivo findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces. *J Gen Virol* **89**, 348-358.
- Lemmer, K., Mielke, M., Pauli, G. & Beekes, M. (2004). Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrPSc bound to steel surfaces. *J Gen Virol* **85**, 3805-3816.
- Lima, F. R., Arantes, C. P., Muras, A. G., Nomizo, R., Brentani, R. R. & Martins, V. R. (2007). Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* **103**, 2164-2176.
- Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R. & Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8334-8339.
- Lowenstein, D. H., Butler, D. A., Westaway, D., McKinley, M. P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S.B. (1990). Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins. *Mol Cell Biol* **10**, 1153-63.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M. & Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**, 997-1003.
- Luhr, K. M., Low, P., Taraboulos, A., Bergman, T. & Kristensson, K. (2009). Prion adsorption to stainless steel is promoted by nickel and molybdenum. *J Gen Virol* **90**, 2821-2828.
- Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. & Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 640-645.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. & Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**, 121-127.
- Manuelidis, L. (1997). Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease and other transmissible agents. *J Neurovirol* **3**, 62-65.
- Marsh, R. F. & Kimberlin, R. H. (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J Infect Dis* **131**, 104-110.
- McGowan, J. P. (1922). Scrapie in sheep. *Scot J Agri* **5**, 365-374.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**, 63-74.
- Milhavet, O., Casanova, D., Chevallier, N., McKay, R. D. & Lehmann, S. (2006). Neural stem cell model for prion propagation. *Stem Cells* **24**, 2284-91.
- Miller, M. W. & Williams, E. S. (2004). Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* **284**, 193-214.
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. & Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-517.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. & Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-1928.
- Murayama, Y., Yoshioka, M., Horii, H., Takata, M., Yokoyama, T., Sudo, T., Sato, K., Shinagawa, M. & Mohri, S. (2006). Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochem Biophys Res Comm* **348**, 758-762.
- National CJD Surveillance Unit (NCJDSU); Edinburgh, S. (März 2010). <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>.

- Nishida, N., Harris, D. A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavel, O. & Lehmann, S. (2000). Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* **74**, 320-325.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. & *et al.* (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-746.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & *et al.* (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-10966.
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B. & Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **39**, 767-778.
- Peretz, D., Supattapone, S., Giles, K., Vergara, J., Freyman, Y., Lessard, P., Safar, J. G., Glidden, D. V., McCulloch, C., Nguyen, H. O., Scott, M., Dearmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2006). Inactivation of prions by acidic sodium dodecyl sulfate. *J Virol* **80**, 322-331.
- Philipps, N., Bridgeman, J. & Ferguson-Smith, M. (2000). BSE inquiry report. *Science-Stationary Office, London* **2**.
- Premzl, M., Gready, J. E., Jermini, L. S., Simonic, T. & Marshall Graves, J. A. (2004). Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins--clues from comparative genomic analysis. *Mol Biol Evol* **21**, 2210-2231.
- Prior, F., Fernie, K., Renfrew, A. & Heneaghan, G. (2004). Alcoholic fixation of blood to surgical instruments--a possible factor in the surgical transmission of CJD? *J Hosp Infect* **58**, 78-80.
- Pritzkow, S., Wagenführ, K., Daus, M. L., Boerner, S., Lemmer, K., Mielke, M., Thomzig, A. & Beekes, M. (2011). Quantitative detection and biological propagation of scrapie seeding activity in vitro facilitate use of prions as model pathogens for disinfection. *PLoS one*
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner, S. B. (1998a). The prion diseases. *Brain Pathol* **8**, 499-513.
- Prusiner, S. B. (1998b). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-13383.
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P. & McKinley, M. P. (1982a). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**, 6942-6950.
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A. & Martinez, H. M. (1982b). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* **11**, 353-358.
- Prusiner, S. B., Gabizon, R. & McKinley, M. P. (1987). On the biology of prions. *Acta Neuropathol* **72**, 299-314.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., Masiarz, F. R., McKinley, M. P. & Martinez, H. M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* **19**, 4883-4891.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., McKinley, M. P., Cochran, S. P., Bowman, K. A. & Kasper, K. C. (1981). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4606-4610.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F. & Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-358.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A. & *et al.* (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-686.
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. & Cohen, F. E. (1998). Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-348.
- Race, R. E., Fadness, L. H. & Chesebro, B. (1987). Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* **68** (Pt 5), 1391-1399.
- Race, R. E., Priola, S. A., Bessen, R. A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G. F., Mucke, L., Chesebro, B. & Oldstone, M. B. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* **15**, 1183-1191.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-182.

- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* **413**, 282-288.
- Riesner, D. (2003). Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* **66**, 21-33.
- Riesner, D. (2007). The scrapie isoform of the prion protein PrP^{Sc} compared to the cellular isoform PrP^C. *Prions in Humans and Animals* **8**, 104-118.
- Rogers, M., Serban, D., Gyuris, T., Scott, M., Torchia, T. & Prusiner, S. B. (1991). Epitope mapping of the Syrian hamster prion protein utilizing chimeric and mutant genes in a vaccinia virus expression system. *J Immunol* **147**, 3568-74.
- Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A. & Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13044-13049.
- Saborío, G. P., Permanne, B. & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810-813.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **268**, 20276-20284.
- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362-374.
- Schätzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., Mobley, W. C. & Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* **71**, 8821-8831.
- Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14279-14284.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15137-15142.
- Sigurdson, C. J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E. A., Hornemann, S., Polymenidou, M., Miller, M. W., Glatzel, M. & Aguzzi, A. (2006). Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol* **80**, 12303-12311.
- Sigurdsson, B. (1954). Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks in infectious which develop slow and some of their special characteristics. *Brit Vet J* **110**, 341-354.
- Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Cecilian, F. & Ronchi, S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett* **469**, 33-38.
- Singh, A., Mohan, M. L., Isaac, A. O., Luo, X., Petrak, J., Vyoral, D. & Singh, N. (2009). Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. *PLoS One* **4**, e4468.
- Soto, C., Anderes, L., Suardi, S., Cardone, F., Castilla, J., Frossard, M. J., Peano, S., Saa, P., Limido, L., Carbonatto, M., Ironside, J., Torres, J. M., Pocchiari, M. & Tagliavini, F. (2005). Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett* **579**, 638-642.
- Soto, C., Saborio, G. P. & Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci* **25**, 390-394.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L. & Prusiner, S. B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**, 1991-2002.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-240.
- Strumbo, B., Ronchi, S., Bolis, L. C. & Simonic, T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* **508**, 170-174.
- Suyama, K., Yoshioka, M., Akagawa, M., Murayama, Y., Horii, H., Takata, M., Yokoyama, T. & Mohri, S. (2007). Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 245-248.
- Suzuki, T., Kurokawa, T., Hashimoto, H. & Sugiyama, M. (2002). cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 912-917.

- Taraboulos, A., Serban, D. & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol* **110**, 2117-2132.
- Taylor, D. M. (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J* **159**, 10-17.
- Taylor, D. M. (2004). Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination. *Contrib Microbiol* **11**, 136-145.
- Taylor, D. M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D. A., Brown, K. L., Lamza, K. A. & Smith, G. R. (1994). Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* **139**, 313-326.
- Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev* **10**, 1736-1750.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90.
- Thompsett, A. R., Abdelraheim, S. R., Daniels, M. & Brown, D. R. (2005). High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques. *J Biol Chem* **280**, 42750-42758.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. & Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642.
- Thomzig, A., Kratzel, C., Lenz, G., Krüger, D. & Beekes, M. (2003). Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep* **4**, 530-3.
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* **176**, 21-30.
- van Rheede, T., Smolenaars, M. M., Madsen, O. & de Jong, W. W. (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol* **20**, 111-121.
- Viles, J. H., Klewpatinond, M. & Nadal, R. C. (2008). Copper and the structural biology of the prion protein. *Biochem Soc Trans* **36**, 1288-1292.
- Vilette, D. (2008). Cell models of prion infection. *Vet Res* **39**, 10.
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G. & Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**, 1132-1135.
- Weber, P., Giese, A., Piening, N., Mitteregger, G., Thomzig, A., Beekes, M. & Kretschmar, H. A. (2006). Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15818-15823.
- Wellner, B. (2010). Untersuchung zu polyanionischen Co-Faktoren bei der autokatalytischen Vermehrung von fehlgefaltetem Prionprotein in vitro mittels Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Diplomarbeit, Freie Universität Berlin*.
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**, 419-420.
- Whittington, M. A., Sidle, K. C., Gowland, I., Meads, J., Hill, A. F., Palmer, M. S., Jefferys, J. G. & Collinge, J. (1995). Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* **9**, 197-201.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**, 199-203.
- Wilesmith, J. W. & Wells, G. A. (1991). Bovine spongiform encephalopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**, 21-38.
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P. & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* **123**, 638-644.
- Wilham, J. M., Orru, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K. D., Taubner, L. M., Timmes, A. & Caughey, B. (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* **6**, e1001217.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.
- Williams, E. S. & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**, 89-98.
- Willoughby, K., Kelly, D. F., Lyon, D. G. & Wells, G. A. (1992). Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*). *Vet Rec* **131**, 431-434.

- Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. & Schätzl, H. M. (1999).** Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**, 1163-1178.
- World Organisation for Animal Health (OIE) (2010).** www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data.
- Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T. N., Gruffydd-Jones, T. J., Wells, G. A. & Wilesmith, J. W. (1991).** Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* **129**, 233-236.
- Yan, Z. X., Stitz, L., Heeg, P., Pfaff, E. & Roth, K. (2004).** Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**, 280-283.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. & Wuthrich, K. (2000).** NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-150.
- Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999).** Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* **5**, 240-243.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

®.....	eingetragenes Warenzeichen
263K.....	Hamster-adaptierter Scrapie Stamm
Abb.....	Abbildung
APS.....	Ammoniumpersulfat
AP.....	Alkalische Phosphatase
AS.....	Aminosäure
bFGF.....	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (engl.: <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BSE.....	spongiforme Enzephalopathie bei Rindern (engl.: <i>Bovine Spongiforme Enzephalopathy</i>)
°C.....	Grad Celsius
ca.....	circa
CAPS.....	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-Aminopropan-Sulfonsäure (engl.: <i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>)
CDP.....	2-Chlor-5-(4-Methoxy Spiro-1,2-Dioxetan-3,2-(5-Chlor))
CHES.....	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-Aminoethan-Sulfonsäure (engl.: <i>N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid</i>)
CJK.....	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl.: <i>Creutzfeldt-Jakob-Disease [CJD]</i>)
cLSM.....	konfokale Laser Scanning Mikroskopie (engl.: <i>confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CSF.....	Zerebrospinalflüssigkeit (engl.: <i>Cerebrospinal Fluid</i>)
CWD.....	Chronische Auszehrung bei Zerviden (engl.: <i>Chronic Wasting Disease</i>)
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ddH ₂ O.....	doppelt destilliertes Wasser
d. h.....	das heißt
dpe.....	Tage nach der initialen Exposition
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF.....	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)
ER.....	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et altera</i>)
fCJK.....	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FFI.....	fatale familiäre Schlafstörung (engl.: <i>Fatal Familial Insomnia</i>)
FSE.....	spongiforme Enzephalopathie bei Katzen (engl.: <i>Feline Spongiforme Encephalopathy</i>)
g.....	Gramm
GDA.....	Glutardialdehyd
GdnSCN.....	Guanidiniumthiocyanat
GFAP.....	saures Gliafaser Protein (engl.: <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GIM.....	Gliazellisationsmedium
GPI.....	Glykolipid-Phosphatidylinositol
GSS.....	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
GWM.....	Gliazellwachstumsmedium
h.....	Stunden
HÄ.....	Hirnäquivalent
HCl.....	Chlorwasserstoffsäure
H ^N	Hirnhomogenat von normalen Hamstern
H ^S	Hirnhomogenat von mit 263K Scrapie infizierten Hamster
i.c.....	intrazerebral (engl.: <i>intracerebral</i>)
iCJK.....	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
IgG.....	Immunglobulin G
imp.....	implantiert
KA _{TS}	Keimaktivität an den Teststiften
KA _{RS}	Keimaktivität an den Referenzstiften
kDA.....	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LD _{50ic.imp.}	mittlere letale Dosis der 263K Scrapie Infektiosität nach intrazerebraler Implantation
logs.....	Log ₁₀ -Stufen
LPP.....	Laemmli-Probenpuffer

min.....	Minuten
ml.....	Milliliter
mM.....	milli Molar
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOCl.....	Natriumhypochlorid
NaOH.....	Natriumhydroxid
NB.....	Neurobasalmedium
NCJDSU.....	<i>National CJD Surveillance Unit</i>
NGS.....	normales Ziegen Serum (engl.: <i>Normal Goat Serum</i>)
NMR.....	Kernspinresonanz (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NSPM.....	Neurospären Medium
OIE.....	<i>World Organisation for Animal Health</i>
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Phosphat-Buffered Saline</i>)
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PK.....	Proteinase K
PMCA.....	zyklische Amplifikation fehlgefalten Proteins (engl.: <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i>)
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF.....	N-Glycosidase F
Prion.....	proteinöses infektiöses Partikel (engl.: <i>Proteinaceous Infectious Particle</i>)
PrP.....	Prionprotein
PrP*.....	metastabiler Übergangszustand des Prionproteins
PrP ²⁷⁻³⁰	Proteinase K resistenter Kern des PrP ^{Sc}
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrPres.....	Protease resistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	fehlgefaltetes, unlösliches Prionprotein
PVDF.....	Polyvinylidendifluoride
qPMCA.....	quantitative PMCA
RF.....	Reduktionsfaktor
RKI.....	Robert Koch-Institut

RML.....	mausadaptiertes Scrapie-Isolat (<i>Rocky-Mountain-Laboratory</i>)
RNA.....	Ribonucleinsäure (engl.. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm.....	Umdrehungen pro minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RT.....	Raumtemperatur
RT-QuIC.....	<i>Real Time Quaking Induced Conversion Assay</i>
S.....	Schwefel
SA.....	Standardabweichung
SAF.....	mit Scrapie assoziierte Fibrillen (engl.: <i>Scrapie Associated Fibril</i>)
Sarcosyl.....	N-Lauroylsarcosine
sCJK.....	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS.....	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE.....	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
sec.....	Sekunden
sPMCA.....	serielle PMCA
SVZ.....	subventrikuläre Zone
Tab.....	Tabelle
Tag ₄₀	Zellen am 40. Tag nach der Beimpfung
Tbl.....	Tablette
TBS.....	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Tris-Buffered Saline</i>)
TBST.....	TBS mit Tween 20 (engl.: <i>Tris-Buffered Saline Tween 20</i>)
TEMED.....	Tetramethylethyldiamin
TME.....	übertragbare Enzephalopathie der Nerze (engl.: <i>Transmissible Mink Encephalopathy</i>)
TRIS.....	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSE.....	übertragbare schwammartige Enzephalopathien (<i>Transmissible Spongiforme Encephalopathy</i>)
Tween 20.....	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV.....	Ultraviolett
vCJK.....	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
VK.....	Vereinigtes Königreich
vs.....	versus

v/v..... Volumen pro Volumen

W.....Watt

w/v..... Gewicht pro Volumen

z. B.....zum Beispiel

ZNS.....Zentralnervensystem

8.2. Publikationsliste

Publikationen:

Quantitative detection and biological propagation of scrapie seeding activity in vitro facilitate use of prions as model pathogens for disinfection.

Pritzkow, S., Wagenführ, K., Daus, M. L., Boerner, S., Lemmer, K., Mielke, M., Thomzig, A. & Beekes, M.

PLoS one (2011; akzeptiert)

PrP^{TSE} in muscle-associated lymphatic tissue during the preclinical stage of mice infected orally with bovine spongiform encephalopathy.

Cardone, F., Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Valanzano, A., Sbriccoli, M., Abdel-Haq, H., Graziano, S., Pritzkow, S., Puopolo, M., Brown, P., Beekes, M. & Pocchiari, M.

J Gen Virol. 2009; **90**: 2563-2568

Poster:

Towards primary cell cultures for the titration of 263K scrapie agent.

Pritzkow, S., Kottwitz, D., Beekes, M.

Prion 2009. 23. – 25. September 2009, Thessalonik, Griechenland. PosterP.2.50

8.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser
Dissertationsarbeit beigetragen haben bedanken.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Michael Beekes für die Bereitstellung dieses
interessanten Themas sowie der tatkräftigen Unterstützung während des gesamten
Promotionszeitraums.

Des Weiteren möchte ich Professor Dr. Gerd Multhaup für die Übernahme des
Gutachtens danken, wodurch meine Promotion im Fachbereich Biochemie an der
Freien Universität Berlin erst ermöglicht wurde.

Ferner geht mein Dank auch an die restlichen Mitglieder der Arbeitsgruppe von P24
die mir mit Rat und Tat bei schwierigen Fragestellungen zur Seite standen sowie Dr.
Achim Thomzig und Dr. Martin Daus für das Korrekturlesen des theoretischen Teils
dieser Arbeit.

Mario Exner danke ich für die stetige Bereitschaft meine kreativen Ideen für Bauteile
in die Tat umzusetzen.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und gleichermaßen
meinem Freund, deren aufmunternde Unterstützung in schwierigen Phasen einen
wesentlichen Anteil am Gelingen sowie an der Fertigstellung dieser Arbeit haben.
Hervorheben möchte ich in diesem Fall meine Eltern sowie meine Schwester für die
aufbauenden und motivierenden Gespräche in der schwierigen Zeit des Schreibens.

8.4. Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 01. Juni 2007 bis zum 15. September 2010 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Des Weiteren bestätige ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Berlin, den

Sandra Pritzkow