

5 Ergebnisse

5.1 Verbesserung der Sensitivität des Western Blot-Nachweises von PrP^{Sc}/PrP 27-30

Im Hinblick auf die Zielsetzungen dieser Arbeit war es zunächst erforderlich, die Sensitivität des PrP^{Sc} Nachweises im Western Blot zu verbessern. Zu Beginn der Arbeit stand zum Nachweis des PrP^{Sc} zunächst nur ein wenig sensitives Western Blot System zur Verfügung. Die Blotfolien wurden dabei mit einem Signalverstärkungskit (Streptavidin-Biotin-Komplex [Dako, Hamburg]) behandelt und die PrP-Banden durch die Farbreaktion von NBT / BCIP angefärbt. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich aber pathologische Prion-Proteine nur in relativ hohen Konzentrationen nachweisen. Bereits bei einer Verdünnung von 1×10^{-5} HÄ (aufgetragen in einer Spur des Gels) war die Nachweisgrenze erreicht. Diese geringe Sensitivität reichte aber nicht aus, um zuverlässige Aussagen zu treffen, ob in bestimmten Geweben kein PrP^{Sc} vorhanden ist, oder ob es nur mit dieser Nachweismethode nicht detektierbar war.

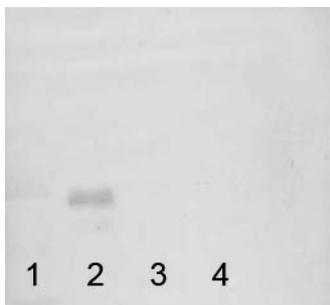


Abb. 3

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in unterschiedlichen Mengen von Scrapie-Hamsterhirnhomogenat, geblottet auf PVDF-Membran, mit Signalverstärkung behandelt, entwickelt mit NBT / BCIP

Bahn 1: MW Marker

Bahn 2: S-Hirnhomogenat 1×10^{-5} HÄ

Bahn 3: S-Hirnhomogenat 1×10^{-6} HÄ

Bahn 4: S-Hirnhomogenat 1×10^{-7} HÄ

Nur auf der Bahn 2 ist ein Signal zu erkennen, hingegen konnte in den Bahnen 3 und 4, in denen

Scrapie Hamsterhirnhomogenat in Verdünnungen von 1×10^{-6} bzw. 1×10^{-7} HÄ aufgetragen wurde, kein Signal detektiert werden. Somit liegt die Grenze zum Nachweis von PrP 27-30 aus Scrapie Hamsterhirnhomogenat mittels Signalverstärkung, Färbung mit NBT / BCIP und direkter Entwicklung auf der PVDF-Membran bei ca. 1×10^{-5} HÄ.

Da bei einer Nachweisgrenze von 1×10^5 HÄ noch 1×10^4 LD₅₀ in der entsprechenden Probe vorhanden sind, war es erforderlich, verbesserte Nachweismethoden zu entwickeln, um auch geringere Mengen Infektiosität nachweisen zu können. Zu diesem Zweck wurde die Verwendung von CDP-Star (Applied Biosystems) in unserem Labor eingeführt, bei dem die Färbung nicht direkt auf der Blotmembran erfolgte. Stattdessen findet eine chemische Reaktion statt, bei der ein aufgelegter Röntgenfilm durch die emittierte Strahlung (Chemolumineszenz) geschwärzt wird. Zunächst wurden nach dem mitgelieferten Protokoll von Applied Biosystems NC-Folien mit CDP-Star mit Nitroblock II entwickelt. Da es dabei aber immer wieder zu störenden Hintergrund-Anfärbungen kam, wurde das von Applied Biosystems vorgegebene Protokoll im Rahmen dieser Arbeit mehrfach verändert. Gute Ergebnisse wurden erzielt, als zu jeder Inkubationslösung 7,5 % (v/v) Ziegennormalserum gegeben wurde. Der Unterschied ist in den folgenden Abbildungen zu erkennen.

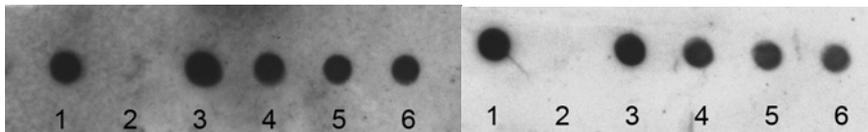


Abb. 4

Western Blot Optimierung zum PrP^{Sc}/PrP 27-30 Nachweis: Hintergrundreduktion durch Blockierung mit Ziegennormalserum

| | | |
|--------------------------|-------------------------|--|
| Punkt 1: S-Hirnhomogenat | 1×10^{-6} HÄ | aufgebracht. Die links abgebildete Hälfte der Membran wurde in TBST ohne Ziegennormalserum inkubiert, bei der Membran auf der rechten Seite wurde bei allen Inkubationsschritten der TBST-Lösung 7,5 % (v/v) Ziegennormalserum zugegeben. Beide Membranteile wurden gemeinsam entwickelt und für 40 Minuten belichtet. Der Unterschied in der Hintergrundfärbung ist deutlich zu erkennen. |
| Punkt 2: | leer | |
| Punkt 3: S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ | |
| Punkt 4: S-Hirnhomogenat | $6,6 \times 10^{-8}$ HÄ | |
| Punkt 3: S-Hirnhomogenat | $3,3 \times 10^{-8}$ HÄ | |
| Punkt 4: S-Hirnhomogenat | 1×10^{-8} HÄ | |

Auf eine NC Membran wurden mit Hilfe einer Dotblotapparatur identische PrP^{Sc}-Mengen

Durch die Verwendung von Ziegennormalserum ergab sich bereits eine deutliche Verbesserung in der Sensitivität, da durch den weniger stark gefärbten Hintergrund der Film länger aufgelegt und so kleinere Mengen an PrP^{Sc}/PrP 27-30 visualisiert werden konnten. (Abb. 5) Um die Hintergrundfärbung weiter zu minimieren, wurde überprüft, ob ein längeres Waschen nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper hilfreich ist. (Abb. 6)

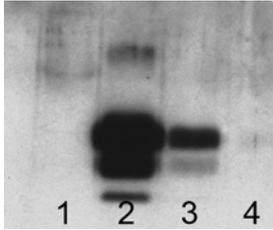


Abb. 5

Western Blot-Nachweis von PrP 27-30 in unterschiedlichen Mengen von Scrapie-Hamsterhirnhomogenat auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP-Star mit Nitroblock II

Bahn 1: MW Marker
 Bahn 2: S-Hirnhomogenat 1×10^{-5} HÄ
 Bahn 3: S-Hirnhomogenat 1×10^{-6} HÄ
 Bahn 4: S-Hirnhomogenat 1×10^{-7} HÄ

Es wurden die Verdünnungsstufen 1×10^{-5} , 1×10^{-6} und 1×10^{-7} HÄ aufgetragen. Der Blot Nachweis für PrP 27-30 aus Scrapie-Hamsterhirn-homogenat auf PVDF Membran, entwickelt mit CDP-Star mit Nitroblock, ist ca. 10-fach sensitiver als der Nachweis mit NBT / BCIP (Vergl. Abb. 3).

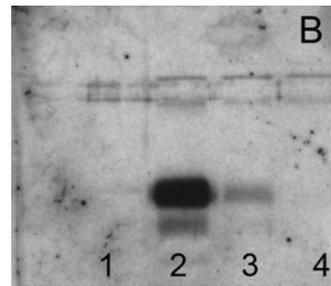
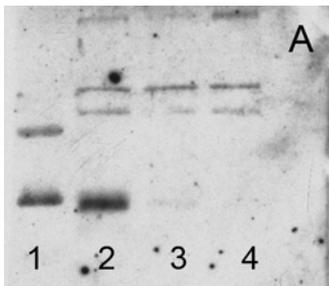


Abb. 6

Western Blot-Optimierung für den Nachweis von PrP 27-30: Hintergrundreduktion durch Waschen mit TBST über Nacht und Waschen mit TBST für eine Stunde, entwickelt mit CDP-Star mit Nitroblock II

Auf beide Membranen wurden aufgetragen:

Bahn 1: MW Marker
 Bahn 2: S-Hirnhomogenat 1×10^{-6} HÄ
 Bahn 3: S-Hirnhomogenat 1×10^{-7} HÄ
 Bahn 4: S-Hirnhomogenat 1×10^{-8} HÄ

Belichtungszeit:

linke Seite 120 Minuten

rechte Seite 60 Minuten

Abb. 6A zeigt den Blot, der nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper über Nacht mit TBST gewaschen worden ist, während Abb. 6B

den Blot zeigt, der nur eine Stunde mit TBST gewaschen wurde. Durch das lange Waschen wird nicht nur die Hintergrundfärbung reduziert, auch das PrP 27-30 Signal wird signifikant geschwächt. Obwohl der Film bei Abb. 6A doppelt so lange belichtet wurde wie der bei Abb. 6B, ist das Signal des PrP 27-30 für die Membran, die über Nacht mit TBST gewaschen wurde deutlich schwächer als das Signal für die Membran, die nur eine Stunde mit TBST gewaschen wurde.

Der Hintergrund auf der linken Membran (Abb. 6A) ist nur wenig angefärbt, aber durch das intensive Waschen wird die Blotsensitivität übermäßig verschlechtert.

Die Verwendung der PVDF-Membran zeigte im Vergleich zur NC-Membran keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Sensitivität, aber aufgrund der deutlich kürzeren Belichtungszeiten wurde der PVDF-Membran der Vorzug vor der NC-Membran gegeben.

Eine zusätzliche Verbesserung konnte im weiteren Verlauf der Versuche durch die Verwendung des CDP-Star ohne Nitroblock erreicht werden, für den die Wasch- und Inkubationslösungen ebenfalls optimiert wurden. CDP-Star mit Nitroblock enthält einen Zusatz, der eine Hintergrundfärbung verhindern soll. Ohne Zusatz von Nitroblock war der Blot jedoch sensitiver. Es handelt sich um zwei Nachweislösungen eines Herstellers, die sich in ihrer Zusammensetzung etwas unterscheiden.

Mit diesem Verfahren konnte die Nachweisgrenze deutlich gesenkt werden, so dass in einer Verdünnung von 6×10^{-8} HÄ noch ein eindeutiges Signal für PrP 27-30 detektiert werden konnte.

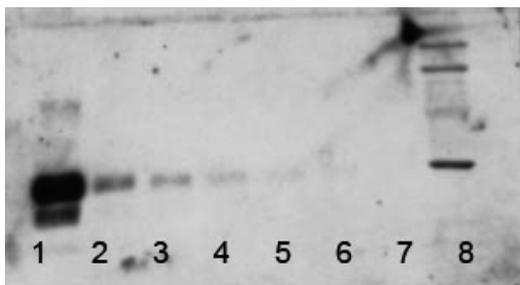


Abb. 7

Western Blot-Optimierung für den Nachweis von PrP 27-30 in unterschiedlichen Mengen von Scrapie-Hamsterhirnhomogenat auf PVDF Membran, entwickelt mit CDP-Star ohne Nitroblock

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| Bahn 1 S-Hirnhomogenat | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 2 S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 3 S-Hirnhomogenat | 8×10^{-8} HÄ |
| Bahn 4 S-Hirnhomogenat | 6×10^{-8} HÄ |
| Bahn 5 S-Hirnhomogenat | 4×10^{-8} HÄ |
| Bahn 6 S-Hirnhomogenat | 2×10^{-8} HÄ |
| Bahn 7 S-Hirnhomogenat | 1×10^{-8} HÄ |
| Bahn 8 Pharmacia Marker | |

Bei dem Blot mit Scrapie-Hamsterhirnhomogenat in Verdünnungsstufen zwischen 1×10^{-6} und 1×10^{-8} HÄ auf einer PVDF-Membran und anschließender Entwicklung mit CDP-Star ohne Nitroblock lassen sich PrP 27-30 Signale in deutlich höheren Verdünnungsstufen verglichen mit früheren Blots (vgl. Abb. 5) detektieren. Sogar in einer Menge von 6×10^{-8} HÄ Scrapie-Hamsterhirnhomogenat konnte ein eindeutiges Signal identifiziert werden.

Durch umfangreiche technische Optimierungen konnte die Sensitivität zum Nachweis von PrP^{Sc}/PrP 27-30 im Western Blot somit von ca. 1×10^{-5} HÄ auf 6×10^{-8} HÄ gesteigert werden, was ca. dem 200fachen entspricht.

5.2 Nachweis von PrP^{Sc} in Rektumproben nach oraler Infektion von Hamstern mit Scrapie (Versuchsreihe 1)

In der ersten Versuchsreihe wurde versucht, PrP^{Sc} möglichst früh im Rektum von oral infizierten Hamstern nachzuweisen.

Es wurde das Rektum von 30 oral infizierten Tiere und 15 mock-infizierten Kontrollhamstern untersucht. Zu verschiedenen Inkubationszeiten [70, 100, 130 Tage nach der Infektion (dpi) und terminaler Phase 160 ± 5 dpi] wurden diese Tiere getötet. Zu den Zeitpunkten 70, 100 und 130 dpi wurden jeweils 6 infizierte und 3 mock-infizierte Hamster untersucht, Zum terminalen Zeitpunkt wurden 12 infizierte Tiere und 6 mock-infizierte Kontrolltiere untersucht.

Das Rektum der Tiere wurde wie unter Material und Methoden beschrieben präpariert und aufgearbeitet. Alle 12 terminal kranken Tiere zeigten eindeutige PrP 27-30 Bandenmuster bei einem Molekulargewicht leicht unterhalb des 30 kDa Markerproteins. Im Gegensatz dazu wiesen Tiere aus früheren Inkubationszeitpunkten kein Banden-Triplett in ihren Rektumproben auf, d.h. nach dem PK- Verdau war kein PrP^{Sc} nachweisbar, gleiches gilt für alle Kontrolltiere, zu keinem Zeitpunkt zeigte ein Kontrolltier ein PrP 27-30 Bandenmuster.

Diese Versuche wurden noch vor der Verbesserung der Blotsensitivität durch Verwendung von CDP Star ohne Nitroblock durchgeführt. Spätere Versuche mit CDP Star ohne Nitroblock bestätigten die Ergebnisse der Versuche mit CDP Star mit Nitroblock.

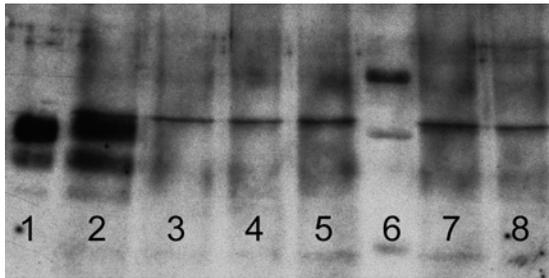


Abb. 8

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 im Rektum von Tieren aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Scrapie-Inkubation, geblottet auf NC-Membran, entwickelt mit CDP mit Nitroblock II (A)

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| Bahn 1: S-Hirnhomogenat | 1x10 ⁻⁵ HÄ |
| Bahn 2: Rektum aus Tier 548/7 | terminal |
| Bahn 3: Rektum aus Tier 548/26 | 130 dpi |
| Bahn 4: Rektum aus Tier 548/51 | 100 dpi |
| Bahn 5: Rektum aus Tier 548/76 | 70 dpi |
| Bahn 6: Pharmacia-Marker | |
| Bahn 7: Rektum aus Tier 548/104 | Kontrolltier |
| Bahn 8: Rektum aus Tier 548/126 | Kontrolltier |

Die aufgearbeiteten und geblotteten Rektumproben zeigen bei der Entwicklung der NC Folie mit CDP-Star mit Nitroblock II nur beim Rektum des terminal erkrankten Tieres (Bahn 2) ein Signal für PrP 27-30. Proben von Tieren, die zu einem früheren Inkubations-Zeitpunkten getötet wurden (Bahn 3-5) bzw. von mock-infizierten Hamstern (Bahn 7 und 8), zeigen keine PrP 27-30 spezifischen Signale.

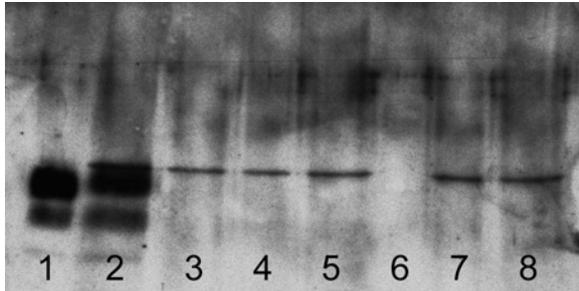


Abb. 9

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 im Rektum von Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Scrapie-Inkubation, geblottet auf NC-Membran, entwickelt mit CDP-Star mit Nitroblock II (B)

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| Bahn 1: S-Hirnhomogenat | 1x10 ⁻⁵ HÄ |
| Bahn 2: Rektum aus Tier 548/9 | terminal |
| Bahn 3: Rektum aus Tier 548/28 | 130 dpi |
| Bahn 4: Rektum aus Tier 548/53 | 100 dpi |
| Bahn 5: Rektum aus Tier 548/78 | 70 dpi |
| Bahn 6: 2xLPP | |
| Bahn 7: Rektum aus Tier 548/105 | Kontrolltier |
| Bahn 8: Rektum aus Tier 548/127 | Kontrolltier |

Die aufgearbeiteten Rektumproben zeigen bei der Entwicklung der NC Folie mit CDP-Star mit Nitroblock II nur beim Rektum des terminal erkrankten Tieres (Bahn 2) ein Signal für PrP 27-30. Proben von Tieren, die zu einem früheren Zeitpunkt der Inkubation getötet wurden (Bahn 3-5) oder mock-infiziert wurden (Bahn 7 und 8), zeigen kein PrP 27-30.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Versuche ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Terminal | 160 dpi | 130 dpi | | 100 dpi | | 70 dpi | |
|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
| S-Tiere | Ergebnis | S-Tiere | Ergebnis | S-Tiere | Ergebnis | S-Tiere | Ergebnis |
| 548/1 | + | 548/26 | - | 548/51 | - | 548/76 | - |
| 548/2 | + | 548/26 | - | 548/52 | - | 548/76 | - |
| 548/3 | ++ | 548/27 | - | 548/53 | - | 548/77 | - |
| 548/3 | ++ | 548/27 | - | 548/54 | - | 548/77 | - |
| 548/4 | ++ | 548/28 | - | 548/55 | - | 548/78 | - |
| 548/4 | ++ | 548/29 | - | 548/56 | - | 548/78 | - |
| 548/5 | + | 548/29 | - | | | 548/79 | - |
| 548/5 | ++ | 548/30 | - | | | 548/79 | - |
| 548/6 | + | 548/30 | - | | | 548/80 | - |
| 548/7 | ++ | 548/31 | - | | | 548/80 | - |
| 548/7 | ++ | 548/31 | - | | | 548/81 | - |
| 548/8 | + | | | | | 548/81 | - |
| 548/8 | ++ | | | | | | |
| 548/9 | ++ | | | | | | |
| 548/9 | ++ | | | | | | |
| 548/10 | ++ | | | | | | |
| 548/10 | ++ | | | | | | |
| 548/11 | ++ | | | | | | |
| 548/11 | ++ | | | | | | |
| 548/12 | ++ | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Kontrolltiere | Ergebnis | Kontrolltiere | Ergebnis | Kontrolltiere | Ergebnis | Kontrolltiere | Ergebnis |
| 548/101 | - | 548/126 | - | 548/151 | - | 548/176 | - |
| 548/102 | - | 548/127 | - | 548/152 | - | 548/177 | - |
| 548/103 | - | 548/128 | - | 548/153 | - | 548/178 | - |
| 548/104 | - | | | | | | |
| 548/105 | - | | | | | | |
| 548/106 | - | | | | | | |

Tab. 1

Zusammenfassung der Ergebnisse der aufgearbeiteten Rektumproben

+ positives Signal für PrP 27-30, ++ stark positives Signal für PrP 27-30.

- PrP 27-30 konnte in der Probe nicht nachgewiesen werden.

Bei allen untersuchten Rektumproben im terminalen Stadium konnte PrP 27-30 nachgewiesen werden, zu früheren Zeitpunkten konnte kein PrP 27-30 nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden insgesamt 30 Tiere untersucht:

| | | | |
|-----------|----|---------------|----|
| Terminal: | 12 | davon positiv | 12 |
| 130 dpi | 6 | | 0 |
| 100 dpi | 6 | | 0 |
| 70 dpi | 6 | | 0 |

5.3 Entwicklung und Nutzung eines neuen Verfahrens zur Extraktion von PrP^{Sc} aus Fäzes (Versuchsreihe 2)

Ergänzend zu den Versuchen mit Rektumproben wurden auch Fäzesproben von oral infizierten Tieren untersucht, und zwar i) von den gleichen Tieren und zu den gleichen Zeitpunkten wie die Rektumproben und ii) zusätzlich von anderen Tieren. Die ersten Fäzesproben wurden dabei den für die Rektumuntersuchungen getöteten Tieren direkt aus dem Dickdarm entnommen, indem dieser frei präpariert wurde und der Darminhalt aus dem Darm heraus gedrückt wurde. Diese Methode schien jedoch schließlich zu störanfällig zu sein, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass kleinere Gewebestücke des Darmes in den Darminhalt gelangten und somit die Untersuchungen kompromittieren würden. Daher wurde nach der Auswertung der Versuchsreihe 2 eine weitere Versuchsreihe mit Tieren gestartet, deren Fäzes in Stoffwechsellkäfigen gesammelt wurde (Versuchsreihe 3).

Erste Versuche das pathologische Prion-Protein PrP^{Sc} aus Fäzes auf die gleiche Weise zu isolieren wie dasjenige aus Rektumproben, entsprechend dem für Rektumproben beschriebenen Protokoll, zeigten dass diese Methode für Fäzesmatrix ungeeignet war.

Trotz der nur geringen Sensitivität des Blots (die Bande in Bahn 5 in der Abb. 10 entspricht nur ca. 1×10^{-6} HÄ) zeigen die Banden mit den Fäzesproben eine sehr starke unspezifische Färbung. Bereits im Gel fiel auf, dass ein großer Teil der Proben in den Gel-taschen zurück blieb und auch das ins Gel eingebrachte Material nicht gleichmäßig lief.

Daher wurde nach Alternativen gesucht, die Proben sorgfältiger aufzureinigen und das PrP^{Sc} von den übrigen, den Western Blot störenden Fäzeskomponenten abzutrennen.

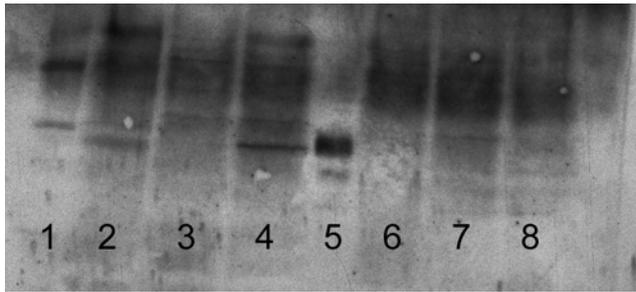


Abb. 10

Western Blot Nachweis für PrP 27-30 für Fäzesproben, aufgearbeitet nach dem

Rektumprotokoll, geblottet auf NC Membran, entwickelt mit CDP Star mit Nitroblock II

Bahn 1 : Pharmacia Marker

Bahn 2 : Fäzesprobe 1

Bahn 3 : Fäzesprobe 2

Bahn 4 : Fäzesprobe 3

Bahn 5 : Hirnhomogenat

10^{-6} HÄ

Bahn 6 : Fäzesprobe 4

Bahn 7 : Fäzesprobe 5

Bahn 8 : Fäzesprobe 6

Der Blot von Fäzesproben, die nach dem Protokoll der Rektumproben aufgearbeitet und auf einer NC-Membran mit CDP-Star mit Nitroblock II entwickelt wurden, zeigt viele unspezifisch angefärbte Proteinbanden, die keinen Rückschluss auf die Anwesenheit von PrP 27-30 zulassen. Eventuell vorhandene PrP 27-30 Banden könnten von Banden anderer Proteine überlagert und damit nicht sichtbar sein.

Es musste daher eine Extraktionsmethode etabliert werden, mit der es möglich war, die Ausbeute an PrP^{Sc} nicht signifikant zu verringern, gleichzeitig jedoch unspezifische und störende Fäzeskomponenten abzutrennen. Von großem Nutzen war dabei die Tatsache, dass das PrP^{Sc} nicht nur bei niedrigen Drehzahlen im Überstand blieb, sondern auch bei relativ hohen Drehzahlen von 20.000 rpm [25.000 x g] in einer 1 %igen Sacrosylllösung (v/v) bei 20 °C. Dabei konnten Fäzeskomponenten (z.B. unverdaute Futterreste) als Sediment abgetrennt werden. Mit Hilfe dieses zusätzlichen Zentrifugationschrittes bei 20 °C war es also möglich, ein deutlich reineres Endpellet aus der Fäzesaufreinigung zu erhalten, bei dem das PrP-Bandenmuster im Western Blot nicht mehr von unspezifischen Schmierbanden überlagert wurde.

Die Aufarbeitung wurde gemäß dem für Rektumproben beschriebenen Protokoll bis zur Zentrifugation 2 durchgeführt. Das Pellet wurde dann in der dort beschriebenen Lösung (Lösung 2) aufgenommen, und mit 20.000 rpm bei 20 °C in einem bei Raumtemperatur äquilibrierten TLA-45 Rotor für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Polyallomerröhrchen überführt, anschließend wurde die Aufarbeitung, mit Zentrifugation 3 beginnend, wie für die Rektumproben beschrieben bis zur Aufnahme des Endpellets in 2x LPP fortgeführt.

Durch Versuche mit Fäzesproben von gesunden Kontrolltieren, denen eine definierte Menge Scrapiehomogenat terminal kranker Tiere zugesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass das eingesetzte Hirnmaterial am Ende der Aufarbeitung auch wieder im Endpellet nachweisbar war. 1×10^{-5} HÄ (einer Fäzesprobe vor Beginn der Aufarbeitung zugesetzt) konnten verlässlich im Endpellet nachgewiesen werden, die Nachweisgrenze entsprach einer Menge von $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ. Dementsprechend konnten 1×10^{-6} HÄ nicht mehr detektiert werden.

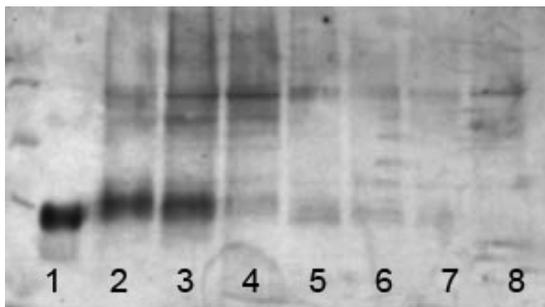


Abb. 11

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 aus mit verschiedenen Konzentrationen Hirnmaterial dotierten Fäzesproben, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | | |
|--------|-----------------|-------------------------|--|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-6} HÄ | Bei der Auftragung von Fäzesproben von gesunden Kontrolltieren, denen vor Beginn der Aufarbeitung verschiedene Mengen Scrapie Hamsterhirnhomogenat zugesetzt wurden, lassen sich nur aus Konzentrationen von mehr als $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ eindeutige Signale für PrP 27-30 detektieren. (Bahn 2-4) Bei Fäzesproben denen weniger oder kein Scrapie Hirnhomogenat zugesetzt wurde, zeigen kein Signal für PrP 27-30 (Bahn 5-8). |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert | 1×10^{-5} HÄ | |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert | $6,6 \times 10^{-6}$ HÄ | |
| Bahn 4 | Fäzes dotiert | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ | |
| Bahn 5 | Fäzes dotiert | 1×10^{-6} HÄ | |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert | 5×10^{-7} HÄ | |
| Bahn 7 | Fäzes | N-Tier | |
| Bahn 8 | Fäzes | N-Tier | |

Bei den Untersuchungen der Fäzesproben wurde daher mindestens eine der Standardproben mit 1×10^{-5} oder $6,6 \times 10^{-6}$ HÄ versetzt, die als Positiv-Kontrolle für die Aufarbeitung fungierte. Sie dienten auch zusätzlich zur Abschätzung der absoluten Menge von PrP 27-30 in den untersuchten Fäzesproben.

| terminal | | 130 dpi | | 100 dpi | |
|----------|---|---------------|---|---------|---|
| 548/1 | - | 548/28 | - | 548/51 | - |
| 548/1 | - | 548/29 | - | 548/52 | - |
| 548/2 | - | 548/32 | - | 548/53 | - |
| 548/3 | - | 548/33 | - | 548/54 | - |
| 548/7 | - | 548/47 | - | 548/55 | - |
| 548/8 | - | 548/48 | - | 548/56 | - |
| 548/9 | - | 548/49 | - | 548/57 | - |
| 548/10 | - | 548/50 | - | 548/58 | - |
| 548/12 | - | | | 548/59 | - |
| 548/13 | - | Kontrolltiere | | 548/60 | - |
| 548/13 | - | 548/101 | - | 548/61 | - |
| 548/14 | - | 548/102 | - | 548/62 | - |
| 548/14 | - | 548/103 | - | 548/63 | - |
| 548/15 | - | 548/104 | - | 548/64 | - |
| 548/16 | + | 548/105 | - | 548/65 | - |
| 548/17 | + | | | | |

Tabelle 2

Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Fäzesproben, die Tieren 100 und 130 Tage nach der Infektion, sowie im terminalen Stadium aus dem Darm entnommen worden waren.

*Bei zwei terminalen Tieren (548/16 und 548/17) wurde ein positiver Befund festgestellt, während alle anderen 14 Proben negativ waren.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese Befunde auf eine Kontamination mit dem stark positiven Rektumgewebe zurückzuführen waren, wurde eine neue Versuchsreihe (Versuchsreihe 3) angesetzt, bei der die Fäzesproben nicht mehr aus dem Darm entnommen wurden, sondern in Stoffwechselläufigen gesammelt wurden.

Die mock-infizierten Kontrolltiere wurden zum gleichen Zeitpunkt getötet wie diejenigen aus der terminalen Phase.

Im Folgenden sind exemplarisch Western Blot Befunde aus den Untersuchungen von Fäzesproben im Rahmen der Versuchsreihe 2 wiedergegeben.

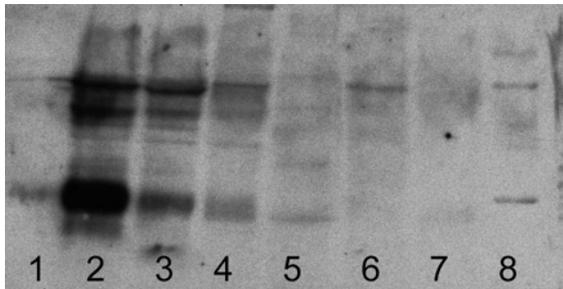


Abb. 12

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von Tieren 100 Tage nach der Inokulation, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|-----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert mit | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 5 | Fäzes von Tier 548/52 | 100 dpi |
| Bahn 6 | Fäzes von Tier 548/51 | 100 dpi |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | MW Marker | |

Bei den Untersuchungen der Fäzes 100 Tage nach der Inokulation konnte kein PrP 27-30 nachgewiesen werden. Auf den Bahnen 5 und 6 sind keine Banden zu erkennen ebensowenig wie auf der Bahn 7, auf der die aufgearbeiteten Fäzes eines N-Tieres aufgetragen wurden. Das Signal für PrP 27-30 aus den dotierten Fäzesproben mit 10^{-5} und $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ (Bahn 2-3) ist eindeutig sichtbar, hingegen konnte aus der mit 1×10^{-6} HÄ dotierten Standardprobe keine zweifelsfreie PrP 27-30 spezifische Bande detektiert werden.

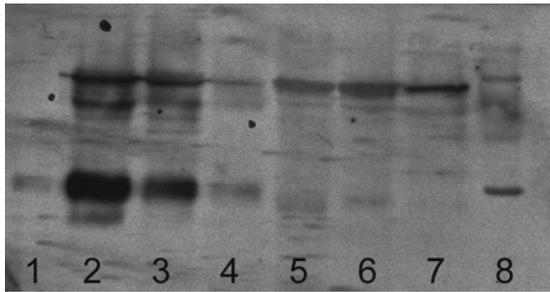


Abb. 13

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von Tieren 130 Tage nach der Inokulation, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|-----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert mit | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 5 | Fäzes von Tier 548/47 | 130 dpi |
| Bahn 6 | Fäzes von Tier 548/48 | 130 dpi |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | MW Marker | |

nachgewiesen werden. Auf den Bahnen 5 und 6 sind keine spezifischen PrP-Banden zu erkennen ebenso wenig wie auf der Bahn 7, auf der die aufgearbeiteten Fäzes eines N-Tieres aufgetragen wurden. Das Signal für PrP 27-30 aus den dotierten Fäzesproben mit 1×10^{-5} und $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ (Bahn 2-3) ist eindeutig sichtbar, hingegen konnte aus der mit 1×10^{-6} HÄ dotierten Standardprobe keine zweifelsfreie PrP 27-30 spezifische Bande detektiert werden.

Bei den Untersuchungen der Fäzes 130 Tage nach der Inokulation konnte kein PrP 27-30

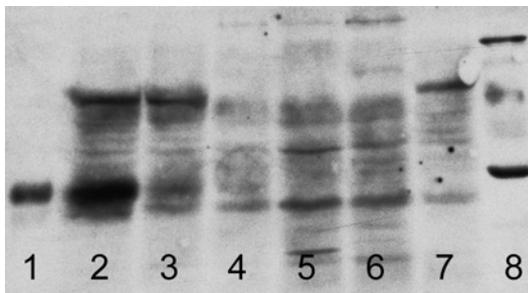


Abb. 14

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von Tieren nach 160 Tagen der Inkubation (terminal kranke Tiere), geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|-----------------|-------------------------|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes dotiert | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 5 | Fäzes 548/10 | terminal |
| Bahn 6 | Fäzes 548/14 | terminal |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | MW Marker | |

Nach Auftragung von aufgearbeiteten Fäzes Proben von terminal erkrankten Tieren zeigt sich

im Immunoblot kein Signal für PrP 27-30. (Bahn 5 und 6). Auf den Bahnen 2 und 3, auf denen mit Scrapie-Hamsterhirnhomogenat dotierte Fäzesproben aufgetragen wurden, sind deutlich die Banden für PrP 27-30 zu erkennen. Die Banden oberhalb und unterhalb der PrP 27-30 spezifischen Bande sind sowohl bei den dotierten als auch bei den unbekanntenen Proben zu erkennen und stellen somit Proteine dar, an die der Antikörper unspezifisch gebunden hat.

Die im Western Blot auftretenden Banden aus den untersuchten Fäzes-Proben der klinisch kranken Scrapie-Hamster (160 dpi) stellen kein PrP 27-30 dar, sondern offenbar andere Proteine, an die der verwendete Antikörper unspezifisch bindet.

5.4 Extraktion von PrP^{Sc} aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechsellkäfigen nach Inokulation mit Scrapie (Versuchsreihe 3)

Untersuchung von Fäzesproben, die in Stoffwechsellkäfigen gesammelt wurden.

In dieser Versuchsreihe wurden die Hamster vor und nach ihrer Fütterung mit infektiösem Hirnhomogenat in so genannte Stoffwechsellkäfige gesetzt, in denen ihre Fäzes und Urinausscheidungen täglich gesammelt werden konnten. Fäzesproben, die von diesen Tieren vor der Beimpfung gesammelt wurden, dienten als Kontrollen und wurden auch zur Erstellung von dotierten Standardproben verwendet, die eine definierte Menge Scrapie-Hirnmateriale enthielten. Diese dotierten Proben dienten als Positivkontrollen, mit denen gleichzeitig die PrP 27-30 Nachweisgrenze abgeschätzt werden konnte.

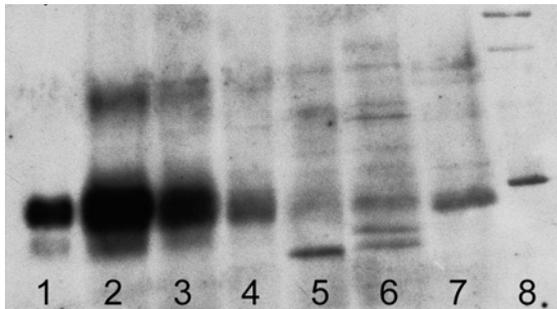


Abb. 15

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von Kontrolltieren und dotierten Fäzesproben, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | | |
|--------|-----------------|-------------------------|---|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ | weils 400 mg Fäzes aufgetragen (die gleiche Menge, die auch für die untersuchten Proben verwendet wurde), auf der Bahn 7 ist das Endpellet aus 100 mg Fäzes zu sehen (die gleiche Menge, die auch bei den Standards verwendet wurde). Im Vergleich zu der Bande des Molekulargewichtsmarkers ist zu erkennen, dass es sich bei der auf der Bahn 7 auftretenden Bande nicht um ein PrP 27-30 spezifisches Signal handelt, sondern um eine Artefaktbande, die leicht unterhalb des PrP 27-30 Molekulargewichtsbereichs liegt. |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert | 1×10^{-5} HÄ | |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ | |
| Bahn 4 | Fäzes dotiert | 1×10^{-6} HÄ | |
| Bahn 5 | Fäzes N Tier 1 | 400 mg Fäzes | |
| Bahn 6 | Fäzes N Tier 2 | 400 mg Fäzes | |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | 100 mg Fäzes | |
| Bahn 8 | MW Marker | | |

Abb. 15 zeigt einen Vergleich von mehreren Kontrolltieren. Es wurde ersichtlich, dass die unspezifischen Western Blot Signale aus den Fäzesproben verschiedener Versuchstiere etwas variierten. Auf den Bahnen 5 und 6 wurden Extrakte aus je-

Die Hamster wurden zum Zeitpunkt ihrer Beimpfung in Käfigen mit granulierter Einstreu gehalten. Nach dem vollständigen Verzehr des mit Scrapie-Hirnmateriale versetzten Futterpellets wurden die Hamster in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Die täglich entnommenen Fäzesproben wurden bei -80 °C gelagert. Zum Versuchsbeginn wurden diese vollständig in eine 10% (w/v)-Suspension überführt und mit Hirnhomogenat von gesunden Tieren versetzt, um sichtbare Endpellets nach der Aufarbeitung zu gewährleisten. Es wurden jeweils 4 x 1 ml dieser Suspension aufgearbeitet und am Ende zu einem Pellet vereinigt (genaue Anleitung unter Material und Methoden).

Dieser Versuch wurde zweimal mit je zwei Tieren (Versuchsreihe 3a und 3b) und einmal mit zehn Tieren (Versuchsreihe 3c) durchgeführt.

5.4.1 Versuchsreihe 3a

Für diese Versuchsreihe wurden Fäzesproben von Tieren innerhalb der ersten 14 Tage nach der Scrapie Verfütterung gesammelt. Die Proben der ersten Tage wurden von jedem Tier mindestens zweimal in unabhängigen Versuchen untersucht.

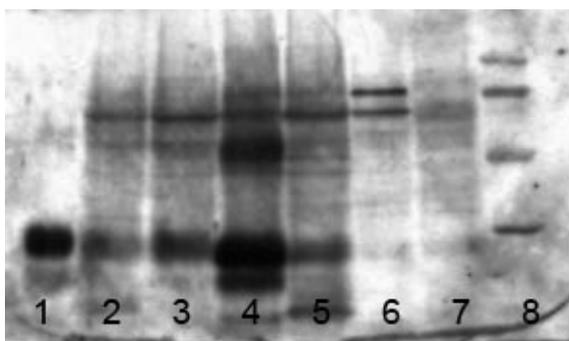


Abb. 16

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von oral infizierten Tieren 1 bzw. 2 Tage nach der Verfütterung des Agens, geblottet auf NC-Membran, entwickelt mit CDP mit Nitroblock II

| | | |
|--------|-----------------|-------------------------|
| Bahn 1 | S-Hirnhomogenat | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert | $6,6 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes Tier 1 | Tag 1 |
| Bahn 5 | Fäzes Tier 1 | Tag 2 |
| Bahn 6 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | MW Marker | |

Beim Blot auf NC Membran und Entwicklung mit CDP-Star und Nitroblock II ist zu erkennen, dass

in den Fäzes von Hamstern, die mit Scrapie-Hamsterhirnhomogenat gefüttert wurden, einen bzw. zwei Tage nach der Verfütterung PrP 27-30 nachgewiesen werden kann (Bahn 4 und 5). Die Menge des ausgeschiedenen PrP 27-30 ist dabei am ersten Tag (Bahn 4) weit höher als 1×10^{-5} HÄ (Bahn 2). Am zweiten Tag liegt die Stärke des Signals für das ausgeschiedene PrP 27-30 bereits leicht unterhalb der dotierten Probe, die mit $6,6 \times 10^{-6}$ HÄ (Bahn 3) versetzt wurde.

Das Tier 1 scheidet am ersten Tag deutliche Mengen PrP^{Sc}/PrP 27-30 aus (mehr als in der Standardprobe mit 1×10^{-5} HÄ enthalten sind), und am zweiten Tag eine PrP^{Sc}/PrP 27-30 Menge, die leicht unter der Standardprobe mit $6,6 \times 10^{-6}$ HÄ liegt.

5.4.2 Versuchsreihe 3b

Für diese Versuchsreihe wurden Fäzesproben von Tieren innerhalb der ersten 14 Tage nach der Scrapie-Verfütterung gesammelt.

Die Proben der ersten Tage wurden von jedem Tier mindestens zweimal in unabhängigen Versuchen untersucht.

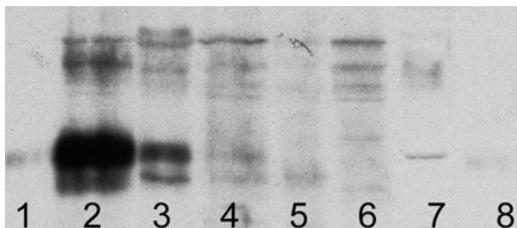


Abb. 17

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von zwei oral infizierten Tieren 6 Tage nach der Verfütterung des Agens, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert mit | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes von Tier 3 | 6.Tag |
| Bahn 5 | Fäzes von Tier 4 | 6. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 7 | N-Fäzes | |
| Bahn 8 | MW-Marker | |

Beim Blot auf PVDF Membran und Entwicklung mit CDP-Star ohne Nitroblock zeigt sich, dass am sechsten Tag nach der Verfütterung kein PrP 27-30 in den untersuchten Proben mehr nachgewiesen werden konnte (Bahn 4 und 5), während die mit Scrapie Hamsterhirnhomogenat dotierten Proben (Bahn 2 und 3) deutliche Signale für PrP 27-30 zeigten. Das Signal für die mit 1×10^{-6} HÄ dotierte Fäzesprobe ist nicht mehr zu erkennen, so dass die Nachweisgrenze für PrP 27-30 in diesem Versuch zwischen $3,3 \times 10^{-6}$ und 1×10^{-6} HÄ lag.

Am sechsten Tag scheiden die Tiere 3 und 4 kein detektierbares PrP^{Sc}/PrP 27-30 mehr aus.

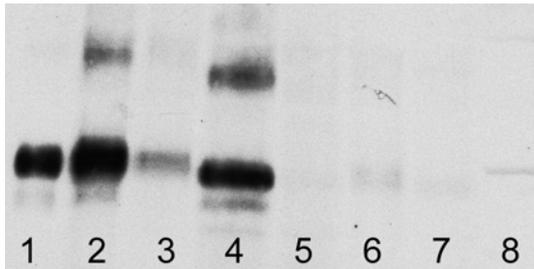


Abb. 18

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von zwei oral infizierten Tieren 2 Tage nach der Verfütterung des Agens, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes Tier 3 | 2.Tag |
| Bahn 5 | Fäzes Tier 4 | 2. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 7 | N-Fäzes | |
| Bahn 8 | MW-Marker | |

Beim Blot auf PVDF Membran und Entwicklung mit CDP-Star ohne Nitroblock zeigt sich, dass am zweiten Tag nach der Verfütterung nicht bei allen

Tieren noch PrP 27-30 nachgewiesen werden konnte (Bahn 5), während in anderen Proben noch PrP 27-30 detektierbar war (Bahn 4). Die mit Scrapie Hamsterhirnhomogenat dotierten Proben (Bahn 2 und 3) zeigten ebenfalls deutliche Signale für PrP 27-30, nur das Signal für die mit 1×10^{-6} HÄ dotierte Probe (Bahn 6) ist nicht mehr eindeutig zu identifizieren, so dass die Nachweisgrenze für PrP 27-30 in diesem Versuch zwischen $3,3 \times 10^{-6}$ und 1×10^{-5} HÄ lag.

Die Ausscheidung ist bei den einzelnen Tieren unterschiedlich. So scheidet Tier 1 am 2. Tag noch PrP^{Sc}/PrP 27-30 aus, während bei Tier 2 keine PrP^{Sc}/PrP 27-30 Ausscheidung mehr detektierbar ist.

Die Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| 1.Ansatz Reihe IIIa | A | B | C | 2.Ansatz Reihe IIIb | A | B | C |
|--------------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------|----------|----------|----------|
| Tier 1 | Ergebnis | Ergebnis | Ergebnis | Tier 3 | Ergebnis | Ergebnis | Ergebnis |
| 1.Tag | +++ | +++ | ++ | 1.Tag | + | +++ | |
| 2.Tag | + | ++ | + | 2.Tag | n.a. | ++ | ++ |
| 3.Tag | - | - | | 3.Tag | - | - | - |
| 4.Tag | + | - | | 4.Tag | - | - | - |
| 5.Tag | + | - | - | 5.Tag | - | - | - |
| 6.Tag | - | - | - | 6.Tag | - | - | - |
| 7.Tag | - | - | - | 7.Tag | - | - | - |
| 8.Tag | - | - | | 8.Tag | - | - | |
| | | | | 9. Tag | - | | |
| | | | | 10. Tag | - | | |
| | | | | 11.Tag | - | | |
| Tier 2 | Ergebnis | Ergebnis | Ergebnis | Tier 4 | Ergebnis | Ergebnis | Ergebnis |
| 1.Tag | ++ | ++ | +++ | 1.Tag | - | - | - |
| 2.Tag | - | - | - | 2.Tag | - | - | - |
| 3.Tag | - | - | - | 3.Tag | - | - | - |
| 4.Tag | - | - | - | 4.Tag | - | - | - |
| 5.Tag | - | - | | 5.Tag | - | - | - |
| 6.Tag | - | - | - | 6.Tag | - | - | - |
| 7.Tag | | - | - | 7.Tag | - | - | |
| 8.Tag | | - | | 8.Tag | - | - | |
| | | | | 9. Tag | - | | |
| | | | | 10. Tag | - | | |
| | | | | 11.Tag | - | | |

Tabelle E3

Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen von Fäzesproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Fäzes aus Stoffwechsellkäfigen.

Von jedem der vier Tiere wurden die Fäzes in jeweils drei unabhängigen Versuchen (A-C) untersucht. An manchen Tagen reichte die Fäzesmenge nicht für drei Versuche. Aus den zusammengestellten Befunden ist erkennbar, dass das verimpfte PrP^{Sc} nur relativ kurze Zeit in den Fäzes nachweisbar ist. Die Länge des Ausscheidens variiert dabei offenbar etwas. Durch die inhomogene Verteilung des PrP^{Sc} in den Fäzes konnte bei wenigen Versuchen nicht in allen Proben des gleichen Tages PrP^{Sc} nachgewiesen werden. (Tier 1 am 4. und 5. Tag In den Versuchsreihen 3a und 3b wurden die Tiere erst in die Stoffwechsellkäfige gesetzt, nachdem sie das ganze Pellet mit dem Scrapie-Hirnhomogenat aufgefressen hatten. Daher ist es möglich, dass mit dem Inokulum kontaminierte Fäzesproben unberücksichtigt blieben (Tier 4), die in den normalen Haltungskäfigen ausgeschieden wurden. Um dieses potentielle Problem zu vermeiden, wurden bei der dritten Teilversuchsreihe (3c) auch die Darmausscheidungen in den Käfigen gesammelt, in denen die Tiere bei der Verfütterung des Inokulums saßen.

5.4.3 Versuchsreihe 3c

Für diese Versuchsreihe wurden die Fäzesproben der ersten 14 Tage nach der Inokulation und die der letzten 7 Tage vor der terminalen Scrapie gesammelt

Die Proben der ersten Tage wurden von jedem Tier mindestens zweimal in unabhängigen Versuchen untersucht.

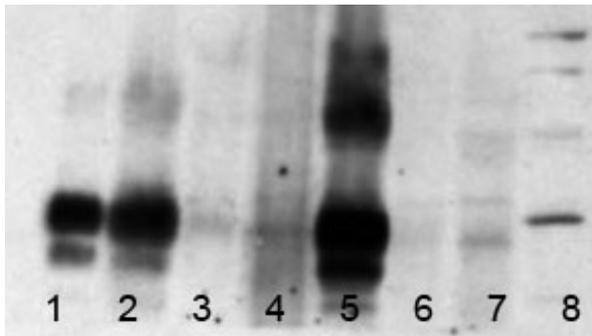


Abb. 19

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von zwei oral infizierten Tieren 2 Tage nach der Verfütterung des Agens, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat | 5×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert mit | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes von Tier H11/3 | 2. Tag |
| Bahn 5 | Fäzes von Tier H11/4 | 2. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | Pharmacia Marker | |

Beim Blot auf PVDF Membran und Entwicklung mit CDP-Star ohne Nitroblock zeigt sich, dass am zweiten Tag nach der Verfütterung nicht bei allen Tieren noch PrP 27-30 nachgewiesen werden konnte (Bahn 4), während in anderen Proben noch PrP 27-30 detektierbar war (Bahn 5). Die mit Scrapie Hamsterhirnhomogenat dotierten Standardproben (Bahn 3 und 6) zeigten keine deutlichen Signale für PrP 27-30, nur das Signal für die mit 1×10^{-5} HÄ dotierte Probe (Bahn 2) ist eindeutig zu identifizieren, so dass die Nachweisgrenze für PrP 27-30 in diesem Versuch bei etwas über $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ lag.

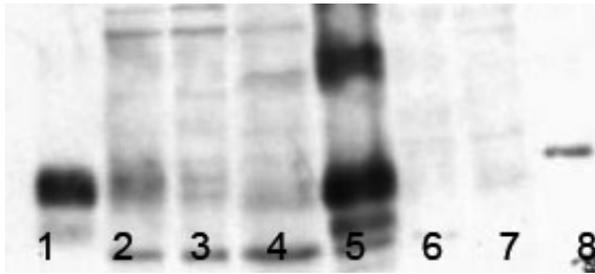


Abb. 20

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von zwei oral infizierten Tieren 3 Tage nach der Verfütterung des Agens, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------|-------------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat | 5×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes dotiert mit | $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ |
| Bahn 4 | Fäzes von Tier H11/1 | 3.Tag |
| Bahn 5 | Fäzes von Tier H11/2 | 3. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert mit | 1×10^{-6} HÄ |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | Pharmacia Marker | |

Tieren noch PrP 27-30 nachgewiesen werden konnte (Bahn 4), während in anderen Proben noch PrP 27-30 detektierbar war (Bahn 5). Die mit Scrapie Hamsterhirnhomogenat dotierten Standardproben (Bahn 3 und 6) zeigten keine deutlichen Signale für PrP 27-30, nur das Signal für die mit 1×10^{-5} HÄ dotierte Probe (Bahn 2) ist eindeutig zu identifizieren, so dass die Nachweisgrenze für PrP 27-30 in diesem Versuch bei über $3,3 \times 10^{-6}$ HÄ lag.

Beim Blot auf PVDF Membran und Entwicklung mit CDP-Star ohne Nitroblock zeigt sich, dass am dritten Tag nach der Verfütterung nicht bei allen

In der Versuchsreihe 3c wurden die Tiere im klinischen Krankheitsstadium noch einmal zwecks zu sammelnder Fäzesproben in Stoffwechsellkäfige gesetzt.

Dabei konnten die in der Versuchsreihe 2 erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. In den Fäzes aller neun untersuchten Tiere war dabei kein PrP^{Sc}/PrP 27-30 nachweisbar. Dies bestätigte die Vermutung, dass die in der Versuchsreihe 2 festgestellten positiven Proben auf eine Kontaminierung mit infektiösem Rektummaterial zurückzuführen waren. Um auszuschließen, dass es sich bei den in einigen Versuchen detektierten Banden, die sich im Molekulargewichtsbereich von ca. 30 kDa befanden, um PrP 27-30 handelt, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden die aufgearbeiteten Proben mit PNGase F behandelt. PNGaseF ist ein Enzym, welches unter Modifizierung bestimmter Aminosäuren angelagerte Zuckerreste abspaltet. Da in diesen Versuchen die für PrP 27-30 nach Behandlung mit PNGase F zu erwartende Molekulargewichtsverschiebung auf ca. 19-20 kDa nicht auftrat, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den betreffenden Banden um unspezifische Signale handelt. Andererseits bestätigten die Deglykosilierungsversuche aber auch, dass es sich beispielsweise in den Fäzes des Tieres H 11/3 (Abb. 22) zwei Tage nach der Inokulation tatsächlich PrP 27-30 handelt.

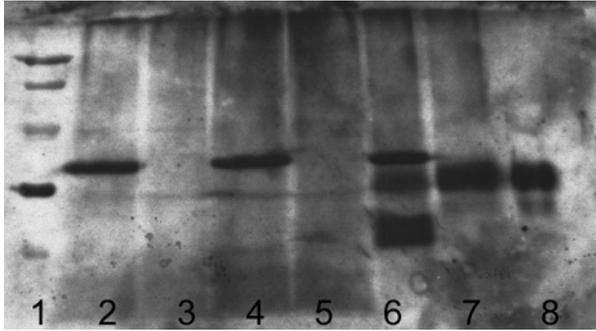


Abb. 21

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 ohne und mit Behandlung mit PNGase F aus den Fäzes von zwei oral infizierten Tieren 160 Tage nach der Verfütterung des Agens (terminaler Zeitpunkt der Erkrankung), geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

Bahn 1: Pharmacia-Marker

Bahn 2: Fäzes Tier H11/8 mit PNGase F aus 200mg Fäzes

Bahn 3: Fäzes von Tier H11/8 terminal aus 200 mg Fäzes

Bahn 4: Fäzes von Tier H11/2 mit PNGase F aus 200mg Fäzes

Bahn 5: Fäzes von Tier H11/2 terminal aus 200 mg Fäzes

Bahn 6: Fäzes dotiert mit PNGase F 5×10^{-6} HÄ

Bahn 7: Fäzes dotiert mit 5×10^{-6} HÄ

Bahn 8: S Hirnhomogenat 1×10^{-7} HÄ

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass durch den PNGase F-Verdau das Signal für PrP 27-30 auf die Höhe des unglykosilierten PrP verschoben wird (Bahn 6). In Proben, in denen kein PrP 27-30 enthalten ist (Bahn 2 und 4) tritt ein solcher Mole-

kulargewichtsshift nicht auf. Die starke Proteinbande oberhalb des 30 kDa Markerproteins in den mit PNGase F behandelten Proben (Bahn 2, 4 und 6) ist auf das Enzym selbst zurückzuführen.

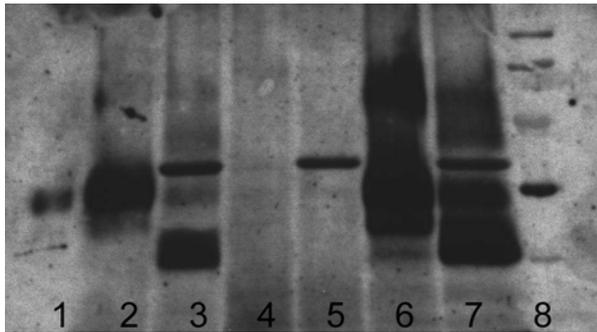


Abb. 22

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 aus den Fäzes von oral infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verfütterung des Agens mit und ohne Behandlung mit PNGase F, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | |
|---|-----------------------------------|
| Bahn 1: S Hirnhomogenat | 1x10 ⁻⁷ HÄ |
| Bahn 2: Fäzes | dotiert mit 5x10 ⁻⁶ HÄ |
| Bahn 3: Fäzes mit PNGase F | dotiert mit 5x10 ⁻⁶ HÄ |
| Bahn 4: Fäzes von Tier H11/6 terminal | aus 200 mg Fäzes |
| Bahn 5: Fäzes von Tier H11/6 mit PNGase F | aus 200mg Fäzes |
| Bahn 6: Fäzes von Tier H11/3 2.Tag | aus 200 mg Fäzes |
| Bahn 7: Fäzes von Tier H11/3 2.Tag mit PNGase F | aus 200mg Fäzes |
| Bahn 8: Pharmacia-Marker | |

Abb. 22 zeigt, dass durch die Inkubation mit PNGase F das Signal für PrP 27-30 (Bahn 6) nach der Deglykosylierung einen Molekulargewichtsshift erkennen lässt (Bahn 7). Dies zeigt deutlich, dass es sich bei der nachgewiesenen Bande tatsächlich um PrP 27-30 handelt. Bei der dotierten

Standardprobe (Bahn 2) ist die Molekulargewichtsverschiebung der Bande nach Behandlung mit PNGase F (Bahn 3) ebenfalls deutlich zu sehen. In den Fäzes, die zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung gesammelt wurden, ist dagegen kein PrP 27-30 nachweisbar.

5.5 Extraktion von PrP^{Sc} aus Fäzesproben, gesammelt in Stoffwechselläufigen nach Inokulation mit ME7-H und BSE (H) (Versuchsreihe 4)

In dieser Versuchsreihe wurden die Fäzesproben von Hamstern gesammelt, die mit dem Hamster-adaptierten Scrapie-Stamm ME7-H bzw. dem Hamster-adaptierten BSE-Stamm BSE-H (Thomzig et al., 2004a) peroral infiziert worden waren. Diese beiden Stämme unterscheiden sich vom 263 K- Stamm u.a. dadurch, dass ihre Inkubationszeiten bei intrazerebraler Infektion wesentlich länger sind. Für Scrapie liegen diese bei ca. 70-83 ± 5 Tagen in die terminal-klinische Phase gelangen (Lowenstein et al., 1990), bei ME7-H bei 331 ± 16 und bei BSE-H bei 287 ± 28 Tagen (Thomzig et al., 2004a). Auch die Symptomatik der erkrankten Tiere unterscheidet sich deutlich. Außerdem konnte bisher kein Ausbruch der Krankheit nach oraler Infektion beobachtet werden. Die Tiere blieben bis 700 dpi (ME7-H) bzw. bis 500 dpi (BSE-H) ohne klinische Symptome, und auch im Hirn dieser Tiere konnte bis zu diesem Zeitpunkt kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Daraus ergab sich die Vermutung, dass das PrP^{Sc} dieser Stämme vielleicht im Verdauungstrakt abgebaut werden könnte und dass es deshalb zu keiner Erkrankung nach oraler Infektion kommt. Dazu sei angemerkt, dass verschiedene TSE-Isolate unterschiedlich sensitiv auf proteolytische Abbauvorgänge, z.B. im Verdauungstrakt, reagieren können. Um dies zu überprüfen, wurden die Versuche der Versuchsreihe 3 mit den Stämmen ME7-H und BSE-H zum Teil analog wiederholt.

Exemplarische Western Blot Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in den Abbildungen 23 und 24 dargestellt.

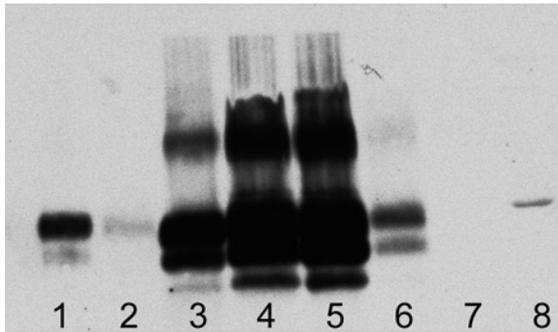


Abb. 23

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von oral infizierten Tieren 1 Tag nach der Verfütterung von Scrapie- (263 K bzw. ME7-H) Hamsterhirnhomogenat, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------------|-----------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat 263 K | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit 263 K | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes 263 K von Tier H37/1 | 1. Tag |
| Bahn 4 | Fäzes ME 7 von Tier H41/1 | 1. Tag |
| Bahn 5 | Fäzes ME 7 von Tier H41/2 | 1. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert mit ME 7 | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | Pharmacia Marker | |

Abb. 23 zeigt, dass die Hamster das PrP^{Sc} aus ME 7-H Hirnhomogenat am ersten Tag nach der Verfütterung genauso ausscheiden (Bahn 4 und 5) wie dasjenige des 263 K-Inokulums (Bahn 3)

Auch am zweiten Tag scheiden die mit ME 7-H infizierten Hamster noch PrP^{Sc} aus. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zu sehen.

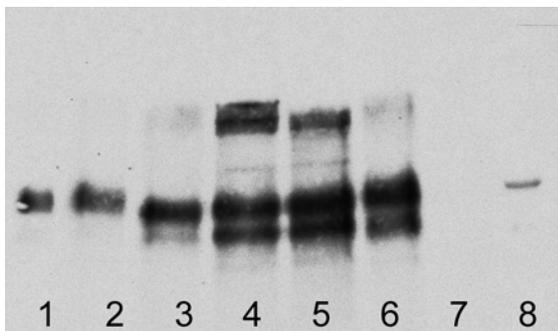


Abb. 24

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 aus den Fäzes von oral infizierten Tieren 2 Tage nach der Verfütterung von Scrapie- (263 K bzw. ME7-H)- Hamsterhirnhomogenat, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|----------------------------|-----------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat 263 K | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit 263 K | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes 263 K von Tier H37/1 | 2. Tag |
| Bahn 4 | Fäzes ME 7 von Tier H41/1 | 2. Tag |
| Bahn 5 | Fäzes ME 7 von Tier H41/2 | 2. Tag |
| Bahn 6 | Fäzes dotiert mit ME 7 | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 7 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 8 | Pharmacia Marker | |

Abb. 24 zeigt, dass die mit ME 7-H infizierten Hamster auch am zweiten Tag nach der Verfütterung PrP^{Sc} ausscheiden (Bahn 4 und 5) ebenso wie die mit 263 K-Inokulum infizierten Hamster (Bahn 3).

Die mit ME7-H infizierten Hamster scheiden PrP^{Sc}/PrP 27-30 sowohl am ersten als auch am zweiten Tag nach oraler Erregerverabreichung aus. (Abb. 23 und 24) Ebenso scheiden Hamster, die mit dem Hamster-adaptierten BSE-Stamm BSE-H oral infiziert wurden, PrP^{Sc}/PrP 27-30 zumindest am ersten Tag nach der Erregergabe aus.

Dieses Ergebnis ist in Abbildung 25 zu sehen:

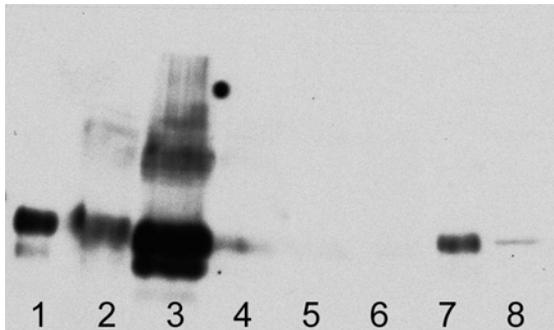


Abb. 25

Western Blot Nachweis von PrP 27-30 in den Fäzes von oral infizierten Tieren 1-3 Tage nach der Verfütterung von BSE-H Hamsterhirnhomogenat, geblottet auf PVDF-Membran, entwickelt mit CDP ohne Nitroblock

| | | |
|--------|------------------------------|-----------------------|
| Bahn 1 | Hamsterhirnhomogenat (BSE-H) | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 2 | Fäzes dotiert mit BSE-H | 1×10^{-5} HÄ |
| Bahn 3 | Fäzes BSE-H von Tier H40/1 | 1.Tag |
| Bahn 4 | Fäzes BSE-H von Tier H40/1 | 2.Tag |
| Bahn 5 | Fäzes BSE-H von Tier H40/1 | 3.Tag |
| Bahn 6 | Fäzes N-Tier | |
| Bahn 7 | Hamsterhirnhomogenat (263 K) | 1×10^{-7} HÄ |
| Bahn 8 | Pharmacia Marker | |

Abb. 25 zeigt, dass auch Hamster, die mit BSE-H oral infiziert wurden, PrP^{Sc} ausscheiden, zumindest am ersten Tag nach der Verfütterung (Bahn 3). Am zweiten Tag nach der Verfütterung ist nur noch ein schwaches Signal zu erkennen (Bahn 4) und am dritten Tag ist kein pathologisches Prion-Protein mehr in den Fäzes nachweisbar.

5.6 PET-Blot und Immunhistochemische Untersuchungen

Die Untersuchungen der oral infizierten Hamster zeigten, dass die Hamster zwar krank wurden, in den Fäzes aber kein und in dem Rektum nur im terminalen Stadium der Infektion PrP^{Sc}/27-30 nachgewiesen werden konnte. Daher war es interessant herauszufinden, wo die Eintrittspforten für das Agens in den Körper liegen und welche Zellen daran beteiligt sind. Dies ist nur mit immunhistochemischen Methoden möglich, die eine räumliche Zuordnung des gefundenen PrP^{Sc}/27-30 ermöglichen. Bei Immunhistochemischen Untersuchungen wird durch den spezifischen Antikörper 3F4 sowohl das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) als auch das pathologische Prion-Protein (PrP^{Sc}) angefärbt. PrP-Ablagerungen zeichnen sich durch bräunliche Färbungen im Gewebeschnitt aus. Die PrP^{Sc}-Ablagerungen treten dabei in granulärer Form auf. Zelluläres PrP^C wird auch angefärbt, ist aber diffuser verteilt und ist durch seine hellbraune homogene Färbung einigermaßen gut vom granulären PrP^{Sc} zu unterscheiden (McBride und Beekes, 1999; Beekes et al., 1998; McBride et al., 1998). Mit dem PET Blot schließlich lässt sich nun eindeutig beweisen, dass es sich um PrP^{Sc} handelt, da bei dieser Methode das zelluläre PrP^C durch den Verdau mit Proteinase K abgebaut wird. Beim PET-Blot werden Gewebeschnitte auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht und das Prion-Protein nach Collagenase A und Proteinase K Inkubation, sowie der Denaturierung der Proteine durch Guanidiniumthiocyanat mittels Antikörpern angefärbt. Mit dem PET Blot konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den gefundenen Ablagerungen nicht um PrP^C, sondern tatsächlich um PrP^{Sc} handelte. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 30 A und B zu sehen.

Unspezifische Färbungen werden durch eine Kontrollfärbung mit Normal-Maus Serum (NMS), in dem sich viele unspezifische Antikörper befinden, ausgeschlossen. In Abbildung 26 ist ein Vergleich zwischen der Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 und mit NMS zu sehen.

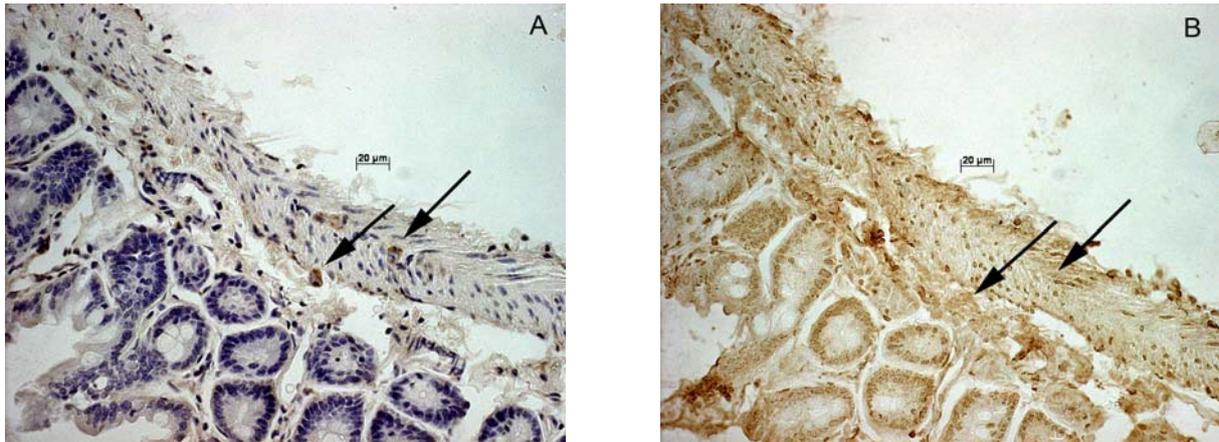


Abb. 26

Immunhistochemischer Nachweis von PrP im Dünndarmgewebe von terminal an Scrapie erkrankten Hamstern; Vergleich zwischen Färbung mit 3F4 und NMS

In Abb. 26 A sind granuläre Ablagerungen des pathologischen Prion-Proteins PrP^{Sc} zu erkennen, die in myenterischen bzw. submucosalen Ganglien lokalisiert sind. Durch die Verwendung des Antikörpers 3F4 wurden diese Ablagerungen angefärbt. In Abb. 26 B ist ein benachbarter Schnitt gezeigt, der mit NMS inkubiert wurde, er wurde jedoch nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dadurch sind in Abb. 26 A die Zellkerne lila, in Abb. 26 B jedoch nicht. Die Anfärbung von PrP^{Sc} ist davon nicht betroffen, so dass eine Anfärbung der PrP^{Sc}-Ablagerungen in Abb. 26 B nicht zu erkennen ist.

Ebenso wie für die IHC verwendet man auch beim PET Blot NMS inkubierte Schnitte als Negativkontrollen, um unspezifische Färbungen auszuschließen.



Abb. 27

PET-Blot aus dem Dünndarm (Ileum): Hamster oral mit dem Scrapie-Stamm 263 K infiziert im terminalen Stadium (172 dpi).

Es handelt sich um zwei aufeinander folgende Schnitte, die zusammen entwickelt wurden. Auf dem Bild 27 A ist das PrP^{Sc} durch die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 spezifisch angefärbt. Hingegen sind auf Bild 27 B, bei dem ein NMS-behandelter Schnitt gezeigt ist, keine PrP^{Sc} Anfärbungen sichtbar. Abbildung 27 A zeigt mehrere Peyer'sche Plaques mit PrP^{Sc}-Ablagerungen aufgereiht wie auf einer Perlenschnur.

In früheren histologischen Untersuchungen konnte die exakte zelluläre Lokalisation des

pathologischen Prion-Proteins aufgeklärt werden (McBride und Beekes, 1999; Beekes et al., 1998; McBride et al., 1998).

So finden sich im terminalen Stadium der Erkrankung bei Hamstern in zahlreichen Strukturen des Darmes PrP^{Sc} Ablagerungen. Dieses ist einerseits das enterische Nervensystem (ENS), bei dem PrP^{Sc}-Ablagerungen sowohl in myenterischen als auch in submucosalen Plexi gefunden werden konnten. Andererseits sind aber auch verschiedene Bestandteile des GALT (gut associated lymphoid tissue = Darmassoziiertes lymphoides Gewebe) stark PrP^{Sc} positiv. Im GALT können Ablagerungen sowohl in den mesenterischen Lymphknoten, den mucosalen lymphoiden Follikeln als auch in den Peyer'schen Plaques auftreten, wobei in den Peyer'schen Plaques vor allem die Keimzentren, das follikel assoziierte Epithel (FAE), Makrophagen und follikulär dendritische Zellen (FDC), befallen sind.

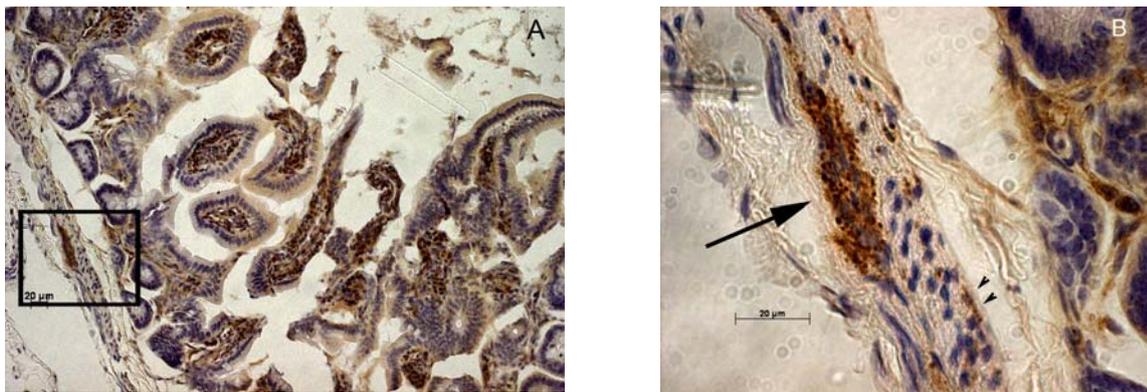


Abb. 28

Immunohistochemischer Nachweis von PrP^{Sc} im Dünndarmgewebe von Hamstern aus dem terminalen Stadium der Erkrankung

In Abb. 28 A ist eine Aufnahme aus dem Dünndarm eines terminal erkrankten Hamsters, der mit 263 K oral infiziert wurde, zu sehen. In dem vergrößerten Ausschnitt in Abb. 28 B ist ein myenterisches Ganglion zu erkennen, das deutliche, granuläre Ablagerungen von PrP^{Sc} zeigt (großer Pfeil). Die kleinen Pfeile zeigen auf submucosale Nerven, die ebenfalls granuläre PrP^{Sc} Ablagerungen aufweisen.

Aus Untersuchungen von McBride und Beekes (1999) ist bekannt, dass PrP^{Sc} schon nach 69 Tagen in verschiedenen Strukturen des Darms immunhistochemisch nachweisbar ist. Daher sollten in dieser Arbeit Darmabschnitte von Hamstern untersucht werden, die sich in früheren Inkubationsphasen befanden, z.B. 60 Tage nach der Inokulation des Scrapie-Agens.

Bereits zu diesem Zeitpunkt sind ebenfalls submucosale Nervenzellen, die Ganglien des

myenterischen Plexus des enterischen Nervensystems sowie das Follikel assoziierte Epithel infiziert (s. Abb. 29). In Abb. 29 B sind PrP^{Sc}-Ablagerungen entlang der submucosalen Ganglien zu sehen. In Abb. 29 C sind Ablagerungen im FAE gezeigt, bei denen es sich um Makrophagen (Pfeile) bzw. weiter lumenwärts um M-Zellen (Pfeilspitzen) handeln könnte.

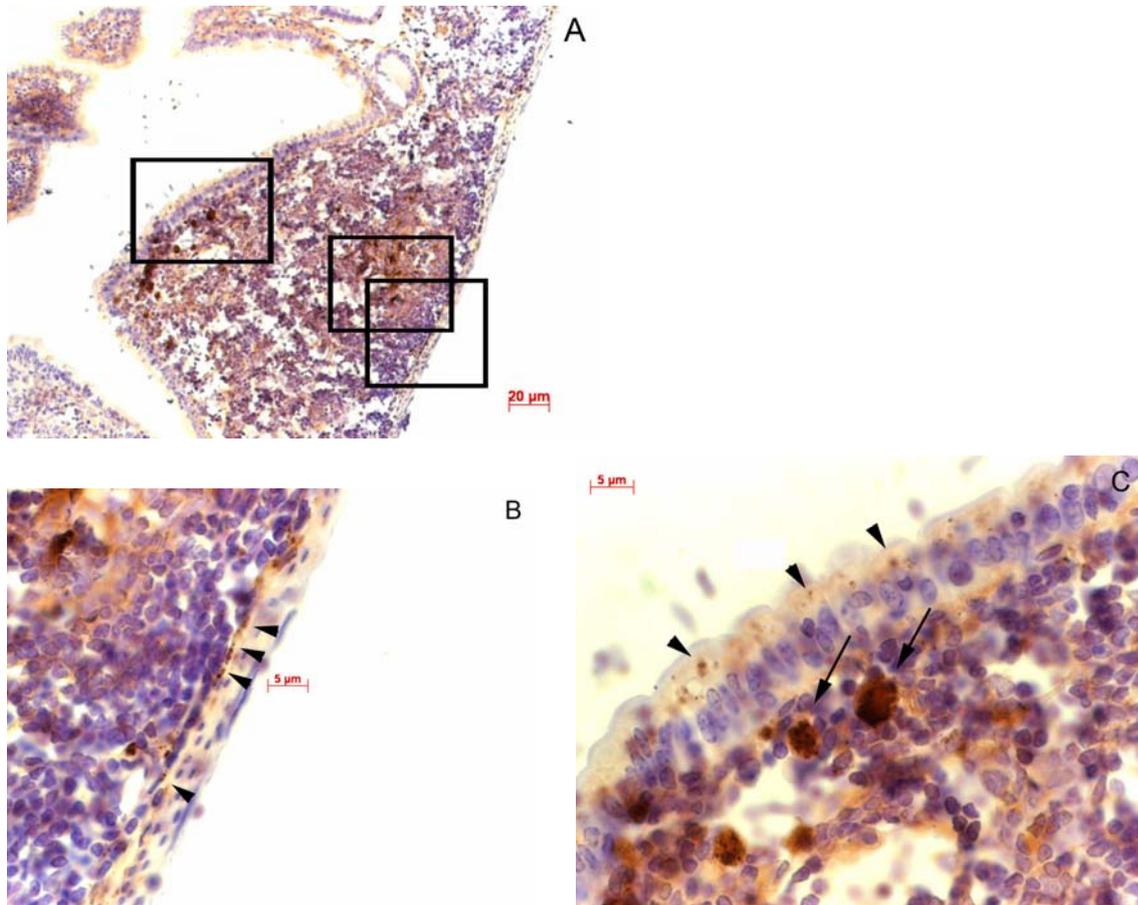


Abb. 29

Immunohistochemischer Nachweis von PrP in einem lymphoiden Follikels eines Hamsters 60 Tage nach der oralen Infektion mit PrP^{Sc}

In der Abbildung 29 A ist ein lymphoider Follikel im Dünndarm eines Hamsters, 60 Tage nach der oralen Infektion mit 263 K, in der Übersicht zu sehen. In den Abb. B und C sind Ausschnittsvergrößerungen zu sehen. In Abb. 29 B weisen die Pfeile auf submucosale Nerven mit PrP^{Sc}- Ablagerungen. In Abb. 29 C sind Ablagerungen im Follikel assoziierten Epithel, die entsprechend ihrer Morphologie auf M-Zellen schließen lassen (Pfeilspitzen) und Makrophagen (Pfeile) zu sehen.

Obwohl sich der PET-Blot zur eindeutigen und sensitiven Identifizierung von PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gewebeschnitt eignet, können mit dieser Methode zelluläre und subzelluläre Strukturen nicht mehr zweifelsfrei aufgelöst werden. Um jedoch Aussagen über die exakte Lokalisation von PrP^{Sc} machen zu können, ist die herkömmliche IHC

unerlässlich. Vergrößert man die Aufnahmen der IHC so lassen sich feinere Strukturen erkennen (vergleiche Bild 30 A und 31 mit 30 B). In Bild 31 ist eine Ausschnittsvergrößerung aus der Abbildung 30 A zu sehen.

Während mit dem PET-Blot eindeutig PrP^{Sc} im Bereich des Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden kann (Abb. 30 B), ist eine genauere räumliche Auflösung nicht mehr möglich. Hingegen können mit der ergänzenden herkömmlichen immunhistochemischen Untersuchung PrP^{Sc}-positive zelluläre Strukturen zugeordnet werden (Pfeil in Abb. 31). Bei dieser zellulären Struktur könnte es sich um einen Makrophagen handeln, der PrP^{Sc} phagozytiert hat.

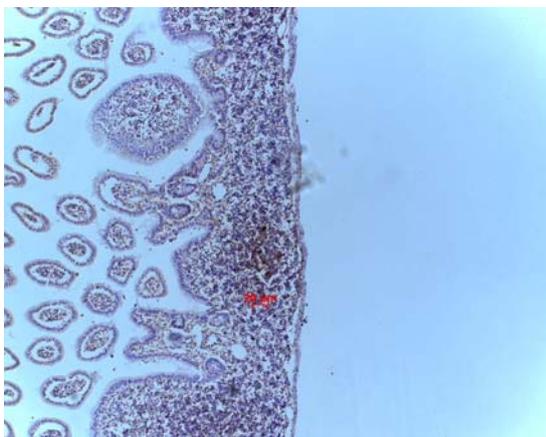


Abb. 30 A

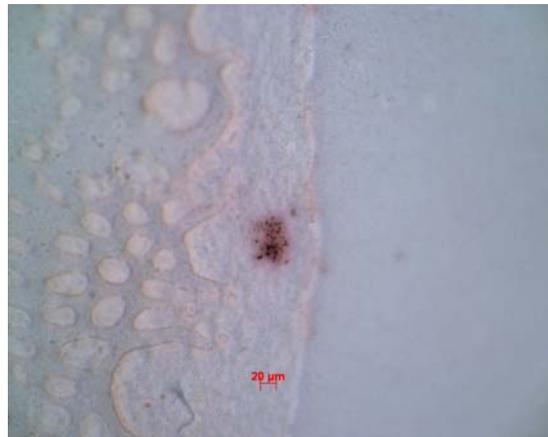


Abb. 30 B

IHC und PET Blot eines Dünndarmsegmentes eines Hamsters oral mit Scrapie 263 K infiziert, 60 Tage nach der Inokulation

Bei den Untersuchungen des Dünndarms (Ileum) von Hamstern, die 60 Tage nach der oralen Infektion mit 263 K Erkrankung getötet wurden, zeigt sich eine Ablagerung des PrP^{Sc} in den Peyer'schen Plaques in der Mucosa der Darmwand, in Abb. 30 A mittels IHC und in Abb. 30 B mittels PET Blots, jeweils in benachbarten Schnitten. Die in der IHC gefundenen granulären Ablagerungen lassen sich mit dem PET Blot eindeutig als PrP^{Sc} Ablagerungen identifizieren.

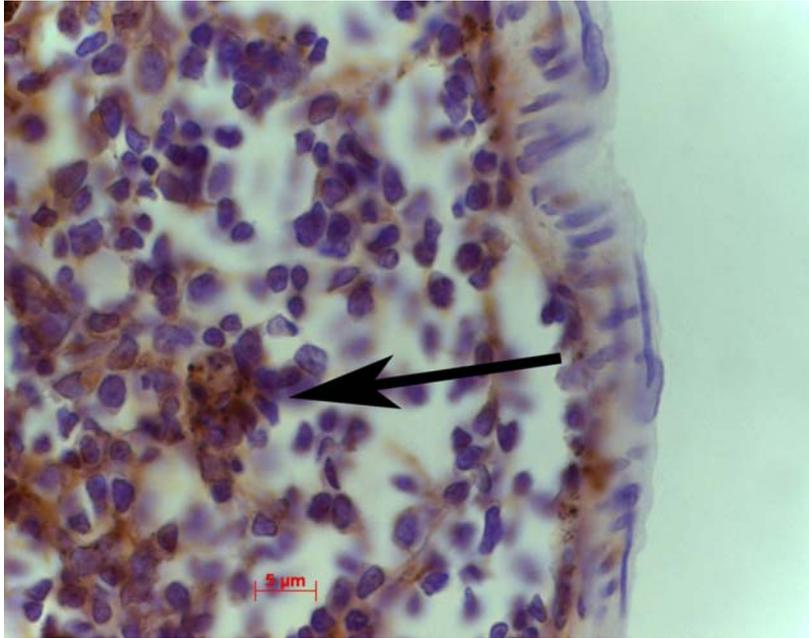


Abb. 31

IHC eines Dünndarmsegmentes eines Hamsters oral mit Scrapie 263 K infiziert, 60 Tage nach der Inokulation

Bei den Untersuchungen des Dünndarms (Ileum) von Hamstern, die 60 Tage nach der oralen Infektion mit 263 K Erkrankung getötet wurden, zeigt sich eine Ablagerung des PrP^{Sc} in den Peyer'schen Plaques. Die Form der Ablagerung könnte auf einen Makrophagen hinweisen, der PrP^{Sc} phagozytiert.

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rektum von oral mit Scrapie infizierten Hamstern konnte erst im terminalen Stadium PrP^{Sc}/PrP 27-30 nachgewiesen werden. In früheren Inkubationsstadien konnte mit den verwendeten sensitiven Nachweissystemen kein PrP^{Sc}/PrP 27-30 detektiert werden.

Werden Hamster mit infektiösem Hirnmaterial gefüttert, scheiden sie nur die ersten Tage nach der Verfütterung PrP^{Sc}/PrP 27-30 mit dem Darminhalt aus. Im weiteren Verlauf der Inkubation einschließlich des klinischen Krankheitsstadiums ist kein PrP^{Sc}/PrP 27-30 mehr in ihren Fäzes nachweisbar. Ebenso wie PrP^{Sc}/PrP 27-30 des Scrapie-Stammes 263K passiert auch peroral inokuliertes pathologisches Prion-Protein der Stämme ME7-H und BSE-H zum Teil den alimentären Trakt von Hamstern ohne vollständig abgebaut oder vollständig aufgenommen zu werden.

Mittels Immunhistochemischer Methoden ist es möglich PrP^{Sc} schon sehr frühzeitig (60 Tage nach der peroralen Inokulation von 263K Scrapie) in verschiedenen zellulären Komponenten des Dünndarmes nachzuweisen und ergänzend mit der PET Blot Technik eindeutig als PrP^{Sc} zu identifizieren. Hiermit konnten granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen sowohl in verschiedenen Strukturen des enterischen Nervensystems (ENS), in den submukosalen und in den myenterischen Ganglien, als auch im GALT lokalisiert werden. Die Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut wiesen jedoch kein pathologisches Prion-Protein auf.