

Untersuchungen zur Inaktivierung von Prionen unter Verwendung einer Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)**

Fakultät Agrarwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Nutztierwissenschaften

Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren (460e)

Professor Dr. L. Hölzle

vorgelegt von

Marie Schöffler

aus Filderstadt

2021

Die vorliegende Arbeit wurde am 07. Juli 2021 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Dekan Fakultät der Agrarwissenschaften: Prof. Dr. Ralf T. Vögele

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2021

Leitung des Kolloquiums: Prof. Dr. Jörn Bennewitz

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Ludwig Hölzle

Berichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. Matthias Büttner

3. Prüfer: Prof. Dr. Michael Kube

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literaturübersicht.....	9
2.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien.....	9
2.2	TSE bei Mensch und Tier	12
2.2.1	TSE beim Menschen	13
2.2.2	TSE beim Schaf (Traberkrankheit, Scrapie)	14
2.2.3	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	15
2.2.4	Chronic Wasting Disease (CWD)	18
2.3	Die Prion-Hypothese	18
2.3.1	Struktur des Prion-Proteine PrP ^C und der abnormalen Form PrP ^{Sc}	18
2.3.2	Natürliche Funktionen der Prionen	20
2.3.3	Umfaltung von PrP ^C zum pathogenen PrP ^{Sc}	20
2.3.4	Eigenschaften und Inaktivierung von PrP ^{Sc}	22
2.4	Diagnostik	22
2.4.1	Tierversuch (Bioassay).....	24
2.4.2	Western Blotting.....	24
2.4.3	Zellbasierte Assays	25
2.4.4	Protein-misfolding cyclic amplification (PMCA).....	25
2.5	Therapie und Prävention	28
2.6	Inaktivierung und chemische Desinfektion von pathogenen Prionen (PrP ^{Sc})	28
2.7	Bedeutung von Recyclingprozessen für biogene Rest- und Abfallstoffe	29
2.8	Gesetzliche Grundlagen	30
2.9	Bedeutung der Hygiene im TSE Fall	32
2.10	Zielsetzung dieser Arbeit.....	32
3	Material	34
3.1	Material und Versuchstiere.....	34
3.1.1	Gewebeproben und Material aus der Tierkörperbeseitigung	34
3.1.2	Laborgeräte.....	35
3.1.3	Chemikalien	36
3.1.4	Antikörper, Enzyme, Kits und Proteingewichtsstandards.....	38
3.1.5	Puffer und Lösungen	38
3.1.6	Versuchstiere	39
3.1.7	Verbrauchsmaterial	40
4	Methoden	41
4.1	Tierexperimentelle Methoden	41
4.2	Herstellung der Hirnhomogenate.....	41

4.3	Vermehrung des an Mäuse adaptierten BSE 301 V	42
4.4	Mäusezüchtung der VM/DK (Genotyp <i>Sinc^{p7p7}</i>) Mäuse.....	42
4.5	Beschaffung des Fleischbreis der Kategorie 1 und 2.....	42
4.5.1	Vorbereitung für die Versuche in der Mikrowellenanlage	42
4.6	Quantifizierung der Hirnhomogenate	43
4.6.1	Quantifizierungseinheit der Verdünnungsstufen im Western Blotting.....	46
4.7	Inaktivierung von infektiösen Prion-Proteinen durch Behandlung in	46
	einer Mikrowellenanlage.....	
4.8	Protein misfolding cycling amplification (PMCA).....	48
5	Ergebnisse	51
5.1	Nachweis von PrP ^{Sc} im infizierten Hirnmaterial.....	51
5.1.1	Vergleichende Vorversuche mit verschiedenen primären Antikörpern	51
	zum Nachweis von Prionen	
5.1.2	Nachweis von PrP ^{Sc} im Ausgangsmaterial (Hirnmaterial von infizierten	51
	Tieren).....	
5.2	Re-Isolierung von PrP ^{Sc} aus mit Prionen versetztem Fleischbrei der Kategorie 1	53
	und Kategorie 2.....	
5.3	Inaktivierungsversuche mit der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen.....	53
5.3.1	Inaktivierungsversuche Scrapie 263 K	54
5.3.2	Inaktivierungsversuche mit Fleischbrei der Kategorie 1 und 2, welcher mit	61
	BSE 301 V infiziertem Maushirnhomogenat versetzt war	
5.4	PMCA <i>in-vitro</i> Amplifizierung von Prionen	67
5.4.1	Herstellung von Hamsterhirnhomogenaten	67
5.4.2	Optimierung der PMCA	70
5.4.3	Nachweis von PrP ^{Sc} aus Scrapie 263 K infizierten Hamsterhirnhomogenat	72
	mittels PMCA	
5.4.4	Inaktivierungsversuche von mit Scrapie 263 K vermischten Peptonwasser	73
6	Diskussion.....	78
7	Zusammenfassung.....	86
8	Summary.....	88
9	Literaturverzeichnis	89
10	Abkürzungsverzeichnis	96
11	Tabellenverzeichnis	100
12	Abbildungsverzeichnis	101
	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	102
	Lebenslauf.....	103
	Danksagung	105

1 Einleitung

TSE steht für den Überbegriff „**T**ransmissible **S**pongiforme **E**nzephalopathie“ und repräsentiert eine Gruppe von tödlich verlaufenden neuropathologischen Veränderungen, für die es zurzeit keine effektive Behandlung oder Heilung gibt. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Krankheiten, die folgende Gemeinsamkeiten haben: Sie sind übertragbar (**t**ransmissible) und es sind schwammartige (**s**pongiforme) Veränderungen im histologischen Bild des Gehirns (**E**ncephalon) sichtbar. Der Verlauf der Erkrankung ist letal und kann sowohl beim Menschen als auch beim Tier auftreten (EFSA, 2019; Houston und Andréoletti, 2019; Spagnolli *u. a.*, 2019; Wang, Rhoads und Appleby, 2019).

Die Erreger der TSE sind infektiöse Proteine, die sogenannten Prionen. Durch Prusiner wurde 1982 der Begriff Prion geprägt, welcher sich von „**p**roteinaceous **i**nfectious **p**article“ ableiten lässt (Prusiner, 1982). Das Besondere an diesen infektiösen Einheiten ist, dass sie keine Nukleinsäure als Erbinformation besitzen. Sie bestehen nur aus unphysiologisch gefalteten, unlöslichen Proteinen (PrP^{Sc}), die sich von in Körperzellen vorkommenden Proteinen (PrP^C) ableiten. Die Übertragung kann durch eine natürliche Infektion oder über gezielte Inokulation erfolgen.

Mitte der achtziger Jahre wurde das Thema TSE erstmals durch die BSE-Krise (Braun, 1998), welche in Großbritannien ihren Ursprung hatte, einer breiten Öffentlichkeit richtig bekannt. BSE nennt sich die Erkrankung beim Rind, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie.

Infolge der Krise wurde 1994 ein Verfütterungsverbot von Tiermehl an Wiederkäuer erlassen. 2001 folgte ein BSE-Test für alle Schlachtrinder, die älter als 30 Monate waren. Des Weiteren wird seit dieser Zeit spezifisches Risikomaterial (SRM) aus der Lebensmittelkette entfernt und vernichtet. Als SRM wird Material bezeichnet von dem ein erhöhtes Risiko einer TSE Übertragung ausgeht, wie Gehirn, Rückenmark, Augen, Darmtrakt, sowie die Milz von Schlachttieren über 12 Monaten (Gelpi, 2020).

Dieses Material muss nach der Verordnung EG 1069/2009 der Europäischen Union unschädlich gemacht werden und es gehen dadurch wichtige Nährstoffe verloren. Außerdem entstanden nun zusätzliche Kosten für die Entsorgung des Risikomaterials und durch den Kauf von zusätzlichen Futtermitteln. Davor wurden Tiermehl und -fett als Futtermittel standardmäßig eingesetzt. Nachdem die Europäische Union sich dazu entschieden hat das Material zu entsorgen, wurde nach einem Weg gesucht dieses Material doch noch einer sicheren Nutzung zuzuführen. Dies war ein Grund für die vorliegende Arbeit.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts “PRIORITY 222887 Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research” angefertigt.

Dieses Projekt wurde von der EUROPEAN COMMISSION über das 7th Framework Programm on Research, Technological Development and Demonstration gefördert. Das Ziel des 7th Framework Programm war die Förderung der Forschung und die Stärkung der wissenschaftlich und technologischen Basis in der europäischen Industrie.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Besonderen mit dem Verfahren zur Inaktivierung von Prionen mit einer Thermodruckhydrolyse mittels Mikrowellen im Labor-Maßstab. Ziel der Versuche war, das Potential dieser Methode zur Inaktivierung von spezifischem Risikomaterial zu evaluieren und so eine Möglichkeit zur Minimierung des von diesem Material ausgehenden TSE-Risikos im Rahmen von Recyclingprozessen zu schaffen. Dabei sollte eine spätere stoffliche Nutzung des Restmaterials gewährleistet werden. Die Sicherheit des Materials steht an oberster Stelle, gefolgt von der Einsparung von Ressourcen.

2 Literaturübersicht

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Erstmals wurde Scrapie bei Schafen vor fast 300 Jahren im Jahre 1732 diagnostiziert (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Resenberger *u. a.*, 2011).

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1759 werden erstmals zwei Kennzeichen der später als transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) genannten Erkrankung beschrieben, nämlich, dass sie übertragbar ist und dass sie ausnahmslos tödlich verläuft.

„Der Trab ist auch eine Krankheit der Schaaf, und ist ansteckend. Sie schleppen sich lange, verzehren sich nach und nach, und zuletzt müssen sie sterben.“ (Leopold, 1759).

Bevor Prionen als Ursache für die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung des Menschen entdeckt wurden, waren Ärzte und Wissenschaftler der Meinung, dass diese Krankheit durch Viren verursacht wird. Erst über 200 Jahre später zeigte sich ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Ätiologie der TSE. Prusiner und Kollegen extrahierten aus dem Gehirn experimentell mit Scrapie infizierter Hamster einen Extrakt, welcher vollständig aus infektiösem Material bestand. Nach weiteren Tests fanden sie heraus, dass es sich um ein Protein handelt, welches gegen Proteinase resistent ist (Prusiner, 1984). Im gleichen Jahr publizierte Prusiner die N-terminale Aminosäuresequenz des Proteinase K (PK)-resistenten Teils des Prion-Proteins (PrP 27-30). Im darauffolgenden Jahr identifizierten zwei voneinander unabhängige Gruppen das PrP Gen (Prn-p-Gen) (Chesebro *u. a.*, 1985; Oesch *u. a.*, 1985; Cassmann und Greenlee, 2020).

Prionen sind im Gegensatz zu Bakterien und Viren deutlich kleiner und nicht im Mikroskop sichtbar zu machen. Sie sind die einzigen Krankheitserreger, die keinerlei Erbinformationen in Form von DNA oder RNA enthalten. Prionen sind lediglich Proteine ohne eigene DNA oder RNA (EFSA, 2019; Houston und Andréoletti, 2019; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Prion-Proteine befinden sich als zelluläre Proteine im Körper. Ihre Funktion ist allerdings physiologisch bislang noch nicht bekannt. Sie befinden sich vorwiegend auf den Synapsen der Neuronen im Zentralnervensystem. Diese Prion-Proteine sind per se nicht pathogen, allerdings werden sie es, sobald sie ihre Konformation ändern. Dies kann sowohl aktiv als auch passiv vonstattengehen. Das zelluläre Prion-Protein PrP^C ändert seine dreidimensionale Struktur und wird so zu einem pathogenen Protein (Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Houston und Andréoletti, 2019; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Dieses anormal gefaltete Prion-Protein wird Prion-Scrapie oder auch nur „Prion“ genannt (PrP^{Sc}). Der Ursprung des Namens liegt in einer Prionen-Erkrankung die, wie oben bereits erwähnt, bei Schafen entdeckt wurde, die sogenannte Traberkrankheit, auch Scrapie genannt. Der Name kommt von „to scrape“, weil erkrankte Schafe aufgrund des starken Juckreizes dazu tendieren, sich an Zaunpfählen oder Toren zu kratzen und zu schrubben. Darüber hinaus manifestiert sich Scrapie bei Schafen, ähnlich wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bei Menschen in bizarren Verhaltensweisen, Schwierigkeiten mit dem Gehen, der Koordination sowie der Balance (Greenlee, 2019; Zetterberg, 2019).

Eine Eigenschaft der pathogenen Prionen ist, dass sie sehr stabil sind. Sie können von den Proteasen im Körper der betroffenen Menschen und Tiere nicht abgebaut werden. Kommen die anormal gefalteten Prion-Proteine in Kontakt mit den gesunden Prion-Proteinen, so induzieren sie auch in diesen eine Konformationsänderung zum pathogenen Protein. Da Letztere nicht abgebaut werden können, akkumulieren sie in den Zellen und bilden Aggregate im Zentralnervensystem. Diese Aggregate führen zur Degeneration der Neuronen, die sich in schwammartiger, löchriger Struktur des Gehirns der erkrankten Menschen und Tiere manifestiert. Wie es dazu kommt, dass pathogene Prionen eine Konformationsänderung der gesunden Prion-Proteinen erreichen, ist noch nicht bekannt (Ritchie und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Houston und Andréoletti, 2019; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 1) zeigt die Histopathologie der spongiformen Läsionen im Gehirn von betroffenen Menschen und Tieren.

Abbildung 1: Histopathologische Veränderungen in von mit Prionen befallenen Gehirnen

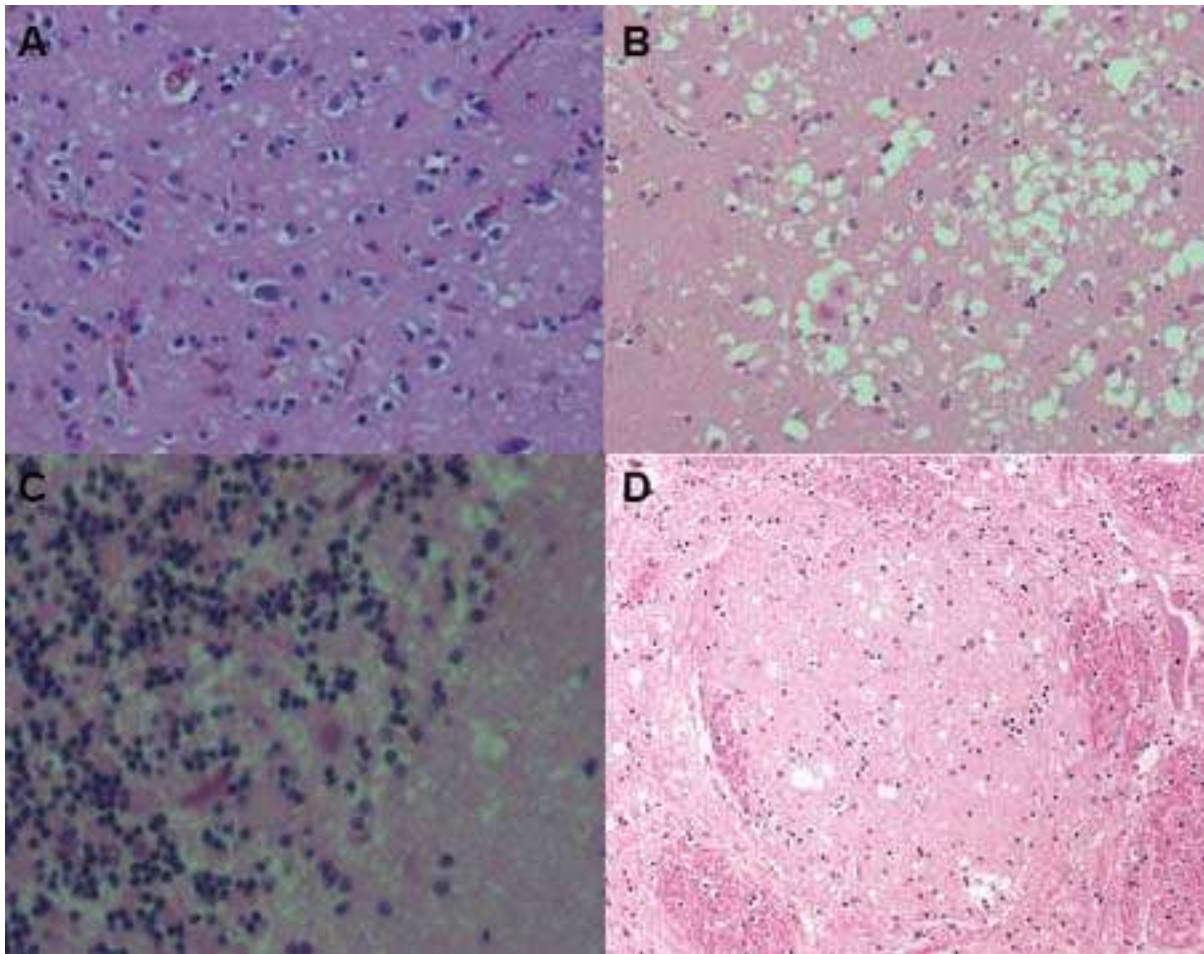


Bild: © Hans Kretzschmar, München, D Martin Groschup, Insel Riems Quelle: Universität Düsseldorf, <https://www.ipb.hhu.de/forschung-ipb/themen/prion-erkrankungen.html> (abgerufen am 13.07.2020).

Abbildung 1 Histopathologie: spongiforme Läsionen des Gehirns von A: sporadischer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, B neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, C Kuru and D BSE.

In allen Bildern ist die schwammartige Struktur des Gewebes, die spongiforme Enzephalopathie, zu erkennen.

2.2 TSE bei Mensch und Tier

Im 18. Jahrhundert wurde die TSE bei Schafen erstmals beschrieben. Zweihundert Jahre später wurde die Erkrankung beim Menschen und weiteren Tierarten entdeckt (wie in Tab. 1 beschrieben).

Tabelle 1: Meistverbreitete Transmissible Spongiformen Enzephalopathien (TSE) im Überblick (modifiziert nach (Prusiner, 2004; Tatzelt, 2011))

Erkrankung	Wirt	Mechanismus der Pathogenese	Erstes dokumentiertes Auftreten
Scrapie	Schaf, Ziege	Infektion in genetisch anfälligen Schafen	1732
Creutzfeldt-Jacob Disease (CJD)	Mensch	Sporadisch, durch Vererbung, Iatrogen	1920 1921
Gerstmann-Sträussler-Schenker Syndrom (GSS)	Mensch	Durch Vererbung	1936
Transmissible Mink Encephalopathy (TME)	Nerz	Infektion über Schafe oder Rinder	1947
Kuru	Stamm der Fore (Mensch)	Infektion über rituellen Kannibalismus	1957
Chronic Wasting Disease (CWD)	Hirschartige	Übertragung noch nicht bekannt	1978
Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)	Rind (Bovinae)	Infektion über kontaminiertes Fleisch- und Knochenmehl	1987
Exotic Ungulate Encephalopathy (EUE)	Zoopaarhufer (Antilopen)	Infektion über mit Prionen kontaminiertes Tiermehl	1988
Feline Spongiforme Encephalopathy (FSE)	Katze (Felis)	Infektion über mit Prionen infiziertes Rindfleisch oder Tiermehl	1991
neue Variante der Creutzfeldt-Jacob Disease (nvCJD)	Mensch	Durch Verzehr von BSE kontaminiertem Fleisch	1996

2.2.1 TSE beim Menschen

Zu Beginn der 20er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben Creutzfeldt (1920) und Jakob (1921) eine neurodegenerative Erkrankung beim Menschen (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921; Barria, Gonzalez-Romero und Soto, 2012). Diese war erst als „Spastische Pseudosklerose“ bekannt. Erst später wurde sie nach den beiden Entdeckern Creutzfeldt und Jakob benannt und heißt seither Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD).

1957 beschrieben Gajdusek und Zigas eine infektiöse Erkrankung, die sich in Papua-Neuguinea endemisch verbreitete und rituellen Kannibalismus als Ursache hatte (Gajdusek und Zigas, 1957). Durch Gemeinsamkeiten der Erkrankung zu CJD ging man von einem gemeinsamen Krankheitserreger aus, welcher aber zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt war.

Prionen-Krankheiten des Menschen können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Will und Ironside, 2017):

Familiär (fCJD)

Erworben (infektiös, iCJD)

Sporadisch (spontan, sCJD)

Beim Menschen unterscheidet man insgesamt vier verschiedene Prionenerkrankungen: das Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom (GSS), die Fatale Familiäre Insomnie (FFI), die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) und das Kuru. Während GSS und FFI eine genetisch bedingte Ursache haben, kann die CJD genetisch und auch durch Übertragung auftreten. Kuru wird ausschließlich durch alimentäre Übertragung ausgelöst (Schmitz *u. a.*, 2017; Will und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Gelpi, 2020).

Es gibt vier Varianten der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Will und Ironside, 2017).

Idiopathisch, sporadisch auftretende Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) 80-90% aller CJD-Fälle treten sporadisch auf. Die Quelle der Infektion ist hier nicht nachvollziehbar, es wird von einer spontanen Entstehung ausgegangen.

Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD): Die Übertragung erfolgt hier durch Vererbung von mehreren *Prn-p*-Punktmutationen und Insertionsmutationen. Diese Form kommt gehäuft in bestimmten Regionen vor, wie z.B. der Slowakei.

Iatrogen erworbene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJD): Die Infektion erfolgt im medizinischen Bereich. Unter anderem gibt es Fälle, bei denen es zu einer Erkrankung durch kontaminierte

Präparate mit Wachstumshormonen kommt, die aus Leichenhypophysen extrahiert wurden. Auch können nicht vollständig dekontaminierte Oberflächen und medizinische Gerätschaften zu einer Infektion führen. Die Inkubationszeit liegt je nach Art der Infektion bei 15 Monaten bis zu 30 Jahren.

Neue Variante der CJD (nvCJD): Diese neue Variante wird auf den Verzehr von kontaminiertem Rindfleisch zurückgeführt. Man geht von einer Inkubationszeit von ≥ 10 Jahren aus.

Ein typisches Symptom ist eine rasch verlaufende Demenz bei jungen Patienten. Es kommt zu Sehstörungen, Gangataxie, sowie Veränderungen im Verhalten (Will und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018).

Das GSS wird durch Vererbung übertragen. Durch die extrem lange Inkubationszeit treten Symptome erst im Alter von 50 bis 60 Jahren auf. Es zeigen sich Ataxien oder spastische Lähmungen der Beine. Diese werden in der Regel als progrediente Demenz assoziiert. Manche Ausfälle erinnern an Alzheimer. Die Dauer der Erkrankung beträgt 5 bis 6 Jahre nach Ausbruch erster Symptome und endet immer tödlich (Collins, McLean und Masters, 2001; Cracco *u. a.*, 2019).

In den späten 80er Jahren wurde erstmals die Fatale Familiäre Insomnie in Italien beschrieben. Hier erkrankten fünf Mitglieder einer Großfamilie (Lugaresi *u. a.*, 1986). Es konnte eine Mutation am Codon 178 des PrP-Gens nachgewiesen werden (Medori *u. a.*, 1992). Die ersten Symptome treten im Alter von 50 Jahren auf. Es zeigten sich progressive Schlaflosigkeit, Dysautonomia (Entgleisung des peripheren und autonomen Nervensystems), Muskelzuckungen und in manchen Fällen auch Demenz (Collins, McLean und Masters, 2001; Llorens *u. a.*, 2017). Nach einer Krankheitszeit von 13 bis 15 Monaten endet sie tödlich (Llorens *u. a.*, 2017).

Kuru ist eine TSE beim Menschen, welche wie bereits erwähnt nur beim Stamm der Fore auf Papua-Neuguinea vorkam. Die Übertragung erfolgte hier durch einen rituellen Kannibalismus. Symptome von Kuru sind Ataxien und Tremor. Nachdem der rituelle Kannibalismus beendet wurde, beobachtete man eine starke Abnahme von Kuru. Wegen der extrem langen Inkubationszeit von über 30 Jahren kommt es trotz allem immer wieder zu weiteren Ausbrüchen (Liberski *u. a.*, 2019).

2.2.2 TSE beim Schaf (Traberkrankheit, Scrapie)

Scrapie kommt in den meisten Ländern, die Schafzucht betreiben, vor (Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Irland, Italien, den Niederlanden, Norwegen, Schweiz und Zypern). Scrapie tritt auch in Ländern außerhalb Europas auf. Es wurde von Fällen in den

USA, Israel, Kanada und Japan berichtet (Wells *u. a.*, 1987). Nach dem Zweiten Weltkrieg trat sie auch wieder in Deutschland auf (230 Fälle von 2004 bis 2021 bekannt; Quelle: Internetauftritt des Ministeriums für Ernährung und Landwirtschaft, aufgerufen am 22.05.2021).

Die Krankheit äußert sich in Symptomen wie Unruhe, Nick- und Seitwärtsbewegung des Kopfes, Schreckhaftigkeit, Muskelzucken, sowie Juckreiz, der mit Kratzen und einem dadurch resultierenden Wollverlust einhergehen kann. Der Bewegungsablauf und die Koordination der betroffenen Tiere ist gestört. Sie magern trotz guter Fütterung ab. Im Endstadium liegen sie fest, dann folgt der Tod. Bis heute gibt es keine Therapie (Greenlee, 2019; Zetterberg, 2019).

In unterschiedlichen Ländern haben sich verschiedene Bezeichnungen für diese Erkrankung entwickelt. Im Englischen heißt sie Scrapie von „to scrape“ gleich kratzen, in Deutschland Traberkrankheit wegen des veränderten Gangs der erkrankten Tiere (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Ulvund, 2001).

Die sehr lange Inkubationszeit von mehreren Monaten bis Jahren erschwert die Aufklärung des Übertragungsweges. Es besteht sowohl die Möglichkeit einer horizontalen (durch z.B. kontaminiertes Futter), als auch einer vertikalen (vom Muttertier auf den Fötus) Übertragung der Prionen. Es kann zu einer Kontamination von Weideflächen durch die infektiöse Nachgeburt erkrankter Muttertiere kommen (Foote *u. a.*, 1993; Onodera *u. a.*, 1993; Greenlee, 2019; Cassmann und Greenlee, 2020). Bedingt durch die hohe Stabilität des Erregers können sich so adulte Tiere durch kontaminiertes Weidegras direkt und indirekt infizieren. Bis heute wurde keine Übertragung auf den Menschen beobachtet. Eine Übertragung der Scrapie von Schafen auf Ziegen konnte 1939 experimentell gezeigt werden (Culle, 1939).

Ebenso konnte eine direkte Übertragung auf Nagetiere (Chandler, 1961) aber auch von in Mäusen passagiertem Scrapie auf Hamster (Zlotnik und Rennie, 1965) nachgewiesen werden. Durch die erfolgreiche Übertragung wurden zwei Modellsysteme etabliert, die durch ihre verkürzte Inkubationszeit, die geringeren Kosten in der Anschaffung, sowie der Haltung enorm wichtig für die Grundlagenforschung sind.

Kürzlich wurde bei Ziegen eine atypische Form von Scrapie in Japan nachgewiesen (Matsuura *u. a.*, 2019). Die Autoren fanden ein PrP-Protein, welches statt der üblichen dreifach Bande im Western Blotting ein Bandenmuster mit mehreren Banden zeigte, dass ebenfalls gegenüber Proteinase K resistent war: PrP^{res}.

2.2.3 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Die Prionenerkrankung des Rindes wird Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) genannt und wurde in den späten 1980er Jahren in England zum ersten Mal beschrieben (Wells *u. a.*, 1987). Diese Erkrankung breitete sich schnell über ganz Großbritannien und Teile

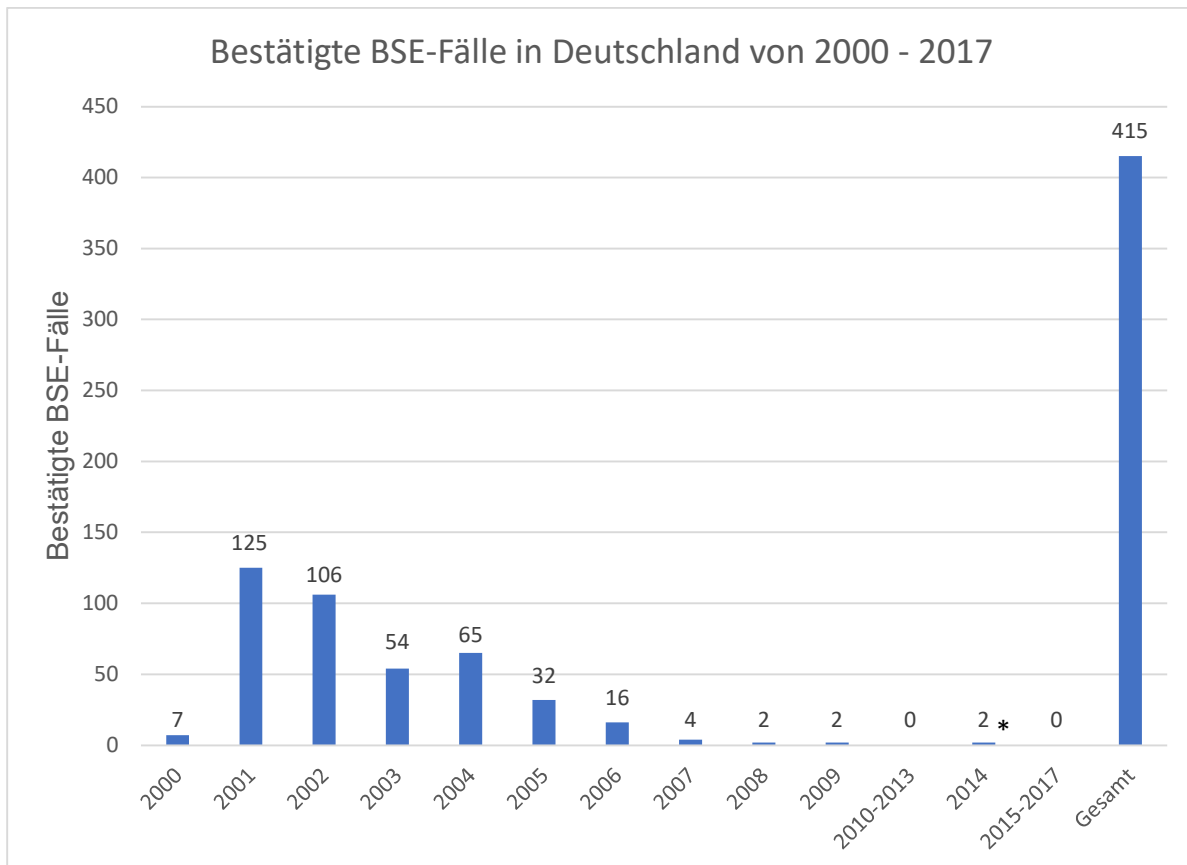
Westeuropas aus. Im Jahr 2005 wurde der erste BSE-Fall in den USA bekannt (Kumagai, Daikai und Onodera, 2019).

Für den Ausbruch in den 1980er Jahren wird die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl an Rinder verantwortlich gemacht. Eine mögliche Ursache dieses Ausbruchs sind auch die in diesem Zeitraum veränderten Dekontaminationsmethoden in englischen Tierkörperbeseitigungsanstalten: Die Temperatur für die Inaktivierung wurde herabgesetzt und es wurde auf den Fettextraktionsschritt verzichtet (Kumagai, Daikai und Onodera, 2019).

In Großbritannien allein waren 178.428 Rinder seit dem ersten Ausbruch bis 2020 betroffen (Quelle: Internetseite von Animal and Plant Health Agency, aufgerufen am 22.05.2021). 1994 wurde ein Verfütterungsverbot von Tiermehl an Wiederkäuer erlassen, was zu einem rapiden Rückgang der Neuinfektionen führte. 2001 folgte ein BSE-Test für alle Schlachtrinder, die älter als 30 Monate waren. Es wurde ein neues EU-Recht in Bezug auf die Verwertung von Tierischen Nebenprodukten eingeführt (TierNebG / BGBl. I S. 82). Das spezifische Risikomaterial (SRM) muss laut Verordnung aus der Lebensmittelkette entfernt und vernichtet werden. Als SRM wird Material bezeichnet, von dem ein erhöhtes Risiko einer TSE-Übertragung ausgeht, wie Gehirn, Rückenmark, Augen, Darmtrakt, sowie die Milz von Schlachttieren über 12 Monaten (Gelpi, 2020).

Seit 2000 sind bis heute 415 bestätigte Fälle in Deutschland gemeldet. Seit 2010 gab es keinen neuen bestätigten Fall in Deutschland, mit Ausnahme im Jahr 2014 (Abb. 2). Hier wurden 2 Fälle atypischer BSE festgestellt. Die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) hat der Bundesrepublik Deutschland den Status des vernachlässigbaren BSE Risikos zuerkannt (Quelle: Internetauftritt des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft aufgerufen am 22.05.2021).

Abbildung 2: Bestätigte BSE-Fälle in Deutschland



* atypischer BSE-Fall

In den Jahren 2010 – 2013 und 2015 – 2017 konnten keine BSE-Fälle mehr nachgewiesen werden. Im Jahr 2014 traten zwei atypische BSE-Fälle (am 09.01. und 5.2.2014) auf (Quelle: Internetauftritt des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft aufgerufen am 22.05.2021).

Die Symptome der BSE ähneln denen der Scrapie beim Schaf. Die Rinder sind sehr schreckhaft und reagieren empfindlich auf Lärm und Licht. Die Koordination ist gestört, wodurch die Tiere stürzen können. Es wird auch Juckreiz und Muskelzucken beobachtet. Bei fortschreitender Erkrankung liegen die Tiere fest, bis sie letztendlich sterben (Braun, 1998). Die Übertragung der Erkrankung erfolgt direkt durch kontaminiertes Tiermehl. Eine horizontale oder vertikale Übertragung konnte nicht gezeigt werden (Kumagai, Daikai und Onodera, 2019).

Man ging zunächst davon aus, dass eine Übertragung vom Rind auf den Menschen nicht möglich sei, doch mit dem Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) wurde diese Annahme revidiert. Als Auslöser wird der Verzehr von mit BSE kontaminiertem Fleisch verantwortlich gemacht. Im Frühjahr 1996 erkrankten 10 britische Patienten an dieser neuen Variante (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001). Die meisten Fälle sind in Großbritannien aufgetreten. Dies ist ein Hinweis auf die Ursache, denn hier begann 10 Jahre zuvor die BSE-Epidemie (Gelpi, 2020).

2.2.4 Chronic Wasting Disease (CWD)

Im Deutschen wird CWD auch chronische zehrende Krankheit genannt, da sie u.a. mit starkem Gewichtsverlust einhergeht. Es handelt sich dabei um die TSE bei Hirschartigen (Ricci, 2017). Die USA und Kanada sind die am meisten betroffenen Länder; am Häufigsten sind der Wapiti-Hirsch und der Virginia-Hirsch betroffen. In einer Naturforschungsstation in Colorado trat der erste Ausbruch 1967 auf. Dass es sich dabei um eine Transmissible Spongiforme Enzephalopathie handelte, wurde erst 11 Jahre später festgestellt. In diesem Zeitraum hatte sich CWD epidemisch in den dortigen Hirschfarmen ausgebreitet. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich auch Wildtiere infizierten. Damit ist CWD die einzige Prionenerkrankung, die bislang bei Wildtieren nachgewiesen wurde (Spraker *u. a.*, 1997; Miller *u. a.*, 2004; Velásquez *u. a.*, 2020).

Das Verbreitungsgebiet der CWD liegt hauptsächlich in den nordamerikanischen Bundesstaaten, vor allem Colorado und Wyoming, sowie in Teilen von Kanada. Der Ausbruch in Kanada wurde wahrscheinlich durch infizierte Tiere aus den USA ausgelöst. Es kann von einer horizontalen und vertikalen Übertragung ausgegangen werden, wobei die vertikale Übertragung eine größere Bedeutung zu haben scheint. Bis heute konnte nicht sichergestellt werden, dass von der CWD keine Gefahr für Menschen ausgehen kann (Velásquez *u. a.*, 2020). Bei den mit CWD infizierten Tieren kommt es zu einem starken Verlust an Gewicht („chronic wasting“) und auffälligem gestörtem Verhalten. Diese Symptome ähneln der Scrapie (Miller and Williams, 2004). Eine Übertragung durch Speichel konnte experimentell nachgewiesen werden. Speichel könnte demnach einen Übertragungsweg darstellen, z.B. über gemeinsam genutzte Tränken oder Salzlecksteine (Mathiason *u. a.*, 2006; Koutsoumanis *u. a.*, 2019).

Der Nachweis der CWD kann präklinisch durch eine Tonsillenbiopsie und dem immunhistologischen Nachweis des pathologischen Prion-Proteins erfolgen (O'Rourke, 2003). Post mortem kann die CWD biochemisch und neurohistologisch bestätigt werden (Koutsoumanis *u. a.*, 2019; Velásquez *u. a.*, 2020).

2.3 Die Prion-Hypothese

2.3.1 Struktur des Prion-Proteine PrP^C und der abnormalen Form PrP^{Sc}

PrP^C ist ein in der Membran mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) verankertes monomeres Glykoprotein (Stahl *u. a.*, 1987). Die abnormale Form des PrP^C, das sogenannte PrP^{Sc} ist durch seine Fehlfaltung resistent gegen den Proteinase-Abbau. Die veränderte Struktur des Prion-Proteins wirkt sich auch auf die physikalischen-chemischen

Eigenschaften aus (Spagnolli et al. 2019). PrP^C besteht aus 253-273 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 33-35 kDa (Kretzschmar *u. a.*, 1986; Spagnolli *u. a.*, 2019).

PrP^C unterscheidet sich weder in der Aminosäuresequenz noch in deren Modifikationen, wie dem GPI-Anker von PrP^{Sc}. Auf biochemischer und biophysikalischer Ebene gibt es jedoch eindeutige Unterschiede. So ist PrP^C mit Proteinase K vollständig abbaubar. PrP^{Sc} ist dagegen resistent. PrP^C ist löslich in milden Detergenzien (Riesner, 2003), wohingegen PrP^{Sc} darin unlöslich ist. PrP^{Sc} hat einen höheren Anteil an β -Faltblatt Strukturen. Bei der zellulären Form überwiegt die α -Helix Struktur (Griffith, 1967; Prusiner, 1982; Spagnolli *u. a.*, 2019). Die Unterschiede liegen also in der Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Mitteln, in der Sensibilität bzw. Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen (Acevedo-Morantes und Wille, 2014; Ritchie und Ironside, 2017; Scheckel und Aguzzi, 2018; Wille und Requena, 2018).

Der N-Terminus der Prion-Proteine ist unstrukturiert und kann daher auch in der PrP^{Sc}-Form von Proteasen verdaut werden. Strukturiert hingegen ist der C-Terminus. Am N-terminalen Ende des Prionen-Proteins PrP^C befindet sich die Signalsequenz, die das Protein dem sekretorischen Weg zufügt, in dem es direkt in das Endoplasmatische Retikulum translatiert wird. Am C-terminalen Ende befindet sich der GPI-Anker, mit dessen Hilfe das Protein an der Zellmembran verankert werden kann (Acevedo-Morantes und Wille, 2014).

Zelluläre Prion-Proteine (PrP^C) bestehen zu etwa 43 % aus alpha-Helices. Die erste Helix ist durch zwei antiparallele beta-sheets eingeschlossen. Daran schließen sich zwei weitere alpha-Helices an, die Proteinstruktur wird durch Disulfid-Brücken-Bindungen stabilisiert. Darüber hinaus ist es glykosyliert. Das pathogene PrP^{Sc} hat im Gegensatz zum PrP^C nur etwa 30% alpha-Helices, der Rest setzt sich vorwiegend aus beta-Faltblattstrukturen zusammen.

Wenn pathogene Prionen (PrP^{Sc}) mit den zellulären Prion-Proteinen in Berührung kommen, so führt das dazu, dass sich diese falsch falten. Die pathogenen Prionen „infizieren“ sozusagen die gesunden Proteine und verleiten sie dazu, sich ebenfalls falsch zu falten (Acevedo-Morantes und Wille, 2014; Ritchie und Ironside, 2017; Spagnolli *u. a.*, 2019). Es erfolgt eine Kettenreaktion. So entstehen immer mehr pathogene Prionen-Proteine, die die Konformation der gesunden ändern (Acevedo-Morantes und Wille, 2014; Ritchie und Ironside, 2017; Scheckel und Aguzzi, 2018; Wille und Requena, 2018).

Aktuell wird davon ausgegangen, dass die kleinste „infektiöse“ Einheit an pathogenen Prion-Proteinen aus zwei solcher Einheiten an PrP^{Sc} besteht. Diese reichen aus, damit sich ein Mensch oder ein Tier infiziert. Der Prozess lässt sich nicht durch nukleinsäure-zerstörende Substanzen aufhalten oder beeinflussen. Einen möglichen Einfluss darauf können unter Umständen PrP-Struktur auflösende Präparate haben, nämlich Anti-PrP-Antikörper.

Es ist bis heute noch nicht im Detail geklärt, wie eine „Infektion“ gesunder Proteine durch pathogene Prion-Proteine entsteht, also wie sich die gesunden Proteine durch den Kontakt mit den Prionen falsch falten können. Der genaue strukturelle Übergang von PrP^C in PrP^{Sc} ist im Detail noch nicht untersucht worden.

Die Aminosäuren-Homologien zwischen Mensch und Tier sind extrem hoch. Dies ist auch einer der Gründe, warum Prionen-Erkrankungen zwischen den unterschiedlichen Spezies übertragen werden können. PrP^C sind vor allem an den Synapsen der Neuronen im Zentralnervensystem lokalisiert (Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Scheckel und Aguzzi, 2018).

2.3.2 Natürliche Funktionen der Prionen

Bis jetzt konnte man dem zellulären Prion-Protein keine eindeutige Funktion zuweisen, aber es gibt verschiedene Hypothesen. Bei PrP „knock-out“ Mäusen (Prn-p^{0/0} Mäuse), welche kein funktionsfähiges Prion-Gen haben, wurden folgende Beobachtungen gemacht: Die Tiere haben einen abnormalen Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *u. a.*, 1996) und einen veränderten Geruchssinn (Le Pichon *u. a.*, 2009). Außerdem konnte auch eine Abweichung der neuronalen Reizweiterleitung festgestellt werden (Collinge *u. a.*, 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte es sein, dass das PrP^C eine neuronale Funktion hat (Premzl, 2004; Coitinho *u. a.*, 2007; Will und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Prionen können außerdem Kupfer binden (Acevedo-Morantes und Wille, 2014). Das zelluläre Prion spielt wohl eine Rolle beim Kupfertransport und der Senkung von überschüssigem Kupfer (Witold und Marcin, 2011).

2.3.3 Umfaltung von PrP^C zum pathogenen PrP^{Sc}

Wie bereits beschrieben kommt es im Zusammenhang mit der Entstehung der TSE zu einer Umfaltung des körpereigenen PrP^C zum pathogenen PrP^{Sc}. Für diesen Prozess existieren unterschiedliche Theorien. Prusiner beschreibt den TSE Erreger als einen unkonventionellen Erreger, weil das Prion selbst als infektiöses Agens gilt („proteinaceous infectious particle“; PrP^{Sc}) und es seine Sekundärstruktur dem zellulären, körpereigenen Prion-Protein (PrP^C) aufzwingt. Dadurch kommt es zu einer Amplifizierung (exponentielle Vermehrung) und Ausbreitung des pathogenen Prion-Proteins (PrP^{Sc}) (Prusiner, 1982).

Gleichzeitig wurde die „protein-only“ Hypothese von Prusiner aufgestellt. Er postulierte, dass es das zelluläre Prion-Protein PrP^C ist, das durch das pathogene PrP^{Sc} in eine Form umwandelt wird, die zur Erkrankung führt.

Die „protein-only“ Hypothese von Prusiner wurde durch die Versuche von Büeler und Kollegen bestätigt (Büeler *u. a.*, 1994). Hier wurden Untersuchungen an Prn-p Knockout-Mäusen (Prn-p^{0/0}) durchgeführt, die kein zelluläres Prion-Protein PrP^C exprimieren und aus diesem Grund auch nicht erkranken, wenn sie mit PrP^{Sc} infiziert werden. Durch die Wiederherstellung der Expression von PrP^C ändert sich dies, die Mäuse können durch PrP^{Sc}-Gabe erkranken. Durch diese Untersuchungen wurde gezeigt, dass zelluläres PrP^C für eine Prionenerkrankung vorhanden sein muss. Des Weiteren wurde auch nachgewiesen, dass der Mechanismus der TSE-Erreger in der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} liegt.

Aus der Hypothese von Prusiner können zwei Erklärungsmodelle abgeleitet werden:

- Das „Heterodimer-Modell“ (Prusiner *u. a.*, 1990) das durch Erweiterung zum „Template Associated Attachment-Modell“ wird.
- Das keiminduzierende PrP-Polymerisations-Modell von Jarrett und Lansbury (Jarrett und Lansbury, 1993; EFSA, 2019; Houston und Andréoletti, 2019; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Im „Heterodimer-Modell“ erfolgt die Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} in einem kinetisch kontrollierten Prozess. Durch die hohe Aktivierungsenergie findet eine spontane Umfaltung nur sehr selten statt. Die neu entstandenen Heterodimere werden möglicherweise über einen metastabilen Übergangszustand PrP^{*} stabilisiert. Durch die Erweiterung dieses Modells zum „Template Associated Attachment-Modell“ wird angenommen, dass die Stabilisierung durch die Bindung eines zellulären Faktors, dem sogenannten Faktor X erfolgt (Cohen und Prusiner, 1998; Spagnolli *u. a.*, 2019).

Bei dem zweiten Erklärungs-Modell, der keiminduzierenden PrP-Polymerisation wurde zunächst von einem Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} ausgegangen (Jarrett und Lansbury, 1993). Die thermodynamisch ungünstige Form des PrP^{Sc} wird durch die Bindung an einen Nukleationskeim stabilisiert. Diese Bindung und die dadurch entstandenen Keime (primäre Nukleation) kommen sehr selten und spontan vor. Wird jedoch extern PrP^{Sc} durch eine Infektion oder mittels spontaner Entstehung von PrP^{Sc} (z.B. bei fCJD) zugegeben, erfolgt durch die Anlagerung der PrP^{Sc} Monomere polymere PrP-Aggregate, die, wenn sie eine kritische Größe erreichen in neue Polymerisationskeime (sekundäre Nukleation) „zerbrechen“. Dies führt zu einer weiteren Umwandlung von PrP^C in die fehlgefaltete Variante PrP^{Sc} (Spagnolli *u. a.*, 2019).

Spagnolli und Kollegen untersuchten die Stabilität des Proteins mittels atomarer MD-Simulation (Molekulardynamik-Simulation). Sie simulierten die Konformationsänderung von PrP^C in PrP^{Sc}. Die Autoren fanden heraus, dass die Protofilamentenden bei der

Konformationsänderung eine maßgebliche Rolle spielen. Die Konformationsänderung von PrP^C in PrP^{Sc} führt über einen sogenannten „intermediate state“, der noch weiterer Forschungen bedarf (Spagnolli *u. a.*, 2019).

2.3.4 Eigenschaften und Inaktivierung von PrP^{Sc}

Die fehlgefalteten pathogenen Prionen sind deutlich schlechter in Wasser löslich als die zellulären Prion-Proteine. Dies liegt daran, dass die hydrophoben Anteile des Proteins nicht gegen das Innere der Struktur gerichtet sind, sondern gegen außen. Dadurch ist PrP^{Sc} nicht nur deutlich schlechter wasserlöslich; diese veränderte Struktur scheint auch eine entscheidende Rolle bei der Resistenz dieses Proteins gegen Desinfektionsmittel, Hitze und UV-Strahlung zu spielen.

Um das pathogene Prion zu zerstören, bedarf es vor allem feuchter Hitze von mehr als 131°C und auch dann wird das Protein erst nach mindestens zwei Stunden inaktiviert und zerstört. Bei trockener Hitze ist es deutlich schwieriger, das pathogene Prion zu zerstören. Hierbei bedarf es einer Temperatur von 200°C und einer Inkubation von mindestens einer Stunde, um das Protein zu deaktivieren. Darüber hinaus sind die pathogenen Prionen gegen Proteasen ebenfalls außergewöhnlich resistent (Acevedo-Morantes und Wille, 2014).

2.4 Diagnostik

Der Nachweis des Erregers von TSE kann post mortem durch eine pathohistologische Untersuchung sowie durch Erregernachweis erfolgen.

Am lebenden Tier und auch am Menschen gibt es zur Zeit noch keinen eindeutigen Nachweis (Braun, 1998; Will und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Gelpi, 2020). Anhand der typischen klinischen Symptome wie Ausfall der Leistung des ZNS, Auffälligkeit in Bewusstsein, Sensorik, Motorik und Verhalten kann auf eine Erkrankung mit Prionen geschlossen werden

Typische pathologische Veränderungen sind im histologischen Präparat zu sehen. Es zeigen sich Vakuolisierung, Amyloid-Ablagerungen und Gliosis (Thellung *u. a.*, 2000; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018). Die charakteristischen fibrillären Strukturen, die sogenannten Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF-Fasern) sind in diesen Akkumulationen nachweisbar (HOPE *u. a.*, 1988; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018).

Es gibt unterschiedliche Methoden, um eine Prionenerkrankung beim Menschen klinisch zu diagnostizieren. Dazu zählen beispielsweise (Meissner *u. a.*, 2009; Ritchie und Ironside, 2017; Zerr *u. a.*, 2018; Gelpi, 2020):

Liquor-Untersuchungen

Elektro-Enzephalogramm (EEG)

Magnetresonanztomografie (MRT)

Computertomografie (CT)

Gehirnbiopsie

prn-p-Genanalyse

Aufgrund der Anamnese und den präsentierten klinischen Symptomen wird bereits die erste Verdachtsdiagnose einer Prionen-Erkrankung gestellt. Patienten zeigen unterschiedliche typische Symptome wie Schlafstörungen (FFI), geistigen Abbau (CJD) oder Ataxien (GSS). Den Patienten werden im Rahmen der Untersuchung unterschiedliche einfache Fragen gestellt (Zerr *u. a.*, 2018; Gelpi, 2020):

Wo befinden wir uns?

In welchem Land sind wir?

Welcher Tag ist heute?

Wie spät ist es?

Vor allem wird in der Anamnese auch erfasst, ob der Patient eine Hornhaut- oder andere Organtransplantationen oder eine Transfusion mit Blut oder anderen Komponenten erhalten hat. Besteht die Verdachtsdiagnose einer Prionen-Erkrankung, so folgt daraufhin eine Untersuchung des Liquors. Diese unterstützt die Verdachtsdiagnose, denn im Liquor können die verdächtigen pathogenen Proteine nachgewiesen werden. Ebenso können eine Magnetresonanztomografie und eine Computertomografie erfolgen, um die pathologischen Hirnstrukturen darzustellen. Bei Verdacht auf eine familiäre Prionenerkrankung kommt ein Gentest zur Bestätigung des Verdachts und zur Sicherung der Diagnose zum Einsatz (Zerr *u. a.*, 2018).

Um eine TSE-Diagnose beim Tier zu verifizieren, wird post mortem aus einer bestimmten Region des Gehirns (der Medulla oblongata in Höhe des Obex) ein Stück entnommen. Der Nachweis erfolgt dann im Tierversuch oder immunohistologisch (Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018).

2.4.1 Tierversuch (Bioassay)

Der Tierversuch gilt als klassische Nachweismethode der Infektiosität des PrP^{Sc}. Hierfür wird dem Versuchstier (z.B. Maus oder Hamster) die zu untersuchende Probe intrazerebral inokuliert. Beim Auftreten erster klinischer Symptome wird das Versuchstier euthanasiert und das Gehirn entnommen, welches dann pathohistologisch auf charakteristische Ablagerungen oder mittels Western Blotting auf PrP^{Sc} untersucht wird. Bis heute ist der Tierversuch immer noch die „goldene“ Standardmethode zum Prionennachweis (Giles *u. a.*, 2017; Ritchie und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018).

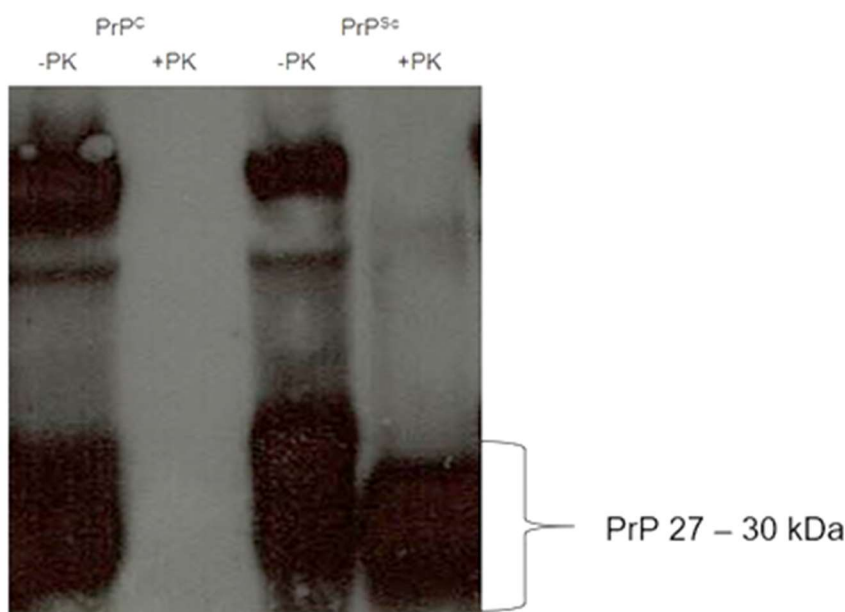
2.4.2 Western Blotting

Mittels Western Blotting kann ein Proteinase K-resistentes Fragment (PrP^{res}) des pathologischen Prion-Proteins (PrP^{Sc}) nachgewiesen werden. Es erfolgt über eine Antigen/Antikörper-Bindung (Ritchie und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018).

Dieses Verfahren findet auch in dem von der Firma Prionics entwickelten Schnelltest Prionics®-Check WESTERN Anwendung (siehe Thermo Fisher Scientific Prionics®-Check WESTERN Kit Gebrauchsinformation).

Bei der Auswertung des Hyperfilms wird geschaut (Abb. 3), ob eine Bande bei den Proben mit PK Verdau auf Höhe von 27 – 30 kDa sichtbar ist. Die Probe ist positiv, wenn auf dieser Höhe eine Bande sichtbar ist, da PrP^{Sc} resistent gegen den Abbau durch die Proteinase K ist.

Abbildung 3: Nachweis von zellulärem und pathologischem Prion-Protein im Western Blotting



-PK = ohne PK Verdau; + PK = mit PK Verdau

2.4.3 Zellbasierte Assays

Eine Alternative zum Tierversuch könnten zellbasierte Assays darstellen. Allerdings gibt es nur wenige Zellkulturmodelle für Prioninfektionen. Auch können nicht alle Prionstämme damit analysiert werden. Bereits Anfang der 80er Jahre konnten in den Arbeitsgruppen von Chesebro und Prusiner erste Infektionsversuche an Maus-Neuroblastoma (N2a) Zelllinien erfolgreich durchgeführt werden (Chesebro *u. a.*, 1985; Race, Fadness und Chesebro, 1987; Butler *u. a.*, 1988).

2.4.4 Protein-misfolding cyclic amplification (PMCA)

Soto und Kollegen beschrieben 2001 eine neue Methode zur zellfreien „Prionenvermehrung“, das so genannte Protein-misfolding cyclic amplification (PMCA Verfahren) (Saborio, Permanne und Soto, 2001).

Mit dieser neuen Methode lassen sich kleinste Mengen von PrP^{Sc} in Geweben des Zentralnervensystems z.B. bei Patienten vom vCJD nachweisen. Auch im Urin und im Blut der Patienten kann mit dieser Methode PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Die Sensitivität ist 4000 mal höher als im Bioassay (Saá, Castilla und Soto, 2006). Bis das Ergebnis bekannt wird dauert es 2-3 Wochen. Bei einem Bioassay liegt die Inkubationszeit dagegen je nach Prionenstamm bei 2-4 Monaten (Ritchie und Ironside, 2017).

In der typischen PMCA wird Hirnmaterial von gesunden Tieren als PrP^C-Quelle genutzt, welche von fehlgefaltetem, Proteinase K-resistentem Prion-Protein (PrP^{res}) umgeformt werden kann (Saborio, Permanne und Soto, 2001; Soto, Saborio und Anderes, 2002). Unter diesen Voraussetzungen kann PrP^{res} in einer solchen Konzentration amplifiziert werden, dass es im Immunoblot trotz kleinen Ausgangsmengen detektierbar ist (Ritchie und Ironside, 2017).

Im ersten Schritt wird PrP^{res} (aus Hirnmaterial von erkrankten Tieren) mit PrP^C im Verhältnis von 1:10 gemischt und bei 37°C (die Temperatur variiert je nach Prionenstamm von zwischen 35-37°C) inkubiert. In dieser Zeit entstehen PrP^{res}-Polymere. In einem zweiten Schritt werden diese durch das Beschallen mit Ultraschallwellen aufgebrochen, wodurch die Konzentration an einzelnen PrP^{res}-Molekülen steigt und so einen besseren Nachweis im Western Blotting zulässt (Ritchie und Ironside, 2017).

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der PMCA nach Soto und Kollegen modifiziert von Pritzkow (Soto, Saborio und Anderes, 2002; Pritzkow, 2011)

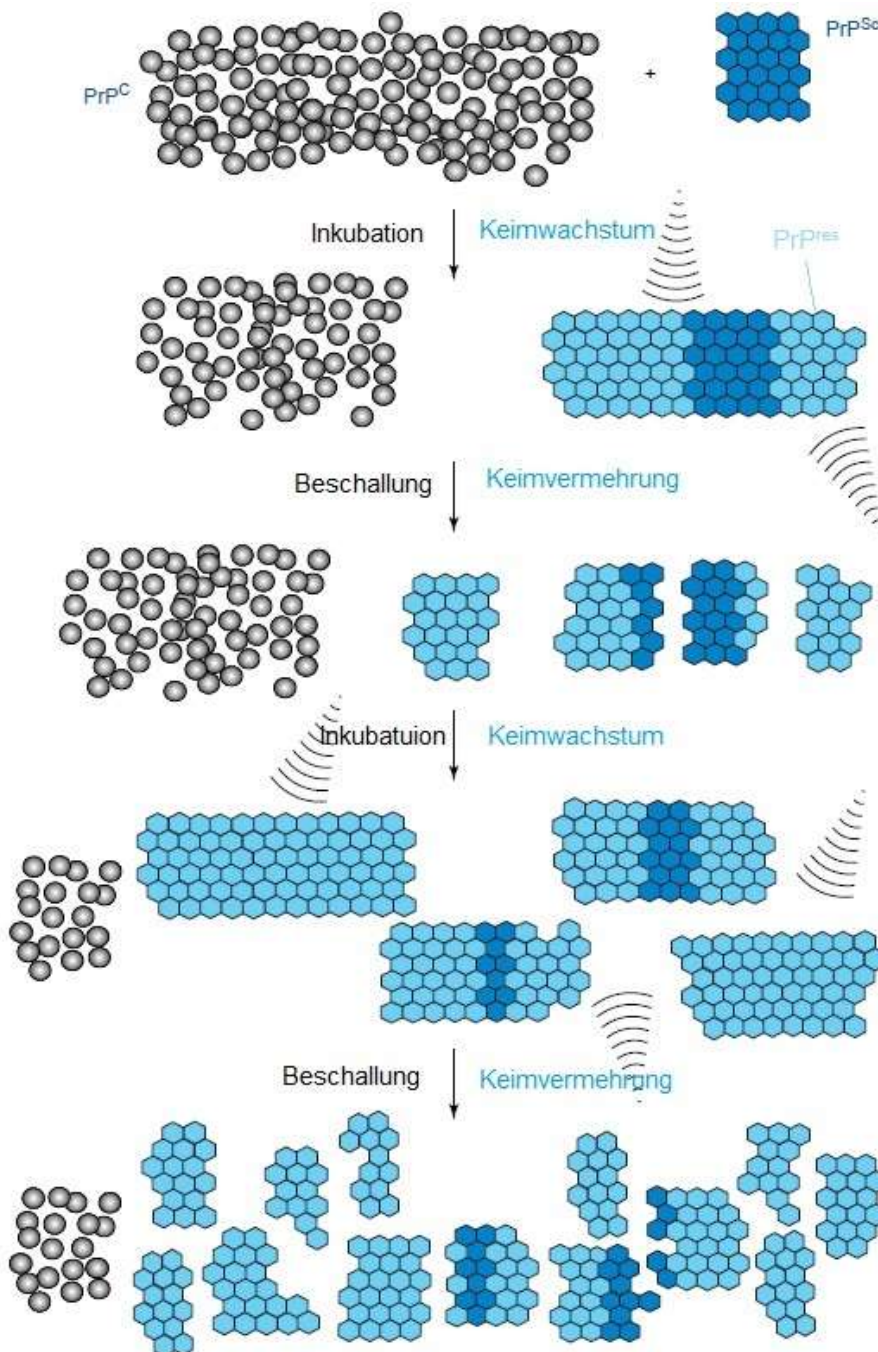


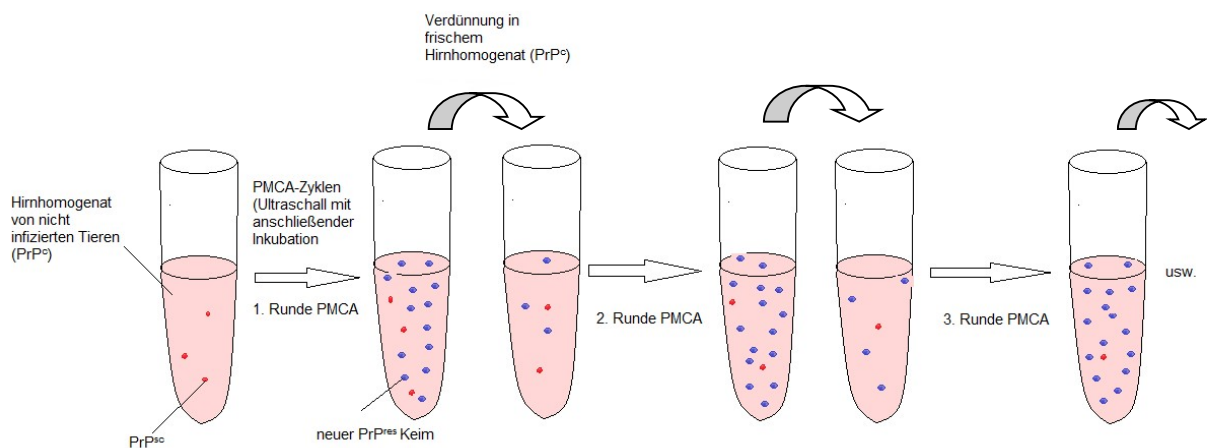
Abbildung nach © Pritzkow (2011)

PrP^{C} wird bei der PMCA in einem Überschuss zu PrP^{Sc} gegeben und einer zyklischen Abfolge von Inkubation- und Beschallungsschritten ausgesetzt. Während der Inkubationsphase erfolgt das Wachstum des PK-resistenten PrP -Aggregats durch die Anlagerung von strukturkonvertierten PrP^{C} -Molekülen. Es folgt eine Ultraschallphase, wodurch die Aggregate fragmentiert werden. Hierdurch werden neue Amplifikationskeime freigesetzt. Dieses Prinzip wiederholt sich mehrfach.

In den vergangenen Jahren wurde die PMCA zu einer seriellen PMCA weiterentwickelt (wie in Abb. 5 gezeigt).

Mit Hilfe der seriellen PMCA kann das Ursprungsmaterial so stark vorverdünnt werden, dass das PK-resistente Prion-Protein im Western Blotting vollständig aus neu gebildetem PrP^{res} besteht. Dadurch ist eine zellfreie autokatalytische *in vitro*-Vermehrung von PrP^{res} möglich (Bieschke *u. a.*, 2004; Ritchie und Ironside, 2017).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der seriellen PMCA (Bieschke *u. a.*, 2004; Caughey *u. a.*, 2009)



Ein Aliquot wird nach der 1. Runde PMCA, welche aus mehreren Zyklen von Beschallungs- und Inkubationsphasen besteht mit frischem Hirnhomogenat nicht infizierter Tiere verdünnt und im Anschluss weiteren PMCA-Zyklen unterzogen.

Mittlerweile konnte tierexperimentell nachgewiesen werden, dass das mit der PMCA generierte PrP^{res} im Empfängertier eine TSE-Erkrankung auslöst (Castilla *u. a.*, 2005; Weber *u. a.*, 2006).

Prinzipiell lässt sich mit Hilfe der seriellen PMCA die Keimaktivität (engl.: seeding activity) von TSE-Erregern mit einer Sensitivität nachweisen, die mit einer 10-fach geringeren Menge von PrP^{Sc} auskommt und damit der Erregertitration im Tierversuch um mehrere Größenordnungen überlegen ist (Bieschke *u. a.*, 2004; Soto *u. a.*, 2005; Weber *u. a.*, 2006; Ritchie und Ironside, 2017).

2.5 Therapie und Prävention

Eine Heilung bei Prionenerkrankungen gibt es bis heute nicht. Prionenerkrankungen verlaufen zu 100 % tödlich. Es können nur die Symptome etwas gelindert und die Lebensqualität bis zum Tod verbessert werden (Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Scheckel und Aguzzi, 2018; Zerr *u. a.*, 2018; Gelpi, 2020).

Die Therapie bei Prionenerkrankungen beim Menschen ist nur palliativ. Da solche Erkrankungen mit Depressionen und anderen psychiatrischen Symptomen einhergehen, können die Symptome mit Antidepressiva und anderen Psychopharmaka (z.B. Antipsychotika) gelindert werden. Menschen, die an CJD erkrankt sind, leiden außerdem auch an Halluzinationen und innerer Unruhe, Angstzuständen sowie Reizbarkeit. In solchen Fällen geben Ärzte Antipsychotika (Zerr *u. a.*, 2018).

Patienten, die an der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder anderen Prionenerkrankungen leiden, haben häufig Myoklonien, Muskelversteifungen, epileptische Anfälle und fehlende Muskelkoordination. Gegen solche Symptome werden den Patienten häufig Anti-Epileptika verschrieben: Carbamazepin, Valproat, Topiramat oder Lamotrigin. Auch Clonazepam kann gegen epileptische Anfälle zum Einsatz kommen (Zerr *u. a.*, 2018).

An Prionen erkrankte Tiere werden hingegen euthanasiert (Ritchie und Ironside, 2017; Greenlee, 2019; Zetterberg *u. a.*, 2019).

2.6 Inaktivierung und chemische Desinfektion von pathogenen Prionen (PrP^{Sc})

Prionen sind außerordentlich resistent (Ritchie und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018). Bei den Desinfektionsverfahren sind Präparate mit Aldehyden kontraindiziert. Aldehyde führen sogar noch zu einer weiteren Stabilisierung der Prionen-Proteine. Prionen sind außergewöhnlich resistent gegenüber chemischen Desinfektions- und Dekontaminationsmitteln. Allgemein haben alkoholhaltige Mittel einen fixierenden und stabilisierenden Effekt auf die fehlgefalteten Proteine. Der Einsatz bestimmter alkoholhaltiger Mittel bei Prionen kann sogar dazu führen, dass das Desinfektionsmittel deaktiviert wird (Ritchie und Ironside, 2017).

Bei Prionen lässt sich meist nur die Infektiosität senken. Eine komplette Inaktivierung wird meist nicht erreicht (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Giles *u. a.*, 2017). Nur durch Oxidationsmittel, (z.B. Natriumhypochlorit) oder auch durch starke Alkalien (z.B. Natronlauge) könnte eine Inaktivierung erreicht werden. Diese Chemikalien greifen aber oft auch das zu desinfizierende Material an. Eine außergewöhnliche Resistenz von Prionen-Proteinen

gegenüber Hitze ist seit langem bekannt. Sie wird der höchsten Hitzeresistenzstufe VI (Inaktivierung mit gespanntem Dampf 134°C, 20 min für Prionen und hochresistente Sporen von Fadenagar) zugeordnet (Wallhäuser, 1988; Ritchie und Ironside, 2017).

Bei der Inaktivierung mit Hitze spielt nicht nur die Temperatur eine Rolle, sondern auch z.B. die Feuchtigkeit. Trockene Materialien lassen sich nur langsam dekontaminieren. Feuchte oder im Dampf sterilisierte Materialien werden hingegen schneller inaktiviert. Auch der pH-Wert spielt eine Rolle. In stark alkalischem Milieu geht die Dekontamination schneller vonstatten als im neutralen Milieu (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Giles *u. a.*, 2017).

Prionen stellen die resistentesten Infektionserreger für Mensch und Tier dar. Es wurde schon gezeigt, dass die üblicherweise im Labor oder in der Industrie gebräuchlichen chemischen und physikalischen Desinfektionsmittel gegen Prionen nichts ausrichten können, bzw. diese nicht inaktivieren können. Prionen sind gegen sie resistent (Ritchie und Ironside, 2017; Aguzzi, Lakkaraju und Frontzek, 2018; Zerr *u. a.*, 2018).

Darüber hinaus hat sich auch gezeigt, dass Prionen gegenüber dem Kochen resistent sind. Bei Fleisch bedeutet dies, dass auch gut gekochtes oder gut durchgebratenes Fleisch infektiös sein kann. Das Kochen selbst geschieht ja meist bei Temperaturen um die 100 °C und für eine kurze Zeit wie 10 Minuten oder 15 Minuten, manche Fleischstücke werden sogar nur für einige Minuten angebraten. Auch das konventionelle Autoklavieren bei rund 120°C für eine oder zwei Stunden reicht nicht aus, um Prionen zu deaktivieren. Trockene Hitze wirkt gegen Prionen erst ab 300°C. Um Prionen zu zerstören, bedarf es sehr aggressiver Maßnahmen wie Säuren, Laugen und dem Autoklavieren bei 130°C über mehrere Stunden bei erhöhtem Druck von mehr als 3 bar. Am besten wählt man eine Kombination aus diesen Verfahren (Ritchie und Ironside, 2017).

Die Validierung des Inaktivierungsverfahrens ist auf Grund der beschriebenen Eigenschaften des speziellen Agens und der Quelle des zu inaktivierenden Materials sehr komplex.

2.7 Bedeutung von Recyclingprozessen für biogene Rest- und Abfallstoffe

Es ist von großer Bedeutung die anfallenden biogenen Rest- und Abfallstoffe zu recyceln, da die Energie- und Stoffressourcen auf der Welt endlich sind. Erneuerbare Energie aus Wasser, Wind, Sonne und biogenen Rest- und Abfallstoffen gewinnen immer mehr an Bedeutung für die Energiewende. Was zunächst als Abfallprodukt erscheint, ist ein wertvoller Rohstoff, der auch energetisch genutzt werden kann.

Ca. 50% der Bioenergie wird aus biogenen Rest- und Abfallstoffen (forstwirtschaftliche Nebenprodukte, landwirtschaftliche Nebenprodukte, Siedlungsabfälle und industrielle Reststoffe)

gewonnen; hierzu kann auch das spezifische Risikomaterial zu einem geringen Prozentsatz (1 - 2%) gezählt werden, welches bei der Schlachtung anfällt. Dieses Material (Schlachthofabfälle) kann potentiell Prionen enthalten und muss daher auf Grund der Rechtsvorgaben verbrannt werden. Hierbei werden das enthaltene Phosphor und auch tierische Eiweiße vernichtet. Diese sind jedoch sehr wertvoll, da sie als Dünger, Phosphor- und Aminosäurequelle in den Energiekreislauf zurückgeführt werden könnten. Der Rest setzt sich zu 25% aus Energiepflanzen und 25% Energieholz zusammen. Im weitesten Sinne kann hier ein Beitrag zum Klimaschutz erbracht werden, da Rest- und Abfallstoffe genutzt werden (Quelle: Internetauftritt Agentur für erneuerbare Energie aufgerufen am 22.05.2021).

Recycling lohnt sich, aber es besteht ein epidemiologisches Risiko, das gemanagt werden muss. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Kosten- Nutzenverhältnis gewahrt bleibt.

2.8 Gesetzliche Grundlagen

Das Gesetz zur Beseitigung von tierischen Nebenprodukten (TierNebG / BGBl. I S. 82) dient zur Durchführung der VERORDNUNG (EG) Nr. 1069/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte.

Hier werden tierseuchen- und hygienerechtliche Bedingungen für die Abholung und Sammlung, Beförderung, Lagerung, Behandlung, Verarbeitung und Verwendung oder Beseitigung tierischer Nebenprodukte sowie für das In-Verkehr-Bringen, die Ein-, Durch- und Ausfuhr festgelegt.

Zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG hat die Europäische Kommission die Verordnung (EU) Nr. 142/2011 erlassen.

In dieser Verordnung wird das Material in drei Kategorien unterteilt, welches in Tierkörperbeseitigungsanlagen gebracht wird. Unter Kategorie 1 fällt alles Material mit TSE Risiko (nach Artikel 4 (1)). Hierunter fallen alle Körperteile von TSE verdächtigen Tieren (im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 999/2001), von Tieren bei denen eine TSE Erkrankung amtlich festgestellt wurde, sowie von Tieren, die bei einem TSE-Tilgungsprogramm getötet wurden oder spezifisches Risikomaterial (nach Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 999/2001).

Zu Kategorie 2 zählen Schlachttiere oder -Teile, welche nicht lebensmitteltauglich sind oder Anzeichen für auf Mensch oder Tier übertragbare Krankheiten (Abszesse, Entzündungen) oder die Fremdkörper enthalten.

In Kategorie 3 gehört Fleisch, das nicht zur Verwendung als Lebensmittel bestimmt ist, wie Fehlprodukte, Retouren, Hörner, Unterkiefer, Schlachtkörper ohne Anzeichen für übertragbare Krankheiten.

In der Verordnung 142/2011 werden Standardverarbeitungsmethoden beschrieben (Tab. 2)

Tabelle 2: Standardverarbeitungsmethoden nach Verordnung 142/2011 (ANHANG IV, Kapitel III)

Verarbeitungsmethode	Verarbeitung
Methode 1 (Drucksterilisation)	<ul style="list-style-type: none"> • Zerkleinerung in 50 mm große Stücke • Kerntemperatur von 133°C für 20 min • „gesättigter Dampf“ • ≥ 3 bar
Methode 2	<ul style="list-style-type: none"> • Zerkleinern in 150 mm große Stücke • Kerntemperatur von mindestens 100°C für 125 min • 110°C für 120 min • 120°C für 50 min
Methode 3	<ul style="list-style-type: none"> • Zerkleinern in 30 mm große Stücke • Kerntemperatur von mindestens 100°C für 95 min • 110°C für 55 min • 120°C für 13 min
Methode 4	<ul style="list-style-type: none"> • Zerkleinern in 30 mm große Stücke • Erhitzung in einem Kessel unter Zugabe von Fett • Kerntemperatur von mindestens 100°C für 16 min • 110°C für 13 min • 120°C für 8 min • 130°C 3 min
Methode 5	<ul style="list-style-type: none"> • Zerkleinern in 20 mm große Stücke • Erhitzung bis das Material koaguliert • Fett und Wasser austreiben • Kerntemperatur von mindestens 80°C für 120 min • 100°C für 60 min
Methode 6 (nur für tierische Nebenprodukte der Kategorie 3, die von Wassertieren oder wirbellosen Wasserlebewesen stammen)	<ul style="list-style-type: none"> • a) 50 mm bei Hitzebehandlung • b) 30 mm bei Hitzebehandlung • Mischen mit Ameisensäure bis zu einem pH-Wert 4,0 oder niedriger, Lagerung von min 24 h • a) eine Kerntemperatur von mindestens 90 °C, die mindestens 60 min • b) eine Kerntemperatur von mindestens 70 °C, die mindestens 60 min

2.9 Bedeutung der Hygiene im TSE Fall

Unter Hygiene versteht man Maßnahmen um die Gesundheit zu erhalten und die Ausbreitung von Erkrankungen zu verhindern. Im Fall der BSE führte das Herabsetzen der Temperatur in den Tierkörperbeseitigungsanstalten in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts dazu, dass in England die BSE-Krise ausgebrochen ist. Durch erhöhten Fleischkonsum der Bevölkerung fielen immer größere Mengen an tierischen Abfällen an. In den Jahren von 1971 bis 1984 wurde in England in den meisten Tiermehl-produzierenden Betrieben das Verfahren umgestellt. Man hat auf Lösungsmittel zur Fettextraktion verzichtet, die Temperatur wurde von 120°C auf nur noch 80-90°C gesenkt und die Verweildauer verkürzt. Das Zusammentreffen dieser ungünstigen Faktoren führte zu einem Teufelskreis. Es musste in kürzerer Zeit mehr Tierfutter (Tiermehl) produziert werden, um den gestiegenen Fleischkonsum und die damit verbundene höhere Anzahl an Tieren zu füttern (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001). Die notwendigen Hygienemaßnahmen wurden nicht eingehalten bzw. waren nicht ausreichend. Zu diesem Zeitpunkt war das Ausmaß der Folgen noch unbekannt.

In England sind große Schafherden schon immer mit Scrapie belastet. Die Schlachttierabfälle von Schafen, wurden wie oben berichtet zu Tiermehl und weiter in der Mischfutterherstellung verarbeitet. Kontaminiertes und nicht adäquat inaktiviertes Tierfutter löste bei der Rinderpopulation, die dieses Futter erhielt die BSE-Krise aus.

Um eine Ausbreitung der BSE-Epidemie zu stoppen wurde als Hygienemaßnahme ein Fütterungsverbot von Tiermehl an Wiederkäuer erlassen.

2.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur sicheren Inaktivierung von Risikomaterial (Kategorie 1) zu finden, welches heute ausschließlich in der Tierkörperbeseitigung verbrannt und entsorgt wird. Da von Kategorie 1 Material ein potentielles TSE-Risiko ausgeht, muss hier eine sichere Inaktivierung stattfinden. Prionen haben eine hohe Resistenz gegenüber gebräuchlichen Inaktivierungsmethoden. Das Verbrennen des Materials ist eine sichere Methode, weil damit eine Übertragung der Infektion ausgeschlossen wird.

Es entstehen jedoch hierbei Emissionen und zusätzliche Kosten. Dieses Material enthält wertvolle Nährstoffe, wie Phosphor und tierische Eiweiße. Eine weitere Nutzung dieses Materials, als Düngemittel und auch als Proteinquelle ist nur dann wertvoll, wenn davon kein epidemiologisches Risiko ausgeht.

In der heutigen Zeit, in der die Ressourcen knapp werden, des Klimawandels und der Notwendigkeit über erneuerbare Energiequellen nachzudenken, ist es unbedingt erforderlich, auch diese Mengen an biogenen Reststoffen einer Nutzung zuzuführen.

In dieser Arbeit sollten verschiedene Prionen-Stämme mit Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen behandelt werden. Es sollten verschiedene Verweildauern und Temperaturen getestet werden, um eine sicherere Inaktivierung im Sinne der Desinfektion zu erreichen.

Ein weiterer Punkt in der vorliegenden Arbeit war es, die Methode der PMCA im Labor zu etablieren. Mithilfe dieser Amplifikationsmethode kann die Nachweisgrenze der Prionen im Ausgangsmaterial im Western Blotting erhöht werden. Durch eine Kombination von PMCA und Immunoblotting kann der Nachweis erbracht werden, ob eine Inaktivierungsmethode die für eine Desinfektion geforderte 4-5 Log₁₀-Stufen-Reduktion erreichen kann. Das ist sonst nur über einen Bioassay möglich. Die PMCA erweist sich als wertvolle Alternative zum Bioassay.

Da in den letzten Jahren das Tierwohl für die meisten Menschen von großer Bedeutung ist und Tierversuche auf ein sinnvolles und nötiges Maß minimiert werden sollten, ist diese Vorgehensweise im Sinne der Suche nach geeigneten Alternativen wichtig.

3 Material

3.1 Material und Versuchstiere

3.1.1 Gewebeproben und Material aus der Tierkörperbeseitigung

Alle verwendeten Gewebeproben und das Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Gewebeproben und Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage

Material	Spezies	Herkunft
Gehirngewebe ¹	Weißwedelhirsch, (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Dr. Edward A. Hoover, Colorado State University
Gehirngewebe infiziert mit Scrapie 263 K ²	Syrischer Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	FLI Tübingen
Gehirngewebe infiziert mit BSE 301 V ³	Maus (<i>Mus Musculus</i>) VM/DK (Genotyp <i>Sinc^{p7p7}</i>)	Roslin Institut Edinburgh
Gehirngewebe infiziert mit nativem BSE ⁴	Rind (<i>Bovidae</i>)	FLI Riems
Gehirngewebe infiziert mit CWD ¹	Weißwedelhirsch, (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Dr. Edward A. Hoover, Colorado State University
Kategorie 1 Material (aus der Tierkörperbeseitigungsanlage) ⁵		TBA Warthausen
Kategorie 2 Material (aus der Tierkörperbeseitigungsanlage) ⁶		Ztn Neckar-Franken

¹ Das Gehirngewebe von einem CWD-Hirsch und negatives Hirschgehirn wurde freundlicherweise von Dr. Edward A. Hoover, Colorado State University zur Verfügung gestellt.

² Das Scrapie 263 K Gehirngewebe stammt aus einem vorangegangenen Projekt (Thermodruckhydrolyse von Prion-Proteinen in tierischen Reststoffen, lebensmitteltauglichen Darm, Blut und Tiermehl, Az.: 24-729.59/182 TSE Forschungsprogramm des Landes Baden-Württemberg)

³ Vom Roslin Institut in Edinburgh wurden über John Spiropoulos 5 mit dem an Mäuse adaptiertem BSE 301 V infizierten Mäusenhirne bestellt, welche für Vorversuche und für die Vermehrung (im FLI Tübingen) benutzt wurde.

⁴ Die Probe des nativen BSE Rind wurde freundlicherweise von Prof. Groschup, FLI Riems zur Verfügung gestellt.

⁵ Kategorie 1 Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage wurde von der TBA Warthausen (AZ: 9181.20, Herr Dr. Sporleder) zur Verfügung gestellt.

⁶ Kategorie 2 Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage wurde von der Ztn Neckar-Franken (Herr Winzig-Heilig) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Laborgeräte

Alle verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresesystem <ul style="list-style-type: none"> • Mini Protean III™ 	Bio Rad Laboratories GmbH (München, D)
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen (Hannover, D)
Bioimagingssystem	Herolab GmbH Laborgeräte (Wiesloch, D)
Horizontalschüttler <ul style="list-style-type: none"> • Unimax 1010 	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Mikrowellenanlage <ul style="list-style-type: none"> • MLS Mega 1200 	MLS GmbH (Leutkirch, D)
pH-Meter <ul style="list-style-type: none"> • pH Meter pH 526 MultiCal® 	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim, D)
Pipetten <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 100, 200, 1000 µl 	Eppendorf AG (Hamburg, D) Gilson Inc. (Middleton, USA)
Power Supply <ul style="list-style-type: none"> • Power source 	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Ribolyser <ul style="list-style-type: none"> • FastPrep 	Bio Rad Laboratories GmbH (München, D)
Schlauchpumpe <ul style="list-style-type: none"> • Pumpdrive 5001 	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Sicherheitswerkbank Klasse II <ul style="list-style-type: none"> • Herasafe KS12 • Lamina Flow Sicherheitskabine 	Thermo Scientific (Langenselbold, D) TSDK Luft- & Reinraumtechnik (Genkingen, D)
Thermoblock	Steute GmbH, (Löhne, D)
Thermomix comfort	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Ultraschallprozessor <ul style="list-style-type: none"> • Sonicator Q700 mit PMCA Aufsatz 	Qsonica LLC. (Newtown, USA)
Ultra-Turrax® Tube Driver	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)

Vortexgerät <ul style="list-style-type: none"> • Reax Top • Model VF2 	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D) Janke & Kunkel (Freiburg, D)
Waagen <ul style="list-style-type: none"> • Kern 572 • Feinwaage • U360 	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern, D) Satorius research AG (Göttingen, D) Satorius universal AG (Göttingen, D)
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> • Heraeus pico 17 • Mini Zentrifuge 	Thermo Scientific (Langenselbold, D) Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Wasserbad: <ul style="list-style-type: none"> • Köttermann • Memmert 	Köttermann GmbH (Uetze, D) Memmert GmbH + Co. KG (<i>Schwalbach, D</i>)
Glaswaren <ul style="list-style-type: none"> • Pipetten 1, 5, 10, 25 ml 	HBG Henneberg-Sander GmbH (Giessen, D)
Glaswaren	Schott AG (Mainz, D)

3.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tab. 5 aufgeführt und entsprechen dem Reinheitsgrad „pro analysi“, außer es wurde anders beschrieben. Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser der Firma VWR angesetzt.

Tabelle 5: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, D)
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, USA)
Ameisensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Bio-Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell, D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Dehydrol 980 (T5)	Cognis Deutschland GmbH und Co. KG (Düsseldorf, D)
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (Ethylendiaminetraessigsäure) 	Promega GmbH (Mannheim, D)

Entwickler-Lösung • Tetenal-Roentogen	Tetenal-Photowerk (Norderstedt, D)
Ethanol absolut	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Fixierlösung • Tetenal Superfix	Tetenal-Photowerk (Norderstedt, D)
Glycin	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS ultra pur)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Roti [®] - Load 1, reduzierend, 4x konz.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Sodium chlorid-solution 5M	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Triton X-100	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Tween 20 [®]	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz (Californien, USA)
1-Butanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)

3.1.4 Antikörper, Enzyme, Kits und Proteingewichtsstandards

Alle verwendeten Antikörper, Enzyme, Kits und Marker sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Antikörper, Enzyme, Kits und Marker

Bezeichnung	Hersteller
Antikörper <ul style="list-style-type: none"> • Goat Anti-Mouse IgG-HRP • POM1 • 3F4 • W226 	Santa Cruz Biotechnology (Californien, USA) Friedrich-Löffler-Institut (Tübingen, D) Merck KGaA (Darmstadt, D) Friedrich-Löffler-Institut (Tübingen, D)
Enzyme <ul style="list-style-type: none"> • Proteinase K 	Qiagen (Hilden, D)
Complete Tablets <ul style="list-style-type: none"> • Mini EASYpack proteinase inhibitor 	Roche (Mannheim, D)
Kit: <ul style="list-style-type: none"> • Western Blotting Luminol Reagent 	Santa Cruz Biotechnology (Californien, USA)
Marker <ul style="list-style-type: none"> • ECL Marker • peqGOLD Protein-Marker IV (Prestained) • peqGOLD Protein-Marker V (Prestained) 	Santa Cruz Biotechnology (Californien, USA) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)

3.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen sind in Tab. 7 aufgeführt und wurden mit deionisiertem Wasser der Firma VWR angesetzt.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Bestandteile
Ameisensäure	1% (w/w) in Aqua dest.
Block-Puffer (Western Blot)	5% (w/w) Magermilchpulver in TBST
BSA	10% in Aqua dest.
Dehydrol 980 (T5)	75% Dehydrol 980 in aqua dest.
L-Sarcosin	10% in PBSa
NaPTA Lösung	4% Phosphorwolframsäure 170 mM MgCl ₂ pH 7,4

PBS	135 mM NaCl 2,5 mM KCl 6 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ +6H ₂ O pH 7,4
PBSa (ohne Ca und Mg)	135 mM NaCl 2,5 mM KCl 6 mM Na ₂ HPO ₄ +2H ₂ O 1 mM KH ₂ PO ₄
PK-Lösung	1:25 in 10 mM Tris/HCl
PK-2x-Puffer	20 mM Tris/HCl 1% SDS 2 mM CaCl ₂
PMCA Puffer	48ml PBS 5 M NaCl 1,5ml Triton X 100 0,5 ml 1 Tablette Proteinase Inhibitor
Primäre Antikörper 3F4 POM1	1:5000 in Block-Lösung 1:5000 in Block-Lösung
Sekundär Antikörper	1:1400 in Block-Lösung
TBS	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,4
TBS-Tween (TBST)	0,05% Tween20 in TBS

3.1.6 Versuchstiere

In der Tab. 8 werden alle verwendeten Versuchstiere aufgeführt

Tabelle 8: Versuchstiere

Versuchstiere	Spezies	Herkunft
Mäuse (VM/DK) ¹	VM/DK Genotyp Sinc ^{p7p7}	FLI Riems
Syrischer Goldhamster	Mesocricetus auratus	Janvier Labs, Frankreich

¹ 5 Zuchtpaare VM/DK Mäuse vom FLI Riems zur Verfügung gestellt.

Die Züchtung der Mäuse erfolgte in der Kleintierzucht des Friedrich-Loeffler-Instituts, Institut für Immunologie, Tübingen.

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Alle eingesetzten Verbrauchsmaterialien werden in Tab. 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Einmal Injektions-Kanüle	Braun (Melsungen, D)
Einmalspritze 10 ml	Braun (Melsungen, D)
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> • 20µl mit Filter • 200µl mit Filter • 1000 µl mit Filter 	Biozym Trading GmbH (Wien, Ö) Biozym Trading GmbH (Wien, Ö) Biozym Trading GmbH (Wien, Ö)
Reaktionsgefäße <ul style="list-style-type: none"> • PCR SoftTubes 0,2ml mit gewölbtem Deckel • 1,5 ml • 15 ml • 50 ml 	Biozym Trading GmbH (Wien, Ö) NeoLab (Leonberg, D) Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen, D) Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen, D)
Röntgenfilm <ul style="list-style-type: none"> • Amersham Hyperfilm™ ECL 	GE Healthcare Limited (Buckinghamshire, UK)
Transfermaterial <ul style="list-style-type: none"> • Filterpapier • PVDF-Transfermembran (0,45µm) • Nitrocellulosemembran Protran BA85 	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D) Merck KGaA, (Darmstadt, D) Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Zirconia/Silica 1mm	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)

4 Methoden

4.1 Tierexperimentelle Methoden

Die Durchführung der tierexperimentellen Versuche und die Arbeiten zur Entnahme von Materialien aus Tieren erfolgten auf der Grundlage eines genehmigten Tierversuches (Genehmigung am 11.07.2011) bzw. registrierter Tötungsanzeigen (Versuchsnummer: T 108/13 Thy).

4.2 Herstellung der Hirnhomogenate

Hamsterhirnhomogenat (HHH)

Die infizierten Gehirne von syrischen Goldhamstern stammten aus dem vorangegangenen Projekt „Thermodruckhydrolyse von Prion-Proteinen in tierischen Reststoffen, lebensmitteltauglichen Darm, Blut und Tiermehl“. Diese Gehirne wurden 1:10 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und im Ribolyser (FastPrep FP120 CellDisrupter in Lysing Matrix D Tubes) homogenisiert.

Mäusehirnhomogenat (MHH)

Es wurden 5 Mäusehirne, welche mit dem BSE 301 V infiziert waren über das Roslin Institut (Edinburgh) bestellt. Diese wurden 1:10 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und im ULTRA-TURRAX® Tube Drive mit Glasperlen homogenisiert.

Hirschhirnhomogenat (HiHH)

Vom Hoover Institut (Colorado State University) wurde ein mit CWD infiziertes Hirschhirn (Weißwedelhirsch, *Odocoileus virginianus*) zur Verfügung gestellt. Das Hirschhirn wurde 1:10 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und in dem ULTRA-TURRAX® Tube Drive mit Glasperlen homogenisiert.

Rinderhirnhomogenat (RHH)

Vom FLI aus Riems wurde mit dem BSE-Stamm infiziertes Rinderhirnhomogenat (1:2 verdünnt in Sucrose) zur Verfügung gestellt. Dieses Rinderhirnhomogenat wurde noch einmal 1:10 in PBS verdünnt und aliquotiert.

Alle verdünnten Hirnhomogenate wurde in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit PBS verdünnt und im Anschluss mittels Western Blotting auf das Vorhandensein von PrP^{res}

untersucht. Die so gewonnenen Hirnhomogenat-Chargen wurden für die folgenden Versuche genutzt.

4.3 Vermehrung des an Mäuse adaptierten BSE 301 V

Für die Vermehrung des an Mäuse adaptierten BSE 301 V wurden VM/DK (Genotyp *Sinc^{p7p7}*) Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in der Tierhaltung des FLI Tübingen gezüchtet. Bei Beginn des Versuchs waren alle Versuchstiere 8 Wochen (+/- 5 Tage) alt. 20 Mäuse wurden mit einem 1%igen (w/v) Hirnhomogenat des BSE 301 V Stamms und 20 Mäuse mit einem 10%igen (w/v) Hirnhomogenat des BSE 301 V intracerebral inokuliert (i.c.). Beim Auftreten erster klinisch manifester neurologischer Ausfallerscheinungen wurden die Mäuse getötet und das Gehirn für die weiteren Analysen entnommen.

4.4 Mäusezüchtung der VM/DK (Genotyp *Sinc^{p7p7}*) Mäuse

Die Mäuse-Linie wurde in der Tierzüchtung des FLI Tübingen gezüchtet. Sobald der Nachwuchs geschlechtsreif war, wurden die Mäuse nach Geschlecht getrennt.

4.5 Beschaffung des Fleischbreis der Kategorie 1 und 2

Für die Untersuchungen in der Mikrowellenanlage wurde Fleischbrei Kategorie 1 von der Tierkörperbeseitigungsanlage (TBA) in Warthausen (AZ: 9181.20, Herr Dr. Sporleder) und der Kategorie 2 von der TBA Ztn NECKAR-FRANKEN (Herr Winzig-Heilig) zur Verfügung gestellt. Das Material wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

4.5.1 Vorbereitung für die Versuche in der Mikrowellenanlage

Um beide Arten von Fleischbrei der Kategorie 1 und 2 auf das gleiche Feuchtigkeitsniveau zu bringen und somit für den Versuch gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde die Restfeuchtigkeit ermittelt. Es wurde Wasser zugemischt, da das Material der Kategorie 1 trockener war, als das der Kategorie 2. Dafür wurden 3,57 g des Kategorie 1 Fleischbrei mit 5,43 g Wasser gemischt.

Da aus einem vorangegangenen Projekt schon Erfahrungen für die Re-Isolierung von PrP^{res} aus Schlachtabfällen (Thermodruckhydrolyse von Prion-Proteinen in tierischen Reststoffen, lebensmitteltauglichen Darm, Blut und Tiermehl) vorliegt, wurde ein Verdünnungsansatz von 1:10 des Hirnhomogenats in Fleischbrei hergestellt. Hierfür wurden 9 Teile Fleischbrei der Kategorie 1 oder 2 mit einem Teil des jeweiligen Hirnhomogenats gemischt.

4.6 Quantifizierung der Hirnhomogenate

Zur Quantifizierung der Hirnhomogenate wurden 40 µl Hirnhomogenat mit 360 µl PBS gemischt. Von dieser 1:10 Verdünnung wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:100 000 000 (bei Scrapie 263 K und BSE 301 V) bzw. 1: 100 000 (bei CWD und BSE) weiter verdünnt. Die Re-Isolierung von PrP^{Sc} aus den Proben wurde im Anschluss mit dem Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll durchgeführt, wie in den folgenden Schritten beschrieben:

1. Zu 400 µl Probe wurde 100 µl T5 (Dehydrol 980) zugegeben und für weitere 10 min bei 21°C auf dem Thermomixer gemischt.
2. Es folgte ein Zentrifugationsschritt, bei 1000 x g für 5 min, danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
3. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden gewogen und dann mit L-Sarcosin gemischt (pro 10 µg Probe 0,6 µl L-Sarcosin). Die Proben wurden dann für 30 min bei 21°C und 1000 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt. Es folgte eine 2. Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min.
4. Danach wurde nur noch mit den Überständen weitergearbeitet. Hierfür wurde der Überstand von Pellet und der Überstand der jeweiligen Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 µl BSA pro Ansatz hinzugefügt. Im Anschluss wurde 1000 µl kaltes Ethanol hinzugefügt und die Proben wurden bei 4°C für 45 min bei 1000 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben ein 3. Mal zentrifugiert für 10 min bei 2000 x g.
5. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde kopfüber kurz angetrocknet. Danach wurde das Pellet mit 85 µl PBS resuspendiert.
6. Es folgte der Proteinase K-Verdau der Proben. Dazu wurde in ein neues Reaktionsgefäß 15 µl PK-2x Puffer vorgelegt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt. Für den PK-positiven Ansatz wurde 6 µl PK-Lösung (19:1 10 mM TrisHCl: PK-Stammlösung) zugegeben. Für die Negativkontrolle wurden 6 µl dH₂O zugegeben. Zu den zwei Ansätzen wurde 15 µl der aufgereinigten Probe hinzugefügt und bei 37°C für 45 min mit 1000 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt.

7. Der Verdau der Proben wurde durch die Zugabe von 9 µl Ladepuffer (1:10 6x BPB: RotiLoad1) und der Inkubation für 5 min bei 97°C und 1000 rpm auf dem Thermomixer gestoppt. Dieser Schritt ist für die Vorbereitung auf die Gelelektrophorese notwendig.
8. Im Anschluss an den PK-Verdau wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 12% Precise Tris-Glycin Protein Gel mit je 20 µl der Proben, 10 µl positiv Kontrolle und Markern (Farbmarker: 5 µl pep Gold Protein Marker IV und 4 µl ECL-Marker) aufgetragen und bei 30 mA pro Gel für 60 min laufen gelassen.
9. Anschließend wurde das Gel auf eine PVFD-Membran, die mit Methanol aktiviert wurde (Immobilon-P Transfer Membran) geblottet. Dazu wurde das Gel auf die Membran gelegt, und anschließend zwischen 4 mit Transfer-Puffer getränkten Blot-Papieren in eine Blot-Kammer gesetzt. Diese wurde an eine Stromquelle angeschlossen und bei 80 mA pro Membran bei einer Laufzeit von 60 min gestartet.
10. Nach dem Blotting wurde die Membran für 60 min zur Absättigung der freien Bindungsstellen in einer 5% Magermilch-Lösung (5 g Bio-Magermilchpulver in 100 ml TBST) bei RT inkubiert.
11. Gefolgt von einem Waschschrift wurde die Membran 3-mal für 5 min in TBST gewaschen.
12. Als nächstes folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (für den Scrapie 263K Stamm mit einem monoklonalen Anti-Prion-Protein-Antikörper (Klon 3F), für den an Mäuse adaptierten BSE Stamm 301V mit dem monoklonalen AK POM1. Dafür wurde die Membran mit dem jeweiligen 1. AK (1:5000 verdünnt in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert.
13. Die Membran wurde nach erfolgter Inkubation erneut dreimal für 5 min mit TBST gewaschen.
14. Daraufhin wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgG-HRP, 1:1400 verdünnt in Blockingpuffer) benetzt und für 60 min bei RT inkubiert.
15. Die Membran wurde nach erfolgter Inkubation erneut 3-mal für 10 min mit TBST gewaschen.
16. Im Anschluss wurde die Membran für 2 min mit 2 ml pro Membran einer ECL-Lösung (Western Blotting Luminol Reagent) benetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die

Membran von der überschüssigen ECL-Lösung befreit und in eine Röntgenkassette gelegt.

17. Im nächsten Schritt wurde ein Hyperfilm auf die Membran gelegt und der Film für die gewünschte Zeit belichtet (in Abhängigkeit der Intensität der Banden für 2 bis 6 min). Der Film wurde im Anschluss in eine Entwicklerlösung getaucht, bis die Banden sichtbar waren. Danach wurde der Film kurz gewaschen, dann in Fixiererlösung getaucht und nach erneutem Spülen unter fließendem Wasser getrocknet.

Die Aufreinigung von PrP^{Sc} aus Proben die mit dem nativem BSE oder CWD versetzt waren, wurden mit dem Protokoll von Alexandra Schwienbacher (FLI Tübingen) vom 24.11.2006 bearbeitet. Dieses Protokoll wurde nach Wadsworth 2001 modifiziert (Wadsworth *u. a.*, 2001).

Jede Probe wurde im doppelten Ansatz benutzt und mit A oder B bezeichnet.

A: ohne Proteinase K Zugabe

B: mit Proteinase K Zugabe

1. Zugabe von 4%igem Sarkosyl (2 g Sarkosyl + 50 ml PBS)

A: Zu 25 µl Hirnhomogenat wurde 25 µl Sarkosyl zugegeben

B: Zu 125 µl Hirnhomogenat wurde 125 µl Sarkosyl zugegeben

und für 15 min bei 37°C auf dem Thermomixer geschüttelt.

2. Zugabe von Benzoase 1:10 mit PBS-A verdünnt

A: 1 µl Benzoase Lösung + 1µl 50 mM mMgCl₂ zu jeder Probe.

B: 5 µl Benzoase Lösung + 5µl 50 mM MgCl₂ zu jeder Probe.

Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min auf dem Thermomixer.

3. Proteinase K Verdau

A: 5,5 µl PBS-A zu jeder Probe

B: 27,5 µl Proteinase K Lösung (1:25 Verdünnt) zugeben,

gefolgt von einer Inkubation bei 37°C für 30 min auf dem Thermomixer.

4. TM-Mini: 1 Tablette mit 1,5 ml bidest. H₂O gemischt und gevortext.

A: 5 µl 4% NaPTA + 9,5 µl TM-Mini zugegeben

B: 35 µl 4% NaPTA + 47,5 µl TM-Mini zugeben

und bei 37°C für 30 min auf den Thermomixer stellen.

5. Als nächstes erfolgte eine Zentrifugation bei 15800 x g für 30 min.

6. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 20 µl 0,1 % Sarkosyl resuspendiert.

7. Zu jeder Probe wurde 10µl Ladepuffer (450µl RotiLoad 4-fach Puffer + 50 µl 6-fach BPB-Gel Ladepuffer) zugegeben und für 10 min bei 95°C und 1000 rpm auf dem Thermomixer inkubiert um den Verdau zu stoppen. Dieser Schritt ist notwendig für die Vorbereitung auf die Gelelektrophorese.

Im Anschluss erfolgte eine Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot wie oben beschrieben.

4.6.1 Quantifizierungseinheit der Verdünnungsstufen im Western Blotting

WBE 1 (Western Blotting Einheit) bedeutet:

PrP^{Sc} kann im Western Blotting bis zu einer Verdünnung von 1:10 nachgewiesen werden.

Mit jeder Western Blotting Einheit (WBE) erhöht sich die Verdünnungsstufe um eine log₁₀-Stufe z.B. WBE 5 bedeutet, dass bis zu einer Verdünnung von 1:100 000 PrP^{Sc} im Western Blotting nachweisbar ist (WBE 5 enthält 4 log₁₀-Stufen mehr Prionen als WBE 1).

4.7 Inaktivierung von infektiösen Prion-Proteinen durch Behandlung in einer Mikrowellenanlage

Mit der hier vorliegenden Untersuchung soll eine Methode gefunden werden, infektiöse Prion-Proteine sicher zu inaktivieren. Die Inaktivierung soll durch eine Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen erfolgen. Die Versuche wurden in der Mikrowellenanlage (MLS 1200 MEGA, Abb.6) durchgeführt.

9 g Fleischbrei Kategorie 1 oder Kategorie 2 wurden mit 1 ml des jeweiligen Hirnhomogenats in einem Gefäß gemischt und bei der eingestellten Zeit und Temperatur in der Mikrowellenanlage behandelt. Als Referenz wurde ein Gefäß nur mit 9 g Kategorie 1 oder 2 mit 1 ml dH₂O gemischt. In diesem Gefäß wurde der Druck und die Temperatur gemessen.

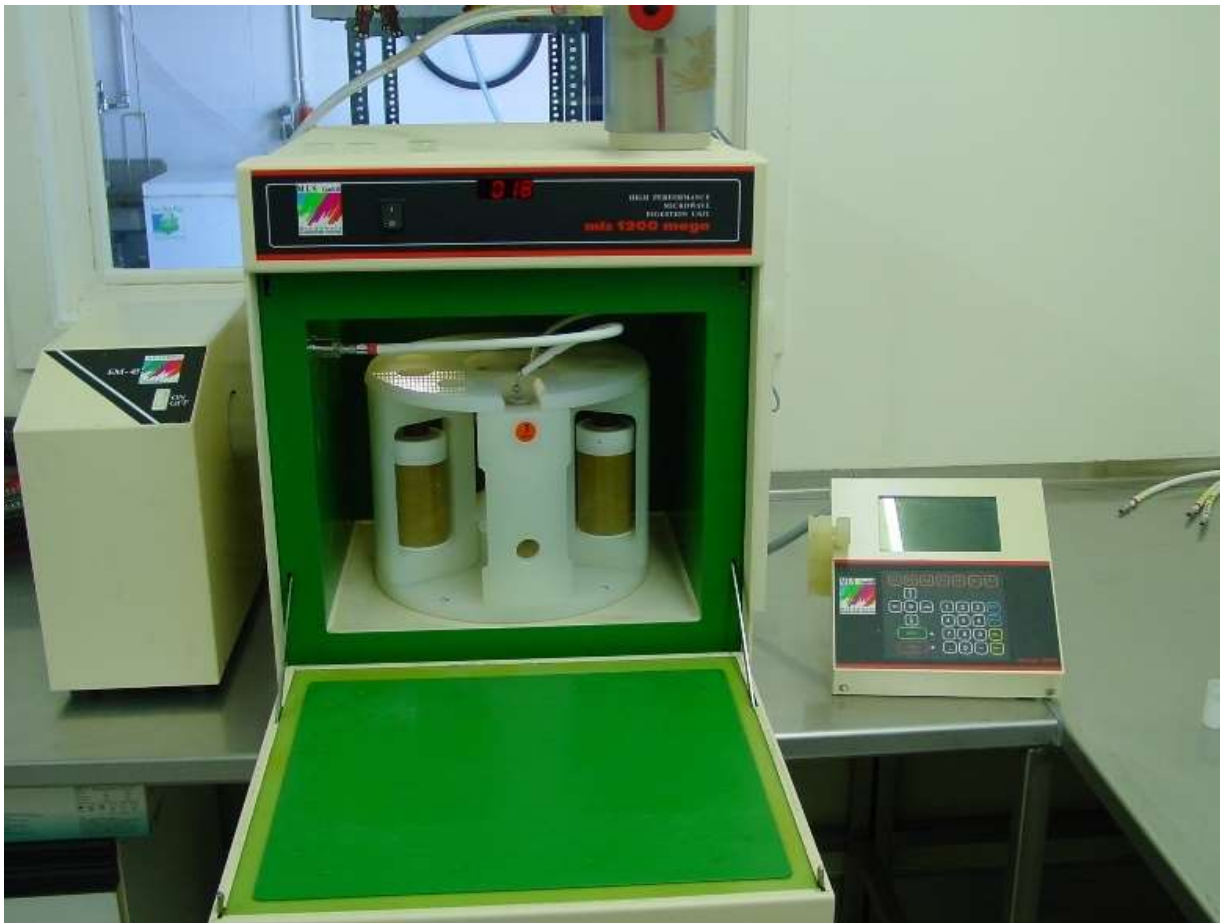
Für die Untersuchungen wurden 3 Temperaturen ausgewählt. Die erste Temperatur sollte in einem Bereich liegen, welcher nach aktuellem Wissensstand die Prionen nicht inaktivieren kann (90 °C). Die zweite Temperatur sollte in einem Bereich sein, in dem die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung gegeben ist (120 °C). Die dritte Temperatur, soll eine Inaktivierung sicherstellen (150 °C).

90 °C	5 min	10 min	15 min
120 °C	5 min	10 min	15 min
150 °C	5 min	10 min	15 min

Jede Temperatur/Zeit-Kombination wurde sechsmal mit dem Stamm Scrapie 263 K und fünfmal mit dem BSE 301 V durchgeführt.

Über einen Randomisierungsplan wurde die Temperatur und Zeit bestimmt. Welche Kategorie als Kontrolle diente wurde jeden Tag neu ausgelost. Für die jeweiligen Zeiten und Temperaturen wurde ein Programm mit einer bestimmten Vorlaufzeit in der Mikrowellenanlage programmiert. Zum Aufheizen der Probe auf die gewünschte Temperatur bei 90 °C wurde eine Vorlaufzeit von 30 Sekunden, bei 120 °C von 60 sec und bei 150 °C von 90 sec gewählt. Im Anschluss erfolgte eine 30 min Abkühlungs-Phase.

Abbildung 6: MLS Mega 1200 Mikrowellenanlage



Direkt nach der Mikrowellenbehandlung wurde die Probe 1:10 verdünnt. Hierfür wurde 1 g mit 9 ml PBS gemischt. Von der Originalprobe und der Verdünnung wurden je 400 μ l in ein Reaktionsgefäß überführt und eingefroren.

Zur Re-Isolierung von PrP^{Sc} aus den Proben wurden im Anschluss das Hohenheim Re-Insolierungsprotokoll angewendet wie oben beschrieben.

Vor dem ersten Schritt der Re-Isolierung wurde zu 400 μ l Probe 100 μ l Ameisensäure (1%ig) hinzugefügt und bei 21°C für 30 min auf dem Thermomixer geschüttelt.

4.8 Protein misfolding cycling amplification (PMCA)

An der Universität Hohenheim war die Möglichkeit einen Bioassay unter L3 Bedingungen durchzuführen nicht gegeben. Über das PRIORITY EU-Projekt habe ich von der PMCA erfahren. Mit dieser Methode können kleinste Mengen an Prion-Protein vermehrt werden. Im August 2012 konnte ich die Methode der PMCA in Toulouse an der Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse erlernen und an der Universität Hohenheim etablieren und modifizieren. Die PMCA wurde nur für die Überprüfung der Versuche mit dem an Hamster adaptierten Scaprie

263K durchgeführt. Für die PMCA wird Hirnmaterial (gesunder syrischer Goldhamster) benötigt, das als PrP^C Substrat für die PMCA dient. Dieses muss auf eine bestimmte Art und Weise gewonnen werden wie im Folgenden beschrieben.

Um Blutreste im Hirn zu vermeiden, welche einen negativen Einfluss auf die PMCA-Reaktion haben, wurden die Hamster mit CO₂ betäubt. Es wurde der Brustraum und das linke Herzohr geöffnet. Mit einer Kanüle (0,9 µm) wurde in die linke Herzkammer gestochen, bei noch schlagendem Herzen und mit ca. 10 ml des PMCA-Puffers durchgespült, sodass das komplette Blut ausgespült wurde. In einem nächsten Schritt wurde die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn vorsichtig entnommen. Das Gehirn konnte verwendet werden, wenn es weiß bis gräulich war. Die Gehirne wurden einzeln in Cryo-Gefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das gefrorene Hamsterhirn wurde auf Eis aufgetaut und nacheinander in einen Mörser gelegt, der vorher über Nacht bei -80°C eingefroren wurde. In die Schale des Mörsers wurde flüssiger Stickstoff gefüllt und das Gehirn gemörsert (ein Hamsterhirn hat ca. 1 g). Es wurde ein 10%iges (w/v) Hirnhomogenat in PMCA-Puffer hergestellt und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Für die weitere Verarbeitung wurden drei Varianten getestet.

- a. Zentrifugation bei 2000 x g für 1 min, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde gepoolt, aliquotiert und das Pellet verworfen.
- b. Zentrifugation bei 2000 x g für 1 min, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Im Anschluss den Überstand über ein Zellsieb mit der Maschenweite von 40 µm filtriert und das Filtrat gepoolt und aliquotiert.
- c. Das Hamsterhirnhomogenat wurde über ein Zellsieb mit der Maschenweite von 40 µm filtriert, das Filtrat gepoolt und aliquotiert.

Alle drei Varianten wurden für die Lagerung bei -80 °C eingefroren.

Es wurden verschiedene Einstellungen des Sonicators getestet. Alle Varianten wurden bei 37°C inkubiert und pro Runde 24 h laufen gelassen.

Beschallungsstärke 51% (360 Watt) 29 min 30 s Inkubation 30 s beschallen. 63 µl negatives HHH + 7 µl Probe nach (Lacroux *u. a.*, 2012)

Beschallungsstärke 77% (540 Watt) 29 min 20 s Inkubation 40 s beschallen. 72 µl negatives HHH + 8 µl Probe nach (Ding *u. a.*, 2012)

Beschallungsstärke 51% (360 Watt) 30 min Inkubation 40 s beschallen. 81 µl negatives HHH + 9 µl Probe nach (Saá, Castilla und Soto, 2006)

Beschallungsstärke 43% (300 Watt) 30 min Inkubation 30 s beschallen. 90 µl negatives HHH + 10 µl Probe nach (Gonzalez-Montalban *u. a.*, 2011)

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Durchführung der PMCA beschrieben:

1. 9 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 81 µl Substrat (negativem Hirnhomogenat) in ein 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß (mit 8-13 Zirkonia Beads) gemischt und in den Sonicator (Q700 von Qsonica) eingesetzt.
2. Die Beschallung wurde gestartet und die Proben für 48 Zyklen (ein Zyklus besteht aus 40 Sek Beschallung und 29 min und 20 S Inkubation bei 37°C) behandelt.
3. Nach den ersten 48 Zyklen wurden die Proben aus dem Sonicator geholt und dann wurde aus jeder Probe 9 µl entnommen und mit 81 µl frischen Hirnhomogenat in ein 0,2 ml PCR Tube (mit 8-13 Zirkonia Beads) gemischt.
4. Es erfolgten weitere 48 Zyklen.
5. Dieses Procedere wurde 4-mal wiederholt, so dass am Ende jede Probe 5 Runden aus einer 24 h Beschallung/Inkubation durchlaufen hat.
6. Die Proben wurden entweder bei -20 °C eingefroren oder sofort weiterbearbeitet.

Nach der PMCA wurden drei verschiedene Methoden der weiteren Verarbeitung getestet:

1. Die Proben wurden direkt verdaut, hierzu wurde wie in 4.6 ab Punkt 7 verfahren.
2. Die Proben wurden wie unter 4.6 ab Punkt 1 beschrieben re-isoliert. Die Mengen wurden an das Volumen der Probe angepasst.
3. Die Proben wurden wie unter 4.6 ab Punkt 1 beschrieben re-isoliert, eine Anpassung des Volumens erfolgte nicht. Die Probe (ca. 90 µl) wurde mit 400 µl kontaminierter Probe gleichgesetzt.

Nach allen drei Varianten erfolgte die Auftrennung im Gel mit einem Western Blotting im Anschluss wie unter 4.6 (ab Punkt 8) beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis von PrP^{Sc} im infizierten Hirnmaterial

5.1.1 Vergleichende Vorversuche mit verschiedenen primären Antikörpern zum Nachweis von Prionen

Für den Nachweis von PrP^{Sc} mittels Western Blotting standen drei primäre Antikörper zur Verfügung. Dabei handelte es sich um die monoklonalen Antikörper (mAK) 3F4 (geeignet zum Nachweis von Prionen in Hamster und Mensch), W226 (für den Nachweis von Prionen in Maus und Hamster) und POM 1 (geeignet für den Nachweis von Prionen in Maus und Schaf). Um den besten Antikörper für das jeweilige Zielprotein zu finden wurden diese in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10 bis 1:1000) von infiziertem Hirnmaterial ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 beschrieben.

Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche mit den primären Antikörpern

Prion Stamm	3F4	W226	POM1
263 K	1:1000*	1:100	1:10
301 V	n.d.	-	1:1000

* = im WB positive Verdünnungsstufe des jeweiligen Hirnmaterials; n.d = nicht durchgeführt; -: nicht nachweisbar;

Für das Zielprotein Scrapie 263 K eignet sich der Antikörper 3F4 am besten. PrP^{Sc} konnte bis zu einer Verdünnung von 1:1000 nachgewiesen werden. Aufgrund unterschiedlicher Affinität waren die Antikörper W226 und POM1 hier nicht optimal geeignet. Ein Nachweis von Scrapie 263 K war nur bis zur einer Verdünnung von 1:100 bei W226 und 1:10 bei POM1 möglich.

Für das Zielprotein BSE 301 V konnte der Antikörper 3F4 nicht genutzt werden, da dieser nur für Hamster und Mensch geeignet ist (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001). Ein Nachweis bis zur Verdünnungsstufe 1:1000 konnte mit dem Antikörper POM1 erreicht werden. PrP^{Sc} (BSE 301 V) wurde durch den monoklonalen Antikörper W226 nicht nachgewiesen.

Deshalb wurden für die weiteren Arbeiten der mAK 3F4 für den Nachweis von 263K bzw. POM1 für 301V verwendet.

5.1.2 Nachweis von PrP^{Sc} im Ausgangsmaterial (Hirnmaterial von infizierten Tieren)

Hierfür wurden Vorversuche durchgeführt um zu prüfen bis zu welcher Verdünnungsstufe PrP^{Sc} noch in infiziertem Hirnhomogenat (Scrapie 263K, BSE 301V, CWD und BSE)

nachweisbar ist. Als primärer Antikörper wurde bei Scrapie 263 K der mAK 3F4, für BSE 301 V, CWD und BSE der mAK POM1 verwendet.

Dazu wurden die Prionen-Stämme (infiziertes Hirnmaterial) dekadisch verdünnt und im Anschluss mit dem Hohenheim Re-Isolierungsprotokoll aufgereinigt. Darauf folgte der Nachweis mittels Western Blotting. Nach dem Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll konnte bei CWD und BSE kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden diese Stämme stattdessen mittels einer NaPTA-Fällung aufgereinigt und anschließend im Western Blotting nachgewiesen.

Die Bestimmung der Sensitivität des Western Blottings erfolgte in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:100 000 000 bzw. bis 1:100 000 bei CWD und BSE (wie in Tab. 11 dargestellt). So konnte der Nachweis erbracht werden, ab welcher Verdünnungsstufe des Ausgangsmaterials kein PrP^{Sc} mehr nachweisbar ist. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Nachweise in den einzelnen Verdünnungsstufen in sogenannte Western Blotting Einheiten (WBE) umgerechnet. Dabei entspricht die WBE 1 einem Nachweis des PrP^{Sc} bis zu einer Verdünnung des Ausgangsmaterials von 1:10.

Sowohl bei Scrapie 263 K als auch bei BSE 301 V konnte PrP^{Sc} noch bis WBE 4 nachgewiesen werden. Bei einer Vorverdünnung von 1:10 entspricht dies WBE 5 pro Gramm Hirnmaterial. Bei CWD und BSE erfolgte die Aufreinigung mittels NaPTA-Fällung. PrP^{Sc} war bis WBE 3 nachweisbar. Das entspricht WBE 4 pro Gramm Hirn.

Tabelle 11: Nachweis von PrP^{Sc} im Scrapie 263 K und BSE 301 V (Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll), CWD und BSE (Aufreinigung mittels NaPTA-Fällung)

Verdünnung von PrP ^{Sc} in PBS	Scrapie 263 K		BSE 301 V		CWD		BSE	
	VD 1	VD 2	VD 1	VD 2	VD 1	VD 2	VD 1	VD 2
1:10 Ausgangsmaterial	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1:100	+	+	+	+	+	+	+	+
1:1 000	+	+	+	+	+	+	+	+
1: 10 000	+	+	+	+	-	-	-	-
1: 100 000	-	-	-	-	-	-	-	-
1: 1 000 000	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1: 10 000 000	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1: 100 000 000	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
WBE	4	4	4	4	3	3	3	3

n= 2; VD = Versuchsdurchgang; n.d.= nicht durchgeführt; + = positiv im Western Blotting; - = negativ im Western Blotting; WBE = Western Blotting Einheit

5.2 Re-Isolierung von PrP^{Sc} aus mit Prionen versetztem Fleischbrei der Kategorie 1 und Kategorie 2

Zur Überprüfung der Re-Isolierung von PrP^{Sc} aus tierischen Nebenprodukten der Kategorie 1 bzw. Kategorie 2 wurde Fleischbrei der Kategorie 1 oder Kategorie 2 mit Prionen-haltigem Hirnmaterial (Scrapie 263 K, BSE 301 V, CWD, BSE) im Labor versetzt und das so präparierte Material für den Prionen-Nachweis im Western Blotting aufgereinigt. Auch hier wurden die Stämme Scrapie 263 K und BSE 301 V mit Hilfe des Hohenheimer Re-Isolierungsprotokolls aufgereinigt, bei CWD und BSE wurde die NaPTA-Fällung verwendet.

Sowohl bei Scrapie 263 K als auch bei BSE 301 V konnte PrP^{Sc} aus Fleischbrei der Kategorie 1 bzw. 2 bis zu WBE 3 nachgewiesen werden.

Bei den Versuchen mit den Prionen-Stämmen CWD und BSE im Fleischbrei, welche mit Hilfe der NaPTA-Fällung aufgereinigt wurden, konnten keine im Western Blotting detektierbaren Prionen aufgereinigt werden. Da sich der Fleischbrei möglicherweise negativ auf die NaPTA-Fällung ausgewirkt hat.

Die Ergebnisse des Nachweis von PrP^{Sc} (Scrapie 263K und BSE 301V) aus Fleischbrei sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Nachweis von PrP^{Sc} aus Fleischbrei der Kategorie 1 bzw. Kategorie 2 in WBE

Mischungen	Scrapie 263K		BSE 301V	
	1	2	1	2
1:10 in PBS	WBE 3	WBE 3	WBE 3	WBE 3
360 µg FB Kat. 1 + 40µl (HH)	WBE 3	WBE 3	WBE 3	WBE 3
360 µg FB Kat. 2 + 40µl (HH)	WBE 3	WBE 3	WBE 3	WBE 3

n=2; HH = Hirnhomogenat WBE = Western Blotting Einheit

5.3 Inaktivierungsversuche mit der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen

In den folgenden Versuchen wurde Fleischbrei der Kategorie 1 oder 2 mit Scrapie 263 K oder BSE 301 V versetzt. Wie in den Vorversuchen wurde 9 g Fleischbrei der Kategorie 1 oder Kategorie 2 mit 1 ml Scrapie 263 K (Hamsterhirnhomogenat) gemischt. In der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen wurde dieses Gemisch bei 90°C, 120°C oder 150°C und bei 5, 10 oder 15 min behandelt.

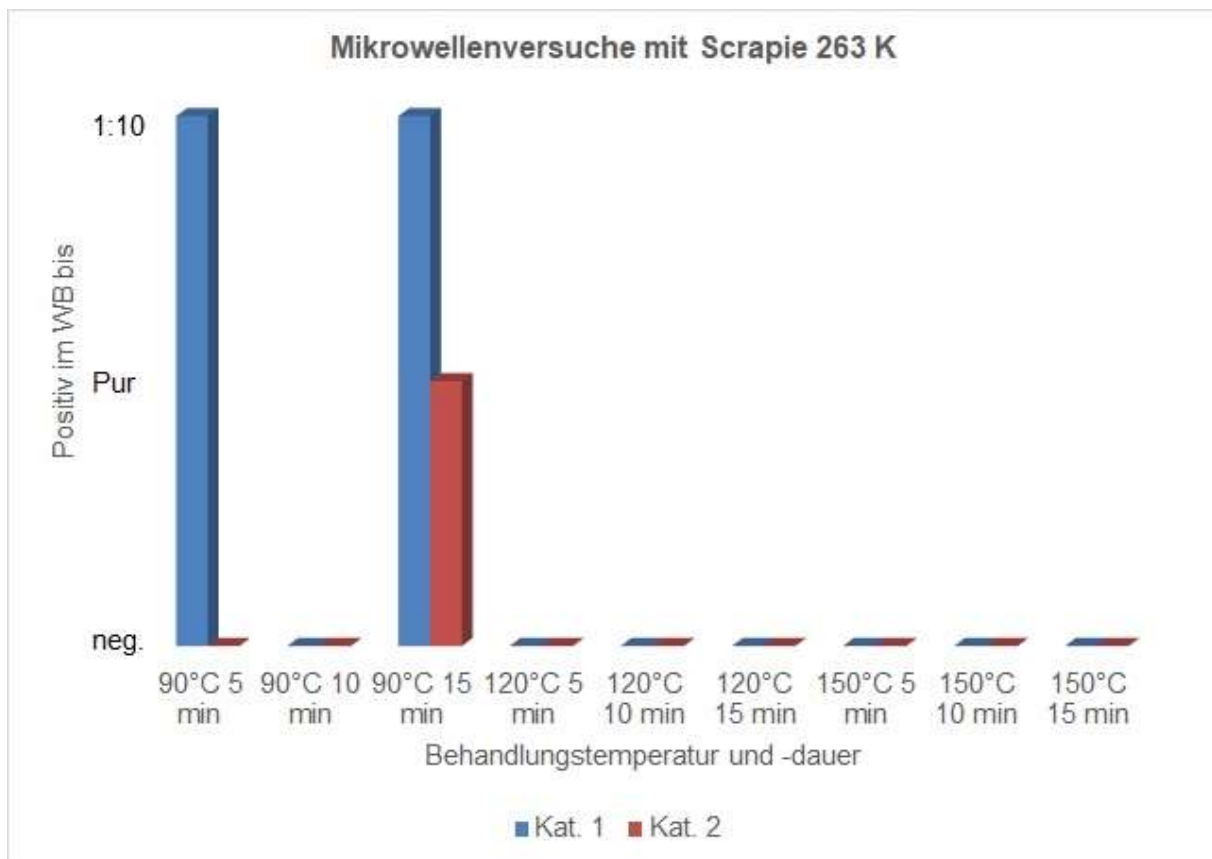
Es sollte herausgefunden werden, mit welcher Temperatur und welcher Verweildauer das Material sicher inaktiviert werden kann.

5.3.1 Inaktivierungsversuche Scrapie 263 K

Im Anschluss an die Inaktivierung des Prionen-haltigen Materials durch Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen wurde das behandelte Material unverdünnt und 1:10 verdünnt mittels des Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll aufgearbeitet und im Western-Blotting weiter analysiert.

Pro Wiederholung wurde jede Temperatur- und Verweildauerkombination einmal durchgeführt (Abb.7-12)

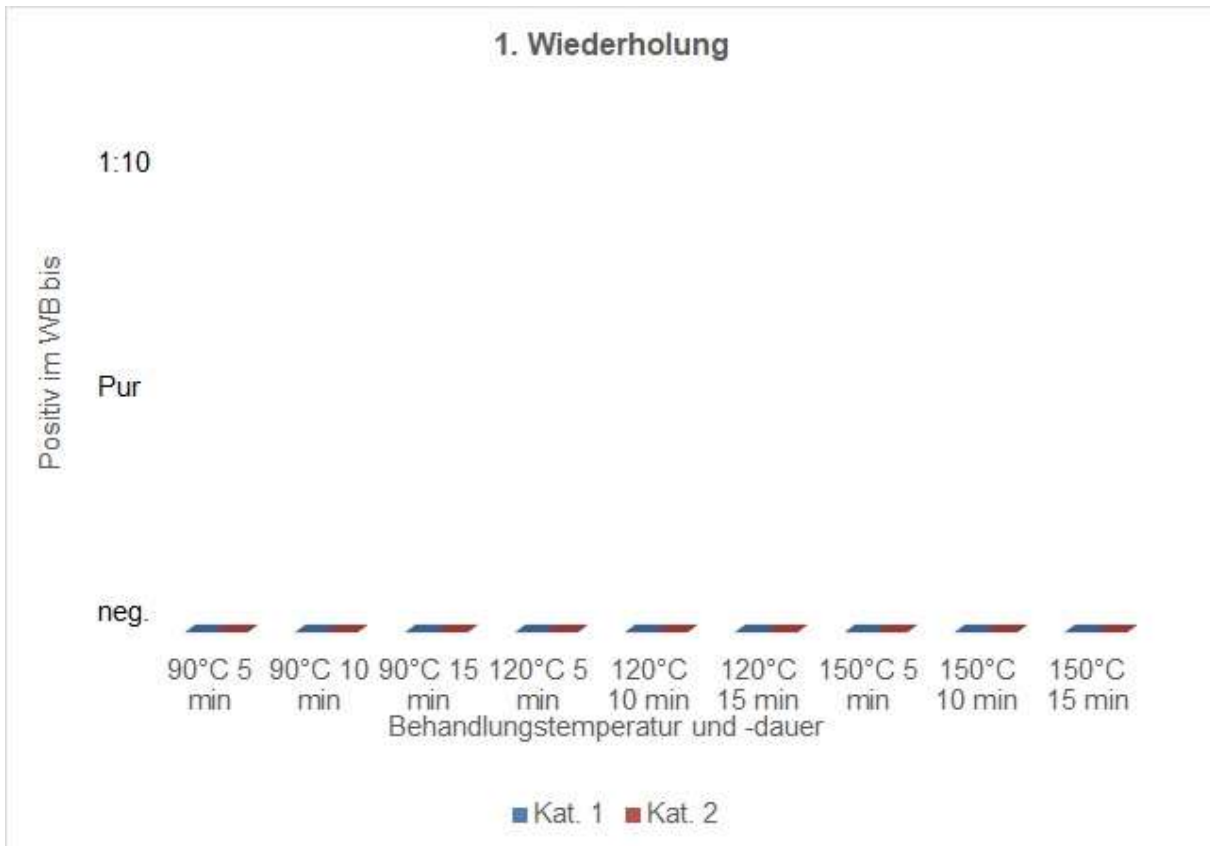
Abbildung 7: 1. Mikrowellenversuch von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei (Kategorie 1/Kategorie 2)



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2; neg. = negativ

Der Versuch zeigt, dass nach einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 5 min kein PrP^{Sc} mehr nachweisbar ist. Dies gilt sowohl bei dem Fleischbrei Kategorie 1 als auch bei Kategorie 2.

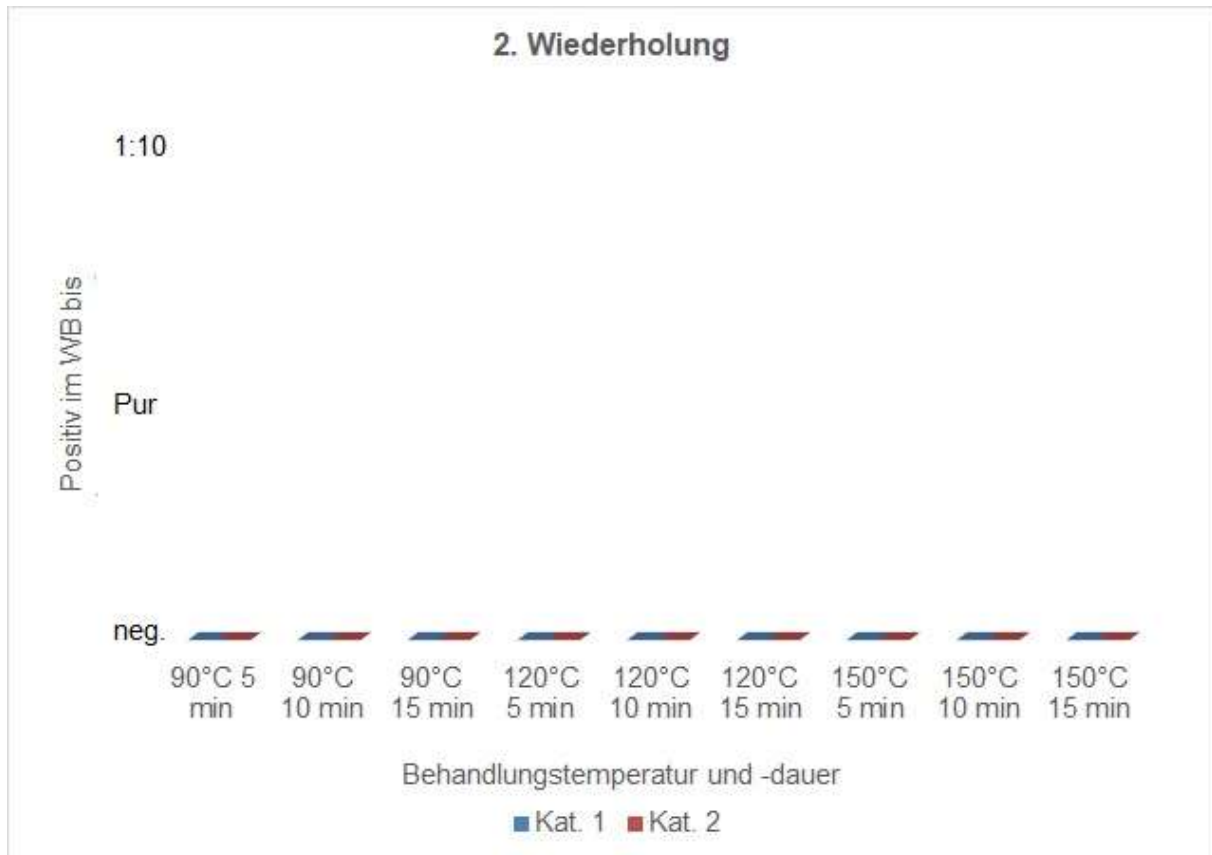
Abbildung 8: 1. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2; neg. = negativ

Nach der ersten Wiederholung konnte kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Dies galt für beide Kategorien.

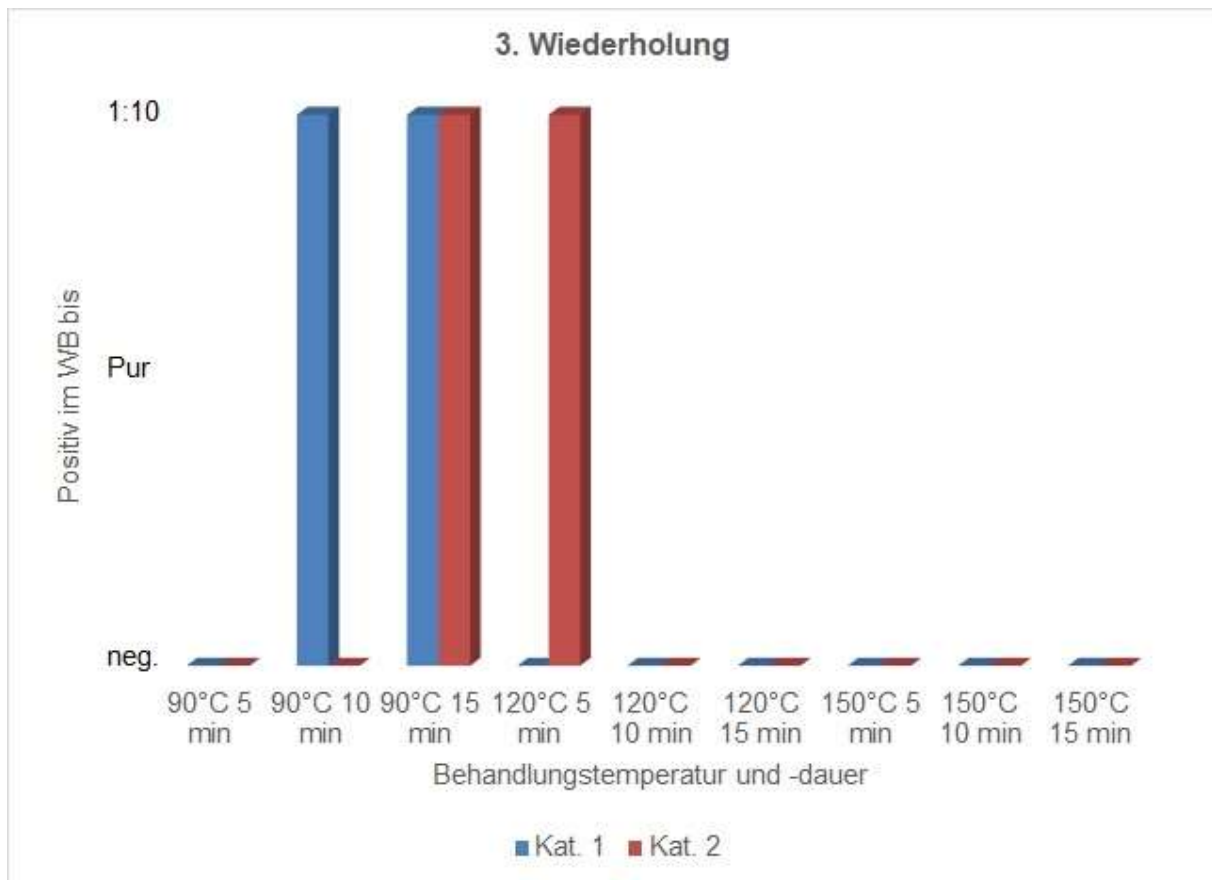
Abbildung 9: 2. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Auch in der zweiten Wiederholung konnte wie bei der ersten Wiederholung kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

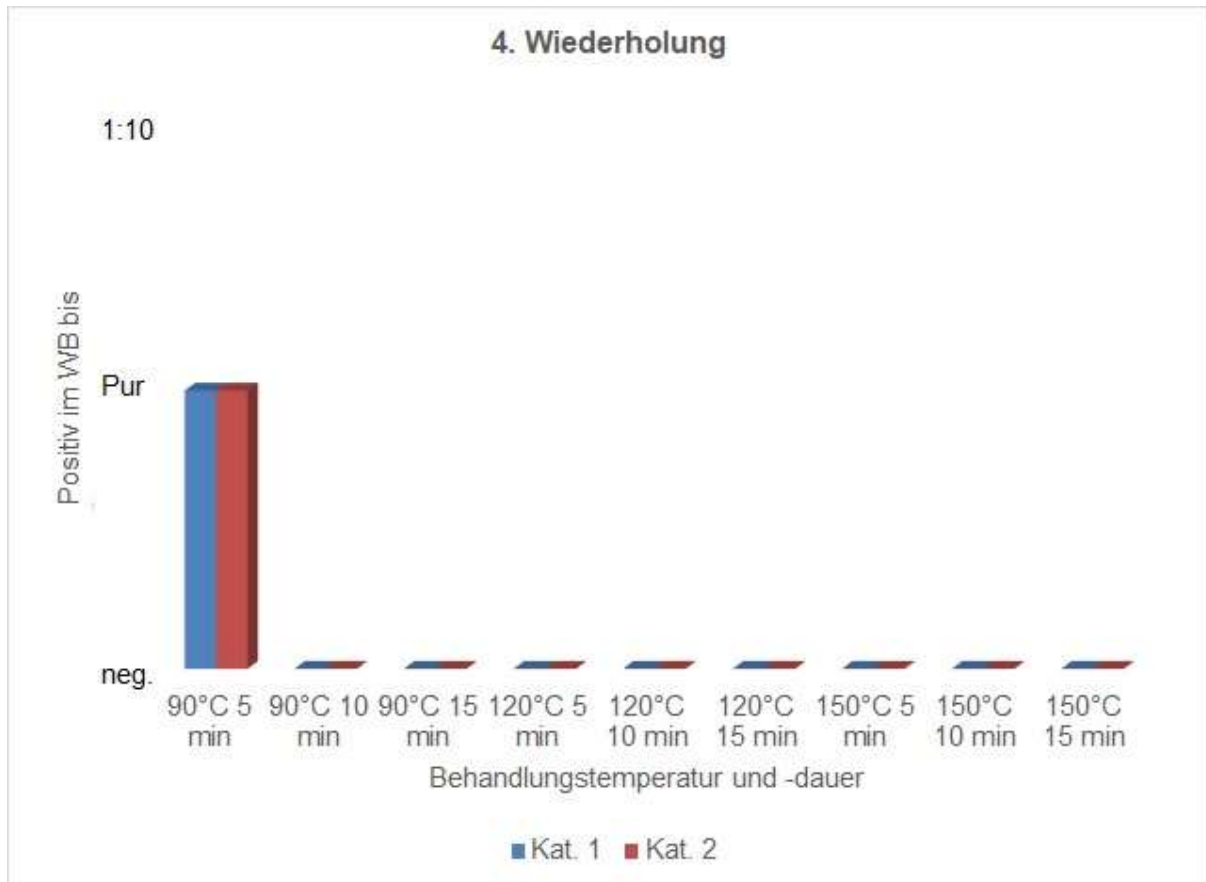
Abbildung 10: 3. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Bei der dritten Wiederholung war PrP^{Sc} erst nach einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer 5 min bei Kategorie 1 nicht mehr nachzuweisen. Bei Kategorie 2 waren 10 min bei 120°C notwendig damit kein PrP^{Sc} mehr nachgewiesen werden konnte.

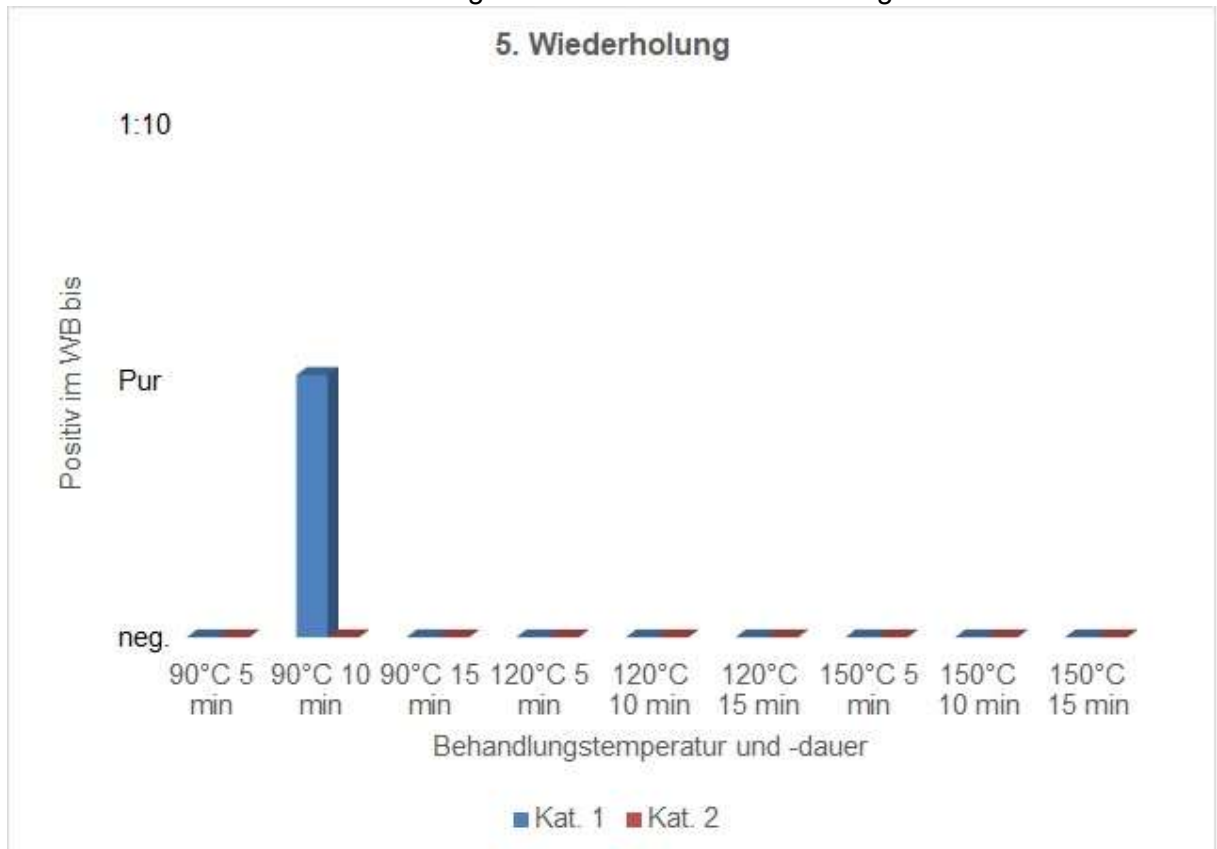
Abbildung 11: 4. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

In der vierten Wiederholung war PrP^{Sc} nach einer Behandlung von 90°C und 10 min im Western Blotting bei beiden Kategorien nicht mehr nachweisbar.

Abbildung 12: 5. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Auch die fünfte Wiederholung zeigte, dass nach einer Behandlungstemperatur von 90°C und einer Behandlungsdauer von 15 min kein PrP^{Sc} im Western Blotting nachweisbar war, beim Material der Kategorie 1.

Im Material der Kategorie 2 konnte bei keiner Variante PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2

Scrapie 263 K																				
Verdünnung	1. Versuch			1. Wiederholung			2. Wiederholung			3. Wiederholung			4. Wiederholung			5. Wiederholung				
	Kat. 1		Kat. 2	Kat. 1		Kat. 2	Kat. 1		Kat. 2	Kat. 1		Kat. 2	Kat. 1		Kat. 2	Kat. 1		Kat. 2		
	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10	1:10	Pur	1:10
90°C 5 min	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90°C 10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90°C 15 min	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 5 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 5 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n = 6; + = positiv im Western Blotting; - = negativ im Western Blotting

Die Versuchsergebnisse der mikrowellenbehandelten Proben, der mit Scrapie 263K versetztem Fleischbrei der Kategorie 1, sind im Western Blotting bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und 5 min Behandlungsdauer negativ.

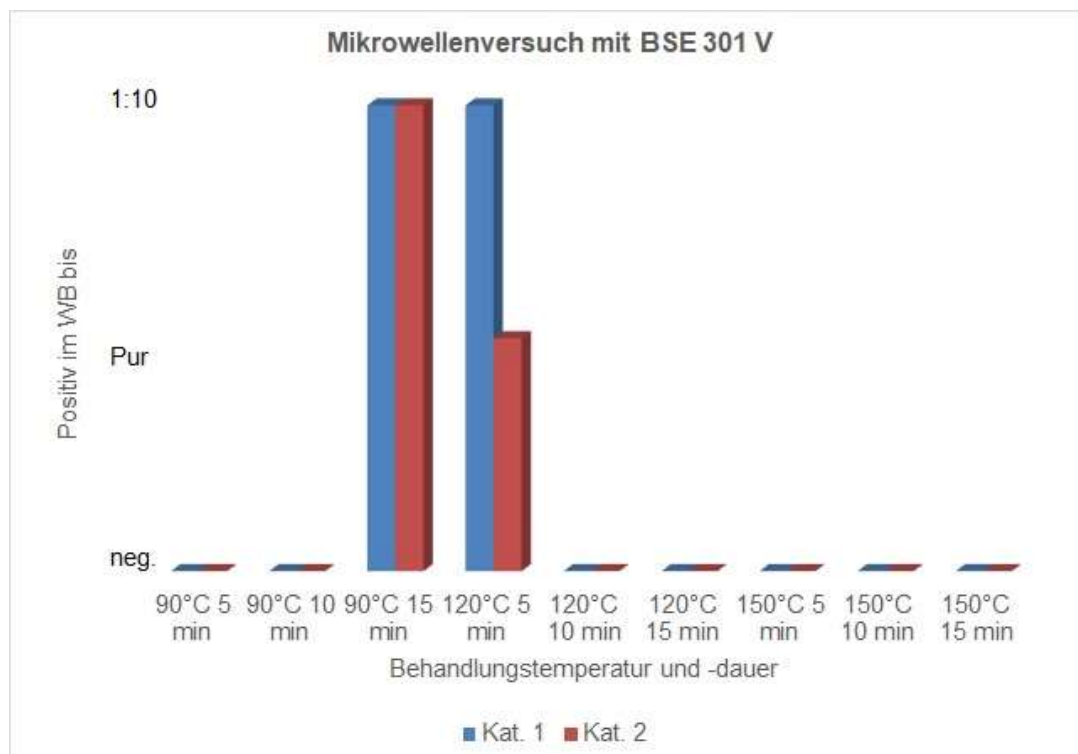
Die Versuchsergebnisse der Kategorie 2 Proben zeigen ein ähnliches Ergebnis. Hier konnte nur bei einer Wiederholung noch PrP^{Sc} bei 120°C und 5 min Dauer nachgewiesen werden. Wählt man eine Temperatur von 90°C, konnte keine vollständige Reduktion bei allen Wiederholungen gezeigt werden.

5.3.2 Inaktivierungsversuche mit Fleischbrei der Kategorie 1 und 2, welcher mit BSE 301 V infiziertem Maushirnhomogenat versetzt war

Wie in den Vorversuchen wurde 9 g Fleischbrei der Kategorie 1 oder Kategorie 2 mit 1 ml BSE 301V (Hirnhomogenat) gemischt. In der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen wurde dieses Gemisch bei 90° C, 120° C oder 150° C und 5, 10 oder 15 min Verweildauer behandelt.

Für den Nachweis wurde jeweils ein Aliquot des unverdünnten Materials entnommen und ein weiteres wurde 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Aufarbeitung mittels des Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll mit anschließendem Western Blotting. Pro Wiederholung wurde jede Temperatur- und Verweildauerkombination einmal durchgeführt (Abb.13-17)

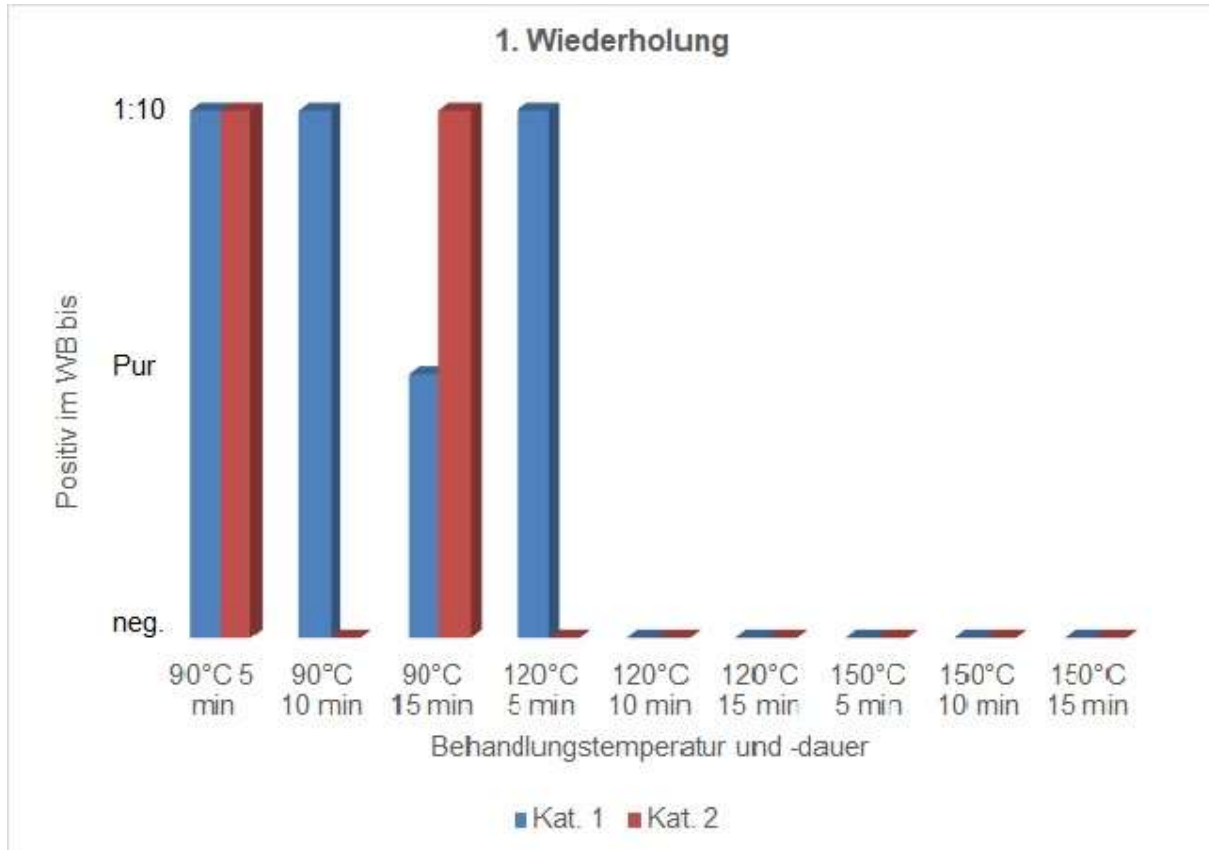
Abbildung 13: 1. Mikrowellenversuch von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Der erste Versuch zeigt, dass erst ab einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 10 min kein PrP^{Sc} mehr nachweisbar war, bei beiden Kategorien.

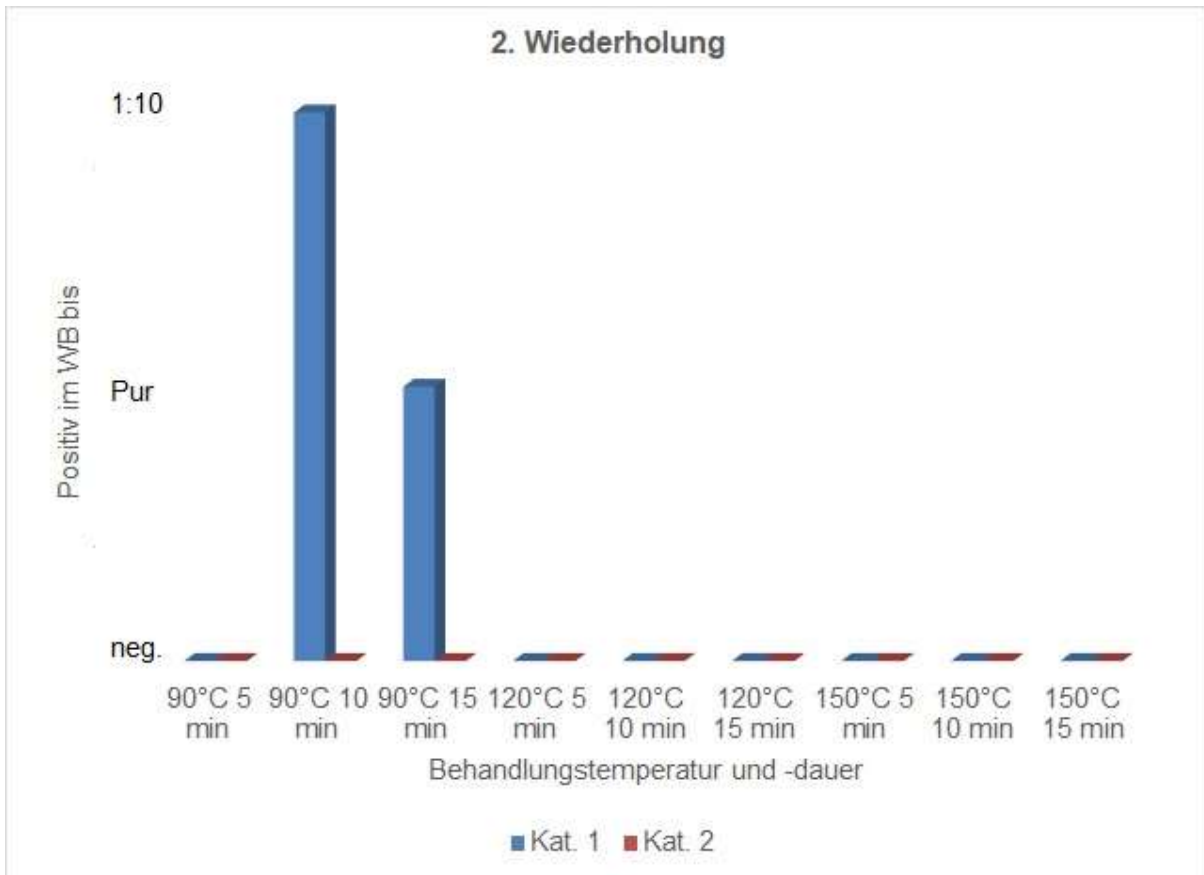
Abbildung 14: 1. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Auch die 1. Wiederholung kommt zu dem Ergebnis, dass erst bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 10 min kein PrP^{Sc} mehr nachgewiesen werden kann. Bei dem BSE 301 V versetztem Material der Kategorie 2 konnte schon bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 5 min nichts mehr nachgewiesen werden.

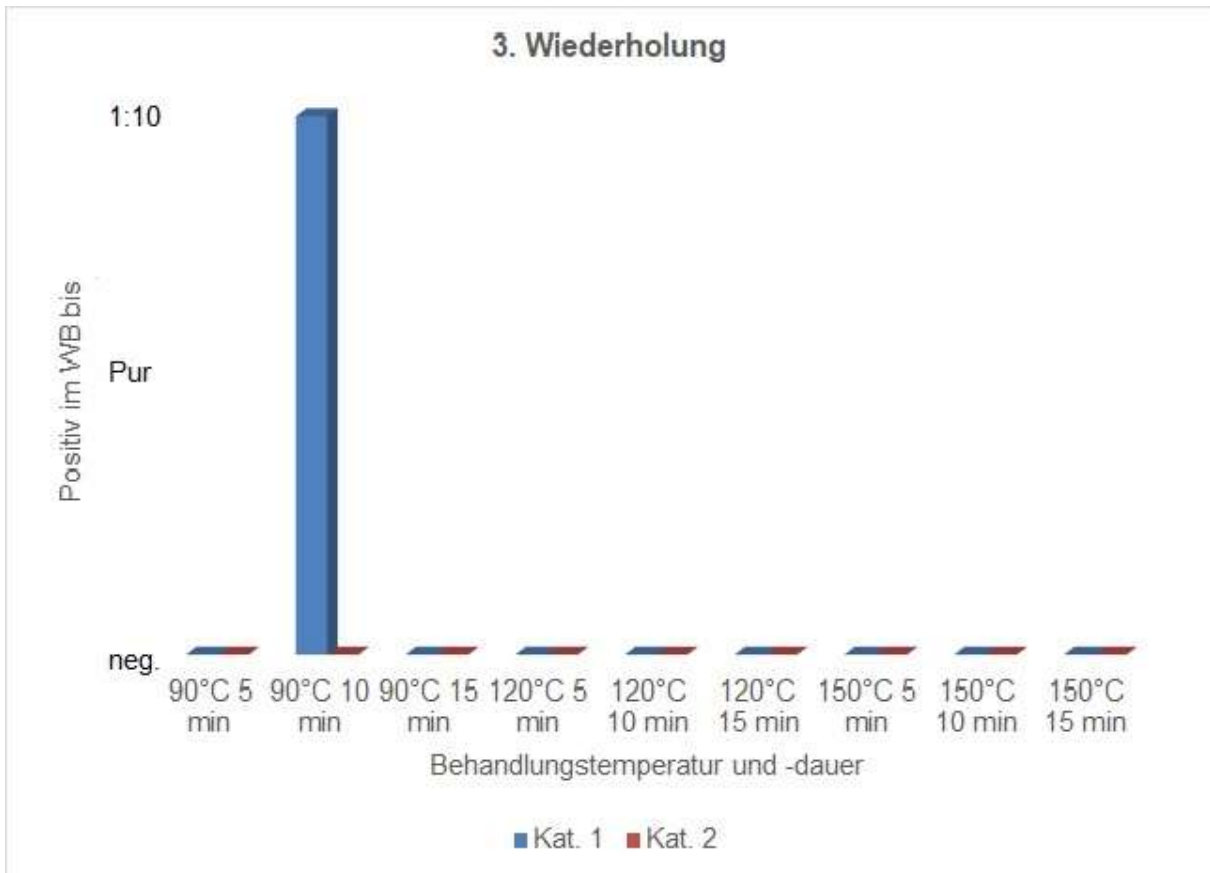
Abbildung 15: 2. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Im Rahmen der zweiten Wiederholung konnte ab 120°C und einer Behandlungsdauer von 5 min kein PrP^{Sc} mehr im Material der Kategorie 1 nachgewiesen werden. Die Proben des Materials der Kategorie 2 zeigten bei allen Behandlungsdauern und Behandlungstemperaturen kein PrP^{Sc} mehr.

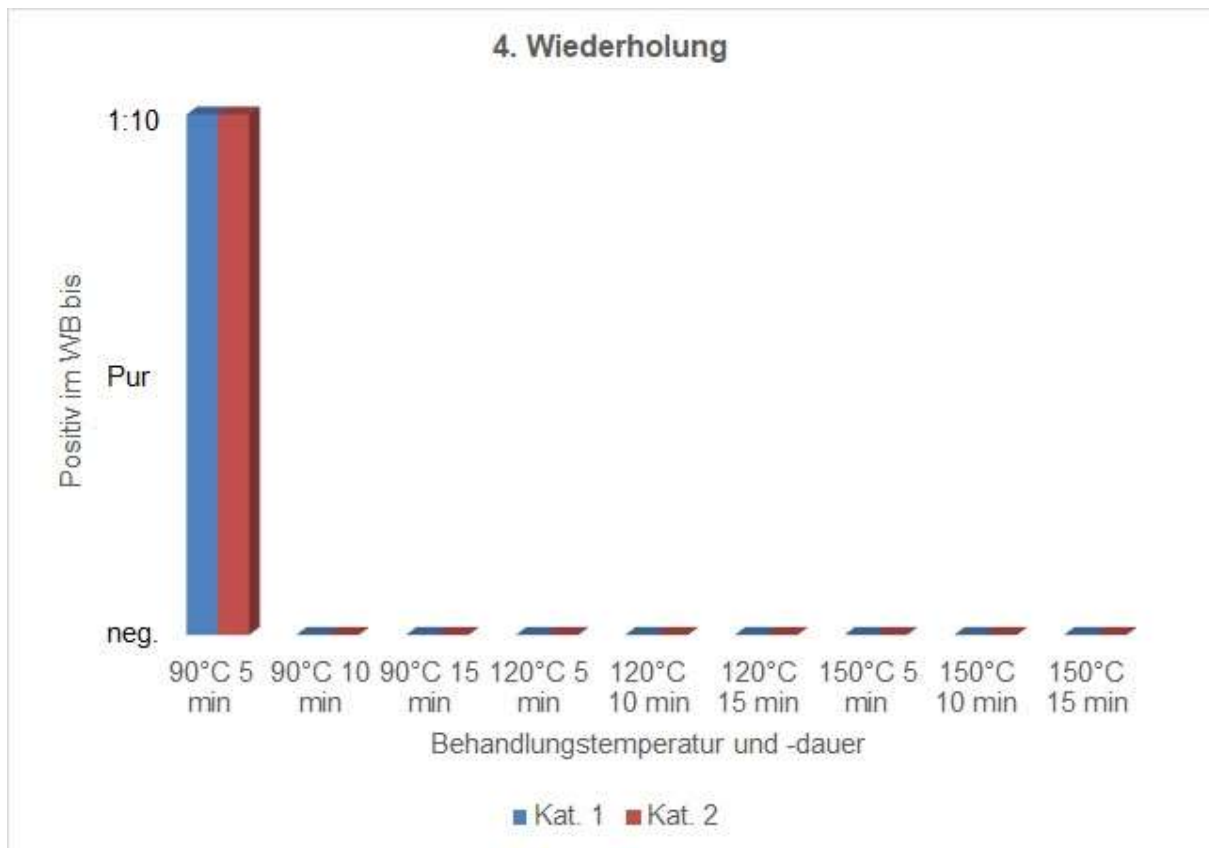
Abbildung 16: 3. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Auch bei der dritten Wiederholung konnte nur aus dem mit BSE 301 V versetztem Material Kategorie 1 noch PrP^{Sc} bei einer Behandlungstemperatur von 90°C und einer Behandlungsdauer von 10 min nachgewiesen werden. Bei den Proben der Kategorie 2 waren alle Behandlungsvarianten negativ.

Abbildung 17: 4. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2



Kat. 1 = Kategorie 1; Kat. 2 = Kategorie 2

Bei der vierten Wiederholung konnte nur bei einer Behandlungstemperatur von 90°C und einer Behandlungsdauer von 5 min PrP^{Sc} im Western Blotting bei beiden Kategorien nachgewiesen werden.

Tabelle 14 Zusammenfassung der Mikrowellenversuche von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2

Verdünnung	1. Versuch				1. Wiederholung				2. Wiederholung				3. Wiederholung				4. Wiederholung				
	Kat. 1		Kat. 2		Kat. 1		Kat. 2		Kat. 1		Kat. 2		Kat. 1		Kat. 2		Kat. 1		Kat. 2		
	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	Pur	1:10	
90°C 5 min	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
90°C 10 min	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
90°C 15 min	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 5 min	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 5 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150°C 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n = 5; + = positiv im Western Blotting; - = negativ im Western Blotting

Die Ergebnisse der mikrowellenbehandelten Proben mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei sind im Western Blotting, bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C negativ und zwar bei allen Behandlungszeiten. Bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 10 min war alles negativ. Werden die Proben nur für 5 min behandelt können bei Kategorie 1 bei zwei Wiederholungen und bei Kategorie 2 bei einer Wiederholung PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Bei einer Behandlungstemperatur von 90°C kann eine vollständige Reduktion nicht bei allen Wiederholungen erreicht werden.

Die Proben aus den vorangegangenen Mikrowellenversuchen sollten eigentlich in einem Bioassay überprüft werden. Da dies wie bereits erwähnt aus verschiedenen Gründen nicht möglich war, wurde eine Alternative gesucht. Daher wurde die Methode der PMCA mit nachfolgendem Immunoblotting als Alternative zum Bioassay gewählt.

5.4 PMCA *in-vitro* Amplifizierung von Prionen

Es ist bekannt, dass im Western Blotting der Nachweis nicht belastbar ist, deshalb sollte ein Bioassay erfolgen (zur Bestimmung des Titers im Hamsterhirnhomogenat und um zu überprüfen, ob die Probe inaktiviert ist). Da es keine Möglichkeit gab, einen Bioassay durchzuführen, wurde die *in vitro*-Amplifizierung durchgeführt, die sogenannte Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA).

Als Grundlage für die PMCA wurde zunächst Hamsterhirnhomogenat von nicht infizierten Hamstern (negatives HHH) hergestellt. Dieses Hirnhomogenat dient als PrP^C-Quelle.

5.4.1 Herstellung von Hamsterhirnhomogenaten

Es wurden drei Verarbeitungsvarianten getestet, um eine optimale Ausbeute an PrP^C des gewonnenen Hirnmaterials zu erreichen. Dazu wurde das bei - 80° C gefrorene Hamsterhirn zerkleinert, in PMCA-Puffer 1:10 verdünnt und weiterverarbeitet. Bei der ersten Variante wurde nach der Verdünnung nur abzentrifugiert, bei der zweiten wurde abzentrifugiert und filtriert, in der dritten Variante wurde nur filtriert.

Das so gewonnene Hamsterhirnhomogenat wurde für die PMCA mit Scrapie 263 K infiziertem Hamsterhirnhomogenat (PrP^{Sc}-Quelle) gemischt. Für die Amplifizierung wurde immer das gleiche mit Scrapie 263 K infizierte Hamsterhirnhomogenat eingesetzt.

Nach ein bis zwei Amplifikationsrunden wurde die Ausbeute an PrP^{Sc} mittels Western Blotting analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 beschrieben.

Tabelle 15: Vergleichende Ergebnisse der PMCA mit Hamsterhirnhomogenaten (unterschiedliche Verarbeitungsmethoden)

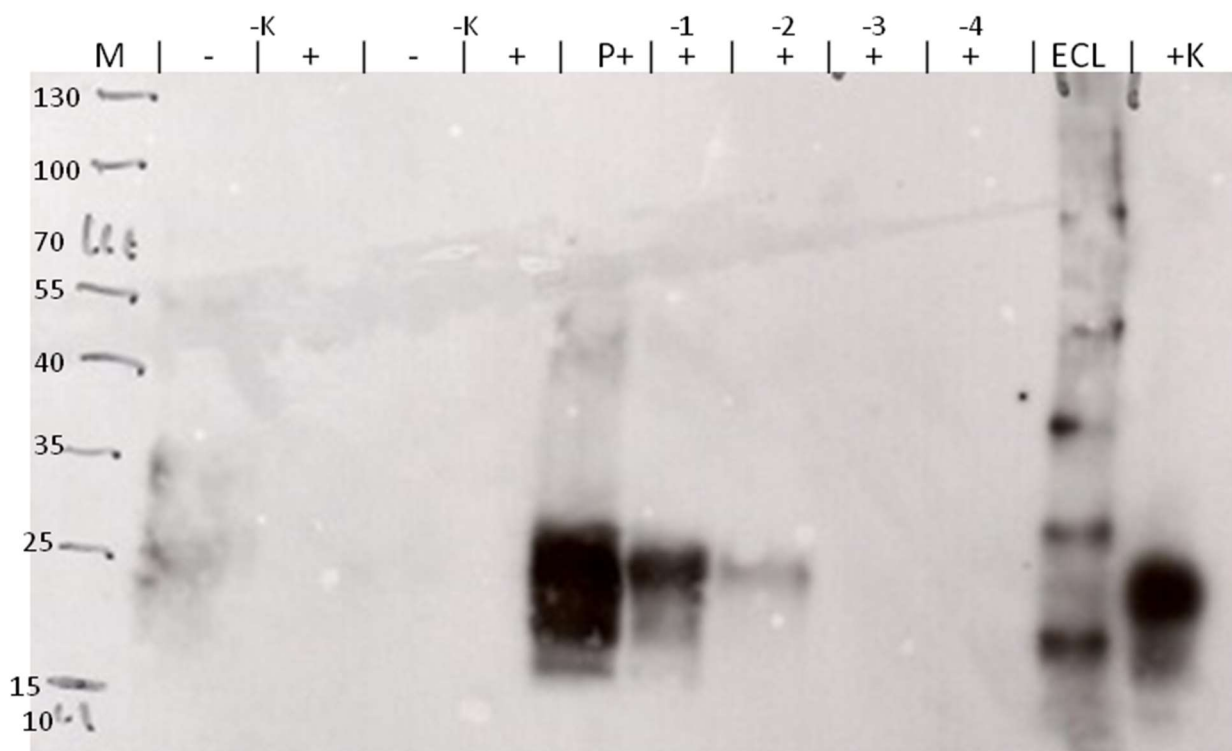
Verarbeitungsmethode	1. PMCA	2. PMCA
Abzentrifugieren	WBE 2	WBE 3
Abzentrifugieren und Filtrieren	WBE 1	WBE 2
Filtrieren	n.n.	n.d.

n = 1; n.n. = nicht nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt; WBE = Western Blotting Einheit

Durch Abzentrifugieren konnte ein Hirnhomogenat erzeugt werden, das eine Amplifizierung des PrP^{Sc} nach 2 Amplifikationsrunden um 3 WBE ermöglicht. Eine zusätzliche Filtration des Überstandes verbessert dieses Ergebnis nicht. Hirnmaterial, das durch eine direkte Filtration des Hirnhomogenats hergestellt wurde, eignete sich nicht für eine Amplifikation von PrP^{Sc}.

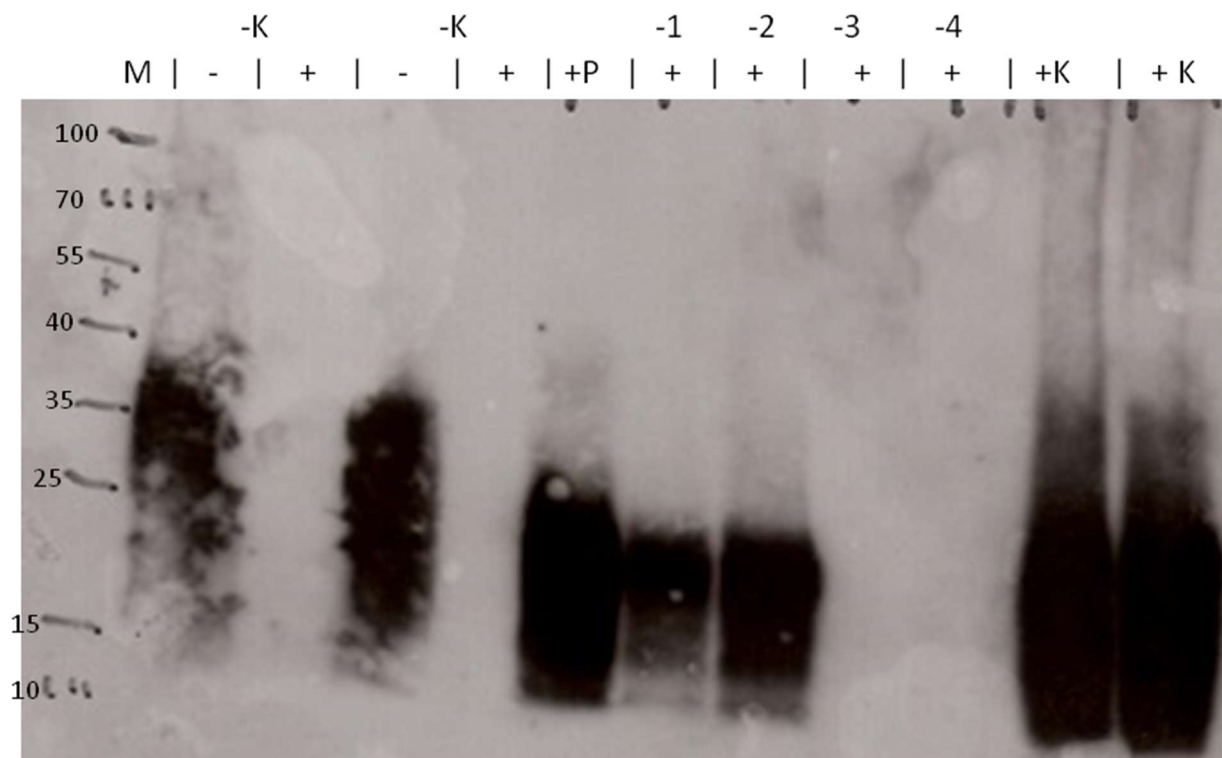
Die Abbildungen 18 - 21 zeigen die Ergebnisse der PMCA mit den verschiedenen präparierten Hamsterhirnhomogenaten im Western Blotting.

Abbildung 18: Abzentrifugieren 1. Runde PMCA



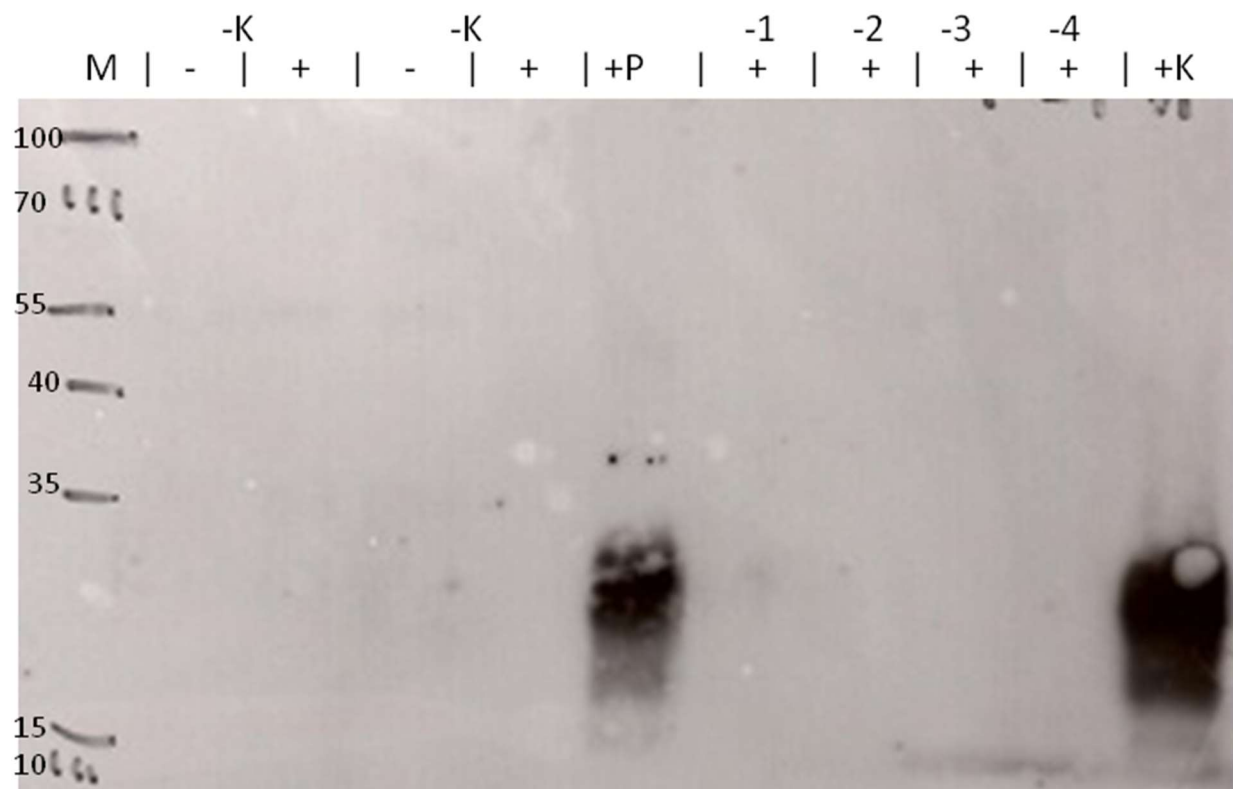
M = Maker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau; ECL = ECL Marker

Abbildung 19: Abzentrifugieren 2. Runde PMCA



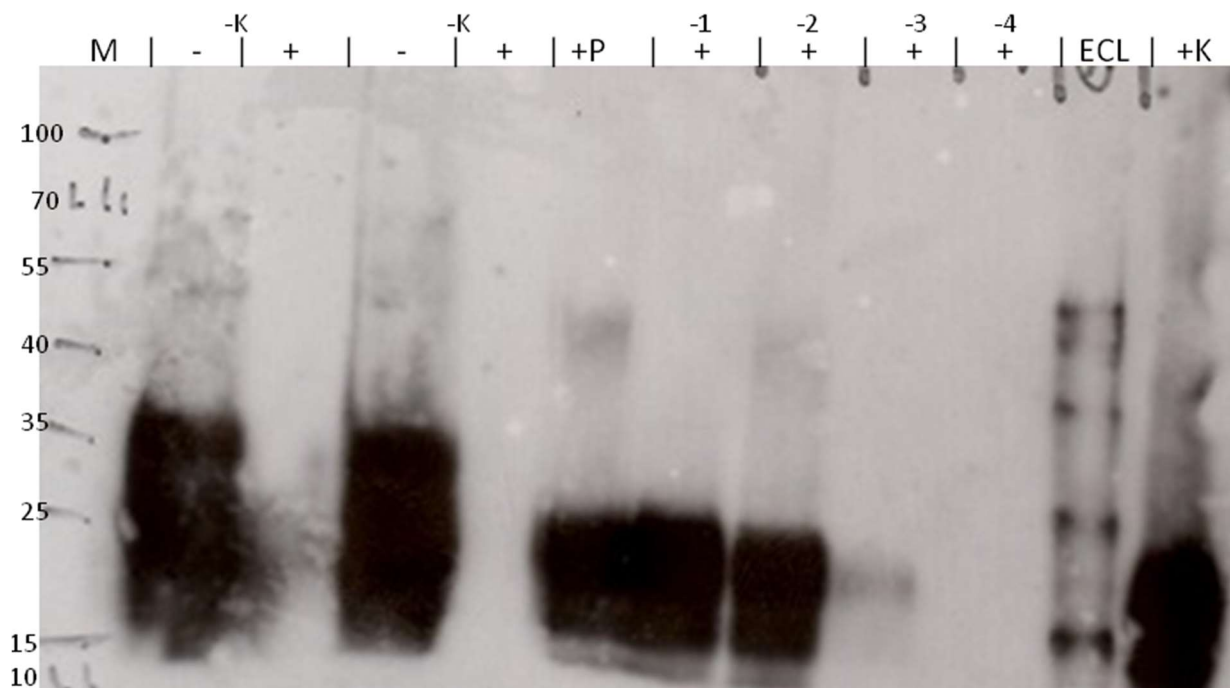
M = Maker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau

Abbildung 20: Abzentrifugieren und Filtrieren 1. Runde PMCA



M = Maker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau

Abbildung 21: Abzentrifugieren und Filtrieren 2. Runde PMCA



M = Marker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau; ECL = ECL Marker

5.4.2 Optimierung der PMCA

Die von Lacroux und Mitarbeiter (2012) beschriebene Methode der PMCA wurde in unserem Labor etabliert. Zur Optimierung der Amplifikationseffizienz wurden zunächst verschiedene Beschallungsstärken und -zeiten untersucht. Dazu wurden die Beschallungsstärken und -zeiten und auch die Menge an verwendetem Material aus vier der gängigsten Veröffentlichungen vergleichend getestet (wie in Tab. 16).

nach Lacroux et al. 2012

51% (360 Watt) 29 min 30 s Inkubation 30 s beschallen. 63 µl negatives HHH + 7 µl Probe

nach Ding et al. 2012:

77% (540 Watt) 29 min 20 s Inkubation 40 s beschallen. 72 µl negatives HHH + 8 µl Probe

nach Saá et al. 2006:

51% (360 Watt) 30 min Inkubation 40 s beschallen. 81 µl negatives HHH + 9 µl Probe

nach Gonzales-Montaban et al. 2011: 43% (300 Watt) 30 min Inkubation 30 s beschallen. 90 µl negatives HHH + 10 µl Probe

Die Beschallungsstärken wurden auf das in unserem Labor verwendete Gerät umgerechnet. Jede Variante wurde über zwei Runden in der PMCA getestet. Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte danach mittels Western Blotting und wird in WBE angegeben.

Tabelle 16: Vergleichende Analyse der Beschallungsstärken und -zeiten

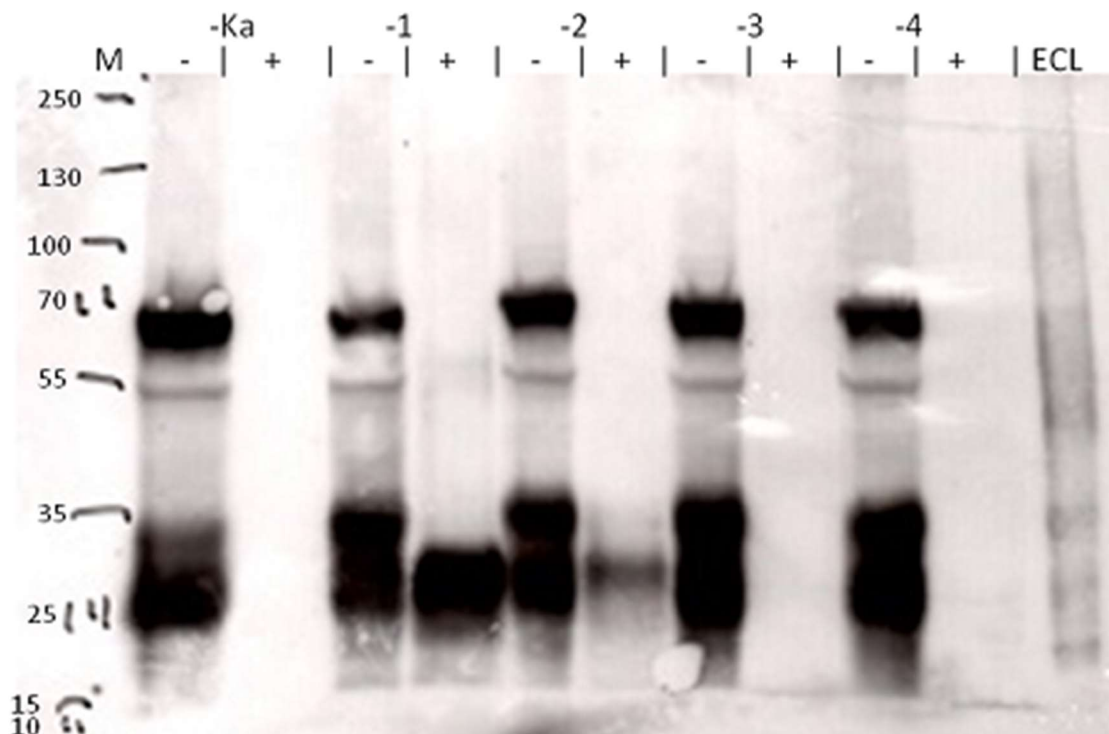
Einstellungen	nach Lacroux et al., 2012)	Nach Ding et al., 2012	Nach Saá et al., 200	nach Gonzalez-Montalban et al., 2011
PMCA 1. Runde	WBE 1	WBE 1	WBE 2	WBE 1
PMCA 2. Runde	WBE 1	WBE 1	WBE 3	WBE 1

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ergebnisse der PMCA mit den verschiedenen Beschallungsstärken und -zeiten im Western Blotting.

Am geeignetsten erwies sich die Methode nach Saá et al., da hier nach nur zwei Runden PMCA bis zu WBE 3 PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte. Deshalb erfolgten alle weiteren Versuche auf der Grundlage folgender Einstellungen:

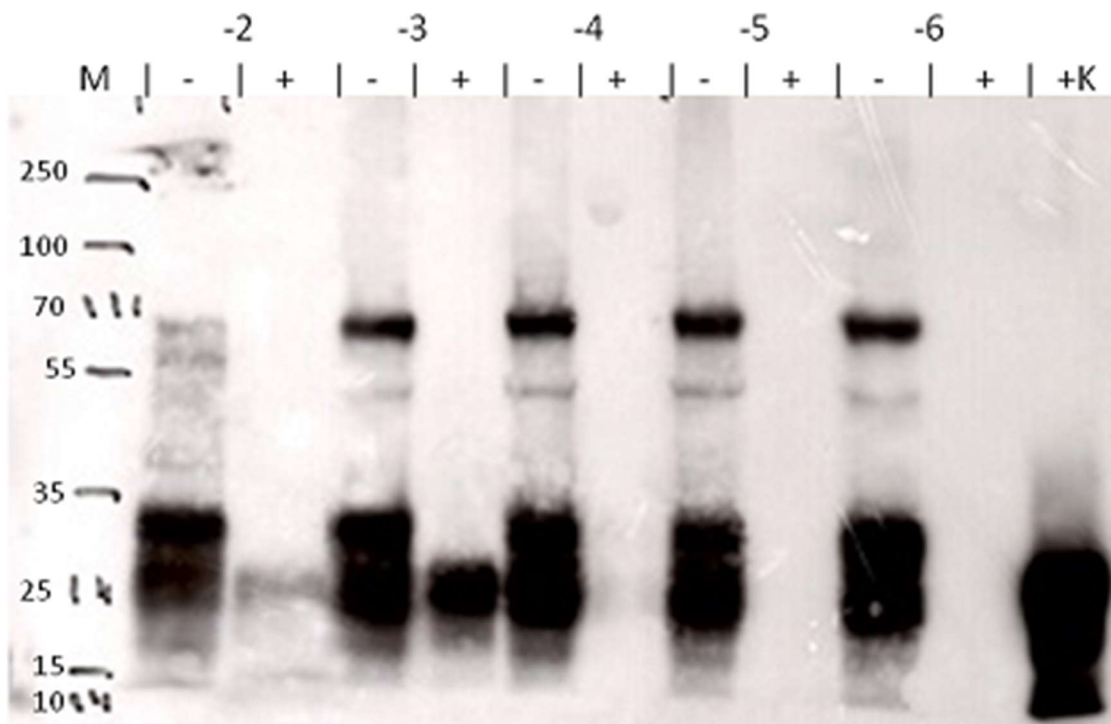
51% (360 Watt), 29 min, 20 s Inkubation 40 s beschallen für 48 Zyklen bei 37°C. Es wurden 81 µl negatives Hamsterhirnhomogenat mit 9 µl Probe gemischt.

Abbildung 22: 1. PMCA nach der Methode von Saá et al. (2006)



M = Maker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau; ECL = ECL Marker

Abbildung 23: 2. PMCA nach der Methode von Saá et al. (2006)



M = Maker; -K = negativ Kontrolle; +K = positiv Kontrolle; - = ohne PK Verdau; + = mit PK Verdau

5.4.3 Nachweis von PrP^{Sc} aus Scrapie 263 K infizierten Hamsterhirnhomogenat mittels PMCA

Im nächsten Schritt wurde nun das vorhandene infizierte Hirnmaterial (Scrapie 263 K) einer PMCA unterzogen, um dadurch die Prionenkonzentration dieses Materials für die nachfolgenden Inaktivierungsbehandlungen zu erhöhen.

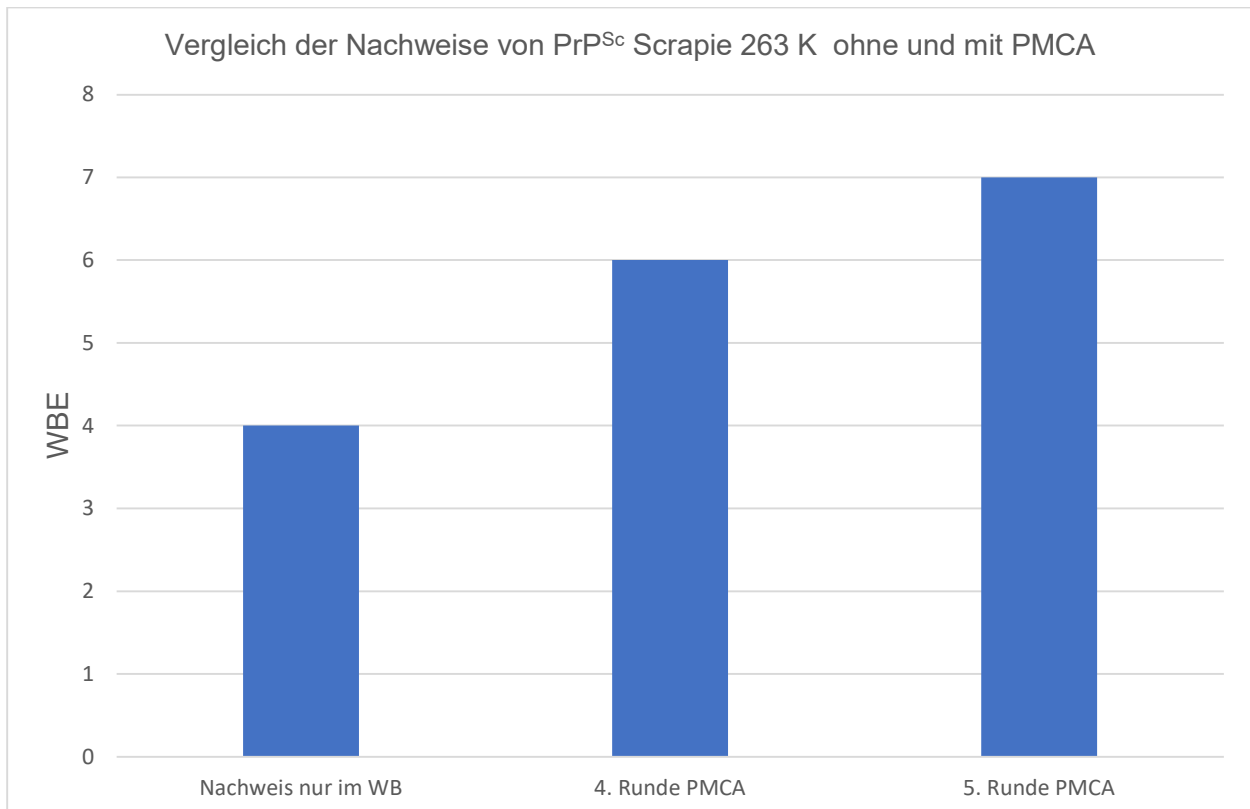
Dazu wurden 9 µl des mit Scrapie 263 K Hamsterhirnhomogenats mit 81 µl Substrat (Hirnhomogenat nicht infizierter Hamster) in einem PCR Reaktionsgefäß (mit 8-13 Zirkonia Beads) gemischt und im Sonicator beschallt (48 Zyklen = eine Runde PMCA). Nach jeder Runde wurde neues Substrat hinzugegeben. Ab der 4. Runde wurde die Probe mit dem Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll bearbeitet und der Nachweis auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} mittels Western Blotting überprüft (Tab 17).

Tabelle 17: Vergleich der Nachweise von PrP^{Sc} Scrapie 263 K Hamsterhirnhomogenat nach 4., 5. Runden PMCA (n=2) sowie nur mittels Western Blotting in WBE

	4. Runde PMCA	5. Runde PMCA	Nachweis nur im WB (ohne PMCA)
WBE	6	7	4

WBE = Western Blotting Einheit

Abbildung 24: Vergleich der Nachweise von PrP^{Sc} Scrapie 263 K Hamsterhirnhomogenat nach 4., 5. Runden PMCA (n=2) sowie nur mittels Western Blotting in WBE



Der Vergleich zeigt, dass nach 5 Runden PMCA 3 WBE mehr vorhanden sind, dies entspricht 3 log₁₀-Stufen mehr als im Ausgangsmaterial ohne PMCA.

Mit diesen Ergebnissen kann man nun das Inaktivierungspotential der Mikrowellenbehandlung zeigen. Mit den so amplifizierten Prionenkonzentrationen kann eine Inaktivierung um 4-5 log₁₀-Stufen validiert werden kann (von WBE 7 auf WBE 2-3).

5.4.4 Inaktivierungsversuche von mit Scrapie 263 K vermischtem Peptonwasser

Für die weiteren Inaktivierungsvalidierungen wurde anstelle von Fleischbrei Peptonwasser als Matrix verwendet. Fleischbrei kann sich auf Grund seiner Konsistenz und Beschaffenheit negativ auf das Ergebnis der PMCA auswirken. Peptonwasser ist ein Gemisch aus Peptiden

und Aminosäuren und weist immer die gleiche Konsistenz und Beschaffenheit auf und kann als Fleischbreiersatz angesehen werden.

Es wurden 9 ml Peptonwasser mit 1 ml Scrapie 263 K-Hamsterhirnhomogenat (Tab. 17 WBE 6 nach 4 Runden PMCA bzw. WBE 7 nach 5 Runden PMCA) vermischt analog zu den initialen Inaktivierungsversuchen mit Fleischbrei.

Das so mit Scrapie 263 K-Prionen versetzte Peptonwasser wurde in die Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen eingebracht und mit 90°C, 120°C oder 150°C sowie 5, 10 oder 15 min behandelt. Das Gefäß zur Messung von Temperatur und Druck wurde mit 9 ml Peptonwasser und 1 ml bidest. H₂O befüllt. In diesem Gefäß befanden sich Messfühler für die Analyse der Parameter Temperatur und Druck.

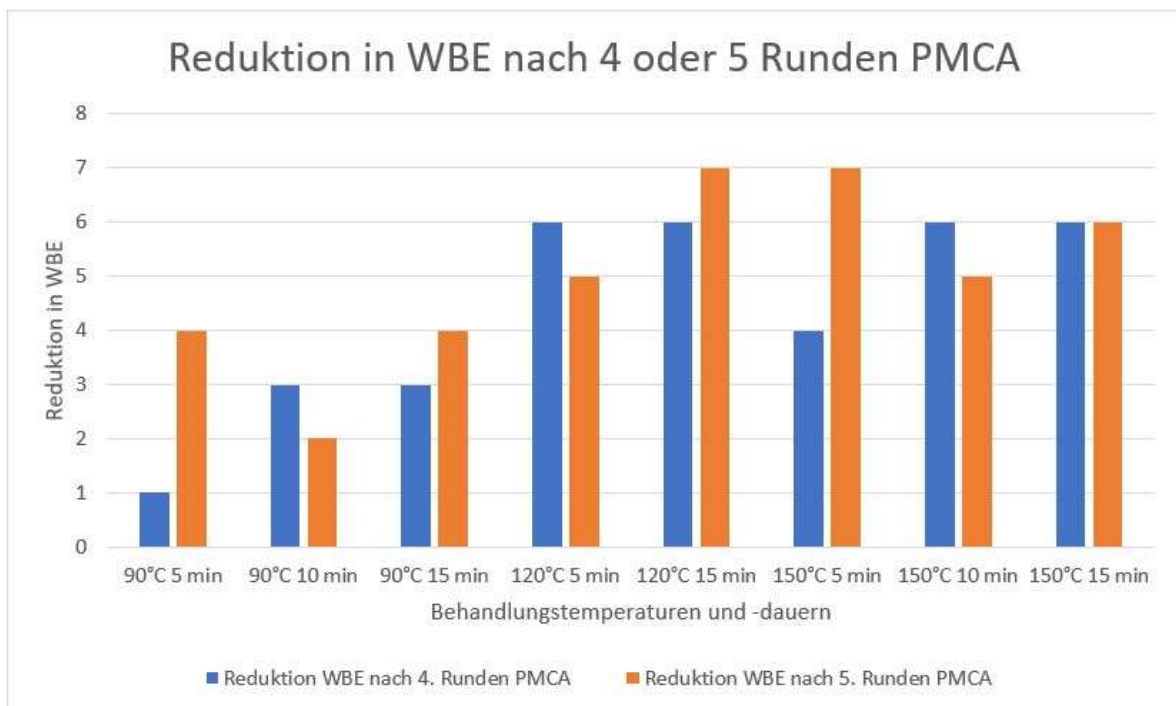
Im Anschluss an die Behandlung in der Mikrowellenanlage erfolgte die Verdünnung des Materials bis zu einer vorher festgelegten Verdünnungsstufe. Hier wurden die Ergebnisse aus den vorangegangenen Inaktivierungsversuchen aus der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen zurate gezogen. Bei einer Behandlungstemperatur von 90°C wurde bis zu einer Verdünnung von 1:10 bis 1:1 000 000 verdünnt, bei 120°C 1:10 bis 1:100 000 und bei 150°C 1:10 bis 1:1 000. Anschließend wurde von jeder Verdünnungsstufe 9 µl mit 81 µl Substrat (Hirnhomogenat nicht infizierter Hamster) in einem PCR Reaktionsgefäß (mit 8-13 Zirkonia Beads) gemischt und im Sonicator beschallt (48 Zyklen = eine Runde PMCA). Nach jeder Runde wurde neues Substrat hinzugegeben. Ab der 4. Runde und 5. Runde wurde die Proben mit dem Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll bearbeitet und der Nachweis auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} mittels Western Blotting überprüft wie in Tab. 18 und Abb. 25 gezeigt.

Tabelle 18: Ergebnisse der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser und anschließender PMCA in WBE

	4.Runde PMCA Ausgangsmaterial: WBE 6	Reduktion WBE	5.Runde PMCA Ausgangsmaterial: WBE 7	Reduktion WBE
90°C 5 min	WBE 5	1	WBE 3	4
90°C 10 min	WBE 3	3	WBE 5	2
90°C 15 min	WBE 3	3	WBE 3	4
120°C 5 min	n.n.	6	WBE 2	5
120°C 15 min	n.n.	6	n.n.	7
150°C 5 min	WBE 3	4	n.n.	7
150°C 10 min	n.n.	6	WBE 2	5
150°C 15 min	n.n.	6	WBE 1	6

n.n. = nicht nachweisbar; WBE = Western Blotting Einheit

Abbildung 25: Reduktion in WBE nach der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser und anschließender PMCA



Die Ergebnisse der Versuche mit den mikrowellenbehandelten Proben des mit Scrapie 263K versetztem Peptonwasser und anschließender PMCA zeigen schon bei einer Behandlungstemperatur und -dauer von 90°C und 10 min eine Reduktion von WBE 2. Um eine vollständige Reduktion im Sinne der Desinfektion zu erzielen braucht man eine Reduktion um 4 bis 5 Log₁₀-Stufen (Reduktion um WBE 4 bis 5). Dies konnte bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 15 min gewährleistet werden.

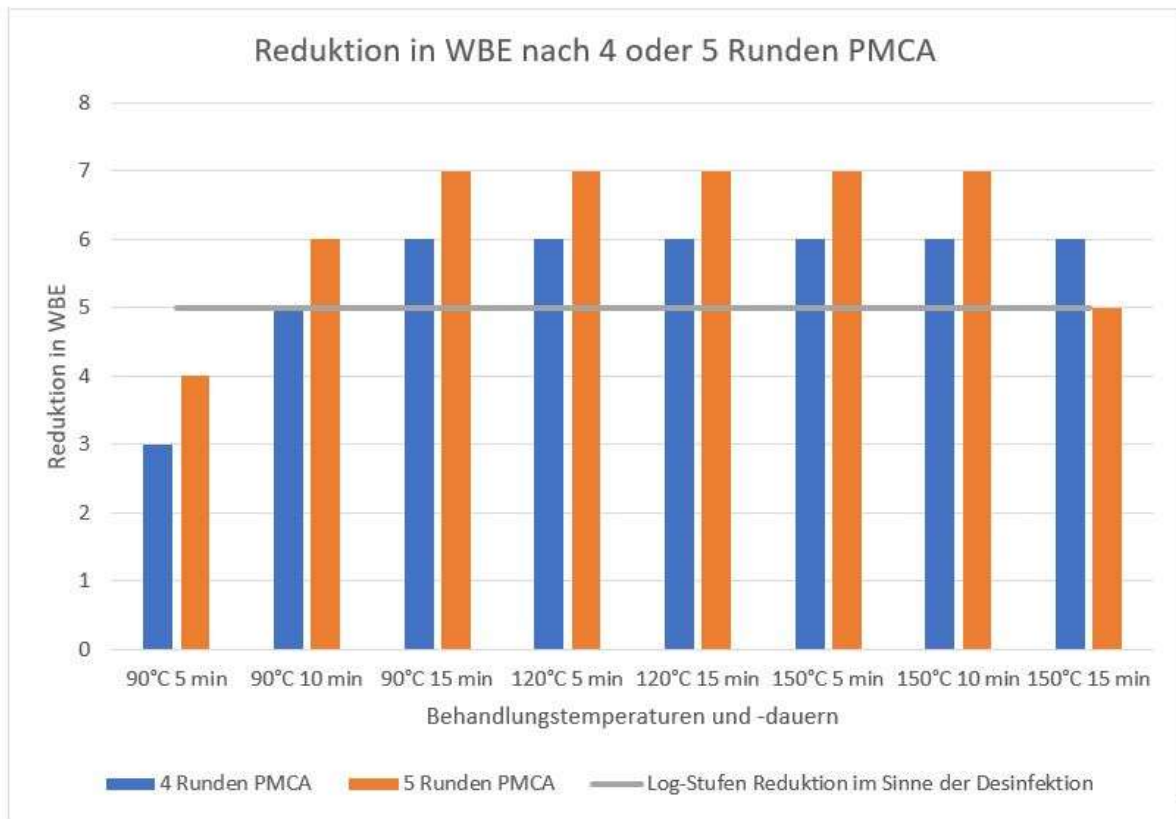
Bei der Wiederholung des Versuchs der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser wurden ausgewählte Behandlungstemperaturen und -dauern aus den in den Vorversuchen getesteten Werten ausgewählt. Diese gewählten Temperaturen und -dauern sollten Eckwerte darstellen (wie in Tab. 19 dargestellt).

Tabelle 19: Eckwertebestimmung der Wiederholung des Versuchs der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser mit PMCA in WBE

	4. Runde PMCA	Reduktion WBE	5. Runde PMCA	Reduktion WBE
90°C 5 min	WBE 3	3	WBE 3	4
90°C 10 min	WBE 1	5	WBE 1	6
90°C 15 min	n.n.	6	n.n.	7
120°C 5 min	n.n.	6	n.n.	7
120°C 15 min	n.n.	6	n.n.	7
150°C 5 min	n.n.	6	n.n.	7
150°C 10 min	n.n.	6	n.n.	7
150°C 15 min	n.n.	6	WBE 2	5

n.n. = nicht nachweisbar im WB; WBE = Western Blotting Einheit

Abbildung 26: Eckwertbestimmungen der Wiederholung des Versuchs, Reduktion in WBE nach 4 oder 5 Runden PMCA nach der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser



Bei den Ergebnissen der Wiederholung konnte schon bei einer Behandlungstemperatur und -Dauer von 90°C und 10 min eine Reduktion von 5 WBE erreicht werden, was einer Inaktivierung im Sinne der Desinfektion entspricht.

6 Diskussion

Prionen zeichnen sich im Gegensatz zu den meisten Viren und Bakterien durch eine sehr hohe Resistenz gegenüber verschiedenen Inaktivierungsmethoden aus (Taylor, 2000, 2004). Sie lassen sich nur sehr schwer bis gar nicht mit Hilfe gängiger Methoden inaktivieren. Mit chemischen (Mittel zur Desinfektion) als auch physikalischen Mitteln wie Hitze oder Kälte ist eine Reduktion der Prionen nur schwer möglich (Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, 2001; Ritchie und Ironside, 2017). Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie Studien zufolge auch als Standard für die Inaktivierung von Mikroorganismen in Betracht gezogen (Lehmann *u. a.*, 2009; Beekes, 2010). Prionen als Standard für die Desinfektion/Sterilisation zu nutzen kann auch Nachteile haben. Die benötigte Behandlungsdauer und -temperatur zur Inaktivierung von Prionen ist deutlich höher als für die meisten Viren und Bakterien, selbst für Endosporen. Dadurch entstehen höhere Kosten, es dauert länger und es kann nicht für alle Materialien angewandt werden. Gelingt allerdings mithilfe einer Methode eine Inaktivierung von Prionen, so sind auch alle Bakterien und Viren sicher inaktiviert und es ist ein verlässlicher Schutz vor einer Infektion gegeben.

In der Literatur finden sich viele Veröffentlichungen, die sich mit der Inaktivierung von Prionen im Sinne einer Desinfektion/Sterilisation befassen. Es geht dabei um die Dekontamination in unterschiedlichen Bereichen, wie z.B. der Dekontamination von medizinische Geräten, Oberflächen und kontaminiertem Wasser/Abwasser.

Für die Dekontamination von medizinischen Geräten und Oberflächen, die mit Prionen kontaminiert sind (für die Versuche wurden mit Scrapie 263 K-Prionen kontaminierte Drähte verwendet), beschreiben Fichet und Mitarbeiter verschiedene chemische Ansätze (Desinfektion mit einem Mittel auf Phenolbasis, einem alkalischen Reiniger, einem Enzymreiniger), die besser oder gleichwertig geeignet sind wie die von der WHO vorgeschlagene thermische Standardmethode (Autoklavieren bei 134°C für 18 min; Literatur WHO). Dabei war eine Kombination aus einem Enzymreiniger (Klenzyme, STERIS, 0,8% v/v in Wasser für 5 min bei 43°C) und verdampftem Wasserstoffperoxid (1,5 mg/l für 3 Stunden bei 25°C) die am besten geeignetste Methode für elektronische Bauteile.

Bei dieser Kombination konnte eine Reduktion von 5-6 log₁₀-Stufen erreicht werden. Der Nachweis von PrP^{res} erfolgte über einen Bioassay mit anschließender Bestätigung über ELISA und Western Blotting (Fichet *u. a.*, 2004). Diese Methode ist vermutlich für die Dekontamination von Kategorie 1 Material nicht sinnvoll, da der Einsatz von Enzymreinigern und Wasserstoffperoxid die weitere Verwendung des inaktivierten Materials z.B. als Düngemittel einschränkt.

Ding und Kollegen beschreiben die Dekontamination von Wasser und Abwasser mit Hilfe von Ozon in Kombination mit pH-Wert, Temperatur und Kontaktzeit. Sie erreichen gute Ergebnisse für die Inaktivierung von Prionen (Scrapie 263 K) in Wasser und Abwasser bei Ozonmengen von 13,0 mg/l, pH 4,4 und 20°C (Ding *u. a.*, 2012). Diese Methode scheint auch eine gute Möglichkeit zur Dekontamination von z.B. Abwasser von Schlachthöfen zu sein. Hierdurch könnte die Übertragung von Prionen und das TSE-Risiko minimiert werden.

Eine weitere Methode zur Inaktivierung von Prionen wird von Hughson und Kollegen beschrieben. Die Autoren benutzten Hypochlorsäure (BrioHOCl™, Briotech) für ihre Inaktivierungsversuche von Prionen, darunter auch Scrapie 263 K. Sie zeigten bei unterschiedlichen Prionen Stämmen, so unter anderem auch BSE, CJD, CWD sowie bei Amyloid-Proteinen, dass nach einer Behandlung mit BrioHOCl™ keine Prionen mehr nachweisbar waren (Hughson *u. a.*, 2016). Hypochlorsäure (HOCl) wird auf natürliche Weise von neutrophilen Granulozyten zur Immunabwehr in Wirbeltieren produziert. Synthetische Präparate, die HOCl enthalten werden zur Desinfektion z.B. für Badewasser in Schwimmbädern verwendet. Es stellt sich die Frage ob eine Behandlung mit HOCl (BrioHOCl™) auch für die Behandlung von Risikomaterial der Kategorie 1 oder 2 geeignet wäre. Dies müsste in weiteren Untersuchungen bestätigt werden, auch im Hinblick auf die weitere Nutzung des Restmaterials z.B. für die Landwirtschaft.

Der Goldstandard zur Behandlung von für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Nebenprodukten zur Verminderung des Infektionsrisikos wird in den Verordnungen (EG) Nr. 1069/2009 und 142/2011 klar geregelt. So ist zurzeit für tierische Nebenprodukte der Kategorie 1 (u.a. Prionen-haltiges Material) die Sterilisation und Vernichtung (Verbrennung) vorgeschrieben. Diese Methode zerstört aber wichtige Nährstoffe, erzeugt Emissionen bei der Verbrennung und verursacht Kosten. Außerdem kann der in diesem Material enthaltene Phosphor nach der Verbrennung (meist als Mitverbrennung mit anderen Stoffen) nicht wirklich gut zurückgewonnen werden. Phosphor gilt aber als endliche Ressource und sollte im Sinne der Nachhaltigkeit auf alle Fälle recycelt werden.

Über die Jahre wurden die Verordnungen zur Verarbeitung und Inverkehrbringen der verschiedenen Materialkategorien zum Teil gelockert, so kann z.B. Material der Kategorie 2 zum Teil in Biogas- oder Kompostierungsanlagen verbracht werden, um anschließend als organisches Düngemittel Verwendung zu finden. Spezifisches Risikomaterial (Kategorie 1) muss grundsätzlich von anderen Lebensmitteln getrennt und eindeutig als solches gekennzeichnet werden, z.B. Material mit BSE Risiko muss blau eingefärbt werden. Bei einer Vermischung von Materialien unterschiedlicher Kategorien richtet sich die Weiterverarbeitung immer nach den Vorgaben der Kategorie des höheren Risikos. So muss z.B. eine Mischung

von Kategorie 1- und Kategorie 2-Material nach den Vorgaben zur Verwertung von Kategorie 1-Material behandelt werden.

Aufgrund der Ansprüche der Gesellschaft nach einer nachhaltigen, umweltverträglichen Tierproduktion stellt sich hier eine zentrale Frage:

Können wir es uns in der heutigen Zeit leisten auf wertvolle Ressourcen zu verzichten?

Der Rohstoff Phosphor ist weltweit knapp, wird aber in der Landwirtschaft dringend benötigt (Rogasik *u. a.*, 2003).

Die Gewinnung von Biogas aus Schlachtabfällen (Kategorie 2 und 3) mit einem hohen Anteil an Methan aus Fetten und Eiweißen müsste auf Schlachtabfälle der Kategorie 1 ausgeweitet werden.

Die Herstellung von Biodiesel aus tierischen Abfallfetten der Kategorie 1 und Kategorie 2 wird bereits in Deutschland im industriellen Maßstab produziert. Biodiesel aus tierischen Abfallfetten kann aber nicht in Deutschland genutzt werden, auf Grund der deutschen Treibhausgas (THG)- Quote. Seit langem ist bekannt, dass fossile Brennstoffe endlich sind. Tierische Abfallfette (wenn Sie nach der Hygieneverordnung sicher aufbereitet werden) sind eine fortwährende Quelle zur Herstellung von Biodiesel. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Entstehung von Treibhausgas bei der Herstellung von Biodiesel aus tierischen Fetten im Vergleich zum Diesel aus fossilen Brennstoffen (Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie e.V). Abzuwägen sind hier auch die Kosten-Nutzenrechnung sowie die CO₂ Bilanz. In Deutschland gilt seit Januar 2021 die CO₂-Bepreisung.

Eine weitere Nutzung von tierischen Reststoffen als ständiger Rohstoff zeigt sich in der Nutzung von Schlachtabfällen. Braunegg und Kollegen zeigten im Projekt „Verwertung von Reststoffen aus Schlachtung und Fleischverarbeitung mit hoher Wertschöpfung“, dass Schlachtabfälle durch einfache Hydrolyse in Fett und Aminosäuren getrennt werden können. Die Fette könnten wie oben beschrieben zu Biodiesel oder Biogas weiterverarbeitet werden. Aus den Aminosäuren wurden biologisch abbaubare Kunststoffe entwickelt, die Polyhydroxyalkanoaten (PHA). Aus diesen wurden z.B. Kunststoff-Formteile und Klebstoffe hergestellt (Braunegg, 2006).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, eine Möglichkeit zu finden Prionen sicher zu inaktivieren. Durch diese Inaktivierung sollten die stofflichen Eigenschaften des behandelten Materials aber möglichst erhalten bleiben. Nach einer Behandlung darf verlässlich kein TSE-Risiko mehr von dem Material ausgehen. Das spezifische Risikomaterial (Kategorie 1- Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage) könnte z.B. als Düngemittel, Biogas, Biodiesel,

Phosphor- oder Aminosäurequelle dienen und nachhaltig in den Energiekreislauf zurückgeführt werden.

Nicht nur Risikomaterial z.B. aus Schlachthäusern und kontaminiertes Wasser muss fachgerecht dekontaminiert werden, auch medizinische Geräte oder Oberflächen können eine Gefahr darstellen. Es sind mehrere Fälle bekannt geworden in denen Patienten operiert wurden, die keine Symptome einer Prionen-Erkrankung zeigten, aber zu einem späteren Zeitpunkt eine Erkrankung durch Prionen bestätigt wurde (lange Inkubationszeit). Wenn medizinische Geräte nicht vollständig dekontaminiert wurden, können dadurch weitere Patienten infiziert werden (Giles *u. a.*, 2017). Es bedarf also unbedingt wirksamer Verfahren für die Desinfektion der verwendeten Materialien und Geräte um Patienten und Personal vor einer Infektion mit Prionen zu schützen.

Eine Behandlung mittels Thermodruck-Hydrolyse ermöglicht den beschleunigten Abbau von organischen Abfällen bzw. organisch gefährlichen Stoffen. Normalerweise laufen deren Abbauprozesse in der Natur oder bei herkömmlicher Entsorgung sehr langsam ab. Solche Substanzen sorgen noch lange dafür, dass bestimmte Produkte oder Flächen kontaminiert bleiben. Sie sind dadurch unter Umständen für Mensch und Tier gefährlich und stellen eine Infektionsquelle dar. Die Entsorgung und Behandlung mittels Thermodruck-Hydrolyse beschleunigt die enzymatische Inaktivierung und den Abbau organisch bedenklicher Materialien um ein Vielfaches. Dies geschieht mittels des erhöhten Drucks und der Prozesstemperatur. Rest- und Abfallstoffe wie z. B. hochgradig belastete Abwässer oder Biomasse, die normalerweise nur langsam abgebaut werden, können mittels Thermodruck-Hydrolyse zügig inaktiviert und abgebaut werden. Dies geschieht mit diesem Verfahren in den meisten Fällen innerhalb von weniger als 30 Minuten (Elbing und Dünnebeil, 1999). Bei dieser Methode fungiert Wasser als Lösungsmittel für die jeweils gefährlichen Substanzen. Im Rahmen der Thermodruck-Hydrolyse werden subkritische Bedingungen hergestellt. Die Materialien werden bei rund 90 bis 220°C bei hohem Druck zwischen 2 und 20 bar für eine bestimmte Zeit inkubiert. Durch die Bedingungen in der Thermodruck-Hydrolyse wird die Oberflächenspannung gesenkt sowie die Benetzungseigenschaften und die relative Dielektrizitätskonstante der organisch gefährlichen Stoffe verändert. So können diese in subkritischem Wasser gelöst werden. Es kommt zur Hydrolyse der gefährlichen Materialien (Elbing und Dünnebeil, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thermodruckhydrolyse mit einer Behandlung durch Mikrowellen kombiniert, um Prionen zu inaktivieren. Dazu wurde Fleischbrei der Kategorie 1 oder Kategorie 2 aus der Tierkörperbeseitigungsanlage mit Scrapie 263 K bzw. BSE 301 V vermischt. In der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen wurde dieses Gemisch bei 90°C, 120°C und 150°C und einer Behandlungsdauer von 5, 10 und 15 min behandelt. Anschließend

wurde es entnommen, verdünnt und über Western Blotting auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} untersucht.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Inaktivierung der Proben von dem versetztem Material der Kategorie 1 mit Scrapie 263 K bei 120°C und 5 min und BSE 301V bei 120°C und 10 min erreicht wird. Bei Proben von dem versetzten Material der Kategorie 2 konnte sowohl bei Scrapie 263 K als auch bei BSE 301 V bei 120°C und 10 min eine vollständige Inaktivierung erreicht werden. Der Nachweis mittels Western Blotting zeigt hier eine Inaktivierung der Prionen. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Inaktivierung, die zur Sicherheit mit einem Bioassay überprüft werden sollte.

Laut Giles stellt der Bioassay die einzige Möglichkeit zur Messung der Infektiosität dar und wird als Gold Standard bezeichnet (Giles *u. a.*, 2017).

Der Bioassay ist aufwändig, kostenintensiv und kann nicht überall durchgeführt werden. In der heutigen Zeit soll aus Gründen des Tierwohls und des Respekts vor Lebewesen Bioassays so gering wie möglich gehalten werden.

Russell und Burch beschrieben das Prinzip der drei Rs (Russell und Burch, 1959):

Bioassays sollen durch alternative Methoden ersetzt werden (replacement) aus Respekt vor den Tieren.

Tiere, die für einen Versuch benutzt werden, sollen auf ein Minimum reduziert (reduction) werden.

Schmerzen, Leiden und Schäden der Tiere sollen so gering wie möglich gehalten werden (refinement)

Da es bei den Versuchen für dieser Arbeit keine Möglichkeit gab einen Bioassay durchzuführen, wurde nach einer Alternative gesucht.

Soto und Kollegen haben Anfang des 21sten Jahrhunderts die PMCA beschrieben. Im Jahr 2000 publizierten die Autoren diese damals neuartige Methode, die bis heute in zahlreichen Forschungsinstituten und Laboren Anwendung findet (Saborio, Permanne und Soto, 2001). Die Anzahl der Versuchstiere kann dank der PMCA-Methode erheblich reduziert werden, teilweise kann sie sogar einen Bioassay komplett ersetzen (Saborio, Permanne und Soto, 2001; Barria, Gonzalez-Romero und Soto, 2012; Saunders, Bartz und Shikiya, 2012; Beekes und Wagenführ, 2013). Aus diesem Grund wurde die PMCA in dieser Arbeit eingesetzt um dadurch die Ergebnisse des Western Blotting zu überprüfen.

Es stellt sich die Frage ob mit der Methode der PMCA Proben die im Western Blotting als inaktiviert gezeigt wurden sicher kein PrP^{Sc} mehr enthalten. Mit dieser Methode lassen sich

auch geringe Mengen an PrP^{Sc} identisch so vervielfältigen, dass diese mittels Western Blotting wieder nachweisbar sind. Sollte kein PrP^{Sc} mehr vorhanden sein lässt es sich auch nicht mehr vervielfältigen. Dies beweist die vollständige Inaktivierung.

Bei den Untersuchungen wurden also die Nachweise in den einzelnen Verdünnungsstufen in sogenannte Western Blotting Einheiten (WBE) umgerechnet. Dabei entspricht die WBE 1 einem Nachweis des PrP^{Sc} bis zu einer Verdünnung des Ausgangsmaterials von 1:10.

Im Western Blotting konnte Scrapie 263 K- und BSE 301 V-Prionen nur bis WBE 4 nachgewiesen werden. Für einen aussagekräftigen Nachweis der Inaktivierung ist das Western Blotting nicht sensitiv genug, da der Immunoblot eine untere Nachweisgrenze hat. Eine erfolgreiche Inaktivierung im Sinne der Desinfektion ist aber durch eine Reduktion um mindestens 4-5 log₁₀-Stufen definiert. In unserem Fall also eine Reduktion um 4 bis 5 WBE. Um diese Parameter auch im Western Blotting validieren zu können, wurde die PMCA-Methode im Labor für den Nachweis von Scrapie 263 K etabliert. Mit der PMCA wurden die möglicherweise noch vorhandenen Prionen (PrP^{Sc}) vermehrt damit die Nachweisgrenze des Immunoblots überschritten werden kann.

So konnte nach 4 Runden PMCA mit anschließendem Western Blotting bis WBE 6 und nach 5 Runden PMCA sogar bis zu WBE 7 die Existenz von PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Hier ist also eine Reduktion von WBE 4 bis 5 möglich. Dies entspricht den Prüfrichtlinien zur Testung von Desinfektionsmitteln und – Verfahren (hier wird eine Reduktion um 4-5 Log₁₀-Stufen gefordert).

Um die Prionen später besser mittels PMCA vermehren zu können wurde mit Peptonwasser gearbeitet anstelle von Fleischbrei der Kategorie 1 oder 2. Peptonwasser ist ein homogenes Gemisch ohne weitere Zusatzstoffe und fungierte in den vorliegenden Untersuchungen als Fleischersatz.

Für die Versuche mit der PMCA wurde Peptonwasser mit Scrapie 263 K gemischt. Dieses Gemisch wurde bei 90°C, 120°C oder 150°C für 5, 10 oder 15 min behandelt. Anschließend wurde es entnommen und verdünnt. Die Verdünnungen wurden bis zu fünf Runden in der PMCA beschallt und inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Nachweis mittels Western Blotting.

Bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 5 min konnte nach 5 Runden PMCA eine Reduktion von WBE 5 erreicht werden. Dies entspricht einer Reduktion im Sinne der Prüfrichtlinien zu Desinfektionsmitteln und - Verfahren.

Die Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen eignet sich als Methode, um Prionen verlässlich zu inaktivieren ohne dass das Material verbrannt wird. Allerdings konnte dies in der

vorliegenden Arbeit soweit nur für die Prionen-Stämme Scrapie 263 K und BSE 301 V nachgewiesen werden. Diese Methode könnte eine effektive Art und Weise darstellen, um auch andere Prion-Proteine Stämme erfolgreich mittels Thermodruck-Hydrolyse mit Mikrowellen zu inaktivieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse aus einem vorangegangenen Forschungs-Projekt (Böhm, 2009).

Eine deutliche Reduktion der Prionen wird bereits bei niedrigeren Temperaturen als die von der WHO vorgeschlagene Methode (Autoklavieren bei 134°C für 18 min) mithilfe der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen erreicht.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde ein Unterschied in der Thermoresistenz zwischen Scrapie 263 K und dem BSE 301 V Stamm festgestellt. Möglicherweise ist der BSE 301 V thermoresistenter. Zum gleichen Ergebnis kommen auch Giles und Kollegen. Sie beschrieben, dass BSE 301V 1 000-fach resistenter gegen die Inaktivierung mit Hitze ist. Sie zeigten auch, dass der native BSE-Stamm 100 bis 1 000-fach resistenter gegenüber Hitze ist, im Vergleich zu BSE 301 V (Giles *u. a.*, 2008).

Ein weiterer Unterschied ergab sich bei der Inaktivierung des Materials der Kategorie 1 und 2. Eine Erklärung dafür wäre der unterschiedliche Restfeuchtegehalt. Um den gleichen Gehalt an Feuchtigkeit zu erlangen wurde Wasser hinzugefügt. Da dies erst direkt vor dem Versuch hinzugefügt wurde besteht die Möglichkeit, dass die Feuchtigkeit sich nicht genauso homogen verteilt hat. Dieses Hypothese könnte in weiteren Forschungen überprüft werden. Fichet hat bereits 2004 festgestellt, dass es einen Unterschied bei der Dekontamination von mit Prionen infiziertem Material gab. Er stellte fest, dass Autoklavieren mit Wasser eine Reduktion von 5 - 6 Log₁₀-Stufen bei 134°C erreicht wird, während Autoklavieren ohne Wasser bei 134° nur 4 - 4,5 Log₁₀-Stufen Reduktion zeigt (Fichet *u. a.*, 2004).

Die vorliegende Arbeit präsentiert eine schnelle und effektive Methode, um pathogene Prionen im Fleischbrei der Kategorie 1 und 2 zu inaktivieren.

Möglicherweise könnte bei bestimmten Materialien die Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen in Verbindung mit anderen Inaktivierungsmethoden wie z.B. Hypochlorsäure (HOCl) zu einer noch effektiveren Inaktivierung der Prionen führen. Es wäre möglich, dass dies bereits bei geringeren Temperaturen und Behandlungsdauern in Kombination mit einer anderen Inaktivierungsmethode zu erreichen ist. Dafür wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig, um auch diese Methoden zu validieren.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode zeigt vielversprechende Ergebnisse, auf denen weitere Forschungsarbeiten aufgebaut werden könnten.

Hier sind vor allem weitere Untersuchungen zur Beantwortung der Frage nach dem weiteren Verwertungspotential des mit der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen behandelten Materials in einem Recyclingprozess zu sehen. Diese sollten sich mit den noch vorhandenen Nährstoffen befassen, und klären, in welcher Quantität und Qualität Aminosäuren und Phosphorquellen noch vorhanden bzw. verfügbar sind. Weitergehende Experimente unter Praxisbedingungen könnten Erkenntnisse liefern ob die Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen auch hier einen Inaktivierungserfolg erreichen kann.

7 Zusammenfassung

Die Erreger der TSE, die sogenannten Prionen sind infektiöse Proteine, die für eine Reihe von tödlich verlaufenden neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen und bei Tieren verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des Projekts "PRIORITY 222887 Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research" Untersuchungen zur Inaktivierung von mit Scrapie 263 K und BSE 301 V versetztem Fleischbrei der Kategorie 1 und 2 durchgeführt. Zum Material der Kategorie 1 gehört spezifische Risikomaterial, welches bei der Schlachtung anfällt und ein potentielles TSE-Risiko birgt. Dieses Material muss zurzeit laut den gesetzlichen Bestimmungen in Europa sterilisiert und verbrannt werden und kann somit nicht einer weiteren Nutzung zugeführt werden. Es sollte eine Methode gefunden werden, mit der zum einen Prion-Proteine sicher inaktiviert werden und zum Anderen eine weitere stoffliche Nutzung dieses hygienisierten Materials ermöglicht wird. Dieses Material könnte z.B. als Phosphor-, Aminosäurequelle in Düngemitteln oder als Teil erneuerbarer Energien wie Biogas oder Biodiesel erfolgen.

Die Behandlung mit der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen ist bereits bei einer Temperatur von 120°C und einer Behandlungsdauer von 5 min erfolgreich in der Inaktivierung des mit Scrapie 263 K versetzten Fleischbrei der Kategorie 1 und 2. Für eine vollständige Inaktivierung des mit BSE 301 V versetzten Fleischbreis der Kategorie 1 und 2 benötigt man eine Temperatur von 120°C und eine Behandlungsdauer von 10 min. Der Nachweis erfolgte hier ausschließlich im Western Blotting.

Da der Nachweis im Western Blotting allein nicht belastbar ist, sollte ein Bioassay erfolgen. Dieser war aus verschiedenen Gründen nicht gewünscht, weshalb nach einer Alternative gesucht wurde.

Mit Hilfe der *in vitro*-Amplifizierung, der sogenannte Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) wurde eine Methode gefunden, die den Bioassay ersetzen kann. Durch die PMCA lassen sich auch geringe Mengen an Prionen identisch so vervielfältigen, dass diese mittels Western Blotting nachweisbar sind. In den nachfolgenden Inaktivierungsversuchen von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser, welches als Fleischbreiersatz diente, wurde bei der Behandlung in der Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen bei einer Behandlungstemperatur von 120°C und 15 min eine vollständige Inaktivierung (mindestens 4-5 log₁₀-Stufen Reduktion) erreicht.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen geeignet ist, eine verlässliche Inaktivierung von Prion-Proteinen in tierischen

Nebenprodukten zu gewährleisten. Das stoffliche Recyclingpotential des so behandelten biologischen Materials muss in weiteren Arbeiten näher untersucht werden.

8 Summary

The pathogens that cause TSE, known as prions, are infectious proteins that are responsible for a number of fatal neurodegenerative diseases in humans and animals.

In the presented work, inactivation of category 1 and 2 meat mash contaminated with Scrapie 263 K and BSE 301 V were investigated as part of the project "PRIORITY 222887 Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research". Category 1 material includes specific risk material that is produced at slaughter and poses a potential TSE risk. Currently this material has to be sterilised and incinerated according to European legislation and thus cannot be put to further use. We were looking for method which, on the one hand, prion proteins are safely inactivated and, on the other hand, a further material use of this inactivated material is made possible. This material could be used, for example, as a source of phosphorus or amino acids in fertilizers or as part of renewable energies such as biogas or biodiesel.

Treatment with thermal pressure hydrolysis using microwaves was shown successful in inactivating category 1 and 2 meat mash contaminated with Scrapie 263 K at a temperature of 120°C and a treatment duration of 5 min. For complete inactivation of category 1 and 2 meat mash contaminated with BSE 301 V, a temperature of 120°C and a treatment duration of 10 min are required. Detection was carried out here exclusively by Western blotting.

Since detection by Western blotting alone is not reliable, a bioassay was needed. The use of animals was not desired for various reasons, which is why an alternative was sought.

With the help of *in vitro amplification*, the so-called Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA), a method was found that can replace the bioassay. With PMCA, even small amounts of prions can be amplified identically in such a way that they can be detected by Western blotting. In subsequent inactivation experiments of peptone water spiked with Scrapie 263 K, which served as a meat pulp substitute, complete inactivation (at least 4-5 log₁₀-step reduction) was achieved when treated in thermal pressure hydrolysis with microwaves at a treatment temperature of 120°C and for 15 min.

In summary, the results of the work could show that thermal pressure hydrolysis with microwaves is suitable to ensure reliable inactivation of prion proteins in animal by-products. The material recycling potential of the biological material treated in this way must be investigated in more detail in further work.

9 Literaturverzeichnis

- Acevedo-Morantes, C. Y. und Wille, H. (2014) „The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models—Considerations and Pitfalls“, *Viruses*, 6(10), S. 3875–3892. doi: 10.3390/v6103875.
- Aguzzi, A., Lakkaraju, A. K. K. und Frontzek, K. (2018) „Toward Therapy of Human Prion Diseases“, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), S. 331–351. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052745.
- Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D. und Soto, C. (2012) „Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding“, in Sigurdsson, E. M., Calero, M., und Gasset, M. (Hrsg.) *Amyloid {Proteins}: {Methods} and {Protocols}*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in {Molecular} {Biology}), S. 199–212. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_14.
- Beekes, M. (2010) „Die variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) Epidemiologie und Schutzmaßnahmen gegen eine Übertragung von Mensch zu Mensch“, *Bundesgesundheitsbl*, 53, S. 597–605. doi: 10.1007/s00103-010-1070-7.
- Beekes, M. und Wagenführ, K. (2013) „Alternatives to Animal Bioassays for Prions“, *Altern Lab Anim*, 41(6), S. P72–P76. doi: 10.1177/026119291304100625.
- Bieschke, J. u. a. (2004) „Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein“, *PNAS*, 101(33), S. 12207–12211. doi: 10.1073/pnas.0404650101.
- Böhm, R. (2009) *Thermodruckhydrolyse von Prion-Protein in tierischen Reststoffen, lebensmitteltauglichem Darm, Blut und Tiermehl (nicht publiziert)*.
- Braun, U. (1998) *BSE und andere spongiforme Enzephalopathien*. Parey. Verfügbar unter: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300027879> (Zugegriffen: 20. November 2020).
- Braunegg, G. (2006) *Verwertung von Reststoffen aus Schlachtung und Fleischverarbeitung mit hoher Wertschöpfung - Fabrik der Zukunft*. Verfügbar unter: <https://nachhaltigwirtschaften.at/de/fdz/projekte/verwertung-von-reststoffen-aus-schlachtung-und-fleischverarbeitung-mit-hoher-wertschoepfung.php> (Zugegriffen: 2. Juni 2021).
- Büeler, H. u. a. (1994) „High Prion and PrPSc Levels but Delayed Onset of Disease in Scrapie-Inoculated Mice Heterozygous for a Disrupted PrP Gene“, *Mol Med*, 1(1), S. 19–30. doi: 10.1007/BF03403528.
- Butler, D. A. u. a. (1988) „Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins.“, *Journal of Virology*, 62(5), S. 1558–1564. Verfügbar unter: <https://jvi.asm.org/content/62/5/1558> (Zugegriffen: 6. Dezember 2020).
- Cassmann, E. D. und Greenlee, J. J. (2020) „Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep“, *American Journal of Veterinary Research*, 81(7), S. 600–614. doi: 10.2460/ajvr.81.7.600.
- Castilla, J. u. a. (2005) „In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions“, *Cell*, 121(2), S. 195–206. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.011.
- Caughey, B. u. a. (2009) „Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions“, *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), S. 177–204. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145410.

Chandler, R. L. (1961) „ENCEPHALOPATHY IN MICE PRODUCED BY INOCULATION WITH SCRAPIE BRAIN MATERIAL“, *The Lancet*, 277(7191), S. 1378–1379. doi: 10.1016/S0140-6736(61)92008-6.

Chesebro, B. u. a. (1985) „Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain“, *Nature*, 315(6017), S. 331–333.

Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1998) „Pathologic conformations of prion proteins“, *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , S. 793–819. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.793.

Coitinho, A. S. u. a. (2007) „Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1“, *Neurobiology of Disease*, 26(1), S. 282–290. doi: 10.1016/j.nbd.2007.01.005.

Collinge, J. u. a. (1994) „Prion protein is necessary for normal synaptic function“, *Nature*, 370(6487), S. 295–297. doi: 10.1038/370295a0.

Collins, S., McLean, C. A. und Masters, C. L. (2001) „Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies“, *Journal of Clinical Neuroscience*, 8(5), S. 387–397. doi: 10.1054/jocn.2001.0919.

Cracco, L. u. a. (2019) „Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease revisited: accumulation of covalently-linked multimers of internal prion protein fragments“, *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), S. 85. doi: 10.1186/s40478-019-0734-2.

Cretzfeldt, H. G. (1920) „Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (vorläufige Mitteilung)“, *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 57(1), S. 1–18.

Culle, J. (1939) „Experimental transmission of trembling to the goat.“, *C. R. Seances Acad. Sci.*, 208, S. 1058–1060. Verfügbar unter: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10007311154/> (Zugegriffen: 6. Dezember 2020).

Ding, N. u. a. (2012) „Inactivation of Template-Directed Misfolding of Infectious Prion Protein by Ozone“, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(3), S. 613–620. doi: 10.1128/AEM.06791-11.

EFSA (2019). Verfügbar unter: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2019.5925> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Elbing, G. und Dünnebeil, A. (1999) „Thermischer Zellaufschluß mit anschließender Faulung - Laboruntersuchung“, *Korrespondenz Abwasser*, 46(4), S. 538–547.

Fichet, G. u. a. (2004) „Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices“, *The Lancet*, 364(9433), S. 521–526. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16810-4.

Foote, W. C. u. a. (1993) „Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer“, *Am J Vet Res*, 54(11), S. 1863–1868.

Gajdusek, D. C. und Zigas, V. (1957) „Degenerative Disease of the Central Nervous System in New Guinea — The Endemic Occurrence of Kuru in the Native Population“, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM195711142572005>. doi: 10.1056/NEJM195711142572005.

Gelpi, K. (2020) „Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, eine menschliche Prionenerkrankung / Creutzfeldt-Jakob-Disease, a human prion disease“, *Journal für Neurologie, Neurochirurgie*

und *Psychiatrie*, 21(1), S. 14–22. Verfügbar unter: <https://www.kup.at/journals/summary/14602.html> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Giles, K. u. a. (2008) „Resistance of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Prions to Inactivation“, *PLoS Pathog.* Herausgegeben von D. Westaway, 4(11), S. e1000206. doi: 10.1371/journal.ppat.1000206.

Giles, K. u. a. (2017) „Bioassays and Inactivation of Prions“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(8), S. a023499. doi: 10.1101/cshperspect.a023499.

Gonzalez-Montalban, N. u. a. (2011) „Highly Efficient Protein Misfolding Cyclic Amplification“, *PLoS Pathog.* Herausgegeben von D. Westaway, 7(2), S. e1001277. doi: 10.1371/journal.ppat.1001277.

Greenlee, J. J. (2019) „Review: Update on Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats“. Verfügbar unter: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985818794247> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Griffith, J. S. (1967) „Nature of the Scrapie Agent: Self-replication and Scrapie“, *Nature*, 215(5105), S. 1043–1044. doi: 10.1038/2151043a0.

HOPE, J. u. a. (1988) „Molecular pathology of scrapie-associated fibril protein (PrP) in mouse brain affected by the ME7 strain of scrapie“, *European Journal of Biochemistry*, 172(2), S. 271–277. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13883.x.

Hörnlimann, Beat, Detlev Riesner, H. K. (2001) „Prionen und Prionkrankheiten“, *De Gruyter*.

Houston, F. und Andréoletti, O. (2019) „Animal prion diseases: the risks to human health“, *Brain Pathology*, 29(2), S. 248–262. doi: <https://doi.org/10.1111/bpa.12696>.

Hughson, A. G. u. a. (2016) „Inactivation of Prions and Amyloid Seeds with Hypochlorous Acid“, *PLOS Pathogens*, 12(9), S. e1005914. doi: 10.1371/journal.ppat.1005914.

Jakob, A. (1921) „Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde“, *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 64(1), S. 147–228.

Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T. (1993) „Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie?“, *Cell*, 73(6), S. 1055–1058. doi: 10.1016/0092-8674(93)90635-4.

Koutsoumanis, K. u. a. (2019) „Update on chronic wasting disease (CWD) III“, *EFSA Journal*, 17(11), S. e05863. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5863>.

Kretzschmar, H. A. u. a. (1986) „Molecular Cloning of a Human Prion Protein cDNA“, *DNA*, 5(4), S. 315–324. doi: 10.1089/dna.1986.5.315.

Kumagai, S., Daikai, T. und Onodera, T. (2019) „Bovine Spongiform Encephalopathy – A Review from the Perspective of Food Safety“, *Food Safety*, advpub. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2018009.

Lacroux, C. u. a. (2012) „Prionemia and Leukocyte-Platelet-Associated Infectivity in Sheep Transmissible Spongiform Encephalopathy Models“, *Journal of Virology*, 86(4), S. 2056–2066. doi: 10.1128/JVI.06532-11.

Lehmann, S. u. a. (2009) „New hospital disinfection processes for both conventional and prion infectious agents compatible with thermosensitive medical equipment“, *Journal of Hospital Infection*, 72(4), S. 342–350. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.024.

Leopold, J. G. (1759) *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft: Fünf Theile. Mit Kupfer und Baurissen.* Günther.

Liberski, P. P. u. a. (2019) „Kuru, the First Human Prion Disease“, *Viruses*, 11(3), S. 232. doi: 10.3390/v11030232.

Llorens, F. u. a. (2017) „Fatal familial insomnia: Clinical aspects and molecular alterations“, *Current neurology and neuroscience reports*, 17(4), S. 30.

Lugaresi, E. u. a. (1986) „Fatal Familial Insomnia and Dysautonomia with Selective Degeneration of Thalamic Nuclei“, *New England Journal of Medicine*, 315(16), S. 997–1003. doi: 10.1056/NEJM198610163151605.

Mathiason, C. K. u. a. (2006) „Infectious Prions in the Saliva and Blood of Deer with Chronic Wasting Disease“, *Science*, 314(5796), S. 133–136. doi: 10.1126/science.1132661.

Matsuura, Y. u. a. (2019) „First case of atypical scrapie in a goat in {Japan}“, *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(7), S. 986–989. doi: 10.1292/jvms.18-0710.

Medori, R. u. a. (1992) „Fatal Familial Insomnia, a Prion Disease with a Mutation at Codon 178 of the Prion Protein Gene“, *New England Journal of Medicine*, 326(7), S. 444–449. doi: 10.1056/nejm199202133260704.

Meissner, B. u. a. (2009) „MRI lesion profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease“, *Neurology*, 72(23), S. 1994–2001. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a96e5d.

Miller, M. W. u. a. (2004) „Environmental Sources of Prion Transmission in Mule Deer“, *Emerg Infect Dis*, 10(6), S. 1003–1006. doi: 10.3201/eid1006.040010.

O'Rourke, K. I. (2003) „Abundant PrPCWD in Tonsil from Mule Deer with Preclinical Chronic Wasting Disease“. Verfügbar unter: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870301500403> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Oesch, B. u. a. (1985) „A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein“, *Cell*, 40(4), S. 735–746. doi: 10.1016/0092-8674(85)90333-2.

Onodera, T. u. a. (1993) „Isolation of Scrapie Agent from the Placenta of Sheep with Natural Scrapie in Japan“, *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY*, 37(4), S. 311–316.

Le Pichon, C. E. u. a. (2009) „Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice“, *Nature Neuroscience*, 12(1), S. 60–69. doi: 10.1038/nn.2238.

Premzl, M. (2004) *Za Luciju, Sofiju i Vilima Thesis Prion Protein Gene and Its Shadow Prion Protein Gene and Its Shadow.*

Pritzkow, S. (2011) *In vitro-Bestimmung der Keimaktivität von Scrapie-assoziiertem Prionprotein.* Verfügbar unter: <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/1494> (Zugegriffen: 2. Juni 2021).

Prusiner, S. B. (1982) „Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie“, *Science*, 216(4542), S. 136–144. doi: 10.1126/science.6801762.

Prusiner, S. B. (1984) „Prions“, 251(4), S. 50–59. doi: 10.2307/24969455.

Prusiner, S. B. u. a. (1990) „Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication“, *Cell*, 63(4), S. 673–686. doi: 10.1016/0092-8674(90)90134-Z.

Prusiner, S. B. (2004) „Prion biology and diseases.“, *Prion biology and diseases.*, (Ed.2). Verfügbar unter: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043120209> (Zugegriffen: 6. Dezember 2020).

Race, R. E., Fadness, L. H. und Chesebro, B. (1987) *Characterization of Scrapie Infection in Mouse Neuroblastoma Cells*, *J. gen. Virol.*

Resenberger, U. K. u. a. (2011) „The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of β -sheet-rich conformers independent of prion replication“, *The EMBO Journal*, 30(10), S. 2057–2070. doi: 10.1038/emboj.2011.86.

Ricci, A. (2017) „Chronic wasting disease (CWD) in cervids“. Verfügbar unter: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.4667> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Riesner, D. (2003) „Biochemistry and structure of {PrPC} and {PrPSc}“, *Br Med Bull*, 66(1), S. 21–33. doi: 10.1093/bmb/66.1.21.

Ritchie, D. L. und Ironside, J. W. (2017) „Chapter Fourteen - Neuropathology of Human Prion Diseases“, in Legname, G. und Vanni, S. (Hrsg.) *Progress in {Molecular} {Biology} and {Translational} {Science}*. Academic Press (Prion {Protein}), S. 319–339. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.06.011.

Rogasik, J. u. a. (2003) „Phosphorpotenziale von Tiermehl und Schlachtabfällen sowie Möglichkeiten des Phosphorreyclings“, in, S. 2003.

Russell und Burch (1959) *The principles of humane experimental technique*. Verfügbar unter: [http://117.239.25.194:7000/jspui/bitstream/123456789/1342/1/PRILIMINERY AND CONTENTS.pdf](http://117.239.25.194:7000/jspui/bitstream/123456789/1342/1/PRILIMINERY_AND_CONTENTS.pdf) (Zugegriffen: 1. Juni 2021).

Saá, P., Castilla, J. und Soto, C. (2006) „Ultra-efficient Replication of Infectious Prions by Automated Protein Misfolding Cyclic Amplification“, *J. Biol. Chem.*, 281(46), S. 35245–35252. doi: 10.1074/jbc.M603964200.

Saborio, G. P., Permanne, B. und Soto, C. (2001) „Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding“, *Nature*, 411(6839), S. 810–813. doi: 10.1038/35081095.

Saunders, S. E., Bartz, J. C. und Shikiya, R. A. (2012) „Protein Misfolding Cyclic Amplification of Prions“, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (69), S. e4075. doi: 10.3791/4075.

Scheckel, C. und Aguzzi, A. (2018) „Prions, prionoids and protein misfolding disorders“, *Nature Reviews Genetics*, 19(7), S. 405–418. doi: 10.1038/s41576-018-0011-4.

Schmitz, M. u. a. (2017) „Hereditary Human Prion Diseases: an Update“, *Mol Neurobiol*, 54(6), S. 4138–4149. doi: 10.1007/s12035-016-9918-y.

Soto, C. u. a. (2005) „Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding“, *FEBS Letters*, 579(3), S. 638–642. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.035.

Soto, C., Saborio, G. P. und Anderes, L. (2002) „Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond“, *Trends in Neurosciences*, 25(8), S. 390–394. doi: 10.1016/S0166-2236(02)02195-1.

Spagnolli, G. u. a. (2019) „Full atomistic model of prion structure and conversion“, *PLOS Pathogens*, 15(7), S. e1007864. doi: 10.1371/journal.ppat.1007864.

Spraker, T. R. u. a. (1997) „SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN FREE-RANGING MULE

DEER (ODOCOILEUS HEMIONUS), WHITE-TAILED DEER (ODOCOILEUS VIRGINIANUS) AND ROCKY MOUNTAIN ELK (CERVUS ELAPHUS NELSONI) IN NORTHCENTRAL COLORADO“, *J Wildl Dis*, 33(1), S. 1–6. doi: 10.7589/0090-3558-33.1.1.

Stahl, N. u. a. (1987) „Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid“, *Cell*, 51(2), S. 229–240. doi: 10.1016/0092-8674(87)90150-4.

Tatzelt, J. (2011) *Prion Proteins*. Springer.

Taylor (2004) *Prions: A Challenge for Science, Medicine, and the Public Health System - Google Books*. Verfügbar unter: https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=3dGFqapTk84C&oi=fnd&pg=PA136&dq=taylor+prion&ots=IOLrZQZwFD&sig=TulCmlHrcvou9h41jd_zZBo_mCQ#v=onepage&q=taylor+prion&f=false (Zugegriffen: 2. Juni 2021).

Taylor, D. M. (2000) „Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A Review“, *The Veterinary Journal*, 159(1), S. 10–17. doi: 10.1053/tvjl.1999.0406.

Thellung, S. u. a. (2000) „Intracellular mechanisms mediating the neuronal death and astrogliosis induced by the prion protein fragment 106–126“, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(4), S. 481–492. doi: 10.1016/S0736-5748(00)00005-8.

Tobler, I. u. a. (1996) „Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein“, *Nature*, 380(6575), S. 639–642. doi: 10.1038/380639a0.

Ulvund, M. J. (2001) „Die Klinik der Scrapie“, in *Prionen und Prionenkrankheiten*, S. 284–289.

Velásquez, C. D. u. a. (2020) „Chronic wasting disease (CWD) prion strains evolve via adaptive diversification of conformers in hosts expressing prion protein polymorphisms“, *J. Biol. Chem.*, 295(15), S. 4985–5001. doi: 10.1074/jbc.RA120.012546.

Wadsworth, J. D. F. u. a. (2001) „Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay“, *The Lancet*, 358(9277), S. 171–180.

Wallhäuser, K. H. (1988) *Sterilization, Disinfection and Conservation Practice*, Gg. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Wang, H., Rhoads, D. D. und Appleby, B. S. (2019) „Human prion diseases“, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 32(3), S. 272–276. doi: 10.1097/QCO.0000000000000552.

Weber, P. u. a. (2006) „Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity“, *PNAS*, 103(43), S. 15818–15823. doi: 10.1073/pnas.0605608103.

Wells, G. A. u. a. (1987) „A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle“, *Veterinary Record*, 121(18), S. 419–420. doi: 10.1136/vr.121.18.419.

Will, R. G. und Ironside, J. W. (2017) „Sporadic and Infectious Human Prion Diseases“, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(1), S. a024364. doi: 10.1101/cshperspect.a024364.

Wille, H. und Requena, J. R. (2018) „The Structure of PrP^{Sc} Prions“, *Pathogens*, 7(1), S. 20. doi: 10.3390/pathogens7010020.

Witold, K. und Marcin, I. (2011) „Prion Protein and Its Conformational Conversion: A Structural Perspective“, in *Prion Proteins*, S. 135–167.

Zerr, I. u. a. (2018) „Cerebrospinal fluid neurofilament light levels in neurodegenerative dementia: Evaluation of diagnostic accuracy in the differential diagnosis of prion diseases“,

Alzheimer's and Dementia, 14(6), S. 751–763. doi: 10.1016/j.jalz.2017.12.008.

Zetterberg (2019) „Neurofilaments in blood is a new promising preclinical biomarker for the screening of natural scrapie in sheep“. Verfügbar unter: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0226697> (Zugegriffen: 19. November 2020).

Zetterberg, H. u. a. (2019) „Neurofilaments in blood is a new promising preclinical biomarker for the screening of natural scrapie in sheep“. doi: 10.1371/journal.pone.0226697.

Zlotnik, I. und Rennie, J. C. (1965) „Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters“, *Journal of comparative pathology*, 75(2), S. 147–157.

10 Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
a.n.	alles negativ
bar	Maßeinheit Druck
BGBI	Bundesgesetzblatt
bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin Fraktion V
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CJD	Creutzfeldt-Jacob Disease
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomografie
CWD	Chronic wasting disease
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EUE	Exotic Ungulate Encephalopathy
et al.	und Mitarbeiter/innen
fCJD	Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FFI	Fatale Familiäre Insomnie

FLI	Friedrich-Löffler-Institut
FSE	Feline spongiforme encephalopathy
g	Gravitationskonstante
GSS	Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HH	Hirnhomogenat
HHH	Hamsterhirnhomogenat
HiHH	Hirschhirnhomogenat
H ₂ O	Wasser
HOCl	Hypochlorsäure
i.c.	intrazerebrale Injektion
iCJD	iatrogen erworbene Creutzfeldt-Jakob-Disease
igG-HRP	sekundär Antikörper
K1	Material der Kategorie 1 aus der Tierkörperbeseitigungsanlage
K2	Material der Kategorie 2 aus der Tierkörperbeseitigungsanlage
-K	negativ Kontrolle
+K	positiv Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
L3	Laborsicherheitsstufe
Log	Logarithmus
M	Marker
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
mg/l	Milligramm pro Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHH	Maushirnhomogenat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milli Molar

MRT	Magnetresonanztomografie
n	Wiederholungsanzahl
N2a	Maus-Neuroblasen-Zelllinie
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat wasserfrei
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natronlauge
NaPTA	Phosphorwolframsäure
n.d.	nicht durchgeführt
n.n.	nichts nachweisbar
Nr.	Nummer
nvCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Disease
OIE	Weltgesundheitsorganisation für Tiergesundheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pH	potentia Hydrogenii
PK	Proteinase K
PMCA	Protein-misfolding cyclic amplification
POM1	monoklonaler Antikörper gegen das Prion Protein
Prn-p	Prion Protein Gen beim Tier
Prn-p ^{0/0}	Fehlen des Prn-p Gens
PrP	Prion Protein
PrP 27-30	Proteinase resistenter Kern des Prion Proteins
PrP*	metastabiler Übergangszustand des Prion Proteins
PrP ^c	Zelluläres Prion Proteins
PrP ^{res}	Proteinase resistenter Teil des Prionproteins
PrP ^{Sc}	Infektiöse Isoform des Prionproteins
RHH	Rinderhirnhomogenat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAF	Scrapie assoziierte Fibrillen

sCJD	sporadisch auftretende Creutzfeldt Jakob Disease
SDS	Natriumdodecylsulfat
sinc ^{p7p7}	Genotyp bei VM/DK Mäusen
SRM	spezifisches Risikomaterial
T5	Dehydrol 980
TBA	Tierkörperbeseitigungsanstalt
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
THG	Treibhausgas
TierNebG	Tierische Nebenerzeugnisse Gesetz
™	Trade Mark
TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
TSE	Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie
VM/DK	Mäusezuchtlinie
w/v	Gewicht pro Volumen
W226	monoklonaler Antikörper gegen das Prion Protein
WB	Western Blotting
WBE	Western Blotting Einheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralesnervensystem
263 K	Hamster adaptierter Scrapie-Stamm
301 V	Maus adaptierter BSE-Stamm
3F4	monoklonaler Antikörper gegen das Prion Protein

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Meistverbreitete Transmissible Spongiformen Enzephalopathien (TSE) im Überblick (modifiziert nach (Prusiner, 2004; Tatzelt, 2011)).....	12
Tabelle 2: Standardverarbeitungsmethoden nach Verordnung 142/2011 (ANHANG IV, Kapitel III).....	31
Tabelle 3: Gewebeproben und Material aus der Tierkörperbeseitigungsanlage.....	34
Tabelle 4: Laborgeräte	35
Tabelle 5: Chemikalien	36
Tabelle 6: Antikörper, Enzyme, Kits und Marker	38
Tabelle 7: Puffer und Lösungen.....	38
Tabelle 8: Versuchstiere.....	39
Tabelle 9: Verbrauchsmaterial.....	40
Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche mit den primären Antikörpern	51
Tabelle 11: Nachweis von PrPSc im Scrapie 263 K und BSE 301 V (Hohenheimer Re-Isolierungsprotokoll), CWD und BSE (Aufreinigung mittels NaPTA-Fällung).....	52
Tabelle 12: Nachweis von PrPSc aus Fleischbrei der Kategorie 1 bzw. Kategorie 2 in WBE.....	53
Tabelle 13: Zusammenfassung der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	60
Tabelle 14 Zusammenfassung der Mikrowellenversuche von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	66
Tabelle 15: Vergleichende Ergebnisse der PMCA mit Hamsterhirnhomogenaten (unterschiedliche Verarbeitungsmethoden)	68
Tabelle 16: Vergleichende Analyse der Beschallungsstärken und -zeiten	71
Tabelle 17: Vergleich der Nachweise von PrPSc Scrapie 263 K Hamsterhirnhomogenat nach 4., 5. Runden PMCA (n=2) sowie nur mittels Western Blotting in WBE.....	73
Tabelle 18: Ergebnisse der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser und anschließender PMCA in WBE.....	75
Tabelle 19: Eckwertebestimmung der Wiederholung des Versuchs der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser mit PMCA in WBE.....	76

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histopathologische Veränderungen in von mit Prionen befallenen Gehirnen ...	11
Abbildung 2: Bestätigte BSE-Fälle in Deutschland	17
Abbildung 3: Nachweis von zellulärem und pathologischem Prion-Protein im Western Blotting	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der PMCA nach Soto und Kollegen modifiziert von Pritzkow (Soto, Saborio und Anderes, 2002; Pritzkow, 2011)	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der seriellen PMCA (Bieschke <i>u. a.</i> , 2004; Caughey <i>u. a.</i> , 2009).....	27
Abbildung 6: MLS Mega 1200 Mikrowellenanlage	48
Abbildung 7: 1. Mikrowellenversuch von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei (Kategorie 1/Kategorie 2)	54
Abbildung 8: 1. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	55
Abbildung 9: 2. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	56
Abbildung 10: 3. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	57
Abbildung 11: 4. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	58
Abbildung 12: 5. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit Scrapie 263 K versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	59
Abbildung 13: 1. Mikrowellenversuch von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	61
Abbildung 14: 1. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	62
Abbildung 15: 2. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	63
Abbildung 16: 3. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	64
Abbildung 17: 4. Wiederholung des Mikrowellenversuchs von mit BSE 301 V versetztem Fleischbrei Kategorie 1/Kategorie 2.....	65
Abbildung 18: Abzentrifugieren 1. Runde PMCA	68
Abbildung 19: Abzentrifugieren 2. Runde PMCA	69
Abbildung 20: Abzentrifugieren und Filtrieren 1. Runde PMCA.....	69
Abbildung 21: Abzentrifugieren und Filtrieren 2. Runde PMCA.....	70
Abbildung 22: 1. PMCA nach der Methode von (Saá et al., 2006)	71
Abbildung 23: 2. PMCA nach der Methode von (Saá et al., 2006)	72
Abbildung 24: Vergleich der Nachweise von PrPSc Scrapie 263 K Hamsterhirnhomogenat nach 4., 5. Runden PMCA (n=2) sowie nur mittels Western Blotting in WBE.....	73
Abbildung 25: Reduktion in WBE nach der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser und anschließender PMCA	75
Abbildung 26: Eckwertbestimmungen der Wiederholung des Versuchs, Reduktion in WBE nach 4 oder 5 Runden PMCA nach der Mikrowellenbehandlung von mit Scrapie 263 K versetztem Peptonwasser	77

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung über die eigenständig erbrachte Leistung gemäß § 18 Absatz 3 Satz 5 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim für die Fakultäten Agrar-, Natur und Wirtschafts- und Sozialwissenschaften

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema **Untersuchungen zur Inaktivierung von Prionen unter Verwendung einer Thermodruckhydrolyse mit Mikrowellen**

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder –beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Marie Schöffler

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marie Simone Schöffler
Geburtsdatum	15.01.1981 in Filderstadt
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Akademischer Werdegang

10/2009 – 06/2014	Promotion am Institut für Nutztierwissenschaften, FG Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren, Universität Hohenheim, Stuttgart
10/2001 – 09/2007	Studium der Agrarbiologie, Schwerpunkt Nutztierbiologie (<i>Dipl. Agr.- Biol</i>), Universität Hohenheim, Stuttgart Diplomarbeit (Untersuchung eines Filtrationsmoduls zur Wasseraufbereitung auf das Retentionsvermögen ausgewählter Bakterien und Viren)
09/1998 – 07/2001	Hedwig-Dohm-Schule Stuttgart (Ernährungswissenschaftliches Gymnasium), Abschluss: Abitur

Beruflicher Werdegang

01/2016 – heute	Außendienstmitarbeiterin der Firma Analytik Jena AG im Bereich Life Science
07/2014 – 12/2015	Außendienstmitarbeiterin der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG
10/2009 – 06/2014	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim, Stuttgart
08/2008 – 09/2009	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim, Stuttgart
05/2008 – 07/2008	Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Agrarpolitik und Landwirtschaftliche Marktlehre, Universität Hohenheim, Stuttgart

09/2007 – 02/2008 Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Umwelt – und Tierhygiene, Universität Hohenheim, Stuttgart

Praktika

03/2006 – 04/2006 Freiwilliges Praktikum am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts Tübingen „Herstellung und Analyse rekombinanter Viren“

07/2005 – 12/2005 Pflichtpraktikum am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts Tübingen

Scheine

03/2005 Sicherheit im Laborbetrieb (Schein)

10/2011 GV-SOLAS B (Zertifikat)

Auslandserfahrung

08/2008 – 10/2008 Auslandsaufenthalt in Ghana (Westafrika) im Rahmen des Projekts „Validierung der Keimzahlreduzierung verschiedener Methoden zur Fäkalienbehandlung“

08/2012 Einwöchiger Auslandsaufenthalt in Frankreich (Toulouse) an der École Nationale Vétérinaire de Toulouse, zum Erlernen einer neuen Methode

Ort, Datum

Marie Schöffler

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor L. Hölzle bedanken vor allem für die zahlreichen Stunden seiner Zeit, die er der Betreuung und Korrektur dieser Arbeit gewidmet hat. Einen großen Dank für die Geduld gerade am Ende meiner Arbeit. Ein weiterer Dank geht an Professor R. Böhm für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit.

Ich möchte mich auch herzlich bei Herr Professor L. Stitz bedanken für die Zusammenarbeit im Projekt "PRIORITY 222887 Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research" und die Möglichkeit einen Teil meiner Studien in den Laboren des FLI Tübingen durchzuführen.

Ein weiterer Dank gilt Elisabeth Blaschke und Silvia Speck, die mich immer wieder aufgebaut haben und mir über die Jahre immer wieder gut zugeredet haben.

Philipp Marro, der mir nach den vielen Jahren den Anstoß zur Fertigstellung meiner Dissertation gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden Vanessa Thiede, Meike Zinnow, Phillipp Klein, Astrid Zimbelmann und, Myrjam Frischauf, die mir durch manche schwere Zeit geholfen haben

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt und ermutigt hat und immer für mich da war.

Ein ganz großer Dank geht an meinen Bruder Patrik Erlmann, der mich von Beginn an bei meiner Arbeit immer wieder auch mental unterstützt hat, meine Mutter für das Korrekturlesen der Arbeit und meinen Vater, der mir den Rücken freigehalten hat.