

**Untersuchungen zur Pathogenese und Diagnostik
von Scrapie am Modell des Syrischen Hamsters
nach oraler Erregeraufnahme
(mittels Rektum- und Fäzesproben)**

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Gudrun Lenz

aus Berlin

August 2007

Datum der Disputation: 27.11.2007

1. Gutachter: PD Dr. Michael Beekes
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Einführung.....	4
2.2	Die Natur des Erregers der TSE	4
2.3	Die Prion Hypothese	6
2.4	Das Prion-Protein.....	7
2.5	Struktur des Prion-Proteins.....	9
2.6	Die Replikation des Prion-Proteins	10
2.7	Strukturisomere des pathologischen Prion-Proteins in Wirtsorganismen der gleichen Spezies.....	11
2.8	Tierische TSEs.....	12
2.8.1	Scrapie.....	12
2.8.2	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	13
2.8.3	Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	14
2.8.4	Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	14
2.8.5	Chronic Wasting Disease (CWD)	15
2.9	Menschliche TSEs	15
2.9.1	Creutzfeldt- Jakob-Krankheit (CJK).....	15
2.9.2	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK).....	16
2.9.3	Kuru	17
2.9.4	Gerstman-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS).....	18
2.9.5	Die fatale familiäre Insomnie (FFI).....	19
2.10	Das Hamster-Modell	19
2.10.1	Infektionswege.....	19
2.10.2	Pathogenese der Scrapie beim Hamster.....	20
3	Zielsetzung:	22
4	Material und Methoden.....	23
4.1	Material	23
4.1.1	Tiere und Tierhaltung.....	25
4.1.2	Infektionstechniken.....	25
4.1.3	Orale Infektion	25
4.1.4	Klinische Beobachtung	25
4.1.5	Tötung und Probenentnahme	26
4.1.6	Probengewinnung im Stoffwechsellkäfig.....	27
4.2	Präparative biochemische Methoden: Rektumproben	28
4.2.1	Vorbereitung der Proben	28

4.2.2	Biochemische Extraktion des pathologischen Prion-Proteins PrP ^{Sc} aus Darmproben.....	28
4.3	Präparative biochemische Methoden: Fäzesproben.....	29
4.3.1	Vorbereitung der Proben	29
4.3.2	Standardproben	29
4.3.3	Biochemische Extraktion des pathologischen Prion-Proteins PrP ^{Sc} aus Fäzesproben.....	30
4.3.4	Erstellung eines Standards für den Western Blot aus Hamsterhirn.....	31
4.4	PET-Blot Verfahren.....	31
4.4.1	Vorbereitung	31
4.4.2	Durchführung.....	31
4.5	Immunhistochemische Methoden	32
4.5.1	Vorbereitung	32
4.5.2	Durchführung.....	32
4.6	Analytische biochemische Methoden.....	33
4.6.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-disk PAGE).....	33
4.6.2	Elektrochemischer Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot).....	35
4.6.3	Detektion mit mAb 3F4 und NBT / BCIP auf PVDF-Folie	36
4.6.4	Detektion mit mAb 3F4 und CDP-Star mit Nitro Block II auf NC und PVDF-Folie	37
4.6.5	Detektion mit mAb 3F4 und CDP-Star ohne Nitro Block auf PVDF-Folie.....	37
4.6.6	PNGase-F-Verdau nach Aufarbeitung.....	38
4.7	Verwendete Lösungen:.....	39
4.8	Verwendete Chemikalien	42
4.9	Sicherheitsmaßnahmen und Desinfektion	43
4.9.1	Sicherheitsmaßnahmen.....	43
4.9.2	Desinfektion	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Verbesserung der Sensitivität des Western Blot-Nachweises von PrP ^{Sc} /PrP 27-30.....	44
5.2	Nachweis von PrP ^{Sc} in Rektumproben nach oraler Infektion von Hamstern mit Scrapie (Versuchsreihe 1)	48
5.3	Entwicklung und Nutzung eines neuen Verfahrens zur Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzes (Versuchsreihe 2).....	51
5.4	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechsellkäfigen nach Inokulation mit Scrapie (Versuchsreihe 3)	57

5.4.1	Versuchsreihe 3a.....	58
5.4.2	Versuchsreihe 3b.....	59
5.4.3	Versuchsreihe 3c.....	62
5.5	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechsellkäfigen nach Inokulation mit ME7-H und BSE (H) (Versuchsreihe 4)	66
5.6	PET-Blot und Immunhistochemische Untersuchungen	69
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
6	Diskussion.....	76
6.1	Verbesserung der Sensitivität des Western Blot Nachweises von PrP ^{Sc} /PrP 27-30.....	76
6.2	Nachweis von PrP ^{Sc} in Rektumproben nach oraler Infektion von Hamstern mit Scrapie (Versuchsreihe 1)	76
6.3	Entwicklung und Nutzung eines neuen Verfahrens zur Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzes (Versuchsreihe 2).....	78
6.3.1	Standard- und Kontrollproben.....	78
6.4	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzesproben, die in Stoffwechsellkäfigen gesammelt wurden (Versuchsreihe 3).....	80
6.5	Extraktion von PrP ^{Sc} aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechsellkäfigen nach Inokulation mit ME7-H und BSE (H) (Versuchsreihe 4)	83
6.6	Immunhistochemische und PET-Blot Untersuchungen	84
7	Zusammenfassung:.....	88
8	Summary.....	89
	Abkürzungsverzeichnis	90
	Abbildungsverzeichnis.....	93
	Tabellenverzeichnis.....	97
	Literatur	98
	Publikationsliste.....	126
	Danksagung	127
	Selbständigkeitserklärung	128