

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische
Lebensmitteltechnologie

Anreicherung und Separation von pathologischem Prionprotein (PrP^{Sc}) aus Rinderhirn mittels Zerschäumungsanalyse

Simon Hans Berner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./ Türkei) H. Parlar
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Univ. Kaposvári/ Ungarn) J. Bauer
3. Univ.-Prof. Dr. H. Horn

Die Dissertation wurde am 28.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.01.2007 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis September 2006 am Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie im Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt angefertigt.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. H. Parlar für die Überlassung des außergewöhnlichen und interessanten Themas sowie für seine wohlwollende Unterstützung. Neuen Ideen begegnete er stets sehr aufgeschlossen und ermöglichte deren Durchführung.

Eine grundlegende Voraussetzung für diese Arbeit war die Unterstützung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Bauer. Er gestattete mir nicht nur die Arbeit im BSE-Labor, sein fachlicher Rat war sehr hilfreich, sowohl bei der Konstruktion der Apparaturen als auch während der Untersuchungen. Dafür meinen herzlichen Dank!

Für die elektrophoretischen Untersuchungen bin ich sehr dankbar, die apparative Ausstattung sowie Ratschläge von Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Görg sowie Herrn Dr. W. Weiss erhalten zu haben.

Im Weiteren möchte ich mich für die unkomplizierte Unterstützung von Herrn K. Scholz bei der Anfertigung der Apparaturen sowie bei Herrn Dr. med. vet. M. Fritz, mit dem ich viele Stunden im BSE-Labor arbeiten durfte, bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Dr. C. Wattenbach sowie meinen Doktorandenkollegen Frau B. Hack und Herrn L. Gabel, mit denen stets ein Arbeiten in kollegialem, produktivem Klima gewährleistet war.

Bei der Korrektur der Arbeit waren mir Frau C. Hessel sowie Herr Dr.-Ing. G. Leupold, bei Computerangelegenheiten Herr M. Mandl und Herr Dr. N. Gmeinwieser eine große Hilfe.

Danke für die angenehme Zusammenarbeit an die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie, besonders auch die Sekretärinnen sowie die Kollegen beim Raps-Forschungszentrum.

Bedanken möchte ich mich bei allen meinen Freunden und meinen Geschwistern für die entspannte Zeit außerhalb der Arbeit.

Grundlegender Dank gebührt meinen Eltern, die mich schon zeitlebens auf vielfache Weise unterstützen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Grundlagen	3
1.	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE)	3
1.1.	Überblick	3
1.2.	Die verschiedenen Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien . . .	4
1.2.1.	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)	4
1.2.2.	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	7
1.2.3.	Kuru („der lachende Tod“)	7
1.2.4.	Tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI)	8
1.2.5.	Traberkrankheit der Schafe und Ziegen	8
1.2.6.	Schwammartige Hirndegeneration der Rinder (BSE)	9
1.2.7.	Weitere Prionkrankheiten	10
1.3.	Ätiologie: Ein Protein als Erreger	11
1.3.1.	Das zelluläre Prionprotein PrP ^C	12
1.3.2.	Das pathologische Prionprotein PrP ^{Sc}	14
1.3.3.	Das Immunsystem und PrP ^{Sc}	15
1.3.4.	Strukturvergleich von PrP ^C und PrP ^{Sc}	17
1.3.5.	Übertragung der pathologischen Struktur	18
1.3.6.	Die Artenschanke (Speziesbarriere)	19
1.4.	Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen	20
1.5.	Pathogenese der Prionkrankheiten beim Menschen	20
1.6.	Diagnostik	22
1.6.1.	Derzeit anerkannte BSE-Nachweismethoden	22
1.6.1.1.	Bioassay (Tierversuch)	22

1.6.1.2.	Histologie	23
1.6.1.3.	Schnelltests	24
1.6.2.	Neue Ansätze zum TSE-Nachweis	26
1.6.2.1.	Nachweis von PrP ^{Sc}	26
1.6.2.2.	Nachweis von Surrogatmarkern	29
1.6.2.3.	Amplifizierungs- und Anreicherungsverfahren	31
1.7.	Visionen von Therapie und Impfung	33
1.7.1.	Therapeutika	33
1.7.2.	Impfung	33
1.8.	Opferzahlen der Epidemie der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie	34
1.9.	Opferzahlen der Neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit . . .	39
1.10.	Prionenforschung	41
1.11.	Risikoeinschätzung	42
2.	Zerschäumungsanalyse	43
2.1.	Adsorptive Gasblasentrennmethode	43
2.2.	Grundlagen der Zerschäumungsanalyse	45
2.2.1.	Schaum	45
2.2.2.	Detergenzien	47
2.2.3.	Prinzip der Zerschäumungsanalyse	48
2.2.3.1.	Oberflächenadsorption	49
2.2.3.2.	Aufkonzentrierung im Schaum	50
2.2.4.	Produkte der Zerschäumung	52
2.3.	Spezielle Techniken der Zerschäumung	52
2.4.	Apparatur und Parameter bei der Zerschäumung	53
2.4.1.	Geometrie der Apparatur	53
2.4.2.	Gaseinleitung: Art und Porengröße	54
2.4.3.	Blasengröße	55
2.4.4.	Gasvolumenstrom, Dauer der Zerschäumung	55
2.4.5.	Gasart	55
2.4.6.	Schäumungshilfsmittel	56
2.4.7.	Effizienz der Zerschäumung	56

2.5. Zerschäumung von Proteinen	57
2.5.1. Proteinkonzentration	57
2.5.2. Proteineigenschaften	57
2.5.3. pH-Wert	57
2.5.4. Ionenstärke	58
III. Praktischer Teil	59
1. Materialien und Geräte	59
1.1. Materialien	59
1.1.1. Tierische Rohstoffe	59
1.1.2. Elektrophorese (SDS-PAGE)	59
1.1.3. Zerschäumung	60
1.1.4. TSE-Analytik	61
1.2. Geräte	61
2. Methoden	63
2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.1.1. Anfertigung des Polyacrylamid-Gels für SDS-PAGE	63
2.1.2. Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE	64
2.1.3. Silberfärbung der PA-Gele	64
2.2. Zerschäumung	66
2.2.1. Proteinfractionierung	66
2.2.2. Anreicherung von Prionprotein	66
2.2.3. BSE-negatives Material	67
2.2.4. Anreicherung von infektiösem PrP ^{Sc}	67
2.3. Reinigung der Gerätschaften	67
2.4. Ermittlung des Prionengehaltes	68
2.4.1. Vorbereitung der Proben: Verdauung	68
2.4.2. ELISA-Test	69
2.4.3. Quantifizierung des Prionengehaltes	69
2.4.4. Bewertung der TSE-Infektiosität	70

IV. Ergebnisse	71
1. Proteinseparation durch Zerschäumung	71
2. Zerschäumung von rekombinantem PrP in Magermilch	74
2.1. Zerschäumung von rPrP in Magermilch mit Tween 20, SDS und BSA	74
2.2. Zerschäumung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Tensides	75
3. Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat	76
4. Einfluss von Ultraschall und SDS	77
4.1. PK-verdautes Hirnhomogenat	78
4.2. Natives Hirnhomogenat	79
5. Zerschäumung von rekombinantem PrP ^C	80
6. Verdautes und unverdautes Hirnhomogenat	81
6.1. Verdautes Hirnhomogenat	81
6.2. Unverdautes (natives) Hirnhomogenat	82
7. Zerschäumung von verschnittenem Hirnhomogenat	84
8. Zerschäumung von Gemischen aus Hirnhomogenat	87
8.1. Anreicherung bei unterschiedlichen Anteilen an BSE-positivem Hirnhomogenat im Gehirngemisch	87
8.2. Detektion von PrP ^{Sc} in BSE-negativ getestetem Rinderhirn nach Zerschäumung	88
8.3. Zerschäumung von Gehirn-Gemisch mit sehr geringem Anteil an pathologischem Hirnhomogenat	90
V. Diskussion	91
1. Zerschäumung von infektiösem Material	91
1.1. Inaktivierung des PrP ^{Sc} und Reinigung der Apparatur	91
1.2. Aerosolbildung des PrP ^{Sc}	92
1.3. Dimensionierung der Zerschäumungsapparatur	92
2. Quelle des pathologischen Prionproteins	93
3. Lösungsmittel für die Zerschäumung	94
4. Generieren des Schaumes	94
5. Schäumungshilfsmittel SDS	95
5.1. SDS-Konzentration	96

5.1.1. Auswirkung von SDS auf die Anreicherung von PrP ^{Sc}	96
5.1.2. Auswirkung von SDS auf den ELISA	97
5.1.3. Wirkung des SDS auf das pathologische Prionprotein	97
5.2. SDS und Ultraschallbehandlung von PrP ^{Sc}	97
6. Zentrifugationsverhalten von PrP ^{Sc}	98
7. Stationäre Zerschäumung	98
8. Proteaseaktivität und Verdauungsstabilität von PrP ^{Sc}	100
9. Zerschäumungsverhalten der Matrix Hirnhomogenat	100
9.1. Separation dispergierter Zellfragmente	101
9.2. Proteinseparation	102
9.3. Art der Aggregation des PrP ^{Sc}	103
9.3.1. Aggregation des PrP ^{Sc}	103
9.3.2. Assoziation des PrP ^{Sc}	104
10. Auswirkungen der Proteolyse des Hirnhomogenates	104
11. Konzentration der Zielkomponente in der Vorlage	107
12. Maximal erzielbare Anreicherung	109
13. Anwendung der Zerschäumung zur Probenaufarbeitung	110
14. Relevanz der entwickelten Zerschäumungsmethode	110
VI. Zusammenfassung	113
A. Anhang	115
1. Fotografie der Zerschäumungsapparatur für pathologisches Hirnhomogenat . .	115
2. Tabellen zu den Abbildungen im Ergebnisteil	116
Literaturverzeichnis	121
Abbildungsverzeichnis	138
Tabellenverzeichnis	140

Abkürzungsverzeichnis

BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten
BSA	bovines Serum-Albumin
BSE	schwammartige Hirndegeneration der Rinder (Bovine Spongiforme Enzephalopathie, Rinderwahnsinn)
c_0	(Anfangs-) Konzentration in der Vorlage
CDI	konformationsabhängiger Immunoassay
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenz
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD: Creutzfeldt-Jakob Disease)
cmc	kritische Mizellenkonzentration (critical micell concentration)
c_s	Konzentration im Spumat
CTAB	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid
CWD	chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (Chronic Wasting Disease)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRMs	detergent-resistant membrane domains, rafts
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Anreicherungsfaktor (enrichment ratio)
FFI	Tödliche familiäre Schlaflosigkeit (Fatal Familial Insomnia)
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
g	Gravitation, Erdbeschleunigung
GB	Großbritannien
GM	Größenmarker
GPI-	Glycosyl-Phosphatidylinositol-
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hu	human (menschlich, vom Menschen)
I	elektrische Stromstärke
i.c.	intracerebral, in das Gehirn
IEP	Isoelektrischer Punkt
IHC	immunohistochemische Untersuchung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
μ L	Mikroliter

mL	Milliliter
M	Teilchenkonzentration [Mol/L]
mA	Milliampere
MBM	meat and bone meal, Fleisch- und Knochenmehl
MMG	$\frac{1}{4}$ Magermilch in H ₂ O
MW	Molekulargewicht
n_0	Stoffmenge in der Vorlage
NaOCl	Natriumhypochlorit (Chlorbleichlauge)
NaOH	Natriumhydroxid
NaOH	Natronlauge
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
nn	nicht nachweisbar
n_s	Stoffmenge im Spumat
nvCJK	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD: new variant Creutzfeldt-Jakob disease)
O.I.E.	Internationales Tierseuchenamt, Paris
O.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
PK	Proteinase K
PMCA	protein misfolding cyclic amplification
PrnP	die für PrP kodierenden Gene
PrP	Prionprotein
PrP ²⁷⁻³⁰	Prionprotein mit der Molekülmasse 27 bis 30 Kilodalton
PrP ³³⁻³⁵	Prionprotein mit der Molekülmasse 33 bis 35 Kilodalton
PrP ^C	zelluläres Prionprotein („cellular“)
PrPres	gegen Protease K-Verdau weitgehend stabiles Prionprotein
PrP ^{Sc}	Scrapie Prionprotein
R	Wiederfindung
RNS	Ribonukleinsäure
rPrP	rekombinantes PrP
s	Sekunde
SAF	Scrapie associated fibrils
SBO	specified bovine offals, spezifizierte bovine Schlachtabfälle
sCJK	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHa	syrischer Hamster

TM	Tiermehl
TME	übertragbare Hirndegeneration der Nerze (Transmissible Mink Enzephalopathie)
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
U	elektrische Spannung
UK	United Kingdom
V	Volt
V	Volumen
V_0	Volumen der Vorlage
V_S	Volumen des Spumates
vCJK	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD: variant Creutzfeldt-Jakob disease)

I. Einleitung

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs, Prionkrankheiten) bei Mensch und Tier sind neurodegenerative Erkrankungen, die bislang tödlich enden [PRUSINER 1998]. Diese Gruppe von Erkrankungen (CJK, BSE, Scrapie u.a.) ist bereits seit Jahrhunderten bekannt. Zuerst beschrieben wurde 1732 Scrapie, die TSE der Schafe [MCGOWAN 1922]. Als sich am Ende des vergangenen Jahrhunderts anzudeuten begann, dass Scrapie die Speziesbarriere hin zum Rind (BSE) bereits überwunden hatte, und Fälle einer bis dahin unbekannt Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen bekannt wurden, bestand schnell der Verdacht, es könnte hier ein Zusammenhang bestehen. Befürchtungen traten auf, die neue Variante der CJK könnte durch Produkte aus tierischen Rohstoffen auf Menschen übertragen werden und viele Opfer fordern.

Um Infektionen zu verhindern, wurden zunächst die Verbreitungswege infektiösen Materials durch verschiedene Maßnahmen unterbrochen. Im Weiteren war es wichtig, empfindliche diagnostische Methoden zur Verfügung zu haben, um Krankheitsfälle bei Mensch und Tier erkennen zu können. Denn im Hinblick auf eine Therapie ist das rechtzeitige Erkennen einer Infektion von zentraler Bedeutung.

Diagnoseverfahren für den Nachweis von Prionkrankheiten wurden bald gefunden; allerdings alle mit dem Manko, dass sie einen eindeutigen Befund bislang nur bei Untersuchungen von krankhaftem Gehirngewebe erlauben. Dies setzt eine Obduktion voraus und ist somit nur *post mortem* möglich. Ein Nachweis des Erregers dieser Erkrankungen, des infektiösen Prionproteins, aus anderen Körperflüssigkeiten scheitert bislang an der zu geringen Konzentration des Erregers in anderen Organen oder Körperflüssigkeiten. Durch Konzentrierung könnte dieses Problem gelöst werden.

Eine Methode zur Anreicherung und Abtrennung von Stoffen aus wässrigen Lösungen, die vom Prinzip her bereits 1925 von Ostwald [OSTWALD 1925] beschrieben wurde, ist die Zerschäumungsanalyse. Sie ermöglicht es, sowohl polare als auch unpolare Komponenten aus wässrigen Lösungen anzureichern oder zu separieren. Die Zerschäumung bietet verschiedenste Vorteile gegenüber alternativen Techniken. Aus ökonomischer Sicht ist diese Methode denkbar günstig, es fallen vergleichsweise kaum Kosten für die Errichtung einer Anlage noch für den Betrieb an. Weiterhin ist die Zerschäumung sehr schonend für das Substrat, zumal keine Temperaturbelastung des Produktes auftritt [SCHNEPF 1959]. Ein großer Vorteil aus ökologischer Sicht ist, dass keinerlei Lösungsmittel notwendig sind, die bei vielen Extraktionsmethoden sowohl im Produkt als auch beim Herstellungsprozess problematisch sind. Gerade bei sehr verdünnten Lösungen, wo sich bei anderen Trenn-

methoden die Betriebskosten durch den hohen Volumendurchsatz massiv steigern, ist die Zerschäumung besonders effektiv, ohne hohen Aufwand oder Kosten zu verursachen.

Auch im analytischen Bereich ist eine Anwendung dieser Technik gut vorstellbar, weil sie aus sehr stark verdünnten Lösungen besonders hohe Anreicherungen zu erzielen vermag. In der Analytik ist es oft von entscheidender Bedeutung, einen gewissen Schwellenwert in der Konzentration zu überschreiten, um eine Detektion zu ermöglichen. Dieses Problem – die Erfassung geringster Konzentrationen – stellt auch bei der *in vivo* Diagnose der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien eine große Herausforderung dar. Die minimalen Stoffmengen sind die Hauptursache dafür, dass die BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) sowie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) bislang nur *post mortem* nach einer immunologischen Untersuchung des Stammhirnes eindeutig belegt werden können.

Ziel der Arbeit

Die Intention der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst hohe Anreicherung sowie Separation des pathologischen Prionproteins, des Erregers der Prionkrankheiten, zu erzielen. So soll ein Nachweis aus Körperflüssigkeiten und somit eine Diagnose *ante mortem* ermöglicht werden. Anders als bei vielen bereits erfolgten Versuchen zur selektiven Anreicherung des pathologischen Prionproteins soll das Ziel hier durch Anwendung der Zerschäumungsanalyse erreicht werden.

II. Grundlagen

1. Prionkrankheiten, Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

1.1. Überblick

Die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSEs) sind Prionkrankheiten, die übertragbar (transmissibel) sind und eine schwammartige Hirndegeneration (spongiforme Enzephalopathie) hervorrufen.

Die Bezeichnung „Prionkrankheiten“ rührt daher, dass Übertragung sowie Entwicklung der krankhaften Veränderung im Hirn (Pathologie) auf ein Protein zurückzuführen sind, das sog. Prionprotein oder kurz Prion. Dieses Protein kann in unterschiedlichen Strukturformen vorliegen. In der sog. zellulären Strukturform ist das Prionprotein funktioneller Bestandteil des gesunden Organismus. In veränderten Formen beeinträchtigt es jedoch die Funktion des Gehirns und bildet im Gehirngewebe Aggregate aus, die das Gewebe schädigen und letztlich zerstören, was bislang unausweichlich den Tod zur Folge hat.

Diese Prionkrankheiten sind nur z.T. ansteckend im klassischen Sinne, dennoch zählt man sie zu den Infektionskrankheiten. Die Bezeichnung „transmissibel“ im Namen der Krankheiten deutet auf die Tatsache hin, dass sie zwischen Arten übertragbar sind, man spricht von der Überwindung der Spezies-Barriere. Diese findet i.d.R. nicht durch natürliche Infektion statt.

Die Prionkrankheiten (TSEs) des Menschen haben eine niedrige Inzidenz und waren daher früher kein für die Allgemeinheit dringliches Problem. Erst durch die BSE-Epidemie und deren Zusammenhang mit einer möglicherweise ähnlich starken Ausbreitung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen wurden die TSEs in das Interessensfeld einer großen Öffentlichkeit gerückt.

Die ersten wissenschaftlichen Hinweise auf eine der Prionenkrankheiten stammt aus dem Jahr 1732. Damals wurde die Scrapie (Traberkrankheit, „Trab“) beschrieben, die TSE der Schafe [MCGOWAN 1922]¹.

¹ Anm.: Literaturangaben nach beendetem Satz beziehen sich auf die Inhalte der vorhergehenden Sätze; befindet sich die Angabe in einem Satz, so bezeichnet die Angabe die Quelle des unmittelbar vorhergehenden Sachverhaltes.

Creutzfeldt [CREUTZFELDT 1920] und Jakob [JAKOB 1921a] beschrieben um 1920 als Erste eine TSE beim Menschen, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK).

BSE wurde 1986 erstmals als eigenes Krankheitsbild erkannt und 1987 beschrieben [WELLS 1987]. Nach gehäuftem Auftreten von BSE forcierte man in Großbritannien 1990 die epidemiologische Überwachung der CJK. Ab 1995 erkrankten und verstarben viele Menschen an der neuen Variante der CJK. Diese, so wurde vermutet, könne kausal mit der BSE verknüpft sein.

Der große Schritt hin zu einem Verständnis der TSE war die von Prusiner [PRUSINER 1982] veröffentlichte These, dass bei den Prionkrankheiten ein bis dahin nicht bekannter Mechanismus der Übertragung und Entwicklung von Krankheiten auftritt, der lediglich durch Proteine bzw. deren räumliche Struktur bedingt wird.

1.2. Die verschiedenen Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

Einen Überblick über die bislang bekannten Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien bei verschiedenen Spezies gibt Tabelle II.1 (Seite 5), eine detaillierte Beschreibung der aufgezählten Erkrankungen folgt.

1.2.1. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)

1920 beschrieb Hans Creutzfeldt [CREUTZFELDT 1920], 1921 unabhängig davon Alfons Jakob [JAKOB 1921a], ein seltenes Symptom, eine „spastische Pseudosklerose“, die heute die Bezeichnung Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) trägt. Je nach Ursache bzw. Übertragungsweg werden verschiedene Formen unterschieden.

Statistische Erhebungen über die Entwicklung der Opferzahlen der CJK in Großbritannien sowie aktuelle internationale CJK-Fälle werden unter II.1.9 ab Seite 39 präsentiert.

Bei der sporadischen (idiopatischen) Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK) kann eine Infektionsquelle für die Erkrankung nicht identifiziert werden. Als Ursache sind zufällige somatische Änderungen des PRNP² sowie spontane Konformationsänderungen des bereits exprimierten Prionproteins denkbar. Letztere könnten in einer Art Kettenreaktion (wie bei allen Prionkrankheiten) ihre Fehlfaltung auf weitere gesunde PrP^C übertragen. [BUDKA 2001a]

Die Inzidenz dieser Form beträgt 0,3 bis 1,3 Fälle pro 10⁶ Einwohner pro Jahr. Sie macht 80 bis 90 % aller CJK-Fälle aus [DELASNERIE-LAUPRETRE 1995].

Bei der sCJK ist weiterhin festzustellen, dass bestimmte genetische Konstellationen die Entstehung der Krankheit begünstigen. 72 % aller an dieser Form der CJK Erkrankten

² Gen, das für das Prionprotein kodiert

Tabelle II.1.: Überblick über die einzelnen Formen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) bei Mensch und Tier [HÖRNLIMANN 2001b]

Vorkommen bei	Krankheitsformen	Internationale Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Quelle und Jahr der Erstbeschreibung
Mensch	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	Creutzfeldt-Jakob-Disease	CJK	[CREUTZFELDT 1920]
	sporadisch		sCJK	[JAKOB 1921b], [JAKOB 1921a]
	iatrogen		iCJK	
	familiär-genetisch		fCJK	
	neue Variante		nvCJK	[WILL 1996]
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	GSS	[DIMITZ 1913] [GERSTMANN 1928] [GERSTMANN 1936]
Kuru	Kuru	Kuru	[ZIGAS 1957]	
Tödliche (oder letale) familiäre Schlaflosigkeit	Fatal Familiar Insomnia	FFI	[LUGARES 1986b]	
Tier	Traberkrankheit der Schafe und Ziegen	Scrapie	Scrapie	1732 nach [MCGOWAN 1922]
	übertragbare Hirndegeneration der Nerze	Transmissible Mink Encephalopathy	TME	[BURGER 1965], [HARTSOUGH 1965]
	Chronisch zehrende Krankheit der Hirsche	Chronic Wasting Disease	CWD	[WILLIAMS 1980]
	Schwammartige Hirndegeneration der Rinder und rinderartigen Wiederkäuer (Bovidae)	Bovine Spongiforme Encephalopathy	BSE	[WELLS 1987] [JEFFREY 1988]
		Feline Spongiforme Encephalopathy	FSE	[WYATT 1990]

sind auf dem PRNP am Codon 129 homozygot für die Aminosäure Methionin, während diese Genkonstellation nur bei 37 % der gesamten Bevölkerung auftritt [PALMER 1991].

Die familiäre CJK (fCJK, familiär-genetisch bedingt, hereditär) wird autosomal-dominant vererbt. In betroffenen Familien wurden unterschiedliche PRNP-Punktmutationen sowie Insertionsmutationen nachgewiesen. Die fCJK macht etwa 10 % aller CJK-Fälle aus. [BUDKA 2001a]

Die iatrogen erworbene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK) umfasst die Fälle, bei denen die Übertragung der CJK durch medizinische Eingriffe oder Unfälle (akzidentell) erfolgt war. Am häufigsten wurde diese sehr seltene Form iCJK durch parenterale Verabreichung von kontaminiertem Wachstumshormon übertragen. Diese Präparate werden aus Hypophysen von Leichen extrahiert. Weiterhin nimmt man Transplantationen (z.B. Augenhornhauttransplantationen oder Übertragungen der harten Hirnhaut) oder unzureichend inaktivierte neurochirurgische Instrumente als Übertragungsweg an. [BUDKA 2001a] Bis 1998 wurden weltweit etwa 180 Fälle von iatrogener CJK bekannt [BUDKA 1998].

Die neue Variante CJK (nvCJK), zuerst 1996 beschrieben, wird in Zusammenhang mit der BSE bei Rindern gebracht. Sie trat und tritt v.a. in Großbritannien auf [WILL 1996]. Nach den ersten Fällen von BSE wurde in Großbritannien eine verstärkte Überwachung der CJK eingeleitet. Man wollte mit einem eigens eingeführten Überwachungsprogramm etwaige Änderungen in der Epidemiologie oder bei anderen Charakteristika der CJK erfassen. Ende 1995 wurden in Großbritannien Fälle von CJK-Patienten mit untypisch niedrigem Sterbealter bekannt. Weiterhin wichen der klinische Verlauf, die psychiatrischen Symptome sowie die neuropathologischen Befunde stark von denen der bis dahin bekannten CJK-Fälle ab.

Die Ursache der nvCJK wird nach wie vor (von der überwiegenden Mehrheit der Wissenschaftler) im Konsum von stark erregerhaltigem bovinem Gewebe gesehen. Man vermutet, dass in den 80er Jahren tierisches Gewebe (v.a. Rückenmark) erkrankter Rinder in Lebensmittel gelangte, das stark mit pathologischem Prionprotein kontaminiert war. Im Verdacht steht hier vor allem Separatorenfleisch, bei dessen Gewinnung es leicht zu einer Kontamination mit stark erregerhaltigem Gewebe kommen kann. Folge war eine weit verbreitete Exposition gegenüber dem infektiösen BSE-Agens [ANDERSON 1996]. Bereits 1989 wurde durch gesetzliche Vorschriften die Verwertung von Risikomaterial verboten. [WILL 2001]

1.2.2. Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)

Erstmalige Erwähnung findet das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) bereits 1913 und 1928 [DIMITZ 1913, GERSTMANN 1928]. Ausführlich beschrieben wurde sie 1936 von Josef Gerstmann, Erwin Sträussler und Isaak Scheinker [GERSTMANN 1936]. Das GSS ist ausschließlich erblich bedingt und Prototyp einer autosomal-dominant vererbten familiären TSE. Nach neuen Forschungsergebnissen erscheint es nicht gerechtfertigt, weiterhin zwischen GSS und familiärer CJK zu unterscheiden [BUDKA 2001c]. GSS konnte im Versuch auf Affen [MASTERS 1981], Ratten und Mäuse [TATEISHI 1997] übertragen werden.

1.2.3. Kuru („der lachende Tod“)

Diese Prionerkrankung des Menschen wurde 1957 erstmals detailliert beschrieben [ZIGAS 1957]. Die Erfahrungen mit Kuru waren für den Verlauf der Erforschung der gesamten TSEs sehr aufschlussreich, denn viele Erkenntnisse über Ansteckung, Verbreitung und Verlauf der Kuru zeigten deutliche Parallelen zu anderen Prionkrankheiten.

Kuru ist eine Krankheit, die bei einigen Volksstämmen, v.a. bei den Fore, den Eingeborenen im östlichen Hochland von Papua Neuguinea, auftrat [GAJDUSEK 1966]. Als Ursachen gelten der Endokannibalismus sowie spezielle rituelle Handlungen mit den Verstorbenen [ZIGAS 1990]. Mitte der Fünfziger Jahre wurden diese Riten eingestellt und die Anzahl der Erkrankungen ging zurück, heutzutage gibt es keine neuen Fälle mehr.

Zum einen wurde infektiöses Hirngewebe verstorbener Angehöriger verzehrt (enterale Aufnahme). Ein anderer Infektionsweg war die parenterale Aufnahme über die Körperoberfläche, vor allem über die Schleimhäute. Nach der Entfernung des Gehirns aus dem Schädel verrieben die Fore dieses auf dem ganzen Körper. Von den beiden Infektionswegen ist der parenterale Weg wesentlich effizienter als der enterale und hat eine kürzere Inkubationszeit zur Folge. Eine direkt-horizontale Übertragung (natürliche Übertragung von Mensch zu Mensch) konnte bei der Kuru nicht beobachtet werden. Dies scheint bei allen Prionkrankheiten, mit Ausnahme von Scrapie und CWD, der Fall zu sein. [HÖRNLIMANN 2001d] Selbst erkrankte stillende Mütter übertrugen Kuru nicht durch die Muttermilch auf ihre Kinder [ALPERS 1979].

Mitte der Fünfziger Jahre wurden diese Riten eingestellt und die Anzahl der Erkrankungen ging zurück, heutzutage sind keine neuen Fälle bekannt.

Hirnschnitte von Kuruopfern weisen die für Prionkrankheiten typischen mikroskopisch kleinen Löcher (Vakuolen) und Kuru-Plaques auf. Speziell bei Kuru befinden sich diese Gewebeerstörungen im Kleinhirn, was die Symptomatik der Krankheit bedingt. Die kuruspezifischen Verhaltensweisen, ein Lächeln im Anfangsstadium, das sich weiter bis zu euphorischen Phasen steigert, sowie eine Neigung zu Gelächter und Gekicher von Erkrankten liegen der Bezeichnung „der lachende Tod“ zugrunde. [HÖRNLIMANN 2001d]

1.2.4. Tödliche (oder letale) familiäre Schlaflosigkeit (fatal familial insomnia, FFI)

Die tödliche familiäre Schlaflosigkeit („fatal familial insomnia“, FFI) ist eine weitere familiäre (genetische, erbliche, hereditäre) Prionkrankheit des Menschen. Diese autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Krankheit ist charakterisiert durch progrediente, unabänderliche Schlaflosigkeit, Dysautonomie und motorische Ausfälle [LUGARESI 1986b]. Jedoch handelt es sich hier um einen anderen genetischen Defekt (Mutation) als beim Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom oder bei der familiären CJK. Die erstmalige Beschreibung erfolgte 1986 [LUGARESI 1986a, LUGARESI 1986b]. Die Erkrankung bedingt eine Schlaflosigkeit, die letal endet [HÖRNLIMANN 2001d].

1995 gelang erstmals eine experimentelle Übertragung dieser Erkrankung [TATEISHI 1995]. Empfänglich für diese Krankheit sind nur Menschen, die Träger einer bestimmten, prädisponierenden genetischen Mutation sind. [BUDKA 2001b]

Bei den familiären Prionkrankheiten des Menschen FFI, GSS, fCJK können aufgrund ihrer hereditären Natur jeweils im Stammbaum der betroffenen Familien weitere Fälle gefunden werden [HÖRNLIMANN 2001b]. Es handelt sich bei diesen nicht um neue Krankheiten, lediglich die wissenschaftliche Beschreibung erfolgte erst im 20. Jahrhundert.

1.2.5. Traberkrankheit der Schafe und Ziegen

Die Traberkrankheit (Scrapie) tritt weltweit auf. Scrapie ist die am frühesten (1732) beschriebene Prionkrankheit und befällt Schafe und Ziegen [MCGOWAN 1922]. In England wurde Scrapie zwischen 1920 und 1950 durch das gehäufte Auftreten bereits zu einem wirtschaftlichen Problem, was eine Erforschung notwendig werden ließ. Vermutlich erfolgte damals auch die Verbreitung der Krankheit in etliche weitere Länder [HOURRIGAN 1979]. Ende des letzten Jahrhunderts wurde die Scrapieforschung wegen des Auftretens der BSE und nvCJK wieder forciert, nachdem man den Zusammenhang zwischen den TSEs und die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Species erkannte.

Aufgrund der Inkubationszeit, des Läsionsprofils (Verteilungsmuster der pathologischen Veränderungen im Gehirn), der Empfindlichkeit des PrP^{Sc} gegenüber Verdauung mit Protease K (PK) sowie weiterer Kriterien können bislang mehr als 15 Scrapie-Erregerstämme unterschieden werden [DETWILER 2001].

Die experimentelle Übertragung der Scrapie gelang zuerst 1936 und 1938, der infektiöse Charakter dieser Erkrankung war somit nachgewiesen [CUILLE 1936, CUILLE 1938].

Die Übertragung der Scrapie zwischen Schafen resp. Ziegen erfolgt nach Pattison in erster Linie maternal. Entweder intrauterin oder extrauterin, als Folge des engen Kontakts während und nach der Geburt [PATTISON 1972, PATTISON 1974]. Der Erreger wird im Fruchtwasser oder in der Plazenta ausgeschieden und kann so auf Lämmer und ältere Tiere übertragen werden [BROTHERSTON 1968]. Die Aufnahme des Erregers erfolgt über

den Verdauungstrakt [HADLOW 1982], über Bindehäute [HARALAMBIEV 1973] oder über Hautläsionen [STAMP 1959]. Eventuell kann es auch zu einer Übertragung durch Heumilben kommen [WISNIEWSKI 1996].

Wie bei allen Prionkrankheiten kommt es zu einer Schädigung des Zentralen Nervensystems. Bei der Scrapie äußert sich das vor allem in Form von Juckreiz und in der Folge Scheuern, Nervosität und Aggressivität, Schreckhaftigkeit, Bewegungsstörungen, Festliegen, Zittern und letztlich dem Tod. [DETWILER 2001]

1.2.6. Schwammartige Hirndegeneration der Rinder und rinderartigen Wiederkäuer (*Bovidae*) – Bovine Spongiforme Enzephalopathie, BSE

1986 wurde, erstmals am zentralen britischen Veterinärlabor, bei der histologischen Gehirnuntersuchung eines Rindergehirns eine lichtmikroskopisch sichtbare Durchlöcherung des Hirngewebes festgestellt. Dieser nie zuvor bei einem Rind festgestellte Befund wurde „Schwammartige Hirndegeneration der Rinder“ (Bovine Spongiforme Enzephalopathie, BSE) genannt [WELLS 1987].

Wie beschrieben, tritt Scrapie seit Jahrhunderten in Großbritannien (GB) auf. Der Zusatz von Tiermehl zu Futter von Schwein, Schaf und Rind war seit Ende des 19. Jahrhunderts in GB und vielen weiteren Ländern verbreitet. Die Verfütterung dieser Stoffe, in die u.a. Hirngewebe von infizierten Schafen einfluss, begann aber erst Probleme aufzuwerfen, als die Technologie der Tierkörperverwertung in GB in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts massiv geändert wurde [FORD 1996]. Im Rahmen der Umstellung des Batchverfahrens auf kontinuierlichen Betrieb wurde einerseits auf die Fettextraktion mit Perchlorythylen verzichtet, andererseits wurden die Erhitzungstemperatur sowie die Erhitzungsdauer verringert. Das daraus resultierende Tiermehl fungierte als Vektor für die Übertragung des infektiösen Materials zwischen den beiden Arten. [WILESMITH 1991]

Das Verbot der Verfütterung von Wiederkäuerprotein an Wiederkäuer wurde in GB 1988 erlassen. Die positiven Auswirkungen dieser Maßnahme zeigten sich erst 1993 in der Überwindung des Höhepunktes der Epidemiekurve. [HÖRNLIMANN 2001c]

Die klinischen Symptome schreiten mit Dauer der Erkrankung fort und dauern Wochen bis Monate, zuletzt folgt der Tod. In erster Linie sind dies Übererregbarkeit, Nervosität, Ängstlichkeit, Überempfindlichkeit auf Lärm, Berührung, z.T. auch Licht sowie später Ataxie bis hin zum Festliegen [SCHICKER 2001].

Wie die herdeninterne Inzidenz der BSE zeigt, ist eine horizontale Übertragung (von Rind zu Rind) nicht anzunehmen [WILESMITH 1996]. Denn eine Häufung von Krankheitsfällen in einer Herde, wie sie bei horizontal ansteckenden Krankheiten auftritt, wird nicht beobachtet.

Zur Entstehung der BSE gibt es unterschiedlichste Theorien. Aktueller Stand der Forschung ist, dass die BSE durch Verfütterung von ovinem PrP^{Sc} an Rinder ausgelöst wurde. Dies geschah durch unzureichende Inaktivierung des Prionproteins während der Gewin-

nung des Tiermehls aus kranken Schafskörpern, das anschließend an Rinder verfüttert wurde [WILESMITH 1991]. Das Überwinden der Speziesbarriere, also das Überschreiten der Artengrenze, erfolgte demzufolge in einer Anpassung des Erregerproteins vom Schaf an das Rind. Es kam hier zu einer Modifikation, denn das bovine PrP^{Sc} unterscheidet sich von jedem einzelnen der ovinen Erregerstämme [FRASER 1992].

Eine ähnliche Theorie besagt, dass die BSE bereits länger in einer symptomlosen Form existierte, aber erst durch das veränderte Aufbereitungsverfahren des Tiermehls ausuferte, bzw. nur die Inzidenz durch den sorglosen Umgang bei der Herstellung von Tierkörpermehl erhöht wurde. [HÖRNLIMANN 2001c]

Weiterhin geht eine andere Theorie davon aus, dass der Scrapie-Erreger eine molekulare Änderung erfahren hat, welche die Virulenz steigerte und so die Artenschranke überwinden konnte [WILESMITH 1994].

Eine Theorie, die in eine völlig andere Richtung geht, ist die Organophosphat-Hypothese. Ihr zufolge ist BSE eine Konsequenz des in GB weit verbreiteten Einsatzes von Phosmet, einer Organophosphat-Verbindung, die als Insektizid eingesetzt wurde [PURDEY 1994, PURDEY 1996]. Neuere Veröffentlichungen, die diese Theorie stützen würden, liegen nicht vor.

Im Jahr 2005 wurde eine weitere Theorie zum Ursprung der BSE veröffentlicht. Sie besagt, dass die BSE in Europa, v.a. in GB, von kontaminiertem Tiermehl ausgelöst worden sei, das vom indischen Subkontinent stammte. Dort soll bei der Gewinnung des Tiermehls auch menschliches, mit CJK belastetes Material, verarbeitet worden sein. [SHANKAR 2005]

Während früher davon ausgegangen wurde, dass es nur eine Variante der BSE und somit einen Stamm von infektiösem Prionprotein beim Rind gibt, fand Casalone [CASALONE 2004] eine zweite Variante. Diese ruft nicht die sonst beobachtete schwammige Struktur hervor, sondern sog. amyloide Plaques, welche in Regionen des Gehirns auftreten, die bei der früher bekannten Form der BSE nicht betroffen waren. Der Erregerstamm ist dem Prionprotein ähnlich, das die spontan auftretende sCJK hervorruft. Ob nun diese neu gefundene PrP-Variante verantwortlich für das Überspringen der Speziesgrenze ist, bleibt zu erforschen.

Statistische Erhebungen über die Entwicklung der Opferzahlen der BSE in Deutschland und Großbritannien sowie aktuelle internationale BSE-Fälle sind am Ende dieses Kapitels unter II.1.8 (ab Seite 34) dargestellt.

1.2.7. Weitere Prionkrankheiten

Im Folgenden werden einige TSEs angeführt, die aufgrund geringerer Bedeutung nicht detailliert beschrieben werden. Allen gemeinsam sind die mehr oder minder ähnlichen, für die Prionkrankheiten typischen, Symptome. Weiterhin enden sie wie alle Prionkrankheiten bislang letal.

- **Chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (chronic wasting disease, CWD)**

Die Chronisch zehrende Krankheit der Hirsche ist in erster Linie in Nordamerika verbreitet und betrifft dort sowohl Tiere, die von Menschen gehalten werden, als auch in Freiheit lebende [WILLIAMS 2001].

- **Übertragbare Hirndegeneration der Nerze (transmissible mink encephalopathy, TME)**

Diese Prionkrankheit betrifft ausschließlich Farmnerze (*Mustela vison*) [HADLOW 2001]. TME als seltene, nicht ansteckende Prionkrankheit ist verursacht durch die Verfütterung von mit dem TSE-Erreger kontaminierten Material an diese Tiere [MARSH 1993].

- **Prionkrankheiten bei Zootieren**

In britischen zoologischen Gärten werden seit 1986 immer wieder spongiforme Enzephalopathien bei Wildtieren festgestellt. Bei den betroffenen Individuen handelte es sich entweder um Vertreter der Familien der Hornträger und somit um BSE-Opfer oder um Vertreter der Familie der Katzen (*Felinae*) und daher um Opfer der FSE (s.u.). Gemein ist allen diesen Tieren, dass sie mit Futter versorgt wurden, das mit Tiermehl versetzt war. [KIRKWOOD 2001]

- **Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) der Katzen**

Neben den in zoologischen Gärten in GB an FSE erkrankten Tieren aus der Familie der Felinae gab es auch einige Fälle bei Hauskatzen [HEWICKER-TRAUTWEIN 2001].

1.3. Ätiologie: Ein Protein als Erreger

Das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) war bei der ersten Beschreibung der Prionkrankheiten noch nicht als Erreger dieser Gruppe von tödlichen Krankheiten bekannt.

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist Prusiners Theorie der pathologischen Prionen als Erreger mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als richtig anzunehmen. Neue Forschungsergebnisse stützen diese „Nur-Protein-Hypothese“ [LEGNAME 2004]. Auch der jüngst geglückte Versuch, infektiöses Prionprotein im Labor zu generieren, untermauert Prusiners Prion-Theorie [CASTILLA 2005].

Als Prusiner [PRUSINER 1982] diese sog. „Nur-Protein-Hypothese“ (protein-only-hypothesis) äußerte, stieß er auf große Skepsis, teilweise auch Ablehnung, in der wissenschaftlichen Welt. Seine These besagt, dass der Erreger der Scrapie nur aus Protein aufgebaut ist und keine DNS enthält. Bis dahin war es undenkbar, dass ein Krankheitserreger sich ohne die Erbsubstanz DNS (Desoxyribonukleinsäure) im Wirtsorganismus vermehren und eine Infektionskrankheit hervorrufen könnte. Ein Replikationsmechanismus ohne Beteiligung von DNS wurde nie zuvor beschrieben. Selbst Viren enthalten DNS, und die kleinsten

bekannten Krankheitserreger, die Virionen, bestehen ausschließlich aus Erbgut (DNS). [PRUSINER 1998]

Ursache für die Prionkrankheiten ist eine „Fehlfaltung“ des gesunden, körpereigenen Prionproteins PrP^C (C für cellular, d.h. zellulär) hin zu einer infektiösen, pathologischen (krankhaften) und pathogenen (krankmachenden) Form, dem PrP^{Sc} (Sc für Scrapie). Die Bezeichnung PrP^{Sc} wird für das pathologische Prionprotein bei Prionkrankheiten allgemein verwendet, wenngleich diese nicht identisch mit dem PrP^{Sc} der Scrapie sind.

Das PrP^{Sc} bewirkt im Wirtsorganismus keine Replikation bzw. Expression des eigenen Proteins. Es betreibt auch keinen eigenen Stoffwechsel wie zelluläre Erreger (z.B. Bakterien), sondern überträgt seine Struktur auf ein anderes Protein, das die gleiche (oder eine ähnliche, im Falle des Überschreitens der Speziesgrenze) Primärstruktur hat. Das PrP^{Sc} muss somit keinen stofflichen Umbau bewirken, sondern lediglich die Konformation (Sekundär-, Tertiär- und evtl. Quartärstruktur) des vorhandenen PrP^C ändern, also die eigene räumliche Anordnung auf ein gesundes PrP^C übertragen. Dieses Kopieren der infektiösen Form des PrP^{Sc} auf PrP^C läuft dann in Form einer Kettenreaktion weiter. [PRUSINER 1991]

Das PrP agiert (in seiner pathologischen Form) als Chaperon für sich selbst (in der zellulären Form) [RIESNER 2001a].

Die pathologische (pathogene, infektiöse) Form des Prionproteins hat einen deutlich erhöhten Anteil an β -Faltblattbereichen gegenüber dem gesunden PrP^C , dessen Sekundärstruktur überwiegend aus α -Helix besteht [PAN 1993].

Im Folgenden werden bedeutende Grundlagen über das Prionprotein sowie Genetik und Pathologie speziell in Bezug auf die Situation beim Menschen beschrieben. Die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien unterscheiden sich bei verschiedenen Spezies. Die einzelnen Formen bei unterschiedlichen Tierarten sind für diese Arbeit nicht von Interesse.

Bei der Darstellung der Strukturen des Prionproteins muss z.T. auf das rekombinante Prionprotein des syrischen Hamsters (SHarPrP) Bezug genommen werden, da die Strukturaufklärung auf Basis dieses Proteins durchgeführt wurde.

1.3.1. Das zelluläre Prionprotein PrP^C

Das humane PrP^C ist ein Glykoprotein, d.h. ein konjugiertes Protein, das im Molekül neben der Aminosäurekette auch Kohlenhydrate enthält. Die Aminosäurekette weist eine Länge von 253 Aminosäuren auf [KRETZSCHMAR 1986]. Das für das Prionprotein kodierende Gen PRNP liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20. Es setzt sich aus zwei Exons und einem Intron von 13 kb (Kilobasen) Länge zusammen. Die Sequenz des PrP liegt auf dem zweiten Exon [PUCKETT 1991]. Die genomische Struktur des PRNP ist bei vielen Säugetieren ähnlich. Auf Aminosäureebene findet sich eine ausgeprägte Homologie der Prionproteine von verschiedenen Säugetierspezies. Paarweise Vergleiche der Ami-

nosäuresequenz des PrP verschiedener Säugerspezies zeigten eine Übereinstimmung von i.d.R. über 90 % [SCHÄTZL 1995]. Diese Gegebenheit ist von zentraler Bedeutung für die Transmissibilität der TSEs zwischen unterschiedlichen Spezies. Weiterhin ist diese große Ähnlichkeit Ursache dafür, dass übertragene pathologische Prionproteine oder bereits zu PrP^{Sc} umgewandeltes körpereigenes PrP^C vom Immunsystem nicht als körperfremd bzw. pathologisch erkannt werden.

Das zelluläre Prionprotein PrP^C ist ein Membranprotein. Es wird überwiegend auf der Oberfläche von Neuronen (Nervenzellen) gebildet, aber auch an der Zellwand von Astrozyten sowie in einer Vielzahl verschiedener anderer Zelltypen exprimiert [KRETZSCHMAR 1986, LIBERSKI 1992, MOSER 1995].

Die Bildung des PrP^C erfolgt in Hirn, Rückenmark, Lunge, Milz und Muskeln [BASLER 1986, BENDHEIM 1992, OESCH 1985].

Aus funktioneller Sicht ist die kupferbindende Eigenschaft des zellulären Prionproteins von zentraler Bedeutung [BROUSOLLE 1989, STÖCKEL 1998, VILES 1999].

Jüngst wurde festgestellt, dass das Prionprotein bei Mäusen eine positive Wirkung auf adulte blutbildende Stammzellen ausübt, indem es deren Überleben in Stresssituationen begünstigt. Bei Mäusen ohne das PRNP (knock-out Mäuse) wird die Blutbildung durch Myelotoxine empfindlich geschwächt. Im Falle von ektopischer³ Expression von PrP in Knochenmarkszellen gewinnen diese Tiere jedoch die Fähigkeit zur Blutbildung zurück [ZHANG 2006].

Am N-Terminus weist das humane PrP^C eine Signalsequenz von 22 Aminosäuren auf. Am entgegengesetzten Ende der Proteinkette (C-Terminus) wird beim sog. Reifen des Proteins eine Sequenz von 23 Aminosäuren abgespalten und am Serinrest 230 ein GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker) angefügt. Über diesen GPI-Anker ist das reife PrP^C in der Zelloberfläche verankert [STAHL 1987]. Die Verankerung erfolgt in sog. DRMs (detergent-resistant membrane domains), auch als „rafts“ bezeichneten, Strukturen [SARNATARO 2004].

Die oben genannten, möglichen N-Glykosylierungen erfolgen an zwei Glykosylierungsstellen, welche sich an den Aminosäureresten 181 sowie 197 befinden. Das PrP kann an den genannten Stellen keine, eine oder zwei Glykosylierungen aufweisen, schematisch dargestellt in Abbildung II.1 (Seite 14). Bei verschiedenen Varianten der CJK treten Unterschiede in der Glykosylierung auf [PARCHI 1997, COLLINGE 1996].

Die N-terminale Hälfte des Prionproteins enthält eine vierfache Octarepeatregion, die Kupferionen-bindende Eigenschaften aufweist [BROUSOLLE 1989, HORNSHAW 1995a], [HORNSHAW 1995b]. Weiterhin besitzt das PrP^C eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cystein-Resten [STAHL 1991], die essentiell für die Stabilität der dreidimensionalen Struktur ist [MEHLHORN 1996]. Schematisch dargestellt ist dies in den Abbildungen II.1 (Seite 14) sowie II.2 (Seite 15).

³ nicht an typischer Stelle liegend [ROCHE 2006]

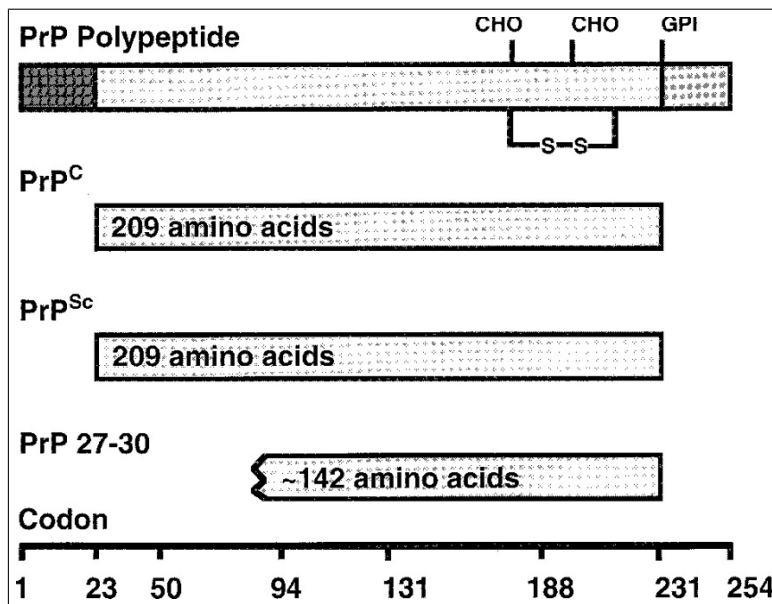


Abbildung II.1.: Schematische Darstellung von Hamster-Prionprotein SHaPrP. In voller Länge besteht SHaPrP aus 254 Aminosäuren. CHO stellt die Glykosylreste dar. Weiterhin ist die Disulfidbrücke $-S-S-$ eingezeichnet. Ganz rechts am obersten Balken („PrP Polypeptide“) befindet sich der GPI-Anker. Nach der Modifikation bestehen PrP^C sowie PrP^{Sc} aus 209 Aminosäuren. PrP²⁷⁻³⁰ ist das Fragment vom PK-stabilen PrP^{Sc} nach dessen Verdauung. Der Maßstab unten zeigt die laufend nummerierten Codons (Nukleinsäuretripletts) an. Diese entsprechen den Aminosäuren. [PRUSNER 1998]

1.3.2. Das pathologische Prionprotein PrP^{Sc}

Einen Bildungsort im Sinne einer Expression des pathologischen PrP^{Sc} gibt es nicht. Es wird aus zelleigenem PrP^C gebildet. Das PrP^{Sc} wird überwiegend im Hirngewebe, aber auch im zentralen Nervensystem sowie im lymphoretikulären Gewebe akkumuliert. In wesentlich geringerer Konzentration findet es sich auch in anderen Geweben und Körperflüssigkeiten. [RIESNER 2001a]

Abbildung II.3 (Seite 16) zeigt eine modellhafte Darstellung der Tertiärstruktur des humanen infektiösen Prionproteins huPrP^{Sc}.

Im Falle der oralen Aufnahme (enteraler Übertragungsweg) des PrP^{Sc} kommt es zunächst zu einer Anreicherung in den Payer'schen Plaques des Gastrointestinaltraktes [MESTRE FRANCES 1979]. Die Ausbreitung des pathologischen PrP^{Sc} im Körper erfolgt in erster Linie entlang der Nervenbahnen und nicht vorrangig im Blut, obgleich auch im Blut Infektiosität nachgewiesen werden konnte. Im Blutserum war sehr geringe, in der Leukozytenmanschette⁴ wesentlich höhere Infektiosität feststellbar. [BROWN 1999] Bei unterschiedlichen Spezies wurde in verschiedenen anderen Organen Infektiosität nach-

⁴ Auflagerung der Leukozyten auf der Erythrozyten-Säule nach Zentrifugieren von Blut oder Sedimentieren ungerinnbar gemachten Blutes [ROCHE 2006]

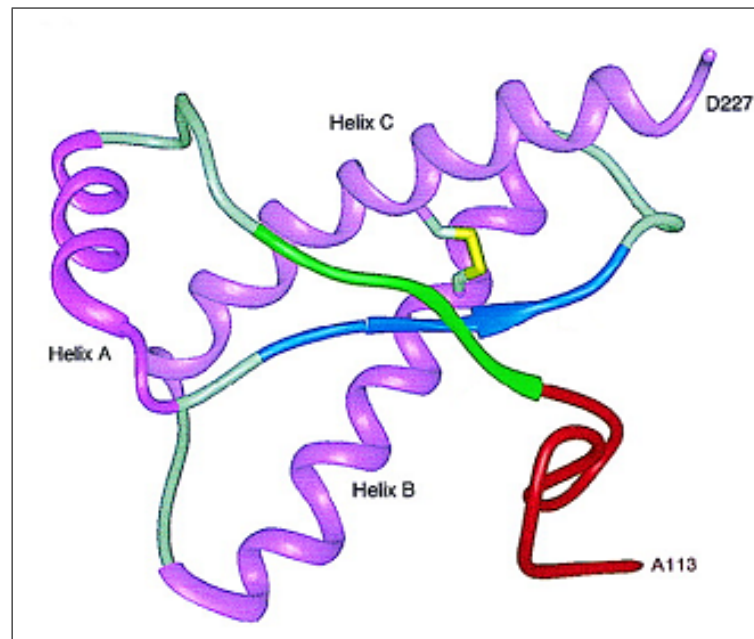


Abbildung II.2.: NMR-Strukturmodell von rekombinantem Hamsterprion (SHa) rPrP(90–231). Wahrscheinlich gleicht die α -Helix-Struktur des SHa rPrP(90–231) der des PrP^C. Das rPrP(90–231) ist von der Seite her abgebildet, wo vermutlich das PrP^{Sc} an das PrP^C bindet. Die Helices A (Aminosäurereste 144–157), B (Aminosäurereste 172–193) und C (Aminosäurereste 200–227) (pink) stellen α -Helix-Bereiche dar. Grün resp. blau sind die Bereiche dargestellt, die eine β -Faltblattstruktur aufweisen. Die Disulfidbrücke zwischen Cys-179 und Cys-214 ist gelb, und die hydrophobe Region aus den Resten 113–126 rot. [PRUSINER 1998]

gewiesen, bei der Scrapie (Schaf, Ziege) u.a. in der Plazenta [RIESNER 2001a]. Darin könnte eine mögliche Ursache für die Übertragung zwischen Individuen liegen, da die Nachgeburt von Tieren gefressen wird.

1.3.3. Das Immunsystem und PrP^{Sc}

Das zentrale Problem für den infizierten Organismus – sowohl bei der Übertragung als auch während der Inkubationszeit der Prionkrankheiten – besteht in der Ähnlichkeit von PrP verschiedener Ausformungen (PrP^C und PrP^{Sc} in allen Modifikationen und Stämmen) zueinander. Das Immunsystem ist aufgrund der Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung nicht in der Lage, pathologisches PrP^{Sc} von der zellulären Form zu unterscheiden [BASLER 1986, SOUAN 2001]. Befindet sich eine relevante Anzahl an speziesspezifischem PrP^{Sc} im Organismus (z.B. durch iatrogene Übertragung innerhalb einer Spezies oder nachdem die Überwindung der Speziesbarriere auf molekularer Ebene schon

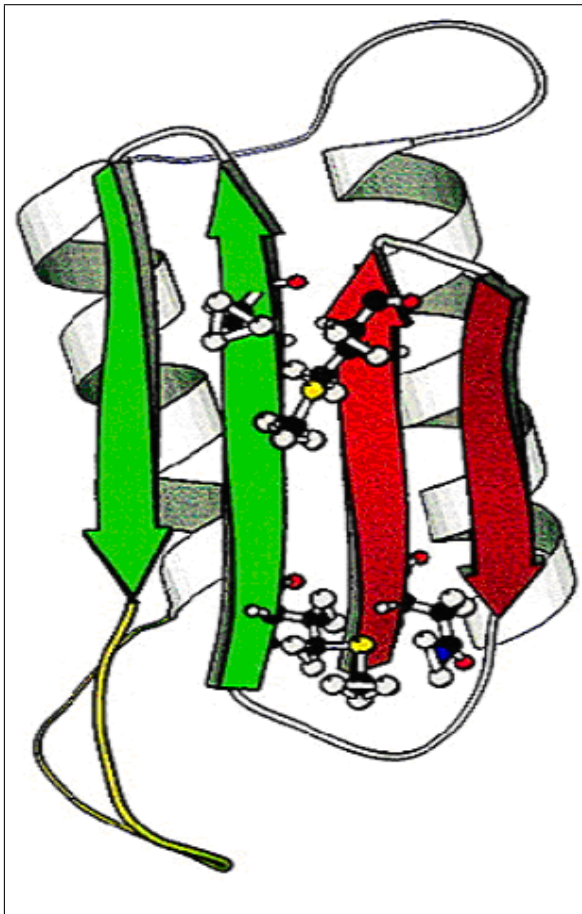


Abbildung II.3.: Modell der Tertiärstruktur des humanen infektiösen Prionproteins huPrP^{Sc}. Rot dargestellt sind die β -Faltblattstruktur-Bereiche zwischen den Aminosäureresten 108–113 sowie 116–122, grün die β -Faltblatt-Bereiche zwischen den Aminosäureresten 128–135 sowie 138–144. Die α -Helix-Bereiche in grau erstrecken sich zwischen den Aminosäureresten 178–191 sowie 202–218. Die vier als Moleküle eingezeichneten Aminosäurereste sind bedeutend im Bezug auf die Speziesbarriere. [PRUSINER 1998]

erfolgte), kann dieses, ohne immunologische Schutzreaktion des Körpers, PrP^C zu PrP^{Sc} umwandeln.

Beim Eindringen von speziesfremdem PrP^{Sc} in einen Wirt kann dessen Immunsystem aufgrund der weitgehenden Homologie des PRNP der verschiedenen Spezies die Proteine nicht als körperfremd erkennen (Genauerer hierzu folgt bei der Beschreibung der Speziesbarriere unter II.1.3.6 (Seite 19)). Somit kann sich der Wirtsorganismus selbst nicht gegen die Invasion sowie Vermehrung der pathologischen PrP^{Sc} im Körper zur Wehr setzen. Sein Immunsystem stuft das pathologische, fremde PrP^{Sc} als reguläres körpereigenes Protein ein. [BASLER 1986, SOUAN 2001]. In der Konsequenz unterbleiben Immunreaktion, entzündliche Erscheinungen, Interferonproduktion, cytotoxischer Effekt (bei in-vitro-infizierten Zellen) sowie eine Veränderung des Lymphozyten T- und B-Spiegels [RIESNER 2001a].

1.3.4. Strukturvergleich von PrP^C und PrP^{Sc}

Das pathologische Prionprotein PrP^{Sc} und das „gesunde“, zelluläre Prionprotein haben eine identische Primärstruktur (Aminosäuresequenz). Auch in der chemischen Zusammensetzung stimmen PrP^C und PrP^{Sc} eines Individuums überein [STAHL 1994]. Der ausschlaggebende Unterschied liegt in der sich unterscheidenden Konformation (räumlichen Struktur) [PRUSINER 2001].

Wie oben erwähnt, enthält die Aminosäurekette beim PrP^{Sc} sowie PrP²⁷⁻³⁰ mehr zu β -Faltblattstruktur gestreckte Bereiche als das PrP^C. β -Faltblattstruktur bedeutet, dass zwei β -Stränge der Aminosäurekette antiparallel aneinander gelagert sind. Die Anteile an α -Helix und β -Faltblattstruktur sind bei PrP^{Sc} etwa gleich groß [RIESNER 1996, SAFAR 1993]. Das zelluläre Prionprotein PrP^C hingegen hat große Bereiche, die schraubig α -helikal aufgewunden sind [PAN 1993], deutlich zu erkennen in Abbildung II.2 (Seite 15). Die Aggregationseigenschaften des pathologischen PrP^{Sc} sowie PrP²⁷⁻³⁰ sind durch die β -Faltblattstrukturbereiche bedingt.

Die möglichen Glykosylierungen am Prionprotein (zweifach, einfach oder gar keine) werden bei der Umfaltung zur pathologischen Form des PrP nicht verändert (siehe Abbildung II.4, Seite 18).

In weiteren Bereichen weisen die Eigenschaften beider Formen des PrP – infektiöse und zelluläre Form – entscheidende Unterschiede auf. Während PrP^C meist wasserlöslich ist, trifft dies für das PrP^{Sc} sowie für die verdaute Form, das PrP²⁷⁻³⁰, nicht zu. PrP^{Sc} neigt zur Bildung von Assoziaten⁵ amyloider Struktur. Gelingt es, PrP^{Sc} oder Pr²⁷⁻³⁰ unter Einsatz spezieller Hilfsmittel (z.B. mit Hilfe denaturierender Tenside, wie SDS [RIESNER 1996]) in eine wässrige Lösung zu bringen, so kann in der Folge keine Infektiosität mehr festgestellt werden [RIESNER 2001a].

Die Bildung von Assoziaten ist eine wichtige Voraussetzung für die weitgehende Stabilität des Prionproteins PrP^{Sc} gegenüber einer enzymatischen Verdauung durch die besonders aggressiv proteolytische Proteinase K (PK). Im Aggregat mit weiteren PrP^{Sc}-Molekülen erlangt dieses eine für Proteine immens hohe Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung sowie proteolytischer Verdauung. Weiterhin besitzt das PrP^{Sc} eine sehr ausgeprägte Stabilität gegenüber UV-Licht [ALPERS 1966].

Bei den Assoziaten des pathologischen Prionproteins sind tetramere bis polymere Strukturen vorzufinden. Die Einwirkung von Proteinase K führt zu einer Abspaltung von etwa 68 Aminosäuren vom N-terminalen Ende (je nach Prionstamm leicht variabel). Der verbleibende Rumpf des vor der Verdauung als PrP^{Sc} bezeichneten pathologischen Prionproteins weist eine Molekülmasse von 27–30 kDa auf und wird daher zur Abgrenzung vom (unverdauten, nativen) PrP^{Sc} als PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet (vergleiche hierzu Abbildung II.1 auf Seite 14). Dieser Molekülrumpf bildet Assoziate in Form sehr regelmäßiger amyloider Stäbchen (Prion Rods) bzw. Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) und weist sehr hohe Stabilität

⁵ Zusammenlagerung (Aggregation) von Teilchen gleicher Art

gegenüber weiterem PK-Verdau auf. Im Gegensatz zum PrP^{Sc} bzw. PrP²⁷⁻³⁰ ist das PrP^C durch Proteinase K schnell zu Oligonukleotiden verdaubar [MCKILEY 1983]. Obwohl das PrP²⁷⁻³⁰ nur mehr ein Rumpf des PrP^{Sc} ist, reicht es aus, um die Strukturumwandlung von PrP^C zu bewirken und verfügt über die volle Infektiosität [RIESNER 2001a]. Abbildung II.4 zeigt ein Elektropherogramm, in dem verdaute und unverdaute Proben mit PrP^C und PrP^{Sc} einander gegenübergestellt sind. Die drei verschiedenen Glykosylierungsformen sind deutlich zu erkennen.

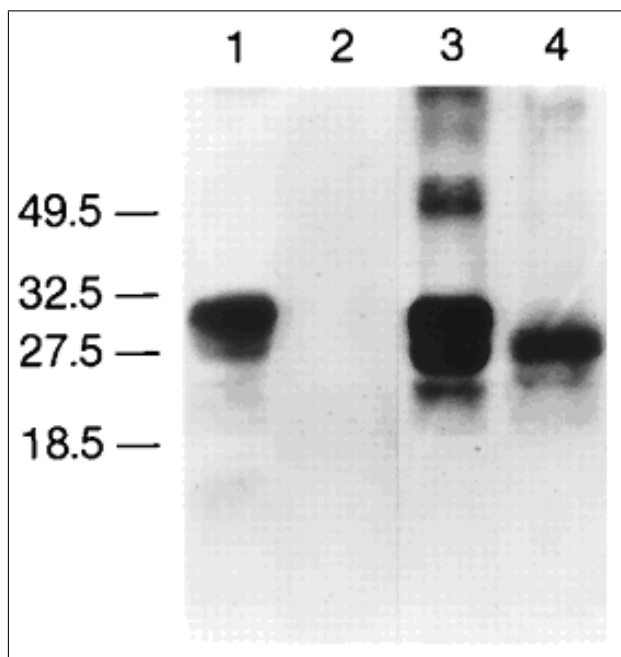


Abbildung II.4.: Elektropherogramm von unverdaulichem sowie PK-verdaulichem PrP^C und PrP^{Sc} Isoformen des Prionproteins: Western Immunoblot von Hirnhomogenat nicht infizierter (Bahnen 1 und 2) und mit PrP^{Sc} infizierter (Bahnen 3 und 4) syrischer Hamster. Die Proben auf den Bahnen 2 und 4 wurden mit 50 µg/mL Proteinase K 30 min bei 37 °C verdaulich. Das PrP^C in den Bahnen 2 und 4 wurde völlig hydrolysiert, während das PrP^{Sc} um etwa 67 Aminosäuren vom NH₂-Ende her verkürzt wurde. Nach der Polyacryl-Gelelektrophorese (PAGE) und Elektrotransfer wurde das Elektropherogramm mit Anti-PrP R073 polyklonalem Kaninchen-Antiserum entwickelt. Die Skala links zeigt die Molekülgröße in Kilodaltons. [PRUSINER 1998]

1.3.5. Übertragung der pathologischen Struktur

Ab dem Zeitpunkt des Eindringens einer relevanten Menge an pathologischem Prionprotein in einen Organismus ist der Umfaltungsprozess des gesunden PrP^C zu PrP^{Sc} als der entscheidende Vorgang für das Entstehen und Fortschreiten der Erkrankung verantwortlich. Dieser Prozess der Übertragung der räumlichen Struktur von infektiösem auf gesundes Prionprotein konnte *in vitro* nachgeahmt werden. Diese systematische Vermehrung fehlgefalteter PrP wird protein misfolding cyclic amplification (PMCA, zyklische Vermehrung des fehlgefalteten Proteins) genannt [SOTO 2002].

Die PMCA wird unter II.1.6 (Seite 22) genauer beschrieben, da sie neben anderen Techniken (z.B. der Zerschäumung) eine Möglichkeit zur Erhöhung der Konzentration von PrP^{Sc} bietet.

Die verschiedenen Konformationen und Modifikationen, in denen das Prionprotein vorliegen kann, beschränken sich nicht auf die zwei absoluten Formen PrP^{Sc} und PrP^{C} . Weder PrP^{C} noch PrP^{Sc} werden durch eine konstante Konformation des Prionproteins definiert. Selbst diejenigen PrP-Moleküle, die einer der genannten Ausformungen zugeordnet werden können, variieren untereinander in ihrer Struktur. Trotz gleicher Primärstruktur tritt eine große Anzahl an verschiedenen Sekundär- und Tertiärstrukturen auf. Diese Modifikationen können im Falle des PrP^{C} unterschiedlich leicht zu PrP^{Sc} umgefaltet werden; im Falle des PrP^{Sc} haben sie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Tendenz als Model zur Veränderung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} zu fungieren.

Die variierenden Ausformungen spielen eine wichtige Rolle für die verschiedenen Erregerstämme⁶. [PRUSINER 2001]

1.3.6. Die Artenschranke (Speziesbarriere)

Wie die Bezeichnung „transmissibel“ im Namen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien beschreibt, sind diese Prionkrankheiten unter bestimmten Umständen zwischen verschiedenen Spezies übertragbar. Einem derartigen Übergreifen der TSEs von einer Spezies auf eine andere steht die Artenschranke (Speziesbarriere) entgegen.

Da im Falle der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien der Erreger der Erkrankung lediglich aus identischen Proteinmolekülen besteht, ist der wichtigste Einflussfaktor auf die Speziesbarriere die Aminosäuresequenzhomologie des Prionproteins von Spenderpezies und Empfängerpezies. Bedingt wird diese durch die Analogie des Prionproteingens PRNP. Je stärker das (infektiöse) PrP^{Sc} der Spenderart dem zellulären Prionprotein PrP^{C} der inokulierten Empfängerart ähnelt, desto leichter wird die Speziesbarriere überwunden, d.h. die pathologische Konformation übertragen, und desto wahrscheinlicher bricht die Erkrankung aus. [PRUSINER 2001]

Die Transmissibilität der TSEs, d.h. die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Spezies, ist eine Konsequenz der bei vielen Säugetierspezies stark ausgeprägten Homologie des Priongens PRNP. Die Übereinstimmungen liegen hier i.d.R. über 90 % [SCHÄTZL 1995]. Neben der Aminosäuresequenzhomologie hat auch die Infektionsdosis Einfluss auf die Übertragung der pathologischen Konformation. Je höher die Anzahl an PrP^{Sc} -Molekülen (Infektionsdosis) ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Erkrankung ausbricht. Die Wahrscheinlichkeit der Umfaltung gilt bezogen auf das einzelne PrP^{Sc} und erhöht sich mit steigender Anzahl der vorliegenden pathologischen Prionproteine.

⁶ Diese sog. Stämme sind keine Stämme im biologischen Sinne des Wortes. Es handelt sich um verschiedene Modifikationen (z.B. Glykosylierungen) und Konformationen (unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstruktur) des Prionproteins.

1.4. Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen

Durch das Auftreten von hereditären Formen der Prionkrankheiten wird deutlich, dass die Genetik eine entscheidende Rolle bei der Entstehung spielt, aber auch Einfluss auf den Verlauf (Pathogenese) der Erkrankung hat.

Mutationen des PRNPs, des Gens, das für das Prionprotein kodiert, können zur Entstehung der erblichen (hereditären, familiären) Varianten der Prionkrankheiten fCJK, GSS und FFI (siehe Tabelle, Seite 5) führen.

Weiterhin legt ein Polymorphismus des PRNP wesentlich den klinischen und pathologischen Phänotyp der Erkrankung fest.

Studien über sCJK-Fälle zeigten eine deutliche Überrepräsentation von Individuen mit homozygoter Konstellation der Aminosäureposition 129 des PRNPs [LAPLANCHE 1994, WILL 1996, PALMER 1991, SALVATORE 1994, WINDL 1996].

Der Grund für die starken Auswirkungen der unterschiedlichen Genvarianten auf Entstehung und Entwicklung der Erkrankung liegt darin, dass die Primärstruktur des Proteins (d.h. die Aminosäuresequenz) entscheidenden Einfluss auf die Faltung und Konformation (Sekundär- und Tertiärstruktur) hat. Somit bedingt die Primärstruktur auch die Empfänglichkeit des Proteins für eine Änderung der Konformation (eine „Umfaltung“) von vorwiegend α -helicalen Bereichen hin zu β -Faltblatt-Bereichen. Das bedeutet, eine derartige Umfaltung des gesunden Proteins ist je nach Aminosäuresequenz (die wiederum eine Konsequenz des Genoms ist) mehr oder weniger leicht möglich resp. wahrscheinlich. Die hereditären Prionkrankheiten treten daher meist nicht bereits bei Geburt auf, denn das PrP ist nicht bereits nach seiner Expression quantitativ fehlgefaltet. Es hat lediglich eine gegenüber dem „gesunden“ PrP stärkere Tendenz, eine pathologische Form anzunehmen. Liegen nach einer statistisch erfolgten Änderung der Konformation einige fehlgefaltete PrP vor, können diese kontinuierlich ihre Struktur auf die vergleichsweise leicht umfaltbaren zellulären Prionproteine übertragen. Es wird vermutet, dass eine der im Rahmen des Polymorphismus möglichen „falschen“ Proteine eine Destabilisierung der α -helikalen Struktur zur Folge hat und somit die Umwandlung zu β -Faltblatt erleichtert erfolgen kann. [PRUSINER 2001]

1.5. Pathogenese der Prionkrankheiten beim Menschen

Der genaue Mechanismus der Schädigung und Zerstörung des Hirngewebes durch die Replikation des PrP^{Sc} konnte bislang nicht ergründet werden. Bekannt ist, dass PrP^{Sc} Aggregate verschiedener Ausformung bildet [MERZ 1981]. Diese Zusammenlagerungen scheinen jedoch nicht die direkte Ursache für die Beeinträchtigungen der Gehirnfunktion zu sein [PRUSINER 2001]. Wenngleich die schwammartige Struktur, resultierend aus Nekrosen von Neuronen und Vakuolenbildung, den TSEs ihren Namen gab, scheinen nicht diese ursächlich für die typischen Symptome (Bewegungs- und Orientierungsstörungen) zu sein.

Diese Defizite beruhen laut Chiesa [CHIESA 2005] auf Prionen, welche die Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen verändern.

Die CJK zeigt sich bei lichtmikroskopischer Untersuchung nach einer histologischen Färbung durch spongiöse Veränderungen (kleine Vakuolen), Nervenzellverlust und astrozytäre Gliose sowie in etwa 15 % der Fälle durch sog. Kuru-Plaques. Zuletzt genannte Symptome und bestimmte Formen der spongiösen Veränderungen sind typisch für die CJK, die Atrophie sowie die astrozytäre Gliose sind unspezifisch. Somit ist die spongiforme Veränderung ein histopathologisch zuverlässiges Indiz. Unter dem Begriff „spongiforme Veränderung“ versteht man eine lichtmikroskopisch erkennbare Hohlräumbildung (2–10–50 μm) des Gehirnparenchyms⁷. Die Geometrie der Hohlräume sowie deren Anordnung bzw. Verteilung ist bei verschiedenen genetischen Konstellationen am Codon 129 des PRN-Ps unterschiedlich.

Ursache für die Hohlräume ist eine Ansammlung von Enzymen in einer Art Bläschen im Hirngewebe (Vakuolen). Aus physiologischer Sicht dienen diese enzymgefüllten Vakuolen dem Abbau von „Abfallgewebe“, das beim Zellumbau entsteht. Möglicherweise werden die Neuronen dadurch enzymatisch geschädigt und es kommt zu Nekrosen im Nervengewebe. [PRUSINER 2001]

Auch die genetische Konstellation und somit der Aufbau des Prionproteins sowie die spezielle Form der vorliegenden Prionerkrankung haben Einfluss auf die Bildung verschiedener Aggregate des PrP^{Sc}. Bei einer bestimmten Genkonstellation können Aggregate mit fibrillärer Ultrastruktur (amyloide Ablagerungen) auftreten, wobei die einzelnen Fasern verschieden lang sind und einen Durchmesser von etwa 10 μm aufweisen. Zudem enthalten diese β -Faltblattstrukturen und haben Affinität zu Kongorot.

Es treten eine ganze Reihe verschiedener Ausformungen der Assoziate des PrP^{Sc} auf, z.B. sog. SAF (Scrapie-assoziierte Fibrillen), Kuru-Plaques sowie andere Formen, die in verschiedenen Bereichen des Gehirns angesiedelt sein können.

Die Pathogenese der Prionkrankheiten kann deshalb sehr unterschiedlich ausfallen, sowohl bzgl. der Lokalisierung und der Ausformung der PrP^{Sc}-Aggregate als auch in Bezug auf die Region der Hirngewebsbeschädigung. Auch Inkubationszeit und spezifische Symptome unterscheiden sich z.T. sehr stark. Aus diesen Beobachtungen wurde die Existenz verschiedener Erregerstämme des Prionproteins gefolgert [DICKINSON 1971, BRUCE 1987, BRUCE 1991].

Die genauen Unterschiede im Verlauf der Krankheit sowie morphologische Abweichungen der Aggregationsform des PrP^{Sc} resp. der entstehenden Ablagerungen sowie die Veränderungen und Zerstörung des Hirngewebes in Abhängigkeit der unterschiedlichen genetischen Konstellationen und verschiedenen Erregerstämme sind sehr komplex und im Detail für diese Arbeit nicht von Bedeutung.

⁷ spezifisches Gehirngewebe

1.6. Diagnostik

Im Rahmen der Beschreibung der diagnostischen Möglichkeiten erfolgt eine Aufzählung und Erläuterung der molekularen, immunologischen Tests sowie der Tierversuche und – am Rande – der histologischen Nachweismethoden. Nicht eingegangen wird auf Indikatoren wie symptomatische Verhaltensstörungen oder motorische Auffälligkeiten, die zwar auf BSE-Erkrankungen hinweisen können, für eine eindeutige Diagnose jedoch nicht genügen.

Als Marker für eine Erkrankung an einer TSE wird in den meisten Tests bislang das veränderte, pathologische Prionprotein PrP^{Sc} , also der Erreger selbst, herangezogen. Ein weiterer Ansatz ist der Nachweis von Substanzen, die spezifisch im Zusammenhang mit einer TSE auftreten (sog. Surrogatmarkern), z.B. Proteine oder DNS-Fragmente.

1.6.1. Derzeit anerkannte BSE-Nachweismethoden

Gemäß dem Erlass der EG-Verordnung 999/2001 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien ist die Untersuchungspflicht seit dem 1. Juli 2001 unmittelbar Teil des EG-Rechts.

Dementsprechend sind

- alle über 24 Monate alten not- und krank geschlachteten Rinder,
- alle über 30 Monate alten für den menschlichen Verzehr geschlachteten Rinder sowie
- über 24 Monate alte verendete Rinder nach einem bestimmten Stichprobenschlüssel mit einem BSE-Schnelltest zu untersuchen.

In Deutschland galt bis 2005 mit dem vorgegebenen Untersuchungsalter aller gesund geschlachteten Rinder von über 24 Monaten ein noch strengeres Gesetz (BSEUntersV, 1.12.2000). Seit 2005 ist die Vorschrift für die Untersuchung von Schlachtrindern an die EU-Maßgabe der Untersuchung aller Schlachtrinder über 30 Monate angeglichen.

1.6.1.1. Bioassay (Tierversuch)

Tierversuche sind die einzige Möglichkeit, mit der die Infektiosität von TSE-bedenklichem Material direkt nachgewiesen werden kann. Die Natur des Erregers der TSEs ist zwar weitgehend bekannt, doch der kausale Zusammenhang zwischen PrP^{Sc} und der Infektiosität ist nicht bis ins Detail aufgeklärt.

Die Korrelation zwischen verschiedenen Formen des Prionproteins und der Infektiosität kann nur im direkten Vergleich der zu bewertenden immunologischen und molekularen Methoden mit dem Bioassay festgestellt werden. Somit ist im Bereich der Forschung der Tierversuch der einzige Weg zur Beurteilung der Infektiosität des PrP^{Sc} in verschiedenen Formen und Mengen. Hinzu kommt, dass das PrP^{Sc} eine minimale Infektionsdosis hat,

die nicht zwangsläufig über der Nachweisgrenze eines zu beurteilenden Tests liegen muss. Daher ist beispielsweise zur Bewertung der Wirksamkeit von Erregerinaktivierungsmaßnahmen ein Bioassay durchzuführen. Solch ein Tierversuch ist allerdings zeitlich und materiell sehr aufwendig. Zudem ist die Aussagekraft des Ergebnisses nicht umfassend, da die Speziesbarriere (als Testtiere dienen in aller Regel Mäuse) bei der Übertragung von TSEs immer eine wichtige Rolle spielt. [KÜBLER 2003].

Um diesem Problem zu begegnen, wurden an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (BFAV) sog. Tgbov-XV-Mäuse gezüchtet, die das bovine Prionprotein exprimieren. Dadurch verringerte sich die Inkubationszeit sowie die Auswirkungen der Speziesbarriere. Solche Tiere sind 10000-fach empfänglicher gegenüber einer BSE-Infektion als gewöhnliche Mäuse [GROSCHUP 2002]. Diese Mäuse wurden auch für die Bewertung der Infektionsgefahr verschiedener, vom Menschen verzehrter, boviner Gewebe und Organe eingesetzt.

1.6.1.2. Histologie

Entsprechend der Maßgaben des Internationalen Tierseuchenamtes (O.I.E.) in Paris müssen im Falle eines positiven oder nicht schlüssigen Ergebnisses im Schnelltest histologische Untersuchungen erfolgen. Diese in den nationalen Referenzlaboratorien durchgeführten Tests dienen der Bestätigung des BSE-Verdacht.

Folgende histologische Methoden stehen dabei zur Verfügung.

- HE-Färbung

Bei dem histologischen Verfahren der HE-Färbung werden die spongiformen Veränderungen im Stammhirn durch Anfärben mit Hämatoxylin-Eosin sichtbar gemacht. Hierzu wird das zu untersuchende Gewebe in Paraffin eingebettet und in etwa 5 bis 10 μm dicke Schnitte zerlegt, die gefärbt und mikroskopisch untersucht werden. Die schwammartige Veränderung (Vakuolisierung) des Stammhirns kann bei experimentell infizierten Tieren erst Wochen bis Monate später erkannt werden, während die Immunohistochemie (s.u.) einen Nachweis schon eher zulässt [BRUCE 1989]. Histopathologische Untersuchungen können einen BSE-Verdacht zwar bestätigen, eignen sich jedoch nicht zur Widerlegung eines solchen, denn eine BSE-Erkrankung kann aufgrund eines negativen Befundes nicht definitiv ausgeschlossen werden [GROSCHUP 2002].

- Immunohistochemie (IHC)

Bei der Immunohistochemie (IHC) werden Prion-Protein-Ablagerungen (PrP^{Sc}) im Stammhirn spezifisch mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Dieser Nachweis zählt zu den zuverlässigsten Methoden für die Diagnostik von Prionkrankheiten

[KITAMOTO 1988]. Die Sensitivität der Methode beruht auf einer speziellen Herstellung und Behandlung der Schnittpräparate aus dem Hirngewebe (Inkubation in 98 %-iger Ameisensäure, Paraffineinbettung, Schneiden, PK-Verdau, Dampfautoklavieren) und Inkubation mit einem spezifischen Anti-PrP-Antikörper. Detektierbar gemacht wird das PrP^{Sc} mit Hilfe eines Sekundärantikörpers. Dieser ist mit Biotin markiert und wird durch Bildung eines Avidin-Biotin-Komplexes sichtbar.

Die nationalen Referenzzentren für BSE und Scrapie der BFAV bedienen sich gemäß der Verordnung 999/2001 zur endgültigen Abklärung von positiven und Verdachtsfällen auch der immunohistochemischen Untersuchung IHC. Für die definitive Diagnose der Erkrankung werden neben der IHC nach Vorgabe der O.I.E. auch ein spezielles Western-Immunoblot-Verfahren oder der Nachweis von SAF (Scrapie-assoziierte Fibrillen) angewendet.

1.6.1.3. Schnelltests

Alle bislang zugelassenen BSE-Schnelltests basieren auf dem Nachweis des als infektiös geltenden PrP^{Sc} in der Obex-Region des Stammhirnes der untersuchten Rinder [AGUZZI 2004]. Da dieses Gewebe nicht im Rahmen einer Biopsie entnommen werden kann, handelt es sich um *post mortem*-Tests.

Diese Nachweismethoden werden als Schnelltests bezeichnet, da sie nach einer Analyse-dauer von 6 bis 8 Stunden ein Ergebnis liefern können, während die Nachweismethoden zur Bestätigung eines BSE-Verdachts in den Referenzlaboratorien mehrere Tage beanspruchen.

Durch die Verordnung EG 999/2001 wurden folgende fünf Schnelltestverfahren anerkannt:

- Prionics[®] Check Western-Test
Immunoblotting-Test auf Grundlage eines Westernblot-Verfahrens zum Nachweis des proteaseresistenten Prionoproteins.
Ein PrP-spezifischer Antikörper und ein mit Alkalin-Phosphatase markierter Sekundärantikörper binden das PrP^{Sc}. Die Detektion erfolgt über Chemilumineszenz.
- Enfer-Test
Chemilumineszenz-ELISA mit Extraktionsverfahren und ELISA-Technik unter Verwendung eines verstärkenden Chemilumineszenz Reagenz.
Das verdaute PrP^{Sc} wird ohne Capture-Antikörper an eine ELISA-Platte adsorbiert. Zur Detektion mittels Chemilumineszenz dienen polyklonale Antikörper und enzymmarkierte Sekundärantikörper.
- Bio-Rad Platelia[®]
Immunoassay zum Nachweis von PrP^{Sc}.

Nach PK-Verdau und Konzentrierung erfolgt ein Sandwich-ELISA. An den Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, die eine Farbreaktion bewirkt. Detektiert wird die resultierende Farbintensität.

- Prionics[®] Check LIA-Test

Nach Probenaufbereitung und PK-Verdau erfolgt zum Nachweis von PrP^{Sc} ein Sandwich-ELISA mit monoklonalen Antikörpern und Detektion durch Chemilumineszenz.

- InPro CDI-5TM-Test

Automatisierter konformationsabhängiger Immunoassay mit Vergleich der Reaktivität eines Detektion-Antikörpers gegenüber PrP^{Sc} und PrP^C. Durch Denaturierung wird im PrP^{Sc} ein Epitop exponiert, das im ELISA nachgewiesen wird. Die Detektion erfolgt mit Hilfe der charakteristischen Emission Europium-markierter Detektorantikörper.

Mitte Februar 2005 wurden von der EU-Kommission weitere sieben BSE-Schnelltests zugelassen (EG R 260/2005; 16.02.2005):

- BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit

Nach dem PK-Verdau des homogenisierten Stammhirns erfolgt eine Aufreinigung durch Fällung und Zentrifugation. Anschließend wird das aufgereinigte PrP²⁷⁻³⁰ immunologisch an Antikörper auf einer Kunststoffoberfläche gebunden. Nach einem Sandwich-ELISA, bei dem ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt wird, kann die Anwesenheit von PrP²⁷⁻³⁰ durch einen enzymatisch (Meerrettichperoxidase) bedingten Farbumschlag erkannt werden, der photometrisch gemessen wird.

Dieser Test wurde zur Quantifizierung des PrP^{Sc}-Gehaltes in der vorliegenden Arbeit verwendet, der genaue Ablauf ist im Methodenteil beschrieben.

Die weiteren 2005 zugelassenen Tests basieren auf den gleichen Prinzipien wie die bereits beschriebenen. Details wurden verändert und Optimierungen vorgenommen.

- CediTect BSE test
- Enfer TSE KIT version 2.0
- INDEXX HerdCheck BSE Antigen Test Kit (EIA)
- Institute Pourquier Speed 'it BSE
- Prionics Check PrioSTRIP
- Roche Applied Science Prion Screen

1.6.2. Neue Ansätze zum TSE-Nachweis

Das Bestreben bei der Forschung im Bereich der TSE-Diagnostik ist die Entwicklung eines zuverlässigen *ante mortem*-Tests. Ein solcher sollte die Diagnostik auf der Basis entnommener Gewebe oder Körperflüssigkeiten im Rahmen einer Biopsie oder das Verwenden ausgeschiedener Körperflüssigkeiten ermöglichen.

Im Falle der BSE bei Rindern müssten betroffene Tiere nicht zum Schlachthof gebracht und geschlachtet werden. Bei der derzeitigen Praxis läuft der Schlachtbetrieb kontinuierlich. Im Falle eines BSE-erkrankten Tieres müssen mehrere geschlachtete Rinder, die vor und nach dem infizierten Rind verarbeitet wurden, als Risikomaterial verworfen werden. Im Falle der nvCJK beim Menschen wäre eine Erkennung der (in der präklinischen Phase noch latenten) TSE-Erkrankung vor Beginn der Symptome grundlegende Voraussetzung für eine Therapie. Weiterhin könnte so eine iatrogene Verschleppung der herkömmlichen sowie der neuen Variante der CJK verhindert werden. Durch Übertragung von humanem Hypophysenhormon oder Transplantationen der *Dura mater* (Hirnhaut) oder *Cornea* (Augenhornhaut) kann es zur Übertragung des infektiösen Prionproteins kommen [PRUSINER 2001].

Geeignet als Quelle für das pathologische PrP^{Sc} und dessen Detektion erscheinen in erster Linie Blut, Liquor oder Urin. Obgleich mit den derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden aufgrund mangelnder Sensitivität noch kein zuverlässiger Nachweis möglich ist, konnte im Bioassay die Übertragbarkeit von TSEs durch Blut und Liquor belegt werden [BROWN 1994]. Dieser Befund belegt die Existenz infektiöser Prionen in diesen Körperflüssigkeiten und lässt vermuten, dass mit einem PrP-Nachweis genügend hoher Empfindlichkeit eine Diagnostik *ante mortem* möglich wäre.

Ein anderer Ansatz zur *ante mortem*-Diagnostik ist die möglichst frühe Detektion von Markersubstanzen (Surrogatmarkern) oder von anderen charakteristischen Veränderungen, die mit der Erkrankung im Anfangsstadium, vor dem klinischen Ausbruch, einhergehen.

1.6.2.1. Nachweis von PrP^{Sc}

Spezifische Anti-PrP^{Sc}-Antikörper

Bei den immunologischen Untersuchungsmethoden finden zumeist Antikörper Anwendung, die unspezifisch mit PrP in seinen verschiedenen Formen agglutinieren. Als selektiven Schritt, um eine Differenzierung zwischen infektiösem PrP^{Sc} und zellulärem PrP^C zu erreichen, nutzt man die weitgehende Proteolyseresistenz des pathologischen Prionproteins gegenüber einer Verdauung durch Proteinase K.

Zahlreiche Forscher versuchen für die Detektion des pathologischen Prionproteins einen spezifischen Antikörper zu konstruieren oder zu finden, der selektiv PrP^{Sc}, nicht aber

PrP^C, agglutiniert [ZOU 2004, SERBEC 2003]. Mit einem solchen wäre die PK-Verdauung als selektiver Schritt nicht mehr nötig.

Trotz einiger Ankündigungen in diese Richtung ist es offenbar sehr kompliziert, einen zuverlässigen spezifischen Antikörper gegen das pathologische PrP^{Sc} zu konstruieren und herzustellen [AGUZZI 2004].

Folgende Möglichkeiten wurden beschrieben:

- Korth [KORTH 1997] beschrieb 1997 einen spezifischen Antikörper 15B3, dessen Funktion jedoch in Frage gestellt wurde [LANE 2003, ZOU 2004].
- Zou [ZOU 2004] stellte einen spezifischen Antikörper OCD4 vor, der menschliches und tierisches pathologisches Prionprotein um eine Größenordnung effektiver binden kann als andere Anti-PrP-Antikörper.
- Der konformationsabhängige Immunoassay CDI (conformation dependent immunoassay), der zur Typisierung verschiedener Prionstämme eingesetzt wird, wurde erstmals von Safar 1993 beschrieben [SAFAR 1993]. Zugrunde liegt dieser Methode die Annahme, dass bei unterschiedlich gefalteten Prionmolekülen verschiedene Epitope am Prionproteinmolekül nach außen gekehrt werden bzw. entstehen, die dann für entsprechende Antikörper zugänglich sind.
Eine Verdauung wäre beim CDI nicht mehr nötig, da die Antikörper die spezielle Sekundär- und Tertiärstruktur des pathologischen Prionproteins erkennen und nur mit dieser speziellen Struktur aggregieren [BELLON 2003].

Bislang wurde kein BSE-Test zugelassen, der auf einem dieser spezifischen Anti-PrP^{Sc}-Antikörper basiert.

Kapillarelektrophorese

Zum Nachweis von PrP^{Sc} im Blut TSE-kranker Schafe (Scrapie) und Elche (CWD) entwickelte Schmerr [SCHMERR 1999] einen immunkompetitiven Bluttest. Dafür bedient sie sich der Kapillarelektrophorese sowie fluoreszenzmarkierter Peptide. Die Detektion erfolgt mit Hilfe laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF).

Zunächst wird dabei eine 15 Aminosäuren lange Sequenz (Aminosäuren 218 bis 232) des Prionproteins synthetisiert und mit Fluorescein markiert. Mit dieser synthetisierten Sequenz (Peptid) werden Hasen immunisiert und spezifische Antikörper (Antiserum) gegen das Peptid gewonnen. Das vom Hasen gewonnene Antiserum ist in der Lage sowohl PrP als auch das synthetisierte und Fluorescein-markierte Peptid zu binden.

Die zu untersuchende Probe wird einem PK-Verdau unterworfen, so dass das PrP^C zerstört

wird. Das verbleibende pathologische PrP²⁷⁻³⁰ und das markierte Peptid konkurrieren um das Antiserum des Hasen.

Nach zwei Messungen kann die Anwesenheit von PrP²⁷⁻³⁰ erkannt werden: einmal wird nur das markierte Peptid und das Antiserum in einem Verhältnis gemischt, so dass sowohl an Antiserum gebundenes als auch freies markiertes Peptid vorliegen. Dieses wird mit EC-LIF analysiert. Dann erfolgt eine zweite Analyse mit EC-LIF, bei der zu demselben Ansatz das Untersuchungsmaterial gegeben wird. Ist bei dieser zweiten Untersuchung PrP²⁷⁻³⁰ enthalten, so bindet dieses an das Antiserum, und die Menge an ungebundenem markiertem Peptid nimmt zu, da weniger Antiserum zur Verfügung steht, das sich mit dem markierten Peptid zusammenlagern kann. Die Menge des Komplexes von markiertem Peptid mit dem Antiserum hingegen nimmt ab, da ein Teil des Antiserums an das PrP²⁷⁻³⁰ angelagert ist.

Durch die Kapillarelektrophorese werden die agglutinierten und nicht agglutinierten Proteine und Antikörper voneinander getrennt und die markierten durch laserinduzierte Fluoreszenz detektiert. Die Veränderung der Mengen an ungebundenem und agglutiniertem markiertem Peptid werden in der Peakfläche ersichtlich.

In jüngerer Zeit erfolgten Versuche, diese immunokompetitive Methode auf die Detektion von PrP^{Sc} im Blut bei CJK-infizierten Schimpansen sowie beim Menschen anzuwenden. Es konnte jedoch kein Erfolg erzielt werden [CERVENAKOVA 2003]. Der Grund dafür kann z.B. in mangelnder Affinität des Antikörpers zu den Prionen der unterschiedlichen Spezies liegen.

Nutzung spezifischer Affinitäten

Neben den spezifischen Antikörpern, die das PrP^{Sc} in einer immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktion binden, wird auch nach anderen Substanzen gesucht, die das pathologische Prionprotein aufgrund einer spezifischen Affinität selektiv anlagern sollen.

- Seprion-Test

Das britische Unternehmen Microsens veröffentlichte 2004 Ergebnisse über einen Liganden („Seprion“), der PrP^{Sc} spezifisch bindet [NEWS 2004]. Mit Hilfe des neuen Verfahrens konnte erstmalig im Blut eines CJK-Patienten pathogenes Prionprotein nachgewiesen werden. Dieses Verfahren nützt die PrP^{Sc}-spezifische Affinität des neuen Liganden im Rahmen eines ELISA. Dieser Test soll das krankhafte Prionprotein bei CJK, BSE, Scrapie und CWD nachweisen. Anders als die in der EU derzeit zugelassenen Tests wird dieser Test als besonders sensitiv und spezifisch beschrieben [LANE 2003].

- Plasminogen

Im Jahre 2000 resp. 2001 wurde berichtet, dass das (Blut-)Serumprotein Plasminogen das pathologische Prionprotein selektiv bindet [FISCHER 2000, MAISSEN 2001]. Mit immobilisiertem Plasminogen könnte das infektiöse PrP^{Sc} aus einer Probe größeren Volumens abgetrennt werden.

Weder von der Arbeitsgruppe um Aguzzi, aus der die Arbeiten stammen, noch von weiteren Forschungsgruppen, die die Methoden anzuwenden versuchten, wurden neuere Erkenntnisse bekannt oder die Ergebnisse bestätigt.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Bei diesem Verfahren werden spezifische Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach der Bindung dieser Sonden an das Prionprotein wird der Fluoreszenzfarbstoff mit Laser angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, das detektiert wird. Durch Koinzidenzdetektion können PrP^{Sc}-spezifische Signale solcher freier Sonden und unspezifischer Aggregate unterschieden werden. Die Unterscheidung der Signale beruht auf der Aggregatbildung des pathologischen PrP^{Sc}. Solche Assoziate liefern ein intensiveres Signal als nicht aggregiertes PrP. Der selektive Schritt einer Verdauung mit Proteinase K ist nicht notwendig. [BIESCHKE 2000]

Nachweis im Urin

2001 wurden Untersuchungsergebnisse veröffentlicht, denen zufolge im Urin von Hamstern, Rindern und Menschen, die an einer TSE leiden, eine Isoform des PrP^{Sc} mit einer Molekülmasse von etwa 32 kDa vorhanden ist, uPrP^{Sc} genannt. Das wenig infektiöse Protein wurde durch Zentrifugation aufgereinigt und elektrophoretisch nachgewiesen. [SHAKED 2001] Neuere Untersuchungen halten das gefundene Protein für eine Kontamination, ein PK-resistentes Protein der äußeren Zellmembran von Enterobacteriaceae [FURUKAWA 2004].

1.6.2.2. Nachweis von Surrogatmarkern

Neben einem Nachweis des unmittelbar die TSE auslösenden Stoffes PrP^{Sc} ist es auch denkbar, Stoffe nachzuweisen, die sekundär bei einer Prionerkrankung entstehen. Beispielsweise können in Blut oder Liquor (Cerebrospinalflüssigkeit) durch neurodegenerative Prozesse oder andere mit der Erkrankung einhergehende Vorgänge, stoffliche Veränderungen vor sich gehen und Proteinbestandteile oder andere Metabolite (z.B. Stressproteine) auftreten. Im günstigsten Fall können diese Stoffe direkt als Indikatoren für eine TSE herangezogen werden. Derartige Substanzen, biochemische oder chemische Veränderungen werden als Surrogatmarker bezeichnet.

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Zusammensetzung von Liquor und Blut (Serum oder Plasma) stellt die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) dar. Spektralanalysen des Blutes infizierter Tiere können sich bereits *ante mortem* von denen gesunder Individuen unterscheiden. Es werden nicht die pathologischen Prionproteine nachgewiesen, sondern Veränderungen im IR-Spektrum des Blutes [LASCH 2003].

Auch die oben beschriebene Unterscheidung einzelner Erregerstämme ist mithilfe der FT-IR möglich [THOMZIG 2004].

Nachweis spezifischer Proteine

Bei neuronaler Degeneration tritt häufig eine spezielle Form von Proteinen auf. Spezifische Proteine sind ein geeignetes Instrument, um das Absterben neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen zu detektieren. Durch das unspezifische Auftreten solcher Proteine bei zahlreichen Erkrankungen eignet es sich meist nicht als TSE-spezifischer Marker [ZERR 2002]. Da dem Nachweis spezifischer Proteine keine große diagnostische Bedeutung beigemessen wird [O.I.E. 2004], werden hier die unterschiedlichen Proteine nur kurz beschrieben.

- 1986 wurden 14-3-3 Proteine durch 2-D-Elektrophorese bei CJK-Patienten in ungewöhnlich hoher Menge vorgefunden, nicht hingegen in der Kontrollgruppe [HARRINGTON 1986]. Green [GREEN 2001] stellte jedoch fest, dass dieses Protein nur in etwa der Hälfte der vCJK-Fälle in veränderter Konzentration vorliegt. Als diagnostische Methode eignet sich der Nachweis einer erhöhten Konzentration an 14-3-3 Proteinen daher nicht.
- Die neuronspezifische Enolase (NSE) sowie das S-100 Protein wurden erstmals von Mokuno [MOKUNO 1983] in Liquor neurologisch erkrankter Patienten nachgewiesen. Beide Proteine sollen unspezifischer sein als die 14-3-3 Proteine [WEBER 1997].
- FABP (fatty acid binding protein) ist ein weiteres Protein, das auf seine Eignung als Markersubstanz für Prionkrankheiten hin untersucht wurde [GUILLAUME 2003]. Genaue Erkenntnisse über die Eignung dieser Substanz als Indikator liegen nicht vor.

Nachweis charakteristisch veränderter Nukleinsäuren

Bei verschiedenen humanen Erkrankungen wie Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten können erhöhte Mengen an Nukleinsäuren (RNS) im (Blut-)Serum nachgewiesen werden [LO 2001, SHAPIRO 1983]. Warum diese Nukleinsäuren im Blut auftreten, ist noch nicht hinreichend geklärt. Sie sind jedoch sehr spezifisch für einzelne Erkrankungen. Nach einer Charakterisierung dieser spezifisch veränderten RNS könnte deren Nachweis als Diagnoseverfahren eingesetzt werden.

Brenig [BRENIG 2002] entwickelte einen Bluttest für BSE, basierend auf dem Nachweis spezifisch veränderter RNS. Diese sind in Proteolipidpartikeln, sog. Mikrovesikeln, lokalisiert. Bei diesem Verfahren wird zunächst Vollblut koaguliert und das Serum gewonnen. In einer Reihe von Zentrifugationsschritten erfolgt eine Separation des Proteolipid-Ribonukleinsäurekomplexes. Nach Aufschluss und Extraktion der RNS wird diese im Rahmen

einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion, Vervielfältigung der RNS) amplifiziert. Nach weiterer Aufbereitung kann ein krankheitsspezifisches RNS-Muster nachgewiesen werden. [BRENIG 2003]

Neuere Untersuchungen in diese Richtung bestätigen, dass erkrankte Tiere ein charakteristisches RNS-Profil der im Blut zirkulierenden Nukleotide aufweisen. Dieses Profil eignet sich als Marker für die BSE, da es eine hohe Korrelation mit der BSE-Belastung aufweist. [SCHÜTZ 2005]

Der Nachweis veränderter Nukleinsäuren, die im Blut zirkulieren, würde einerseits einen *ante mortem*-Test ermöglichen, andererseits könnte hierin auch die Möglichkeit liegen, Bluttransfusionen durch einen TSE-Test des Blutes sicherer zu machen.

Nachweis veränderter Genexpression

2001 wurden Diskrepanzen bei der Expression des Genoms von TSE-erkrankten und gesunden Mäuse festgestellt. Transkribierte DNS-Stücken unterscheiden sich. Ein spezielles Fragment wird bei infizierten Tieren weitaus weniger transkribiert als bei gesunden. Das angesprochene Fragment kodiert für ein Protein, das vermutlich eine Rolle bei der Blutbildung spielt, und wird als erythroid differentiation-related factor (EDRF) bezeichnet. [MIELE 2001]

Inwiefern dieser neuartige Ansatz Relevanz für die TSE-Diagnostik besitzt, ist bislang nicht ersichtlich.

1.6.2.3. Amplifizierungs- und Anreicherungsverfahren

Die Anreicherung von PrP^{Sc} wird in dieser Arbeit unter dem Aspekt betrachtet, als Vorbereitung für die Analytik zu dienen, speziell beim Prionprotein im Hinblick auf eine empfindlichere Detektion von pathologischem PrP^{Sc}.

Aus analytischer Sicht stellt die künstliche Erhöhung der Konzentration einer Zielkomponente in oder aus einer Probe eine Möglichkeit dar, Konzentrationen zu detektieren, die ohne diese Anreicherung unterhalb der Nachweisgrenze lägen.

Im Falle des pathogenen Prionproteins entwickelte Soto [SOTO 2002] eine Methode, PrP^{Sc} zu vermehren. Man versuchte viele Jahre, den Prozess der Übertragung der Fehlfaltung von pathogenem PrP^{Sc} auf PrP^C *in vitro* zu simulieren. 2002 gelang diese „Vermehrung“ durch Übertragung der räumlichen Struktur von einem PrP^{Sc} auf PrP. Die Methode der zyklischen Vermehrung der missgefalteten Proteine wird als „protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA) bezeichnet. In eine Vorlage von zellulärem PrP werden bei dieser Methode infektiöse PrP^{Sc} gegeben und inkubiert. Das pathologische Prionprotein wirkt als Model, an das sich PrP^C anlagert und die Struktur des PrP^{Sc} übernimmt. Durch Behandlung mit Ultraschall werden diese Aggregate zerteilt und weiteres PrP kann angelagert und konvertiert werden. Dieser Vorgang wird sehr häufig wiederholt und so eine Vermehrung erzielt (siehe Abbildung II.5). [SOTO 2002]

Das Aufbrechen der Aggregate mittels Ultraschall stellt einen essentiellen Schritt bei der Vermehrung der pathologischen PrP^{Sc} dar [PIENING 2005].

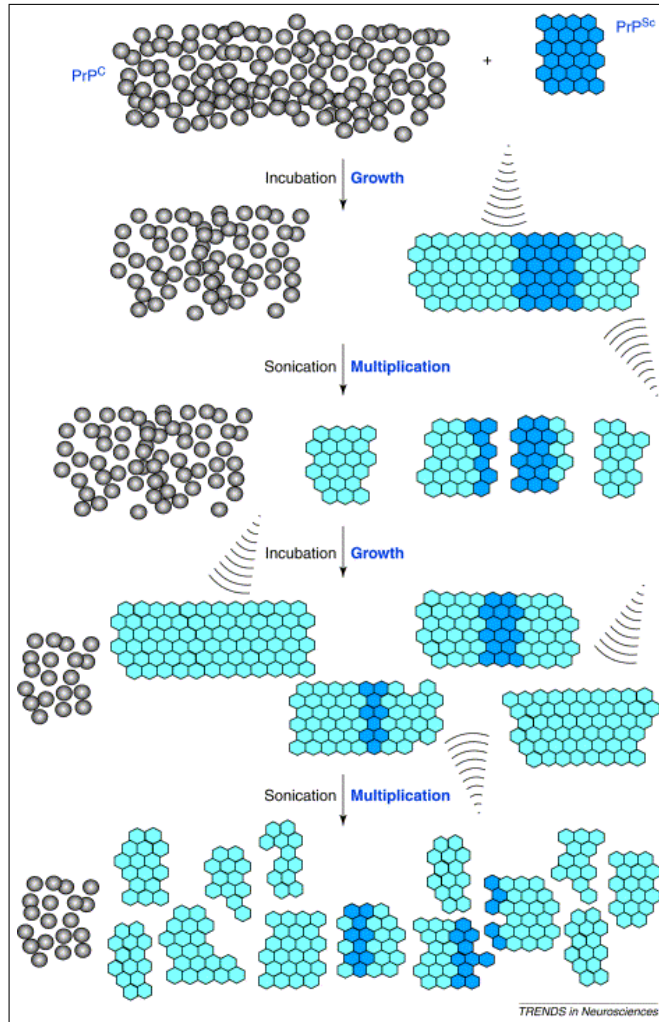


Abbildung II.5.: Protein misfolding cyclic amplification (PMCA). Für die zyklische Vermehrung der fehlgefalteten Proteine wird eine Probe, die geringste Mengen an PrP^{Sc} und einen großen Überschuss an PrP^C enthält, Zyklen von Inkubation und Ultraschallbehandlung unterzogen. Während der Inkubation wachsen die PrP^{Sc}-Aggregate durch Umwandlung und Anlagerung von PrP^C an das Polymer. Ultraschall zerteilt große Aggregate in kleinere Bruchstücke und erhöht die Anzahl der Einheiten, die die Umwandlung bewirken. Die Zyklen des PMCA können beliebig oft wiederholt werden, bis die Menge an PrP^{Sc} groß genug ist, um einfach detektiert werden zu können. [SOTO 2002]

Der Erfolg dieser Methode ist von großer wissenschaftlicher Bedeutung, denn die Übertragung der pathologischen Konformation vom PrP^{Sc} auf reines, gesundes zelluläres PrP^C ist ein Beleg für die Richtigkeit von Prusiners Prionmodell mit der Hypothese, dass nur Proteine an diesem Prozess beteiligt sind (protein-only-hypothesis).

Neue Ergebnisse der Forschungsgruppe um Soto [SOTO 2005] bestätigen die Befunde, denn bei einem künstlich infizierten Rind sowie einem Hamster konnte bereits in der vorklinischen Phase nach einer PMCA das pathologische PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

1.7. Visionen von Therapie und Impfung

Nachdem die bislang zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten erläutert wurden, beschäftigt sich der nachfolgende Abschnitt mit möglichen, ggf. präventiven, Maßnahmen gegen Prionerkrankungen.

1.7.1. Therapeutika

Trotz großer Bemühungen in Richtung Therapie, sind bislang weder eine solche noch die Beeinflussung des tödlichen Verlaufes der TSEs möglich [GONI 2005].

Folgende Stoffe wurden oder werden als mögliche Therapeutika beforscht: Kongorot [CAUGHEY 1992], Amphotericin B, Antracycline [TAGLIAVINI 1997], Polyanionen [CAUGHEY 1993b], Porphyrine [PRIOLA 2000], verzweigte Polyamine [SUPATTAPONE 2001], Curkuma [CAUGHEY 1993a] und andere, zuletzt sogar kleine RNS-Fragmente [DAUDE 2003]. Weitere Therapiekonzepte sind z.B. ein dimeres Prionprotein als Aggregationshemmer [MEIER 2003] oder der Einsatz von Antikörpern.

1.7.2. Impfung

Im Hinblick auf eine Impfung gibt es einige Untersuchungen, die bislang alle ohne akzeptablen Erfolg geblieben sind.

In Zellkulturen kann die PrP-Replikation durch Anti-PrP-Antikörper [KLEIN 2001] und andere Antikörper gegen PrP [PERETZ 2001, ENARI 2001] unterbunden werden.

Die Entfernung des für PrP codierenden Gens PRNP führte bei Mäusen zu einer guten Immunisierung [BRANDNER 1996, BÜELER 1992].

Bei intraperitonealer Inokulation von Mäusen mit PrP^{Sc} konnte durch Verabreichung von monoklonalen Anti-PrP-Antikörpern (Passivimpfung) vor dem Einsetzen der klinischen Symptome eine Verzögerung des Krankheitsverlaufes erreicht werden [WHITE 2003].

Auf ähnliche Weise konnte die Pathogenese (nach peritonealer Inokulation bei Mäusen) durch Einsatz eines transgen exprimierten Immunglobulins gestoppt werden, das ein Epitop eines monoklonalen Anti-PrP-Antikörpers hoher Affinität enthält [HEPPNER 2001]. Versuche, eine Aktivimpfung (aktive Immunisierung) zu entwickeln, scheiterten daran, dass das Immunsystem PrP unterschiedlicher Form als körpereigen akzeptiert [AGUZZI 2004].

Goni [GONI 2005] berichtete von einer Impfung der Mucosa von Mäusen mit einem Salmonella Stamm, die eine Infektion mit PrP^{Sc} über die orale Route verhindert oder verzögert. Bei den Mäusen traten keine Nebenwirkungen auf.

1.8. Opferzahlen der Epidemie der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie

Im Folgenden werden die Statistiken der Anzahl von Opfern der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie aufgezeigt. Die Prionkrankheiten von Mensch und Rind sind in dieser Arbeit von besonderem Interesse, denn im Zusammenhang mit der Ausbreitung und der Überschreitung der Speziesbarriere sind dies die bedeutendsten Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien.

Wie oben beschrieben, breitete sich die BSE nach der Umstellung der Aufbereitungsmethode von Tiermehl in Großbritannien epidemieartig aus.

BSE-Fälle vor dem Jahr 2000 international

Tabelle II.2 zeigt die Opferzahlen der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie in einigen Ländern bis zum Jahre 2000. Es ist ersichtlich, dass neben Großbritannien, wo es bis zum Jahr 2000 über 180.000 BSE-Fälle gab, nur noch in Irland, Portugal, der Schweiz und Frankreich, ggf. noch in Belgien, nennenswerte Opferzahlen aufgetreten sind. Wie in den weiteren Tabellen noch deutlich wird, war im Jahr 2000 der Höhepunkt der Opferzahlen der BSE bereits überschritten.

Tabelle II.2.: Fälle von BSE in Großbritannien und anderen Ländern bis zum Jahr 2000^a [BROWN 2001].

Land	endemische Fälle	importierte Fälle	Fälle gesamt
Großbritannien	180.376 ^b	0	180.376
Republik Irland	487	12	499
Portugal	446	6	452
Schweiz ^c	363	0	363
Frankreich ^c	150	1	151
Belgien	18	0	18
Niederlande	6	0	6
Liechtenstein	2	0	2
Deutschland	3	6	9
Dänemark	1	1	2
Luxemburg	1	0	1
Oman	0	2	2
Italien	0	2	2
Spanien ^d	0	2	2
Kanada	0	1	1
Falklands (UK)	0	1	1
Azoren (Portugal) ^e	0	1	1

^{a)} Quelle: Organization of International Epizootics (Paris) and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK).

^{b)} einschließlich 1287 Fällen von Inseln um Großbritannien

^{c)} einschließlich Fällen, die bei der aktiven Überwachung mit immunologischen Methoden gefunden wurden

^{d)} Herkunft und Daten infizierter Fälle werden untersucht

^{e)} von Deutschland importiert

Bestätigte BSE-Fälle in Deutschland

In Deutschland wurden im Zeitraum vom 01.01.2000 bis 31.01.2006 insgesamt 12,7 Millionen Rinder auf BSE untersucht. Innerhalb dieses Zeitraums wurden 392 Fälle von BSE amtlich festgestellt. Tabelle II.3 zeigt die Anzahl der als BSE-positiv getesteten Rinder, gegliedert nach Bundesländern.

Tabelle II.3.: Anzahl der bestätigten BSE-Fälle in der Bundesrepublik Deutschland (BRD), nach Bundesländern, seit 2000 bis zum 31.06.2006.

Bundesland	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Gesamtanzahl
Baden-Württemberg	-	12	11	9	6	6	3	47
Bayern	5	59	27	21	21	7	1	141
Berlin	-	-	-	-	-	-		
Brandenburg	-	3	4	3	3	3		16
Bremen	-	-	-	-	-	-		
Hamburg	-	-	-	-	-	-		
Hessen	-	3	2	2	2	-	2	11
Mecklenburg-Vorpo.	-	2	4	-	3	2	1	12
Niedersachsen	1	17	27	7	14	2	4	72
Nordrhein-Westfalen	-	2	2	4	8	4	1	20
Rheinland-Pfalz	-	4	6	-	2	1		13
Saarland	-	1	-	-	-	-		1
Sachsen	-	4	4	3	2	2		15
Sachsen-Anhalt	-	4	4	1	1	-		10
Schleswig-Holstein	1	12	14	1	1	3		32
Thüringen	-	2	1	3	2	-	1	9
BRD	7	125	106	54	65	32	11	400

Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien

Die beiden Darstellungen II.6 und II.4 (Seite 38) zeigen den Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien bzw. dem United Kingdom seit Mitte bzw. Ende der 1980er Jahre.

In Abbildung II.6 ist deutlich der Verlauf der Opferzahlen sowie der Höhepunkt der BSE-Epidemie in Großbritannien zu erkennen. Seit dieser Zeit zeigen die Maßnahmen der BSE-Bekämpfung Wirkung.

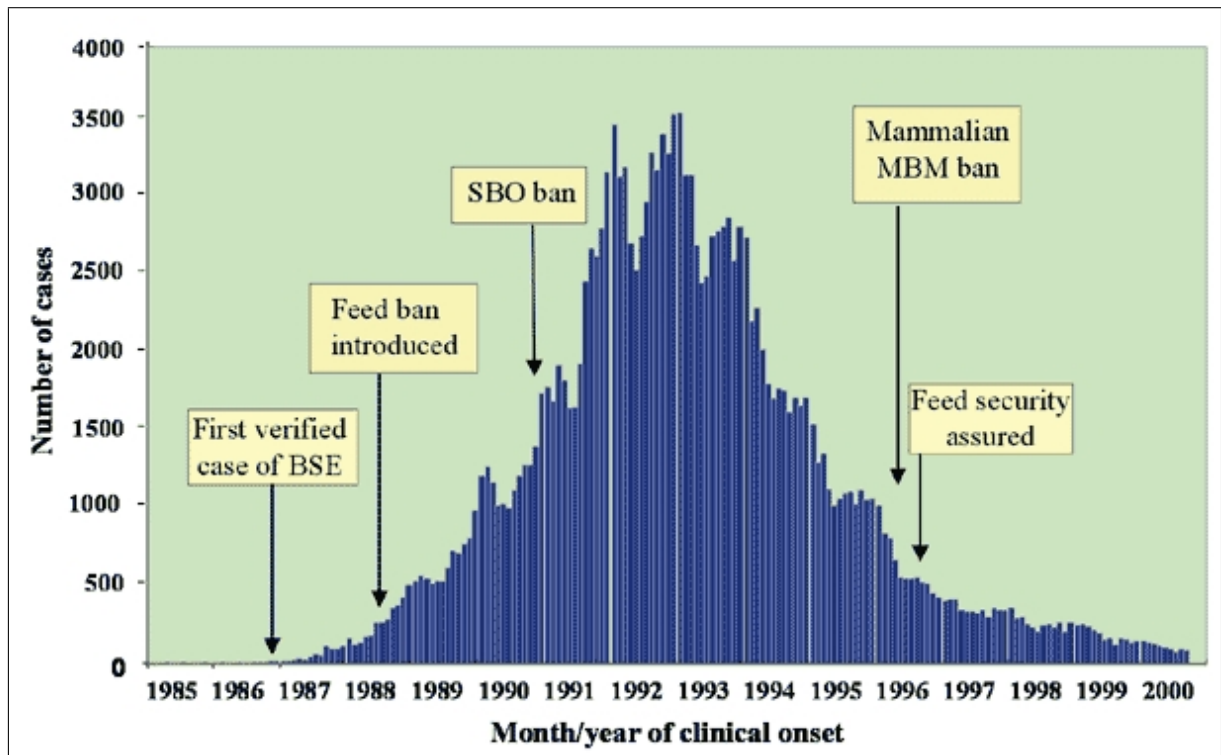


Abbildung II.6.: Zeitlicher Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien 1986 bis 2000. Die Zeitpunkte der ergriffenen Maßnahmen sind angezeigt. 1986: Erste aufgetretene BSE Fälle; 1988: Verfütterungsverbot eingebracht; 1990: Verbot spezifizierter Schlachtabfälle (SBO, spezified bovine offals) von Rindern (d.h. Hirn, Rückenmark, Thymus, Mandeln, Milz, Innereien) über 6 Monate; 1996: Ausweitung des Verfütterungsverbotes von Fleisch- und Knochenmehl (MBM, meat and bone meal) an Lebensmittel liefernde Tiere, 1994 auf alle Säugerarten. [BROWN 2001]

Tabelle II.4 zeigt den Verlauf der Opferzahlen sowie Höhepunkt der BSE-Epidemie in Großbritannien und im United Kingdom. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass die rückläufige Tendenz der an BSE erkrankten Rinder weiter anhält.

Tabelle II.4.: Anzahl der Fälle Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE) im United Kingdom^a.

	Alderney	Great Britain	Guernsey ^c	Isle of Man ^b	Jersey	Northern Ireland	Total United Kingdom
bis 1988	0	442	4	0	0	0	446
1988	0	2469	34	6	1	4	2514
1989	0	7137	52	6	4	29	7228
1990	0	14181	83	22	8	113	14407
1991	0	25032	75	67	15	170	25359
1992	0	36682	92	109	23	374	37280
1993	0	34370	115	111	35	459	35090
1994	2	23945	69	55	22	345	24439
1995	0	14302	44	33	10	173	14562
1996	0	8016	36	11	12	74	8149
1997	0	4312	44	9	5	23	4393
1998	0	3179	25	5	8	18	3235
1999	0	2274	11	3	6	7	2301
2000	0	1355	13	0	0	75	1443
2001	0	1113	2	0	0	87	1202
2002	0	1044	1	0	1	98	1144
2003	0	549	0	0	0	62	611
2004	0	309	0	0	0	34	343
2005	0	203	0	0	0	22	225

^a) Fälle seit dem Jahr der Restriktion

^b) Diese Zahlen weisen auch Tier mit aus, die lediglich aufgrund klinischer Symptome als BSE-erkrankt festgestellt wurden.

1.9. Opferzahlen der Neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die folgenden Tabellen zeigen die Opferzahlen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sowie, im Speziellen, der Neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Opfer international

Tabelle II.5.: Anzahl der CJK-Verdachtsfälle unter 50 Jahren zwischen 1996 und 31.12.2005 sowie Anzahl der Todesfälle als Folge der vCJK bis 31.12.2005.

Land	Anzahl der Verdachtsfälle unter 50 Jahren seit 1996	Anzahl der vCJK-Fälle
Australien	63 ^a	0
Österreich	119	0
Kanada	48 ^b	1
Frankreich	1028 ^c	14
Deutschland	136 ^d	0
Italien	251	1
Niederlande	22	1
Slovakei	134	0
Spanien	45 ^b	1
Schweiz	26	0
Großbritannien	415 ^e	153

^a) einschließlich 5 familiärer Fälle und 38 nachträglich ausgeschlossener Fälle

^b) bis 30.09.2005

^c) einschließlich Verdachtsfälle auf familiäre oder iatrogene CJK

^d) beim Ausbruch

^e) ohne Verdachtsfälle auf familiäre oder iatrogene CJK

Bei den Opferzahlen der vCJK in Abbildung II.5 wird ersichtlich, dass nur in den Ländern eine größere Anzahl an vCJK-Opfern zu verzeichnen ist, in denen auch die BSE verstärkt aufgetreten war.

Opfer in Großbritannien

In Abbildung II.6 sind die Verdachtsfälle sowie die Opferzahlen der CJK in Großbritannien bis zum Mai 2006 dargestellt. Eine Aufgliederung je nach Form der vorliegenden CJK ermöglicht einen Einblick in den Verlauf der Opferzahlen der vCJK.

Es wird hier erkennbar, dass es im Jahr 2000 einen deutlichen Höhepunkt der vCJK-Opferzahlen gab. Seither sind die Opferzahlen rückläufig. Dieser Verlauf ist schlüssig im Bezug auf den Verlauf der Epidemie der BSE bei den Rindern. Der Höhepunkt der vCJK beim Menschen ist zeitlich verzögert, da die Vorsorgemaßnahmen aufgrund einer wesentlich längeren Inkubationszeit später Wirkung zeigen.

Tabelle II.6.: Überwiesene CJK-Fälle, gesicherte und vermutete CJK-Todesfälle in Großbritannien (Mai 2006).

überwiesene CJK-Verdachtsfälle		gesicherte und vermutete CJK-Todesfälle						
Jahr	Fälle	Jahr	sCJK sporadisch	iCJK iatrogen	fCJK hereditär	GSS	vCJK	Tote gesamt
1990	[53]	1990	28	5	0	0	-	33
1991	75	1991	32	1	3	0	-	36
1992	96	1992	45	2	5	1	-	53
1993	78	1993	37	4	3	2	-	46
1994	118	1994	53	1	4	3	-	61
1995	87	1995	35	4	2	3	3	47
1996	133	1996	40	4	2	4	10	60
1997	162	1997	60	6	4	1	10	81
1998	154	1998	63	3	3	2	18	89
1999	170	1999	62	6	2	0	15	85
2000	178	2000	50	1	2	1	28	82
2001	179	2001	58	4	3	2	20	87
2002	163	2002	72	0	4	1	17	94
2003	162	2003	79	5	4	2	18	108
2004	114	2004	51	2	4	1	9	67
2005	121	2005	64	3	6	6	5	84
2006*	44	2006	27	0	3	1	3	34
Fälle gesamt	2088	Tote gesamt	856	51	54	30	156	1147

*) bis 30. Juni 2006

1.10. Prionenforschung

Prusiners Prionmodell, das lange Zeit von vielen Wissenschaftlern sehr skeptisch bewertet oder abgelehnt wurde, wird durch neue Forschungsergebnisse gestützt. 2005 gelang es einer Forschergruppe um Castilla infektiöses Prionprotein im Labor zu generieren und Hamster damit zu infizieren [CASTILLA 2005]. Damit ist eine wesentliche Lücke im Beweis von Prusiners Nur-Prion-Hypothese geschlossen.

Woran genau die Infektiosität gekoppelt ist, und wie im Detail die Übertragung der infektiösen Eigenschaften vonstatten geht, konnte noch nicht ergründet werden. Auch die molekularen und biochemischen Vorgänge der Neurodegeneration sowie die physiologische Funktion des zellulären PrP sind nicht geklärt. [AGUZZI 2004]

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass das verdauungsbeständige Prionprotein (PrPres), das in den zugelassenen BSE-Tests nachgewiesen wird, nachweislich nicht identisch mit der Komponente aus infektiösem Gehirn ist, an die die Infektiosität gekoppelt ist. So existieren beispielsweise weitgehend proteolyseresistente Prionproteine PrPres, die keine Infektiosität aufweisen. [RIESNER 2001b]

Folgende neueren Erkenntnisse könnten für zukünftige Forschungsarbeiten sowie den Umgang mit den TSEs noch Auswirkungen haben:

- Bei oral infizierten Hamstern konnte schon vor Einsetzen der klinischen Symptome in Muskelgewebe PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte [THOMZIG 2004].
- Neueste Untersuchungen bestätigten PrP^{Sc} in der Milch einer BSE erkrankten Kuh, die an Mastitis litt [LIGIOS 2005].
- Auch im Urin von Mäusen mit chronischer Nierenentzündung, die mit Scrapie infiziert wurden, konnten pathologische Prionproteine nachgewiesen werden [SEEGER 2005].
- Ein Patient entwickelte über sechs Jahre nach dem Empfang einer Bluttransfusion Symptome einer TSE. Das Blut war vom Spender mehr als drei Jahre vor dem Einsetzen der klinischen Symptome einer TSE entnommen worden. [AGUZZI 2004]

1.11. Risikoeinschätzung

Eine neuerliche Hysterie sollten derartige Forschungsergebnisse nicht auslösen. Die Detektion von PrP^{Sc} in weiteren Körperflüssigkeiten und Organen ist eine Frage der Zeit. Da Infektiosität bereits in Blut nachgewiesen wurde [BROWN 1999], kann eine Übertragung in alle Bereiche des Körpers durch die Läsion innerer Organe nicht ausgeschlossen werden. Die Anreicherung im gesamten Nervensystem ist bekannt, ebenso im Lymphsystem. [RIESNER 2001a]

Durch verbesserte und noch steigende Empfindlichkeit der analytischen Methoden kann es somit bei infizierten Individuen zukünftig möglich sein, im gesamten Organismus geringste Mengen an PrP^{Sc} und/oder Infektiosität nachzuweisen.

Betrachtet man die Statistiken, so wird im Falle der BSE deutlich, dass gerade in Großbritannien, das als einziges Land von einer BSE-Epidemie betroffen war, seit 1993 die getroffenen Maßnahmen deutlich greifen und die BSE-Epidemie überwunden ist. Auch in den anderen betroffenen Ländern treten nur noch vereinzelte BSE-Fälle auf. Durch die Kenntnis der Hauptursachen für die starke Ausbreitung konnte die BSE wieder weitestgehend zurückgedrängt werden.

Für die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit kann wohl ein ähnlicher Verlauf angenommen werden. Trifft die Kausalität der BSE für die vCJK zu, so ist der folgende Verlauf der Opferzahlen schlüssig. Das Abklingen der CJK-Fälle erfolgt aufgrund längerer Inkubationszeiten der Erkrankung beim Menschen zeitlich verzögert und gestreckt. Auch hier scheint der Zenith der Opferzahlen bereits überschritten zu sein.

2. Zerschäumungsanalyse

Die Zerschäumungsanalyse (oder kurz Zerschäumung) zählt zu der Gruppe der adsorptiven Gasblasentrennmethoden. Gemeinsam ist allen Methoden aus dieser Gruppe die Ausnutzung von Phasengrenzflächenphänomenen an der Kontaktfläche zwischen Flüssigkeit und Gas. Diese Methoden sind wirkungsvolle, aber schonende Maßnahmen, sowohl zur Abtrennung als auch zur Aufkonzentrierung von Stoffen aus Lösungen und Suspensionen.

Sehr viele chemische Verbindungen und Substanzen sind selbst oberflächenaktiv und haben deshalb das Bestreben, sich an der Phasengrenzfläche anzulagern. Im Fall von Stoffen ohne eigene Affinität zur Phasengrenzfläche können für eine Zerschäumungsanalyse ausgewählte Schäumungshilfsmittel (Detergenzien) zugegeben werden, mit deren Hilfe eine Anreicherung an der Grenzfläche erzielt werden kann.

2.1. Adsorptive Gasblasentrennmethoden

Die Zerschäumungsanalyse wird in verschiedenen Variationen angewandt und ist geeignet, unterschiedliche Stoffe aus wässrigen Lösungen zu separieren oder anzureichern.

Einen Überblick über die verschiedenen Formen der Zerschäumungsanalyse gibt Abbildung II.7.

Lemlich [LEMLICH 1972] differenzierte die verschiedenen Zerschäumungsformen zunächst in schaubildende Verfahren (Schaumseparation) und nichtschäumende adsorptive Blasen-

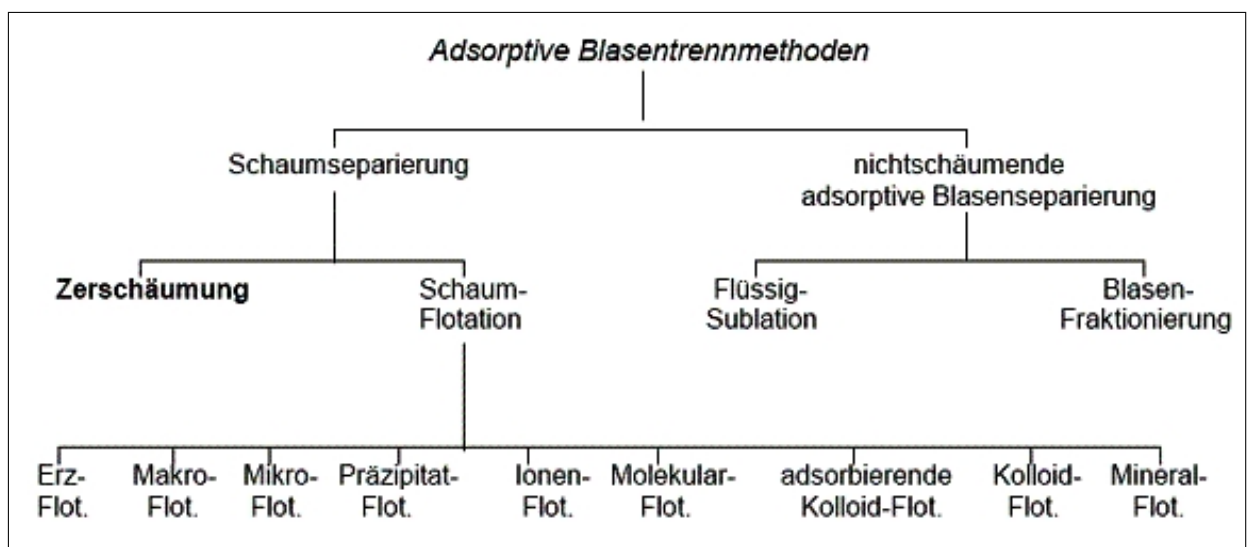


Abbildung II.7.: Die unterschiedlichen adsorptiven Gasblasentrennmethoden nach Lemlich [LEMLICH 1972]. (Flot. bedeutet Flotation)

senseparation. Je nach Art der anzureichernden Stoffe und Vorgehensweisen werden diese beiden Kategorien noch weiter differenziert. Die nichtschäumenden adsorptiven Blasen-separierungsmethoden umfassen die Lösungsmittelsublation und die Blasenfraktionierung. Unter Schaumseparierung versteht man die Schaumflotation, die wieder viele verschiedene Ausformungen findet, sowie die Zerschäumung. Eine konkrete Zuordnung zu einem Typ ist nicht immer möglich. Die Übergänge sind fließend.

(Gas-)Blasenfraktionierung (bubble fractionation)

Bei dieser Form der nichtschäumenden adsorptiven Blasen-separierung kommt es nach Dormann und Lemlich [DORMANN 1965] durch Adsorption gelöster oberflächenaktiver Verbindungen an die aufsteigenden Gasblasen zu einer relativ geringen Konzentrationsverschiebung. An der Phasengrenzfläche der Blasen steigen die Verbindungen mit zur Flüssigkeitsoberfläche auf. Dort entweicht das Gas der Blasen, und das angereicherte Fluid aus der vormaligen Phasengrenzfläche wird oben in der Flüssigkeit angereichert. Aus dieser oberen Region wird dann das leicht angereicherte Fluid entnommen. [MAAS 1974]

Lösungsmittelsublation (solvent sublation)

Die wässrige Phase, in der die anzureichernde Substanz vorliegt, wird bei der Lösungsmittelsublation mit einer darin nicht löslichen organischen Phase (z.B. Octanol) überlagert. Im Gegensatz zur Gasblasenfraktionierung reichern sich die an der Blase mittransportierten Moleküle nicht einfach nur oben in der Flüssigkeit an, sondern lösen sich im unpolaren Medium, wenn die Blasen dieses passieren und das Gas in die Atmosphäre übertritt. Bedient man sich hier ionischer Tenside, können auch Stoffe ohne Oberflächenaktivität aus wässriger Lösung extrahiert werden.

Schaumflotation (foam flotation)

Anders als bei den anderen adsorptiven Gasblasentrennmethoden werden bei der Schaumflotation, vereinfacht meist Flotation genannt [GAUDIN 1957], nicht gelöste Stoffe, sondern Partikel aus einer Suspension geschäumt. Diese Technik findet weit verbreitet Anwendung und wird je nach Größe und Behandlungsweise der abzutrennenden Stoffe in mehrere Gruppen unterteilt [KARGER 1968, MAHNE 1971]. Dies sind die Erzflotation zur Aufreinigung verschiedener Erze [GAUDIN 1957], die Makroflotation, bei der makroskopische Partikel, sowie die Mikroflotation, bei der mikroskopische Partikel (z.B. Mikroorganismen), abgeschäumt werden [DOGNON 1941]. Weiterhin gibt es die Präzipitationsflotation, bei der die Zielsubstanz erst präzipitiert wird und dann durch die Gasblasen in den Schaum getragen werden kann [BAARSON 1963]. Bei der Ionen- bzw. Molekülflotation werden nichttensidische Ionen bzw. Moleküle mit Hilfe eines unlöslichen Kollektors abgeschäumt [SEBBA 1962]. Von Kolloidflotation spricht man, wenn das abzuschäumende Material an kolloidale Partikel adsorbiert und mit diesen in den Schaum transportiert wird.

Zerschäumungsanalyse (foam fractionation)

Anders als bei der Flotation, wo suspendierte Partikel angereichert werden, handelt es sich bei der Zerschäumungsanalyse um echt oder kolloidal gelöste Stoffe, die selbst meist auch oberflächenaktiv sind, also Detergenzwirkung aufweisen und im Schaum angereichert werden. Eine Zugabe von Tensid zur Unterstützung der Schäumbarkeit ist möglich.

Wie oben bereits angedeutet, ist eine genaue Differenzierung bei der Nomenklatur nicht immer möglich, denn Anwendungen der adsorptiven Gasblasentrennmethode bedienen sich verschiedener Effekte oder können nicht genau einer Gruppe zugeordnet werden. Bei systematischer Benennung wären viele Anwendungen zwischen den einzelnen Methoden anzusiedeln. So gibt es z.B. bei der Ionenflotation auch Techniken, bei denen keine partikulären Bestandteile an der Abtrennung beteiligt sind, sondern ein in echter Lösung befindlicher Stoff abgeschäumt wird [DOYLE 2003]. Ebenso verhält es sich bei der Separation komplexer Gemische durch adsorptive Gasblasentrennmethode. Aufgrund der Vielzahl der enthaltenen Stoffe kann im Einzelnen oft nicht differenziert werden, welche Komponente selbst den Schaum bildet, welche mitgetragen wird, und welche Komponenten vielleicht nur durch ein Zusammenwirken untereinander [BACKLEH 2001] an der Phasengrenzfläche angereichert werden.

Auf derart semantische Probleme stößt man auch in dieser Arbeit, sobald man versucht, die genutzten Effekte einer speziellen Technik aus der Gruppe der adsorptiven Gasblasentrennmethode zuzuordnen. In derartigen Fällen wird der erzielte Effekt beschrieben, ohne etwaige Widersprüche zur engeren begrifflichen Definition zu erörtern.

2.2. Grundlagen der Zerschäumungsanalyse

2.2.1. Schaum

Definitionsgemäß sind Schäume disperse Systeme von Gas in Flüssigkeit oder Feststoff, d.h. es sind Gasblasen, die durch dünne Schichten aus Flüssigkeit oder Feststoff getrennt sind [MANEGOLD 1953]. Da in dieser Arbeit nur Schäume mit Flüssigkeiten relevant sind, wird der Feststoffschaum im Folgenden vernachlässigt.

Bei den Schäumen bezeichnet man die zwei extremen Formen der Verteilung von Gas und Flüssigkeit ineinander als Kugelschaum resp. Polyederschaum. Der Übergang zwischen diesen beiden Grenzformen ist fließend. Eine Zwischenform ist der Wabenschaum. Zur Veranschaulichung dienen die Abbildungen II.8 (Seite 46) sowie, im Detail, Abbildung II.11 (Seite 50).

Der **Kugelschaum** ist eine konzentrierte Verteilung selbstständiger, d.h. voneinander unabhängiger Blasen in einer Flüssigkeit. Bei der Zerschäumung tritt diese Blasenform in der Flüssigkeit auf sowie dort, wo die aufsteigenden Blasen sich konzentrieren und die Flüssigkeit zwischen diesen zurückzulaufen beginnt (siehe Abbildung II.8, Seite 46, unten).

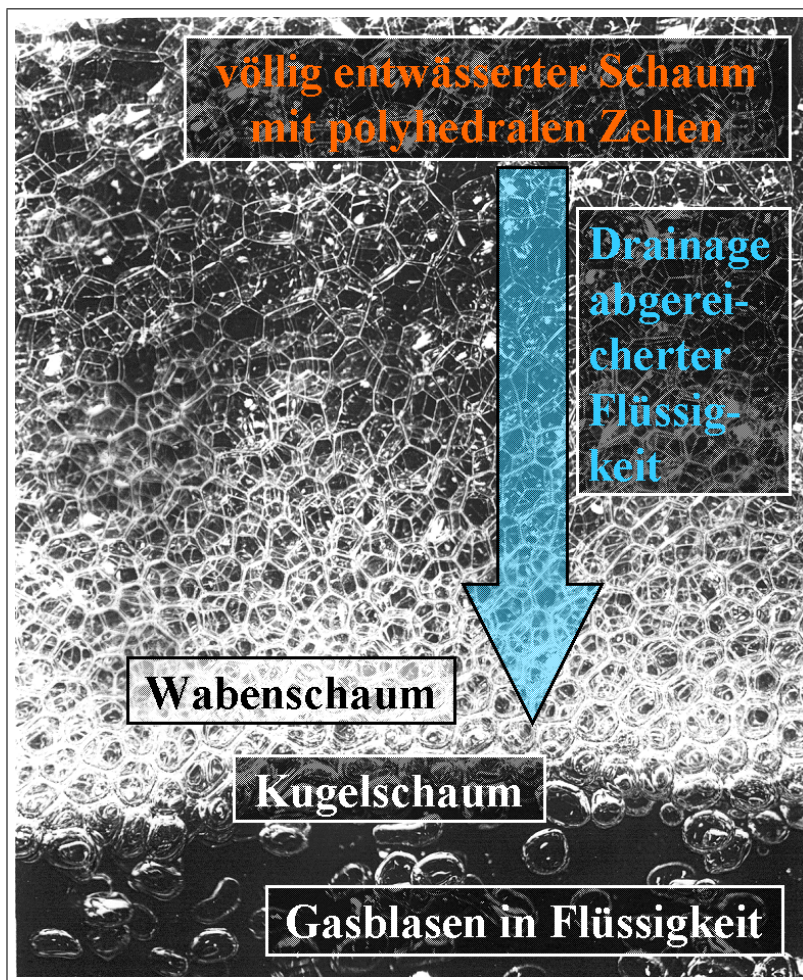


Abbildung II.8.: Entwicklung und Verhalten des Schaumes während der Zerschäumung. Die in der Flüssigkeit vereinzelt vorliegenden Gasblasen sammeln sich oben an der Flüssigkeit und bilden einen Kugelschaum. Aus diesem entsteht durch Rücklauf von Flüssigkeit schnell Wabenschaum. Dieser geht durch Drainage abgereicherter Flüssigkeit kontinuierlich in Polyederschaum über, aus dem, ganz oben, völlig entwässerte polyhedrale Zellen hervorgehen.

Ist dieser Rückfluss – man spricht von Drainage – etwas fortgeschritten, so entsteht **Wabenschaum** (siehe auch hierzu die Abbildung II.8), d.h. die Blasen sind nicht mehr sphärisch (kugelförmig), aber noch rundlich, mit ebenen Bereichen an den Kontaktflächen. Durch den weiteren Rückfluss von Flüssigkeit zwischen den Blasen lagern sich die Grenzflächen der einzelnen Blasen in steigendem Maße aneinander und bilden ebene Flächen, es entsteht **Polyederschaum** (Abbildung II.8 oben, sowie Abbildung II.11 (Seite 50)). Bei diesem Schaum sind die einzelnen Blasen lediglich noch durch Flüssigkeitslamellen voneinander getrennt, deren Dicke 10 nm bis 1 μm beträgt. Schematisch ist eine derartige Lamelle (bei einer freien Blase) in Abbildung II.9 (Seite 47) dargestellt. Die Grenzflächen der Lamellen zur Gasphase hin werden von Detergenzien (oberflächenaktive Substanzen) gebildet.

An den Kanten und Ecken der Polyeder treffen die (im Schaum ebenen) Lamellen aufeinander und die interlamellare Flüssigkeit bildet zusammenhängende Dreieckskanäle, deut-

lich erkennbar in Abbildung II.11 (Seite 50). Diese Kanäle, als Gibbs-Kanäle [BARTSCH 1926] oder Plateau-Ränder [PRINS 1988, GRIEVES 1982] bezeichnet, spielen eine zentrale Rolle für die Drainage im Schaum, und somit für die Anreicherung bei der Zerschäumung. In Abbildung II.12 (Seite 51) ist ein Schnitt durch einen Gibbs-Kanal dargestellt. Diese im Polyederschaum auftretenden Kanäle werden unter II.2.2.3.2 (Seite 50) näher beschrieben.

Während die Generierung von Kugelschaum auch ohne Vorhandensein von Detergenzien möglich ist, weil lediglich Gas in einer Flüssigkeit verteilt vorliegt, sind für Wabenschaum und Polyederschaum oberflächenaktive Stoffe in der Lösung eine zwingende Voraussetzung, da die Phasengrenzfläche stabilisiert sein muss [TADROS 2005].

2.2.2. Detergenzien

Detergenzien sind Stoffe, welche die Grenzflächenspannung herabsetzen. Synonym spricht man auch von oberflächenaktiven Substanzen oder Tensiden. Detergenzien sind amphiphile Substanzen, d.h. sie haben mindestens einen hydrophilen (wasserliebenden) und einen hydrophoben (wasserabstoßenden) Molekülteil. [RÖMPP 2005]

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von Molekülabschnitten gegenüber Wasser orientieren sich Detergenzien bevorzugt mit dem hydrophilen Molekülteil zur Wasserphase, mit dem hydrophoben Teil weg vom Wasser, zur Gasphase [LEMLICH 1972] resp. hin zu einer lipophilen Phase. Deshalb ordnen sich amphiphile Moleküle an Phasengrenzflächen an und verändern deren Eigenschaften. In erster Linie verringern Tenside die Oberflächenspannung, was grundlegende Voraussetzung für die Bildung von Schaum ist [MAAS 1974].

In Abbildung II.9 ist dieses Verhalten schematisch dargestellt.

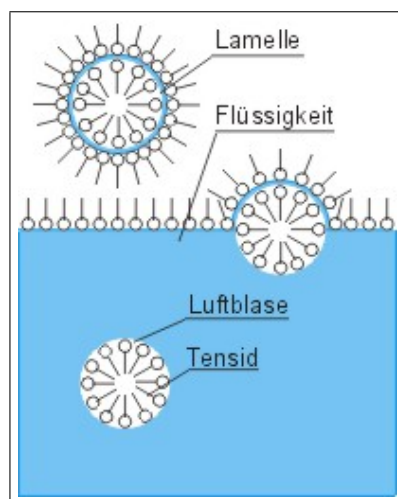


Abbildung II.9.: Verhalten von Tensidmolekülen in und außerhalb von Flüssigkeit. Die Tenside sind als Strich mit einem Ring an einer Seite symbolisiert. Dieser Ring steht für den hydrophilen (wasserliebenden) Molekülteil, der Strich stellt die hydrophobe (wasserabstoßende) Molekülregion dar.

Aus energetischer Sicht führt die Anlagerung amphiphiler Moleküle zu einem begünstigtem Zustand der Detergenzien, da wasserunlösliche Molekülregionen einen energieärmeren Zustand einnehmen, wenn sie vom Wasser weg in die Gasphase ragen. Zudem hat die Grenzfläche der Flüssigkeit einen energieärmeren Zustand, weil polare Moleküle des Lösungsmittels nicht in direkten Kontakt mit der (hydrophoben) Gasphase treten, sondern die Tensidmoleküle die Unterschiede von polarer und unpolarer Phase vermitteln. Als Folge wird die Oberflächenspannung herabgesetzt, die einer Ausdehnung oder Neuschaffung von Phasengrenzfläche entgegenwirkt. Der ungünstige, weil hochenergetische Zustand großer Oberfläche wird somit durch die vermittelnde Wirkung der oberflächenaktiven Moleküle in einen günstigeren, energieärmeren gewandelt. [TADROS 2005]

Das Bestreben, eine möglichst geringe Oberfläche zu bilden, äußert sich des Weiteren auch in der sphärischen Form von Blasen, denn die Kugel ist diejenige geometrische Form, welche im Vergleich zum Volumen die geringste Oberfläche (Grenzfläche) aufweist.

Eine wichtige Größe bei der Schaumbildung mit Hilfe von Tensiden ist die kritische Mizellen-Konzentration (critical micelle concentration, cmc). Von ihr hängt es ab, ob die Luftblasen nach Verlassen der Flüssigkeit sofort kollabieren oder Schaum aufgebaut wird. Die cmc gibt die Konzentration an Detergens an, bei der die amphiphilen Moleküle nicht mehr einzeln in der Lösung vorliegen, sondern Aggregate bilden. In dieser Form wenden sie ihre lipophilen Molekülregionen einander zu, und es sind nur noch die hydrophilen Regionen des Moleküls im Wasser gelöst. Dies kann sphärisch zu Kugelmizellen, zu Stabmizellen oder zu lamellaren Doppelschichten führen. Mischformen zwischen den genannten Anordnungen sind möglich. Entscheidend ist bei allen Aggregatformen die Zusammenlagerung hydrophober Molekülregionen, um diese nicht in das wässrige Lösungsmittel zu orientieren.

2.2.3. Prinzip der Zerschäumungsanalyse

Ostwald [OSTWALD 1936] beschreibt mit dem Terminus Zerschäumung das Einleiten eines Gases in eine flüssige Phase, wobei die Blasen beim Austritt aus der Flüssigkeit Schaum bilden, der in einer Säule aufsteigt. Am Ende der Säule wird der Schaum in ein Gefäß überführt und zerfällt dort. Eine sehr einfache Apparatur für die Zerschäumungsanalyse zeigt Abbildung II.10 aus Seite 49.

Voraussetzung für die Bildung von Schaum ist die Anwesenheit von oberflächenaktiven Stoffen in der Flüssigkeit. Solche Stoffe lagern sich aufgrund sowohl hydrophiler als auch hydrophober Molekülstrukturen bevorzugt an die Phasengrenzfläche zwischen Gas(-blasen) und Flüssigkeit an. Dort setzen sie die Oberflächenspannung herab und bilden einen flexiblen, kohäsiven Film. Bei der Zerschäumung reichern sich (vorrangig) die Komponenten mit der höchsten Affinität zur Grenzfläche an [SCHNEPF 1959].

Die oberflächenaktive Substanz ist im Idealfall die anzureichernde selbst. Ist deren Tensidwirkung nicht stark genug oder deren Konzentration zu niedrig für eine Schaumbildung,

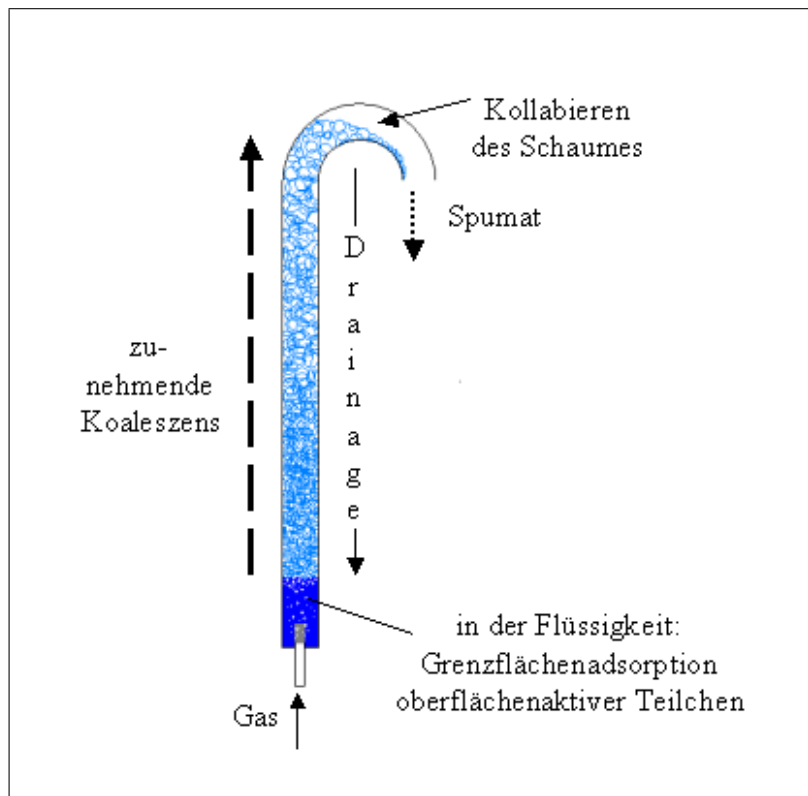


Abbildung II.10.: Schematische Skizze einer Zerschäumungsapparatur während der Zerschäumung. Das durch die Fritte unten in die Flüssigkeit geleitete Gas generiert Blasen, die den Schaum aufbauen. Die für die Zerschäumung wichtigen Prozesse der Grenzflächenadsorption in der Flüssigkeit sowie Drainage und Koaleszenz des Schaumes in der Säule sind angezeigt. Oben an der Säule verlässt kollabierter Schaum als Spumat die Säule.

können zur Unterstützung der Schäumung Detergenzien zugegeben werden. Da es genaue, systematische Vorhersagen über die Wirkung zugegebener Tenside bei der Zerschäumung noch nicht gibt, muss die Eignung einzelner Tenside empirisch ermittelt werden. Die Anreicherung von Substanzen bei der Zerschäumung wird in erster Linie durch die Grenzflächenadsorption der oberflächenaktiven Substanzen an die Gasblasen in der Flüssigkeit sowie die Drainage und das Kollabieren und die Koaleszenz von Blasen in der Schaumsäule gewährleistet.

2.2.3.1. Oberflächenadsorption

Beim Aufsteigen der Gasblasen in der Flüssigkeit ordnen sich oberflächenaktive Substanzen in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften an der Phasengrenzfläche an. Daraus resultiert ein Ansteigen der Konzentration des oberflächenaktiven Stoffes hin zur Grenzfläche. Entscheidenden Einfluss haben bei diesem Vorgang die Oberflächenspannung zwischen den Phasen, die Oberflächenaktivität, die Hydrophobizität und das elektrokinetische Potential der anzureichernden Verbindung(-en). Die an der Oberfläche der Blasen entstehende Schicht oberflächenaktiver Moleküle wird

in der Flüssigkeit mit nach oben transportiert. Sie verhindert ein Zerplatzen der Blasen oben an der Flüssigkeitssäule aufgrund der verringerten Oberflächenspannung und der Bildung eines kohäsiven Filmes.

2.2.3.2. Aufkonzentrierung im Schaum

Die Effekte, welche bei der Zerschäumung eine Anreicherung bedingen, die weit über die Differenzierung der Konzentration durch die Oberflächenadsorption hinausgeht, finden in der Schaumsäule statt. Dies ist zum einen der Drainage-Effekt und zum anderen die Kollabatlabbildung.

Drainage

Sowohl die Gravitation als auch die Sogwirkung der Gibbs-Kanäle (Plateau-Ränder) (deutlich erkennbar in Abbildung II.11, skizziert in Abbildung II.12 auf Seite 51) an den Rändern der polyhedralen Blasen bewirken die Drainage. Die genannten Kanäle weisen aufgrund der Krümmung der Oberfläche an den Kanten der Polyeder einen Unterdruck gegenüber den Lamellenflächen auf, d.h. die Flüssigkeit, die zwischen den Polyederflächen mit in den Schaum getragen wurde (Marangoni-Effekt) [TADROS 2005], wird in die Kanäle zwischen den Polyederrändern gesaugt. Von dort sowie aus den Lamellen fließt, bedingt durch die Gravitation, abgereicherte Flüssigkeit zurück in die Vorlage. Die an der Phasengrenzfläche angelagerten Moleküle hingegen verbleiben an der Phasengrenzfläche der Blase. Dies bedeutet eine selektive Entfernung von Lösungsmittel und somit eine Anreicherung der Moleküle an der Phasengrenzfläche. [GRIEVES 1982]

Einfluss auf die Geschwindigkeit der Drainage hat neben der Blasengröße und der Temperatur auch die stoffliche Zusammensetzung der Flüssigkeit (z.B. die Viskosität) [LANGE 1972].

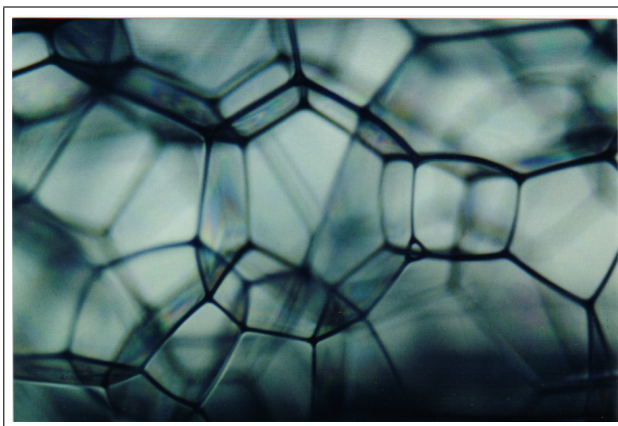


Abbildung II.11.:

Polyederschaum. Die Lamellen dieses stark entwässerten Schaumes sind kaum noch zu erkennen. Deutlich sieht man die Struktur aus Gibbs-Kanälen.

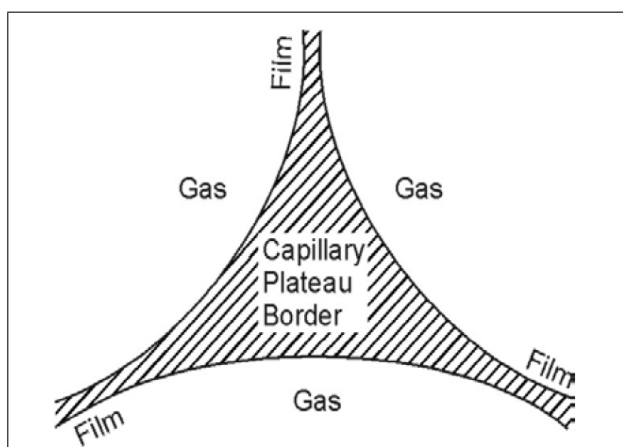


Abbildung II.12.:

Darstellung eines Gibbs-Kanals (Plateau-Rand) [GRIEVES 1982]. Die Gasphase ist bezeichnet; die schraffierte Fläche ist ein mit Flüssigkeit befüllter Gibbs-Kanal.

Koaleszenz und Kollabieren des Schaumes

Koaleszenz (Zusammenschluss von kleinen Blasen zu größeren) im Schaum sowie das Kollabieren (Zerfall, Brechen des Schaumes) von Blasen am oberen Ende der Schaumsäule führen dazu, dass die Oberfläche verringert wird.

Als Konsequenz fließt das wässrige Lösungsmittel, angereichert mit oberflächenaktivem Material, in den Schaum zurück. Auf diese Weise entsteht in der Schaumsäule von oben her ein Gegenstrom von angereicherter Flüssigkeit. Da dieser in Wechselwirkung mit der Phasengrenzfläche tritt, wird die Aufkonzentrierung verstärkt. Hier wird auch ersichtlich, dass sich Stoffe entsprechend ihrer Affinität zur Oberfläche in der Schaumsäule anreichern.

Die entscheidenden Effekte Drainage und Koaleszenz sowie Kollabieren des Schaumes werden von Parametern wie Temperatur, Druck, Viskosität der Flüssigkeit, Art und Konzentration der anzureichernden Substanz und des ggf. zugesetzten Tensides beeinflusst. Von Bedeutung ist auch die Größe der Blasen, die u.a. durch die Porengröße der Fritten und den Gasvolumenstrom aber auch durch die Oberflächenspannung, und somit das Tensid beeinflusst werden. Weiterhin übt die Dimension der Apparatur einen Einfluss auf das Verhalten der Blasen bei der Zerschäumung aus. Näheres zu diesen Parametern folgt unter 2.4 auf Seite 53.

2.2.4. Produkte der Zerschäumung

Produkte aus der Zerschäumung sind einerseits das **Spumat** [OSTWALD 1941]. Das ist der zerfallene (kollabierte) Schaum, der oben von der Schaumsäule gewonnen wird (siehe Abbildung II.10 auf Seite 49). Im Spumat sind die Substanzen enthalten, die im Schaum in bzw. an die Phasengrenzschicht der Schaumblasen ein- bzw. angelagert waren. Dies sind die oberflächenaktiven Substanzen und gegebenenfalls an die Grenzfläche oder die Tenside angelagerte Inhaltstoffe.

Andererseits bleibt (im Sumpf) von der Vorlage, aus der geschäumt wurde, abgereicherte Flüssigkeit zurück. Sie wird als **Rückstand** bezeichnet.

2.3. Spezielle Techniken der Zerschäumung

Entsprechend der Vielzahl an Trennungproblemen, die mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse gelöst oder zu lösen versucht werden, gibt es unterschiedlichste Variationen und Modifikationen beim Zerschäumungsprozess.

Den bekannten Zerschäumungsapparaten ist ein Flüssigkeitsreservoir am unteren Ende der Säule, in welches das Gas zur Erzeugung von Schaum geleitet wird, und darüber ein Rohr, in dem die Aufkonzentrierung stattfindet, gemein (Abbildung II.10, Seite 49). Die Beschickung der Apparatur mit Vorlage und Ablauf aus dem Sumpf sowie Gewinnung des Spumates am Kopf des Rohres werden auf unterschiedliche Weise bewerkstelligt. Im Falle stabiler Blasen kann eine Vorrichtung zum Zerstören (Brechen) des Schaumes und so zur Gewinnung des Spumates angebracht werden.

Zur Verbesserung der Zerschäumungseffizienz sind folgende Abwandlungen des einfachen Prozesses möglich.

- **Batch-Verfahren und kontinuierliche Zerschäumung**

Beim Batch-Betrieb wird die Säule einmal mit Vorlage befüllt. Aus dieser Flüssigkeit wird geschäumt, ohne die Vorlage nachzufüllen oder aus dem Sumpf abzuziehen. Somit handelt es sich um eine diskontinuierliche Verfahrensweise. Experimentelle Fragestellungen werden meist in diesem Modus untersucht, da er in begrenztem Maßstab und gegenüber kontinuierlicher Arbeitsweise einfacher durchführbar ist.

Alternativ besteht die Möglichkeit, die Zerschäumung kontinuierlich zu betreiben, d.h. in den Vorlagebereich (den Sumpf) wird laufend neue Vorlageflüssigkeit eingeleitet und an einer festgelegten Position abgereicherte Flüssigkeit entnommen. Dies wäre bei einer praktischen Anwendung im großen Maßstab günstig, da kontinuierlicher Betrieb im industriellen Ablauf meist weniger arbeitsintensiv und daher wirtschaftlicher ist als ein chargenweises Arbeiten.

- **Kreislaufzerschäumung**

Eine weitere Option bei der Durchführung der Zerschäumung ist die Rückführung von Schaum oder Spumat in die Zerschäumung. Man spricht in diesem Fall von Kreislaufzerschäumung [OSTWALD 1941]. Diese Möglichkeit besteht bei kontinuierlichem und bei diskontinuierlichem Betrieb. Die Einspeisung des zurückgeführten Stromes ist in beliebiger Höhe in den Schaum sowie in den Sumpf möglich.

- **Kolonnenzerschäumung**

Bei der Kolonnenzerschäumung handelt es sich um eine Reihenschaltung von Zerschäumungssäulen, wobei das Spumat aus einer Säule jeweils die Vorlage für die nächste Säule liefert [OSTWALD 1940]. So ist eine weitere Anreicherung des Spumates in der jeweils nächsten Stufe möglich.

Eine Fortentwicklung der Kolonnenzerschäumung ist die Multistage-Zerschäumung. Hier wird die Zerschäumung auf mehreren Böden durchgeführt [DARTON 2004].

Die bisher genannten Möglichkeiten des kontinuierlichen und diskontinuierlichen Betriebs, der Spumatrückführung und des Kolonnenbetriebes sind je nach Problemstellung modifizier- und kombinierbar.

2.4. Apparatur und Parameter bei der Zerschäumung

2.4.1. Geometrie der Apparatur

Neben den stofflichen Gegebenheiten haben auch die geometrischen Abmessungen der gesamten Zerschäumungsapparatur Einfluss auf Ablauf und Resultat der Zerschäumung.

Vorlagebereich

Die Form des Vorlagegefäßes bedingt aufgrund der Höhe der Flüssigkeit die Zeitspanne, in der die Blasen in der Vorlage verweilen und somit die Dauer, in der Oberflächenadsorption stattfinden kann [URIAZEE 1995, AHMAD 1975]. Werden im Verhältnis zur gebildeten Schaummengende große Volumina der Vorlage eingesetzt, kann das Vorlagegefäß eine sphärischere Form erhalten als das Rohr, wodurch die vertikale Abmessung der Apparatur gering gehalten werden kann. Durch diese Maßnahme verringert sich die Verweilzeit der Blasen in der Flüssigkeit und somit die Zeit für die Adsorption. Doch den maßgeblichen Beitrag für eine hohe Anreicherung liefern die Drainage und die Koaleszenz in der Schaumsäule sowie das Kollabieren oben am Schaumsäulenende. Die Verweilzeit in der Vorlage übt einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Anreicherung aus [KINOSHITA 2003].

Säulenquerschnitt, volumenvergrößernde Einbauten

Der Querschnitt der Säule bedingt die Geschwindigkeit, mit der sich die Schaumsäule aufbaut, sowie die Drainage und die Koaleszenz. Weiterhin hat er großen Einfluß auf das Kollabieren des Schaumes und so den Aufbau einer Schaumsäule.

Bei gegebenem Volumenstrom ist die Strömungsgeschwindigkeit von der Rohrquerschnittsfläche abhängig. Betrachtet man die für die Anreicherung maßgeblichen Effekte der Drainage und der Koaleszenz [KINOSHITA 2003], sollten Einbauten mit erweitertem Querschnitt die Anreicherung verbessern. Denn die zwischen den Blasen zurücklaufende Flüssigkeit hat eine bestimmte Geschwindigkeit, die entgegen der des aufsteigenden Schaumes gerichtet ist. Je größer die Querschnittsfläche der Einbauten ist, desto mehr Flüssigkeit kann in gleicher Zeit zurücklaufen. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Schaumsäule aufbaut, verringert sich bei größerem Durchmesser, die Rückflussgeschwindigkeit der Flüssigkeit hingegen bleibt konstant. Verschiedene Anwender der Zerschäumung setzen solche Einbauten bereits ein [SCHONFELD 1967, BANERJEE 1993].

Andererseits beschreibt Liu [LIU 1995], mit kleineren Säulendurchmessern höhere Anreicherungen erzielt zu haben.

(Schaum-) Säulenhöhe

Kinoshita et al. [KINOSHITA 2003] fanden bei Zerschäumungen in verschieden hohen Schaumsäulen die stärkste Anreicherung bei der Arbeit mit der längsten Säule. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Schaumsäule die entscheidenden Abläufe (Koaleszenz, Kollabieren und Drainage) zur Anreicherung stattfinden (wie oben beschrieben). Die im Schaum zurückfließende Flüssigkeit ist gegenüber dem verbleibenden Schaum abgereichert. In einer höheren Schaumsäule kann stärker abgereichertes Spumat oben vom Schaum abgenommen werden. [LIU 1995, DORMANN 1965]

Begrenzt wird die ausführbare Höhe der Schaumsäule durch die Stabilität des Schaumes, denn ab einer gewissen Höhe kollabiert der Schaum so stark, dass kein weiterer Aufbau der Schaumsäule möglich ist.

2.4.2. Gaseinleitung: Art und Porengröße

Zur Erzeugung unterschiedlich feiner Blasen für die Zerschäumung können verschiedene Vorrichtungen eingesetzt werden. Im einfachsten Fall leitet man das Gas einfach durch ein Verteilerrohr ein. Zur Generierung feinerer Blasen werden stabförmige Glasfilterkerzen, Metallfritten sowie poröse plane Membranen, die senkrecht zum Rohr in dieses eingelassen sind, verwendet [LIMA 1994]. Durch die Auswahl der Porosität von Fritte resp. Membran kann Einfluss auf die Blasengröße genommen werden.

2.4.3. Blasengröße

Die Blasengröße ist in erster Linie abhängig von der Porosität der Fritte sowie von der Höhe des Gasvolumenstromes (Flux) und der Oberflächenspannung der Flüssigkeit gegenüber dem Gas. Fritten mit feinen Poren bilden eher kleine Blasen, grobe Fritten größere. Bei hohem Gasvolumenstrom entstehen größere Blasen als bei niedrigerem.

Beim Aufsteigen in der Vorlage haben kleine Blasen eine längere Verweilzeit, da sie langsamer aufsteigen. Zudem fällt das Oberflächen/Gasvolumen-Verhältnis bei kleineren Blasen (bei gleichem Gesamtgasvolumen) stark zu Gunsten der Oberfläche aus. Die für die Zerschäumung entscheidende Phasengrenzfläche ist (bei konstantem Flux) bei kleinen Blasen (feiner Schaum) wesentlich größer.

2.4.4. Gasvolumenstrom, Dauer der Zerschäumung

Die Höhe des Gasvolumenstromes (Flux) hat folgende Einflüsse auf das Resultat der Zerschäumung: Ein niedriger Flux bewirkt bei gleicher Porosität der Fritte eher kleinere Blasen. Die Schaumsäule baut sich langsamer auf, und bei längerer Verweilzeit des Schaums in der Säule kann mehr Drainage erfolgen. Hinzu kommt eine geringere Menge an Flüssigkeit, die bei geringem Flux aus der Vorlage mit in den Schaum getragen wird. Deshalb sollte die Anreicherung bei geringem Gasvolumenstrom relativ hoch sein.

Bei hohem Gasvolumenstrom wird viel Flüssigkeit mit in den Schaum getragen und in der Schaumsäule mit hoch transportiert, weil der Rückfluss aufgrund der hohen Geschwindigkeit des Schaums nicht effektiv ist. Ein hoher Flux führt zugleich zu einer größeren Oberfläche, die pro Zeit gebildet wird, an der sich die oberflächenaktiven Substanzen anlagern können. Somit lässt sich auf diese Weise die Wiederfindung im Schaum verbessern [BROWN 1998, NOBLE 1998, AHMAD 1975].

Führt man eine Zerschäumung über einen längeren Zeitraum durch, kann auch bei geringem Flux eine größere Oberfläche generiert werden, die den Transport der grenzflächenaktiven Substanzen gewährleistet.

2.4.5. Gasart

Je nach Empfindlichkeit und anderen Voraussetzungen des Substrates kann der Schaum mit unterschiedlichen Gasen generiert werden. Für Anwendungen, bei denen z.B. eine oxidative Veränderung von Inhaltsstoffen keine Rolle spielt (z.B. bei der Entfernung von Schadstoffen aus Abwasser), kann mit Druckluft gearbeitet werden. Das ist die denkbar kostengünstigste Möglichkeit für die Gasversorgung bei der Zerschäumung.

Wird bei einer Zerschäumung mit Substanzen gearbeitet, die empfindlich sind, z.B. gegenüber einer Veränderung des pH-Wertes oder Oxidation, so ist es ungünstig, als Gas CO_2 (führt in wässriger Lösung zur Säuerung) oder Druckluft (Oxidationspotential des

Sauerstoffes) zu verwenden. Also eignen sich in solchen Fällen nur inerte Gase. Das sind Edelgase, die sehr teuer sind. Stickstoff (N_2), der bei Bedingungen, wie sie bei der Zerschäumung auftreten, reaktionsträge ist, stellt eine geeignete Alternative dar, die wesentlich preiswerter zur Verfügung steht als Edelgase. Des Weiteren bildet Stickstoff relativ feinen, cremigen Schaum, der vergleichsweise stabil ist [MONTERO 1993].

2.4.6. Schäumungshilfsmittel

Befinden sich in der zu zerschäumenden Lösung nativ nicht genug schaumaktive Substanzen, können zusätzlich Detergenzien zugegeben werden, welche die Bildung von Schaum gewährleisten. Als allgemeinen Richtwert schlägt Maas [MAAS 1974] eine Konzentration von 10^{-3} bis 10^{-7} Mol oberflächenaktiver Substanz vor.

Untersuchungen in der Vergangenheit zeigten, dass es für viele Problemstellungen bei der Zerschäumungsanalyse am günstigsten für die Anreicherung ist, eine möglichst geringe Konzentration an Schäumungsmittel (Tensid) einzusetzen [KONDURU 1992].

2.4.7. Effizienz der Zerschäumung

Zur Charakterisierung des Erfolges der Zerschäumung werden in erster Linie zwei Größen berechnet: der Anreicherungsfaktor ER und die Wiederfindung R .

Die Ausgangskonzentration in der Vorlage hat großen Einfluss auf die erzielbare Anreicherung dieser Substanz im Schaum. Je verdünnter die Lösung ist, desto höhere Anreicherungsfaktoren (ERs) können erzielt werden. [SCHNEPF 1959]

Der **Anreicherungsfaktor ER** errechnet sich als Quotient aus der Konzentration des betrachteten Stoffes im Spumat c_S und dessen Konzentration in der Vorlage c_0 .

$$\text{Anreicherungsfaktor } ER = \frac{c_S}{c_0}$$

Die **Wiederfindung R** setzt die Stoffmenge n an Zielsubstanz im Spumat (n_S) ins Verhältnis zu dessen Menge in der Vorlage (n_0):

$$\text{Wiederfindung } R = \frac{n_S}{n_0}$$

mit $n = c * V$ ist

$$R = \frac{c_S * V_S}{c_0 * V_S},$$

wobei V_S und V_S die Volumina von Spumat bzw. Vorlage sind.

2.5. Zerschäumung von Proteinen

Speziell bei der Anwendung der Zerschäumung auf die Anreicherung oder Separation von Proteinen gibt es Besonderheiten, die im Folgenden beschrieben werden.

2.5.1. Proteinkonzentration

Nach Britten und Lavoie ist eine Proteinkonzentration in der Vorlage günstig, die gerade groß genug ist, um Schaum bilden und stabilisieren zu können [BRITTEN 1992]. Denn je mehr Phasengrenzfläche den Proteinen zur Verfügung steht, desto leichter kann deren Auffaltung (Denaturierung) erfolgen, welche die Schaumbildung unterstützt. Reicht die Oberflächenaktivität der Proteine in der vorliegenden Konzentration nicht aus, um einen Schaum zu bilden, werden Tenside zugesetzt.

2.5.2. Proteineigenschaften

Die Fähigkeit von Proteinen, Schaum zu bilden (Schaumkapazität [DICKINSON 1989]), unterscheidet sich bei verschiedenen Proteinen stark. Ausschlaggebend hierfür ist das Vermögen des Proteins, die Oberflächenspannung herabzusetzen [KINSELLA 1987]. Das bedeutet, die Geschwindigkeit, mit der die Proteine zur Phasengrenzfläche diffundieren, das Vermögen der Proteine, sich dort anzulagern und aufzufalten (Oberflächendenaturierung) und sich an der Phasengrenze anzuordnen [BULL 1972, MACRITCHIE 1978]. Nach Clarkson [CLARKSON 1999] geht die Orientierung der hydrophoben Molekülregionen (v.a. Aminosäurereste) in die Gasphase mit einer Auffaltung (partielle Denaturierung) des Proteins einher. Dieser Mechanismus verbessert die Schäumbarkeit sowie die Schaumstabilität. Liegen im Proteinmolekül starke intramolekulare Bindungen vor, wie z.B. Disulfidbrücken, kann die Auffaltung der Polypeptidketten erschwert sein [CHARM 1972]. Belitz [BELITZ 2001] führt die Schaumstabilität auf das Vermögen der Proteine zurück, starke, flexible kohäsive Filme zu bilden, die die Koaleszenz verringern.

Im Einzelnen beeinflussen Molekulargewicht, Molekülstruktur, Oberflächenhydrophobizität, Löslichkeit und Auffaltbarkeit der Proteine die Bildung sowie Stabilisierung eines Schaumes. [CLARKSON 1999, BELITZ 2001, DICKINSON 1989]

Aufgrund des Molekulargewichtes sind kleinere Proteinmoleküle in der Lage, schneller an die Phasengrenzfläche zu diffundieren als größere.

2.5.3. pH-Wert

Neben vielen anderen Parametern übt auch der pH-Wert einen Einfluss auf das Ergebnis der Zerschäumung aus. Speziell bei der Zerschäumung von Proteinen spielt er eine wichtige Rolle, da der Ladungszustand von Polypeptiden vom pH-Wert abhängig ist.

Verschiedene Literaturquellen beschreiben eine optimale Anreicherung von Proteinen an deren isoelektrischem Punkt (IEP) [LIU 1995, AHMAD 1975, SARKAR 1987, BROWN 1998]. Ahmad und Sarkar führen dies auf die fehlende Nettoladung und damit schlechtere Löslichkeit am IEP und höhere Affinität zur Phasengrenzfläche zurück. Brown begründet dieses Phänomen mit der verringerten Oberflächenspannung beim IEP.

Es wurde jedoch auch beschrieben, dass sich Proteine am IEP nur mit erniedrigter Effizienz anreichern lassen [PETERS 1952].

Clarkson [CLARKSON 1999] untersuchte die Beschädigung von Proteinen während der Zerschäumung und stellte den pH-Wert als eine Haupteinflussgröße für diese im Allgemeinen unerwünschte Veränderung der Proteine heraus.

2.5.4. Ionenstärke

Im Falle der Zerschäumung von Proteinen untersuchten Brown et al. [BROWN 1998] den Einfluss der Ionenstärke auf die Resultate der Zerschäumung. Bei bovinem Serumalbumin (BSA) beobachteten sie bei steigender Ionenstärke eine schlechtere Anreicherung bei gleichzeitig verbesserter Wiederfindung.

Die Ionenstärke ist neben dem pH-Wert die maßgebliche Einflussgröße auf die Beschädigung von Proteinen während der Zerschäumung [CLARKSON 1999].

III. Praktischer Teil

1. Materialien und Geräte

1.1. Materialien

1.1.1. Tierische Rohstoffe

- BSE-positives Hirnmaterial
Lehrstuhl für Tierhygiene
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising – Weihenstephan
- Stammhirn (Obexregion) junger (gesunder) Kälber
Schlachthof, D-94315 Straubing, Germany
- Cerebrospinalflüssigkeit
Lehrstuhl für Tierhygiene
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising – Weihenstephan

1.1.2. Elektrophorese (SDS-PAGE)

- Acrylamid, 2x research grade,
SERVA Elektrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg, Germany
- Ammoniumpersulfat, p.a.,
Merk KGaA, D-64271 Darmstadt, Germany
- Bromphenolblau,
Amersham Biosciences AB, SE-75184 Uppsala, Sweden
- DL-Dithiotreitol minimum 99 % titration,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim, Germany
- Formaldehyd, ≥ 37 %, p.a., ACS,
Carl Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe, Germany
- Glycerin, p.a.,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Germany
- Glycin, analytical grade,
SERVA Elektrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg, Germany

- Größenmarker: Precision Blue Protein Standard, (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa-Banden)
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München, Germany
- Kerosin, pure,
SERVA Elektrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg, Germany
- Methylenbisacrylamid,
Amersham Biosciences AB, SE-75184 Uppsala, Sweden
- Natriumacetat, ≥ 99 %, p.a., ACS, wasserfrei,
Carl Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe, Germany
- Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a., $\geq 99,8$ %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe, Germany
- Natriumthiosulfat Pentahydrat,
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Germany
- Natriumdodecylsulfat (SDS), 2x cryst. analytical grade,
SERVA Elektrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg, Germany
- GelBond[®] PAG Film
Cambrex Bio Science, 4800 Verviers, Belgium
- Silbernitrat,
Degussa-Hüls, D-60287 Frankfurt
- Tetramethylethyldiamid (TEMED),
Amersham Biosciences AB, SE-75184 Uppsala, Sweden
- Trizma[®] -base, Reagent Grade, minimum 99,9 % titration
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim, Germany
- Ethanol, absolute,
Mallinckrodt Baker, 74000 AA Deventer, Holland
- Essigsäure, 100 % p.a.,
Carl Roth GmbH & Co KG, D-76185 Karlsruhe, Germany

1.1.3. Zerschäumung

- Magermilch, 0,3 % Fettgehalt
- Molkenproteinisolat, 90 % Molkenprotein
- Glasfritten der Porositäten 3, 4 und 5
ROBU Glasfilter-Geräte GmbH, D-57644 Hattert
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalz-Lösung, 10 mM Natrium/Kalium-phosphatpuffer pH 7,2, 0,8 % NaCl u. 0,02 % KCl
- Dodecylsulfat Natriumsalz zur Synthese (SDS)
Merck, Schuchardt, D-85665 Hohenbrunn
- Tween[®]20 (Polyethoxysorbitanlaurat)
Merck, Schuchardt, D-85665 Hohenbrunn

- Bovines Serumalbumin (BSA)
BSA wurde eingesetzt aufgrund seiner sehr starken schaubildenden Wirkung.

1.1.4. TSE–Analytik

- ELISA für Prionproteine:
Roboscreen[®] BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit, Roboscreen, D–04129 Leipzig
- Rekombinantes bovines Prion Protein (PrP^C), His–tagged:
Histidinmarkierter, vollentwickelter Teil (gesamte Länge) von bovinem PrP (25–244), exprimiert in *Escherichia coli* BL21, gelöst von Einschlusskörpern in 6 M Guanidin–HCl und gereinigt mittels Ni(II)–Nitroacetat–Agarose–Chromatographie.
Länge 228 aa, MW 24724
Roboscreen, D–04129 Leipzig

1.2. Geräte

- ELISA–Mikroplattenlesegerät:
SLT labinstruments Deutschland GmbH,
D–74564 Crailsheim, Germany
- Mikroplattenwascher:
anthos fluido Typ 24550,
ANTHOS LABTEC INSTRUMENTS GmbH,
5071 Wals, Austria
- Elektrophoresekammer:
2117 MULTIPHOR II Electrophoresis Unit
LKB BROMMA, Schweden
- Spannung für Elektrophorese:
2301 MACRODRIVE Powersupply
LKB BROMMA, Schweden
- Skizze der konstruierten Zerschäumungsapparatur für pathologisches Gehirn siehe
Abbildung III.1.

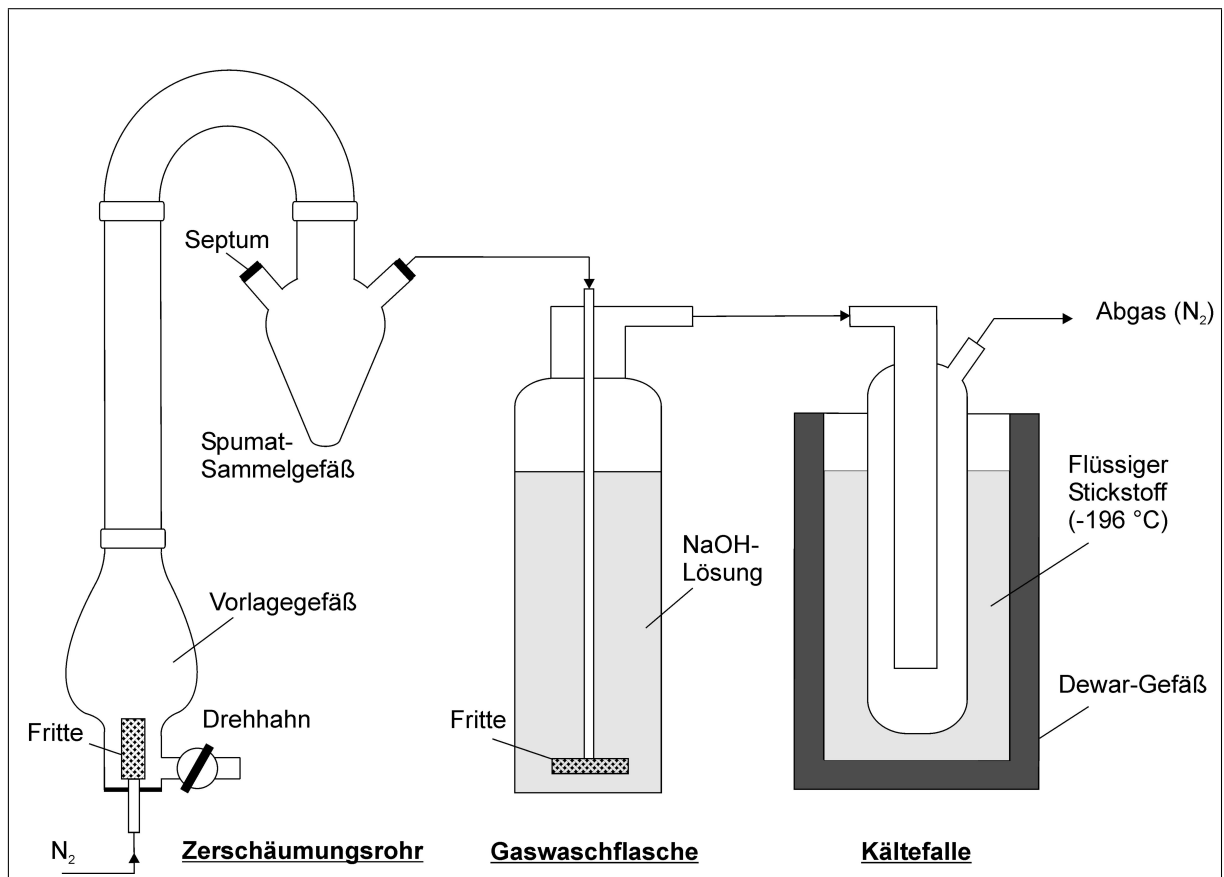


Abbildung III.1.: Schematische Darstellung der Apparatur, die für die Zerschäumungsanalyse von pathologischem Gehirn in dieser Arbeit verwendet wurde. Die gesamte Höhe des Zerschäumungsrohres beträgt 500 mm. Das Vorlagegefäß ist 100 mm hoch, die gerade Säule 350 mm. Der Bogen zur Abnahme des Spumates ist 50 mm hoch und ebenso breit. Die Rohre haben einen Durchmesser von 18 mm. Abgesehen von Verschraubungen, Dichtung und Septum besteht das Zerschäumungsrohr aus Glas. Eine photographische Abbildung dieser Zerschäumungsapparatur befindet sich im Anhang (Abbildung A.1 auf Seite 115).

2. Methoden

Da in dieser Arbeit die erzielte Anreicherung von zentraler Bedeutung ist, zielen alle Versuche darauf hin ab, in möglichst geringem Spumatvolumen möglichst viel des pathologischen Prionproteins PrP^{Sc} aus der Vorlage anzureichern. Eine hohe Wiederfindung wird nicht angestrebt und ist aufgrund zu geringer Konzentrationen an PrP^{Sc} nicht messbar.

Daher wird in dieser Arbeit immer mit dem erzielten Anreicherungsfaktor ER argumentiert, nicht mit der Höhe der Wiederfindung R.

2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Abschätzung, ob in den einzelnen Spumatfraktionen eine Separation der verschiedenen Proteine stattfindet oder sich das gesamte Protein in konstantem Verhältnis anreichert, wird die SDS-PAGE angewandt. Die elektrophoretischen Versuche werden mit BSE-negativem Gehirn durchgeführt.

2.1.1. Anfertigung des Polyacrylamid-Gels für SDS-PAGE

- Der **Puffer** dient sowohl für das Trenngel als auch für das Sammelgel.
Für 100 mL Puffer 18,15 g Trizma Base und 0,4 g SDS in etwa 80 mL H₂O_{demin} lösen. Mit 4 M HCl auf pH 8,8 einstellen. Mit H₂O_{demin} ad 100 mL auffüllen.
- Für 100 mL der **Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung**: 29,1 g Acrylamid und 0,9 g Methylenbisacrylamid in 100 mL H₂O_{demin} lösen, 0,5 g Serdolit MB-1 hinzufügen und 10 min rühren.
- Zusammenstellung des Rahmens für die Polymerisierung des Gels:
Auf die glatte Glasplatte auf eine Wasserschicht den GelBond[®] PAG Film legen, darauf die Glasplatte mit dem U-förmigen Gummirahmen (0,5 mm Dicke). Die beiden Platten mit Klammern zusammenhalten und auf 4 °C kühlen.
- Unmittelbar vor dem Gießen der PA-Gele die Flüssigkeiten nach dem Protokoll für Sammel- und Trenngel (Tabelle III.1, Seite 64) mischen.
- TEMED (Tetramethylethyldiamid, Startreagenz) sowie Ammonium-Persulfat (Katalysator für die Vernetzungsreaktion) erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zu der Flüssigkeit geben.

- Nach vorsichtigem Einfüllen, zuerst der Flüssigkeit des Sammelgels (6,0 mL) und dann des Trenngels (ca. 24 mL), ruht das noch nicht polymerisierte Gel 15 min und wird dann für 30 min bei 50 °C polymerisiert.

Tabelle III.1.: Protokoll zur Herstellung von Sammel- und Trenngel für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).

	Sammelgel	Trenngel
Glycerin	3,75 g	3,125 g
Trenngel-Puffer	2,5 mL	6,25 mL
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	2,0 mL	10,625 mL
H ₂ O _{demin}	2,5 mL	50,625 mL
TEMED	5 µL	12,5 µL
Ammonium Persulfat (40 %)	10 µL	25 µL

2.1.2. Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

- **Probenpuffer:** 60,6 mg Trizma-Base, 0,2 g SDS und 2,0 g Glycerin in etwa 50 mL H₂O_{demin} lösen und mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen, 0,1 g DL-Dithiotreitol und 0,5 mg Bromphenolblau zugeben, ad 10 mL mit H₂O_{demin} auffüllen.
- Probe mit gleichem Volumen Probenpuffer versetzen und 5 min bei 95 °C erhitzen.
- Polyacrylamidgel auf einem Film von Kerosin auf die wassergekühlte (20 °C) Unterlage platzieren.
- Bis zu 15 µL der aufbereiteten Probe bzw. Größenmarker in die Slots geben.
- Stromstärke I: 15 bis 32 mA; Spannung U: sukzessiv von 150 V auf 250 V im Sammelgel steigern, im Trenngel max. 820 V.

2.1.3. Silberfärbung nach Blum et al. (Electrophoresis 8, 93 (1987)) (modifiziert)

- **Reagenzien:**
 - **Fixierlösung:** 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 50 % H₂O_{demin}
 - **Waschlösung I:** 30 % Ethanol, 70 % H₂O_{demin}
 - **Waschlösung II:** 30 % Ethanol, 70 % H₂O_{demin}

- **Sensibilisierlösung** (Thiosulfatreagenz):
100 mg Natriumthiosulfat
ad 500 mL mit $\text{H}_2\text{O}_{demin}$ auffüllen
 - **Färbereagenz** (Silbernitrat):
1,0 g Silbernitrat und
0,1 mL Formaldehyd (37 %)
ad 500 mL mit $\text{H}_2\text{O}_{demin}$
 - **Entwicklerreagenz**:
15 g Natriumcarbonat,
0,25 mL Formaldehyd (37 %)
2,5 mg Natriumthiosulfat
ad 500 mL mit $\text{H}_2\text{O}_{demin}$ auffüllen
 - **Stoppreagenz**:
2,5 g Glycin
ad 500 mL mit $\text{H}_2\text{O}_{demin}$ auffüllen
- Die Durchführung der **Färbung der Gele** aus der Elektrophorese erfolgt mittels Silberfärbung nach dem Protokoll in Tabelle III.2:

Tabelle III.2.: Protokoll für die Durchführung der Silberfärbung nach Blum (*Electrophoresis* 8, 93 (1987)), modifiziert.

	Reagenz	Dauer
Fixieren	Fixierlösung	mind. 3 h
Waschen I	Waschlösung I 2	0 min
Waschen II	Waschlösung II	20 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{demin}$	20 min
Sensibilisieren	Sensibilisierungsreagenz	1 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{demin}$	3 x 20 s
Färben	Färbereagenz	20 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{demin}$	3 x 20 s
Entwickeln	Entwicklerreagenz	3 bis 5 min (Reagenz wechseln)
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{demin}$	20 s
Stopp	Stoppreagenz	5 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{demin}$	3 x 10 min

2.2. Zerschäumung

Die Zerschäumungsanalyse erfolgt in der bei 1.2 Geräte als Skizze (Abbildung III.1 auf Seite 62) und im Anhang als Fotografie (Abbildung A.1 auf Seite 115) gezeigten Apparatur im Batch-Betrieb.

- Zur Generierung des Schaums werden Glas-Kerzenfritten der Porosität 4 verwendet. Vorversuche zeigten, dass diese einen Schaum günstigerer Stabilität erzeugen als Fritten anderer Porositäten. Weiterhin ist die Schaumbildung bei dieser Porosität der Fritte konstanter und besser reproduzierbar.
- Bei Zerschäumungen, bei denen nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass zur Ermittlung des am besten geeigneten Schäumungshilfsmittels auch andere Tenside eingesetzt werden, wird das Tensid SDS zugegeben. Grundsätzlich wird möglichst wenig SDS eingesetzt, da hohe SDS-Gehalte zu einem schlechteren Signal im ELISA führen und auch die Anreicherung durch unnötig hohe SDS-Konzentrationen verschlechtert wird (siehe Ergebnisse).
- Als Gas für die Zerschäumung wird Stickstoff verwendet.
- Aus einer Vorlage werden im Rahmen einer Zerschäumung jeweils mehrere Spumate zur Quantifizierung der Anreicherung gewonnen.

2.2.1. Proteinfraktionierung

- Bei Zerschäumungen zur Proteinseparierung wird zwischen den Spumatentnahmen jeweils eine definierte Zeitspanne bei konstanter Höhe geschäumt, wobei die Schaumsäule zwischen den Entnahmen der einzelnen Spumatfraktionen nicht kollabiert, sondern aufrechterhalten bleibt.

2.2.2. Anreicherung von Prionprotein

- Bei der Zerschäumung von Stammhirnhomogenat für die Anreicherung von PrP wird der Volumenstrom des Gases so geregelt, dass sich sehr langsam eine Schaumsäule aufbaut. Dann wird bei konstanter Höhe der Schaumsäule geschäumt. Bei den Vorversuchen wurde deutlich, dass bei einer Schäumungsdauer von etwa 20 bis 30 min vor Entnahme des Spumates die höchste Anreicherung erzielt werden kann.
- Zwischen den Spumatentnahmen und dem neuen Schäumungsbeginn kollabiert die Schaumsäule vollständig (sofern nicht extra anders betont), so dass wieder eine eigenständige Zerschäumung betrachtet werden kann. Der abgereicherte Sumpf ist die Vorlage für die neuerliche Zerschäumung. Die sukzessiv gewonnenen Spumatfraktionen werden entsprechend als S1, S2, ..., S_n nummeriert.

2.2.3. BSE-negatives Material

- Obgleich PrP^C als ungefährlich gilt, wird der Stickstoffvolumenstrom aus dem Spumatsammelgefäß durch eine Gaswaschflasche mit 4 M NaOH geleitet, um evtl. als Aerosol im Gas befindliche Substanzen zurückzuhalten. Probenaufgabe der Vorlage sowie Probenentnahme (aus Sumpf und Spumatauffanggefäß) erfolgen stets mittels einer Kanüle durch die Septen unten am Sumpf bzw. am Spumatauffanggefäß.
- Schladitz
[SCHLADITZ 1999] beschreibt eine Umfaltung von Proteinen an der Phasengrenzfläche zwischen Wasser und Luft hin zu β -Faltblatt-Strukturen. Vor der Zerschäumung von PrP^C wurde deshalb sichergestellt, dass es durch den Zerschäumungsvorgang nicht zu einer Änderung der Proteinstruktur kommt und so eine infektiöse bzw. gegen Proteinase K resistente Form entsteht.

2.2.4. Anreicherung von infektiösem PrP^{Sc}

- Die Zerschäumung von BSE-positivem Gehirn sowie die Untersuchungen zur Anreicherung von PrP^{Sc} werden in einem L3*-Labor durchgeführt. Die Zerschäumungsapparatur enthält bei Arbeiten mit pathogenem Material neben der Gaswaschflasche mit 4 M NaOH eine Kältefalle mit flüssigem Stickstoff (-196 °C), in der mögliche Aerosolkomponenten im Gasstrom und jegliche Feuchtigkeit, welche die Gaswaschflasche verlässt, resublimiert wird. Die gesamte Zerschäumungsapparatur befindet sich unter einer Laminarflow-Sterilbank.
- Aufgabe der Vorlage sowie Entnahme von Proben aus dem Sumpf erfolgen über das Septum am Vorlagegefäß. Die Entnahme der Spumatfraktionen wird mit einer Kanüle durch das Septum am Spumatauffanggefäß bewerkstelligt.

2.3. Reinigung der Gerätschaften

- Bei Arbeiten mit nicht bedenklichem Material werden die Gerätschaften nach jeder Zerschäumung mit Spülmittel gereinigt, dann mit Wasser, destilliertem Wasser und anschließend mit Aceton gespült. Die Fritte wird zur Reinigung nach jedem Versuch mit Wasser durchspült und mit Druckluft durchgeblasen. Anschließend folgen 15 Minuten in einer 2-Propanol-KOH Lösung im Ultraschallbad. Zuletzt wird die Fritte noch einmal mit Leitungswasser, mit destilliertem Wasser und Aceton gespült.
- Wurde eine Zerschäumung von infektiösem Material durchgeführt, so wird die im Sumpf befindliche Flüssigkeit mittels Kanüle abgezogen und bei 134 °C bei 2 bar für 20 min autoklaviert. Nach dieser thermischen Inaktivierung wird die Flüssigkeit

zu gleichen Teilen mit 13 %-iger Natriumhypochloritlösung versetzt, die mindestens 24 Stunden einwirkt.

Die entleerte Apparatur wird von der Seite der Gaszuleitung vor dem Rücklaufrohr und abluftseitig nach dem Spumatsammelgefäß unterbrochen, das gesamte Zwischenstück zerlegt und für 24 Stunden in ein 4 M NaOH-Bad gelegt. Die weitere Reinigung erfolgt wie bei der Arbeit mit nicht infektiösem Material.

2.4. Ermittlung des Prionengehaltes

Die Quantifizierung des Gehaltes von Prionprotein erfolgt mittels ELISA nach entsprechender Aufbereitung laut Roboscreen[®] BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit (Roboscreen, D-04129 Leipzig).

Da das pathologische Gehirngewebe nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung steht, wird das Protokoll des BSE-Tests in den Punkten modifiziert, wo nur Aliquote der Probe weiterverwendet werden. Weiterhin wird die Abfolge des Protokolls für die Zerschäumung unterbrochen, denn das Hirn wird nach der Homogenisierung geschäumt und erst die resultierenden Proben werden laut Protokoll des Testkits weiter untersucht. Zudem muss bei den (abgereicherten) Proben aus dem Sumpf ein größeres Volumen bezüglich des enthaltenen PrP^{Sc} untersucht werden, um O.D.-Werte im linearen Messbereich zu erhalten.

Der chronologische Ablauf des Tests mit den notwendigen Modifikationen wird nachfolgend beschrieben. Die notwendigen Reagenzien stammen aus dem Roboscreen[®] BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit. Die Herstellung der frisch anzusetzenden Lösungen entspricht den Vorschriften dieses Kits.

Bei Untersuchungen des PrP^C-Gehaltes in BSE-negativem Rinderhirn unterbleiben die Verdauung mit PK sowie die Fällung.

2.4.1. Vorbereitung der Proben: Verdauung

1. Präzipitationslösung (Fällungslösung) für mindestens 60 min auf 4 bis 8 °C kühlen.
2. 350 ± 50 mg der Gehirnprobe in das Homogenisierungsröhrchen (ribulicing tube) geben und zweimal 45 s bei max. Geschwindigkeit im Ribolyser homogenisieren.
3. Das so gewonnene Hirnhomogenat zur Gewinnung der Eichgeraden bzw. zur Beimischung der Vorlage für die Zerschäumung einsetzen.
4. Zerschäumung
5. Die Proben für die Eichreihen resp. die Proben aus der Zerschäumung (unterschiedliche Volumina) in 2 mL Reaktionsröhrchen geben. Bei Volumina größer 900 µL wird die Probe auf mehrere Röhrchen verteilt.
6. 100 µL der rekonstituierten PK-Lösung hinzugeben und durch zweimaliges Mischen am Vortex-Mischer bei max. Geschwindigkeit gründlich homogenisieren.
7. Bebrütung (Inkubation) bei 37 ± 1 °C für 20 min mit regelmäßigem Schütteln.

8. Von der gekühlten Präzipitationslösung doppelt soviel Volumen zugeben wie von der PrP-haltigen Probe eingesetzt wurde. Das Gemisch zweimal kurz auf höchster Stufe auf dem Vortexmischer homogenisieren und 20 min bei 4 bis 8 °C kühlen.
9. Zentrifugation bei $16000 \times g$ für 10 min. Den Überstand vorsichtig abgießen, die überschüssige Flüssigkeit an einem Zellstofftuch abtupfen.
10. 50 μL Solubilisierungspuffer zu dem Pellet im Röhrchen geben und durch Ratschen am Röhrchenständer das Pellet lösen. Bei 100 °C 5 min kochen mit zweimaligem Schütteln. Die Proben dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

2.4.2. ELISA-Test

1. Die nach obigem Protokoll vorbereiteten Proben mit 70 μL Verdünnungspuffer versetzen und am Vortex-Mischer zweimal homogenisieren.
2. Die Proben in den Röhrchen, nach kurzer Zentrifugation (um alle Flüssigkeit unten im Röhrchen zu sammeln), vollständig in die einzelnen Kavitäten des ELISA-Streifens übertragen.
3. Der ELISA-Streifen wird mit Versiegelungsband verschlossen und 60 min bei 37 ± 1 °C bebrütet.
4. Nach Entfernung des Versiegelungsbandes wird der ELISA-Streifen 3 mal mit 200 μL verdünntem Waschpuffer gewaschen.
5. Jeweils 100 μL HRP-Konjugat-Lösung in jede Vertiefung des ELISA-Streifens pipettieren, wieder versiegeln und 60 min bei 4 bis 8 °C kühl stellen.
6. Versiegelung entfernen und fünfmal mit 200 μL verdünntem Waschpuffer waschen.
7. 100 μL Färbereagenz in jede Vertiefung des ELISA-Streifens pipettieren und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren, ohne zuvor die Versiegelung angebracht zu haben.
8. Beenden der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 150 μL Stopp-Reagenz.
9. Erfassung der O.D.-Werte bei 450 nm und 620 nm im Microplatten-Lesegerät.

2.4.3. Quantifizierung des Priongehaltes

Die Bestimmung der Gehalte an PrP erfolgt durch photometrische Messung der Proben nach dem ELISA. Der sekundäre Antikörper des Sandwich-ELISA ist an das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden, das den Umsatz eines farblosen Agens in eine farbige Verbindung katalysiert. Die Menge an entstandenem Farbstoff, die zu der Menge an vorhandenem PrP proportional ist, wird photometrisch durch die Messung der Extinktion bestimmt. Die Quantifizierung (halbquantitativ) wird mit Hilfe von Kalibrierkurven vorgenommen. Diese Kurven werden gemessen und der lineare Messbereich festgestellt. Zur Quantifizierung werden O.D.-Werte zwischen 0,05 und 1 verwendet. Diese liegen eindeutig sowohl im linearen Messbereich des Photometers als auch des ELISA.

Da die gesamte Prozedur der Verdauung und des ELISA mehrere Stunden dauert und die relevanten Faktoren wie Zeit, Temperatur, Konzentrationen etc. nicht bei allen einzelnen Untersuchungen völlig konstant sind, werden bei jedem einzelnen ELISA Kalibrierpunkte mitgeführt. Dies ist für die Quantifizierung notwendig, denn unter den genannten Bedingungen können nur O.D.-Werte derselben ELISA-Untersuchung aufeinander bezogen werden.

Eine entscheidende Voraussetzung für die Quantifizierung des PrP^{Sc} ist eine weitgehende Unempfindlichkeit des Ergebnisses der Verdauung gegenüber dem Mengenverhältnis von PrP^C, PrP^{Sc} und Begleitmaterial der Matrix sowie zugesetzter Proteinase K-Menge. Denn verschiedene PrP^{Sc}-haltige Proben aus der Zerschäumung weisen unterschiedliche Mengen und Mengenverhältnisse des PK-stabilen zum normalen, zellulären Prionprotein sowie zu Zellbestandteilen auf. Zur Verdauung werden aber konstante Mengen an Proteinase K zugegeben.

Dieser Einfluss der Zusammensetzung der Probe und der zugegebenen Menge an Proteinase K wird daher vorab überprüft. Es zeigt sich, dass weder die in der Arbeit auftretenden Schwankungen in der Menge des zugegebenen PK noch die Dauer der Verdauung oder die Zusammensetzung der Proben einen messbaren Einfluss auf den O.D.-Wert ausüben.

2.4.4. Bewertung der TSE-Infektiosität nach Roboscreen[®] BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit

Der Grenzwert für die Beurteilung der Infektiosität der als negativ oder positiv zu beurteilenden Proben liegt bei einem O.D.-Wert von 0,2.

Proben mit einem O.D.-Wert von weniger als 0,2 sind als negativ einzustufen.

Proben, deren O.D.-Wert größer als 0,2 ist, werden zunächst als infektiös angenommen und müssen im Rahmen eines Doppeltests genauer untersucht werden. Resultiert aus diesem Test mindestens ein O.D.-Wert über 0,2, so ist die Probe als infektiös einzustufen.

IV. Ergebnisse

Im Vordergrund stehen in dieser Arbeit die Resultate aus der Zerschäumung von pathologischem Prionprotein. Die Anreicherung dieses Erregers der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien war das Ziel der Experimente. Im Rahmen von Voruntersuchungen bzw. zur Ermöglichung einer genaueren Interpretation der Ergebnisse der Anreicherung von PrP^{Sc} waren weitere unterschiedliche Untersuchungen mit verschiedenen Substanzen notwendig. Neben dem pathologischen Prionprotein (PrP^{Sc}) aus dem Stammhirn BSE-erkrankter Rinder wurde mit Prionprotein (PrP^C) aus gesundem Rinderhirn sowie mit rekombinantem Prionprotein (rec. PrP) gearbeitet. Die Resultate der Arbeit werden im Ergebnisteil nur aufgelistet, sofern die Ergebnisse in konkreten Zahlenwerten bestehen; Beobachtungen, die nicht quantifizierbar jedoch von Interesse sind, werden in der Diskussion an entsprechender Stelle aufgezeigt.

Die Tabellen der Messwerte, die den Diagrammen im Ergebnisteil zugrunde liegen, sind im Anhang (ab Seite 115) abgedruckt.

1. Proteinseparation durch Zerschäumung

Neben der Anreicherung kann durch die Zerschäumung in vielen Fällen auch eine Separation, also eine selektive Anreicherung einzelner Proteine, erzielt werden. Um dies im Falle von Hirnhomogenat zu überprüfen, wird BSE-negatives Stammhirnhomogenat zerschäumt. Die einzelnen Spumatfraktionen sowie die Vorlage werden elektrophoretisch aufgetrennt und einander gegenübergestellt.

Als Vorlage werden 15 mL PBS mit 333 mg/L SDS, 1 mg BSA und 20 μ L Homogenat aus gesundem Rinderstammhirn versetzt. Diese Lösung wird zunächst 20 min stationär geschäumt, d.h. bei konstanter Höhe der Schaumsäule, ohne Spumat abzunehmen. Dann werden sukzessiv Spumatproben von etwa 200 μ L entnommen. Zwischen den einzelnen Entnahmen von Spumat bleibt die Schaumsäule durch entsprechende Regulation des Gasvolumenstromes aufrecht erhalten, sie kollabiert nicht.

Bei der Aufarbeitung der Proben für die Elektrophorese werden diese vor dem Erhitzen (5 min, 100 °C) mit Probenpuffer verdünnt. Die Spumatproben werden auf 1/20 verdünnt, die Proben der Vorlage bzw. des Sumpfes auf 1/5 und der Größenmarker (GM) auf 1/3. Auf das PA-Gel werden von den aufbereiteten Proben je Slot jeweils 20 μ L gegeben, vom Größenmarker 7 μ L.

Der Größenmarker beinhaltet Proteine der Molekülmassen 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa. Das resultierende Elektropherogramm der Spumatfraktionen ist in Abbildung IV.1 gezeigt; das der einzelnen Vorlagen aus dem Sumpf in Abbildung IV.2 (Seite 73).

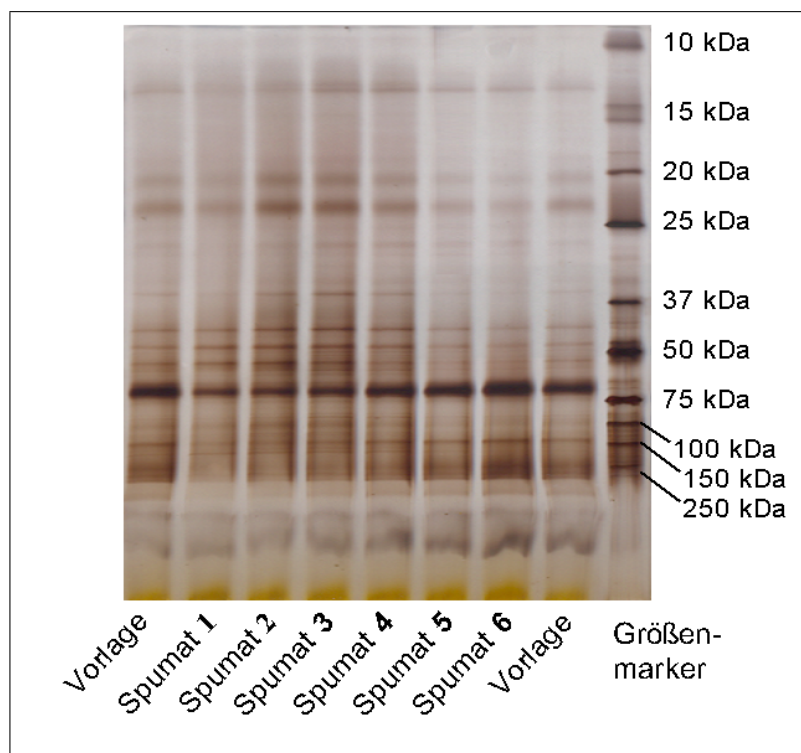


Abbildung IV.1.: Elektropherogramm der sukzessiv entnommenen Spumatfraktionen (S1–6) aus der Zerschäumung von BSE-negativem, mit BSA dotiertem, Stammhirnhomogenat. Ganz rechts die Bahn des Größenmarkers.

Bei den Spumatfraktionen 1–6 (S1–S6) in Abbildung IV.1 ist deutlich zu erkennen, dass bei Proteinen mit einer Molekülmasse kleiner etwa 60 kDa die intensivsten Banden in den Spumatfraktionen 2, 3 und 4 auftreten. Das bedeutet, dass nicht nur die Anreicherung dieser Proteine stark steigt, sondern auch deren absolute Konzentration im Spumat, obwohl die Spumatfraktionen aus einer mehr und mehr abgereicherten Vorlage geschäumt werden.

Bei den Proteinen kleiner 60 kDa treten leichte Verschiebungen bei der Anreicherung verschiedener Proteingruppen auf. Die Proteine mit etwa 13 kDa sind in S3 und S4 in der höchsten Konzentration vorhanden. Größere Proteine, ab etwa 60 kDa, hingegen reichern sich in den späteren Spumatfraktionen wesentlich stärker an als in den früheren. Die intensive Bande bei 66 kDa stammt von BSA und ist in Spumatfraktion S6 am stärksten angereichert.

Vergleicht man z.B. die Banden mit ca. 23 kDa mit der des BSA, kann man deutlich erkennen, dass das Protein mit 23 kDa von S3 nach S6 in immer geringerer Menge im Spumat ist, das BSA hingegen in steigender Menge.

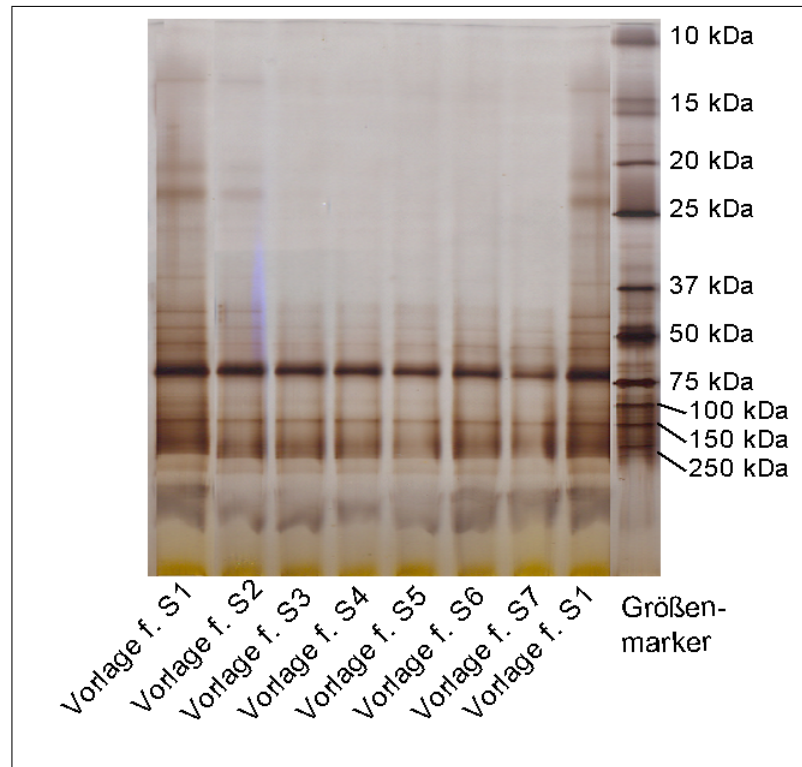


Abbildung IV.2.: Elektropherogramm von sukzessiv entnommenen Proben aus dem Spumpf (Vorlagen für die Spumatfraktionen S1–S6) aus der Zerschäumung von BSE-negativem, mit BSA dotiertem Stammhirnhomogenat. Ganz rechts die Bahn des Größenmarkers.

Proteine, die größer sind als etwa 40 kDa, sind im Elektropherogramm in Abbildung IV.2 schon ab der Vorlage für das zweite Spumat nicht mehr zu erkennen. Bei den größeren Proteinen kann in der Vorlage eine Abreicherung nicht deutlich erkannt werden. Eine Ausnahme stellt das BSA (dicke Bande, 66 kDa) dar. Dieses zeigt nach der Entnahme einiger Spumate v.a. in der Vorlage für S7 eine deutlich schwächere Bande.

Kleinere Proteine bis etwa 60 kDa liegen in den Spumatfraktionen 2, 3 und 4 in der höchsten Konzentration vor, größere hingegen in später entnommenen Spumatfraktionen. Das bedeutet für die Vorlage, dass hier vorrangig die kleinen Proteine, dann die größeren abgereichert werden. Bei den Elektropherogrammen der Vorlagen ist dies nur für das BSA deutlich ersichtlich, weil die Mengen durch die Abreicherung von jeder Vorlage zur nächsten rasch sinken.

2. Zerschäumung von rekombinantem PrP in Magermilch

Aufgrund der stark begrenzten Verfügbarkeit von PrP^{Sc} werden einige Zerschäumungen zur Vorbereitung mit rekombinantem PrP (rPrP) in verdünnter Magermilch durchgeführt. Als Lösungsmittel dient ein Gemisch aus $\frac{3}{4}$ destilliertem Wasser mit $\frac{1}{4}$ Magermilch.

2.1. Zerschäumung von rPrP in Magermilch mit Tween 20, SDS und BSA

Zur Zerschäumung von rekombinantem PrP aus verdünnter Magermilch wird als Schäumungshilfsmittel bovines Serumalbumin (BSA) (2 mg/mL) bzw. SDS (16 μ g/mL) bzw. Tween 20 (400 μ g/mL) zugesetzt. Die Spumate werden jeweils nach einer Stunde stationären Schäumens entnommen. Die O.D.-Werte als Maß für das enthaltene rekombinante PrP in Vorlagen und Spumaten sind in Abbildung IV.3 dargestellt.

Mit den Schäumungshilfsmitteln Tween 20 und BSA wird keine Anreicherung erzielt. Bei der Schäumung mit SDS hingegen kann eine Anreicherung beobachtet werden. Die Struktur des Schaums hat bei dem Einsatz von SDS als Schäumungshilfsmittel deutlich Tendenz zur Bildung von Polyederschaum. Mit BSA und Tween 20 ist der Schaum durchgehend sehr feucht und oben an der Schaumsäule liegt Kugelschaum vor.

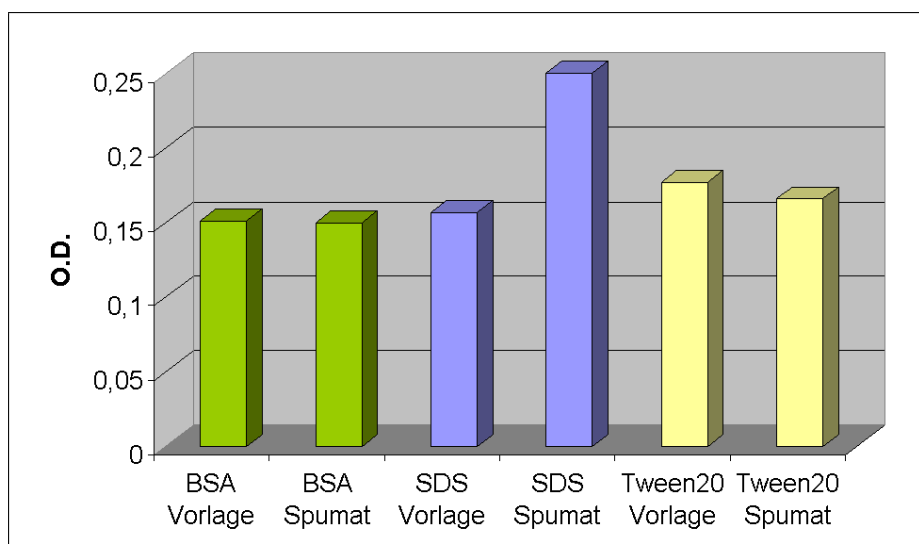


Abbildung IV.3.: Zerschäumung von rekombinantem PrP^C in verdünnter Magermilch mit Tween 20, SDS und BSA. Auf der Ordinate sind die O.D.-Werte entsprechend den Gehalten an rPrP aufgetragen.

2.2. Zerschäumung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Tensides

Zerschäumungen mit verschiedenen hohen Konzentrationen von SDS zeigen, dass steigende Mengen an SDS die Anreicherung im Schaum verringern.

Als Vorlage wird jeweils verdünnte Magermilch mit 3,3 mg/L, 10 mg/L bzw. 30 mg/L SDS versetzt und eine Ausgangskonzentration von 4 ng/L rPrP eingestellt. Von diesem Gemisch werden je 20 mL zerschäumt. Abbildung IV.4 zeigt die durch die Zerschäumung erzielten Konzentrationen von rekombinatem PrP.

Beim Vergleich der Anreicherungsfaktoren für das rekombinante PrP^C bei verschiedenen SDS-Konzentrationen ist ein Absinken der gemessenen rPrP-Konzentration in den Spumaten mit steigender SDS-Konzentration ersichtlich. Die Zugabe von SDS als Schäumungshilfsmittel wirkt sich ungünstig auf die messbare Anreicherung des Prionproteins aus.

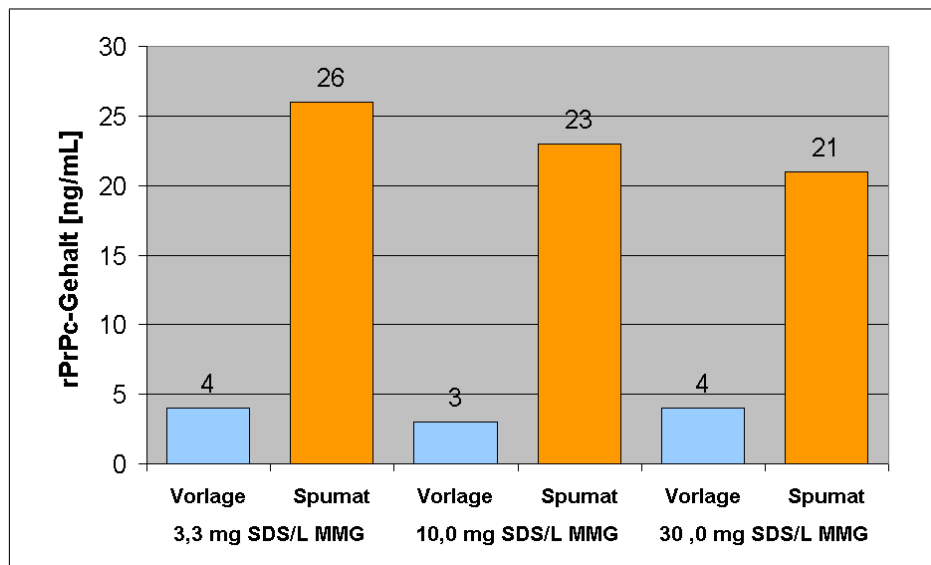


Abbildung IV.4.: Zerschäumung von rekombinatem PrP^C in verdünnter Magermilch (MMG) mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen. Auf der Abszisse sind jeweils Vorlagen und Spumate bei der Zerschäumung mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentrationen von rPrP.

3. Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat

Zentrifugation bei $1000 \times g$

Zur Betrachtung des Verhaltens einer verdünnten Hirnhomogenat-Lösung im Schwerfeld wird eine Zentrifugation durchgeführt. 1950 μL PBS werden mit 50 μL nativem Hirnhomogenat versetzt und homogenisiert. In einem Reaktionsgefäß wird zunächst eine Minute bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Daraus werden eine Probe (100 μL) aus dem Überstand und das Pellet¹ in 100 μL der Lösung entnommen. Nach zwei und fünf Minuten Zentrifugation desselben Reaktionsgefäßes werden jeweils Proben nach dem gleichen Muster gewonnen. Der Gehalt an PrP^{Sc} wird mittels ELISA ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung IV.5 dargestellt.

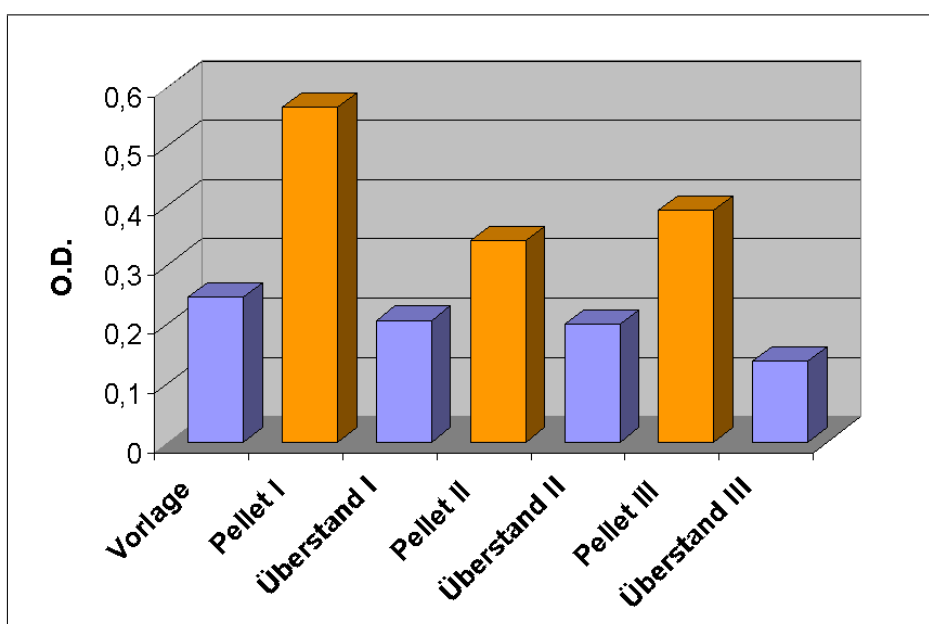


Abbildung IV.5.: O.D.-Werte (entsprechend dem Gehalt an PrP^{Sc}) bei der Zentrifugation verdünnten Hirnhomogenates. Die blauen Balken stellen die PrP^{Sc} -Konzentration in der Vorlage bzw. im Überstand dar. Der Überstand aus einer Zentrifugation ist jeweils die Vorlage für die jeweils nächste Zentrifugation. Rechts neben Überstand bzw. Vorlage ist jeweils die PrP^{Sc} -Konzentration im Pellet dargestellt (orange Balken).

In den Vorlagen bzw. Überständen nimmt die Konzentration an PrP^{Sc} bei jedem Zentrifugationsschritt ab. Im Pellet kommt es nach einer Minute zu einer deutlich stärkeren Anreicherung als bei den folgenden Zentrifugationen. Bei jedem der Zentrifugationsschritte kommt es zu einer Verringerung der Menge des PrP^{Sc} im Überstand und zu einer Anreicherung im Pellet (Abbildung IV.5).

¹ Sediment, Zentrifugat

Zentrifugation bei $20000 \times g$

360 μL PBS werden mit 40 μL nativem Hirnhomogenat versetzt und homogenisiert. Nach einer Zentrifugation über 60 Minuten bei $20000 \times g$ werden jeweils 100 μL oben am Flüssigkeitsspiegel, in der Mitte der Flüssigkeitssäule sowie unten das Pellet entnommen. Die Proben werden verdaut und der Gehalt an PrP^{Sc} im ELISA ermittelt.

Wie Tabelle IV.1 zeigt, ist das gesamte PrP^{Sc} aus der Vorlage im Pellet sedimentiert. In den Proben aus dem Überstand kann kein PrP^{Sc} detektiert werden.

***Tabelle IV.1.:** O.D.-Werte (entsprechend dem Gehalt an PrP^{Sc}) von Proben aus der Zentrifugation von verdünntem Hirnhomogenat bei $20000 \times g$ über 60 Minuten. Die Probeentnahme erfolgt ganz oben im Überstand, in der Mitte der Flüssigkeitssäule sowie ganz unten im Röhrchen (Pellet).*

Probenahme	O.D.-Wert
oben	0,018 (n.n.)
Mitte	0,018 (n.n.)
Pellet	1,705

4. Einfluss von Ultraschall und SDS auf den Nachweis von PrP^{Sc}

Da SDS als Schäumungshilfsmittel eingesetzt wird, ist es wichtig, den Effekt dieses Tensides auf die PrP^{Sc}-Quantifizierung mittels ELISA zu überprüfen. Weiterhin wird der Effekt von Ultraschall auf pathologisches Hirnhomogenat vor der Zerschäumung getestet, dieser könnte die Anreicherung begünstigen. Riesner [RIESNER 2001a] beschreibt, dass eine Ultraschallbehandlung unter Anwesenheit von SDS zu einer Zerteilung von PrP^{Sc}-Assoziaten führt.

4.1. PK-verdautes Hirnhomogenat

Aus einem Pool von 85 μL verdaulichem, mit 1 mL PBS versetztem Hirnhomogenat werden jeweils 100 μL Probevolumen nach unterschiedlicher Behandlung untersucht. Überprüft werden die Auswirkungen einer 15-minütigen Ultraschallbehandlung (im Ultraschallbad), einer Zugabe von etwa 100 mg SDS/L (Konzentration wie bei der Zerschäumung) und einer Kombination der beiden Maßnahmen. Die resultierenden O.D.-Werte als Maß für den PrP^{Sc} -Gehalt zeigt Abbildung IV.6.

Die absoluten Werte der verschieden behandelten Proben unterscheiden sich nur marginal. SDS führt zu einer Verringerung des gemessenen O.D.-Wertes gegenüber der Analyse ohne dieses Tensid. Ultraschall erhöht das Signal des PrP geringfügig, jedoch zu wenig, als dass es zur deutlichen Erhöhung der Empfindlichkeit des Nachweises eingesetzt werden könnte.

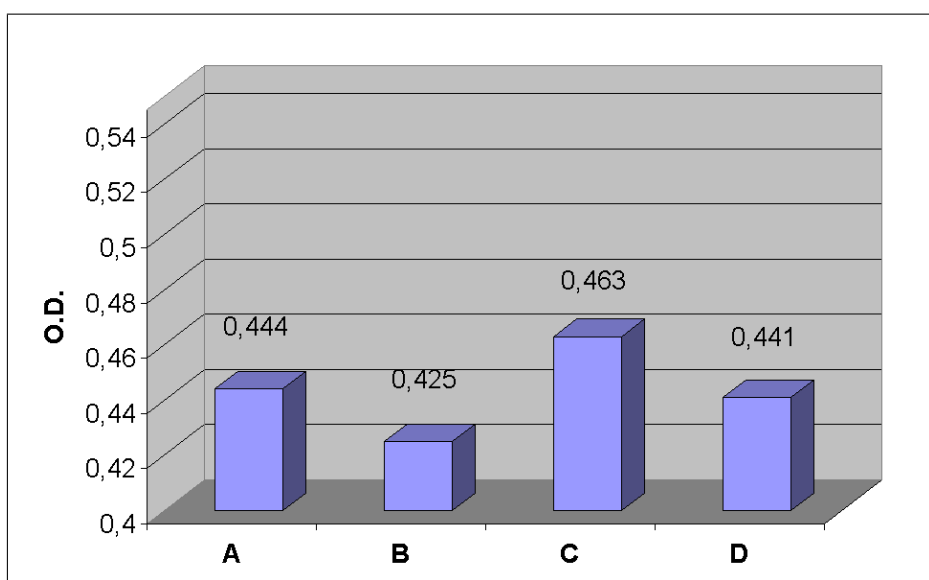


Abbildung IV.6.: O.D.-Werte (entsprechend der Konzentrationen an PrP^{Sc}) von identischen Mengen an verdaulichem PrP^{Sc} , das vor der Untersuchung mittels ELISA A) nicht weiter behandelt, B) mit SDS versetzt, C) mit Ultraschall behandelt oder D) mit SDS versetzt und mit Ultraschall behandelt wurde.

4.2. Natives Hirnhomogenat

Die Einflüsse von SDS und Ultraschall auf unverdautes PrP^{Sc} bzw. auf den Nachweis von PrP^{Sc} mittels ELISA werden überprüft. In einer 1/20 Verdünnung von nativem Hirnhomogenat in PBS wird das PrP^{Sc} zum einen ohne weiteres quantifiziert, weitere Proben werden mit 500 mg/L SDS versetzt und untersucht sowie, nach Ultraschallbehandlung, bzgl. des PrP^{Sc}-Gehaltes überprüft. Zum anderen wird das native Hirnhomogenat mit 500 mg/L SDS versetzt, mit Ultraschall behandelt und untersucht.

Die Zugabe von SDS zu verdünntem nativem Hirnhomogenat führt zu einer Verringerung des Signals nach dem ELISA. Ultraschallbehandlung hingegen erhöht das Signal wesentlich. Wird Hirnhomogenat mit SDS versetzt und mit Ultraschall behandelt, so überwiegt die Wirkung des SDS (siehe Abbildung IV.7).

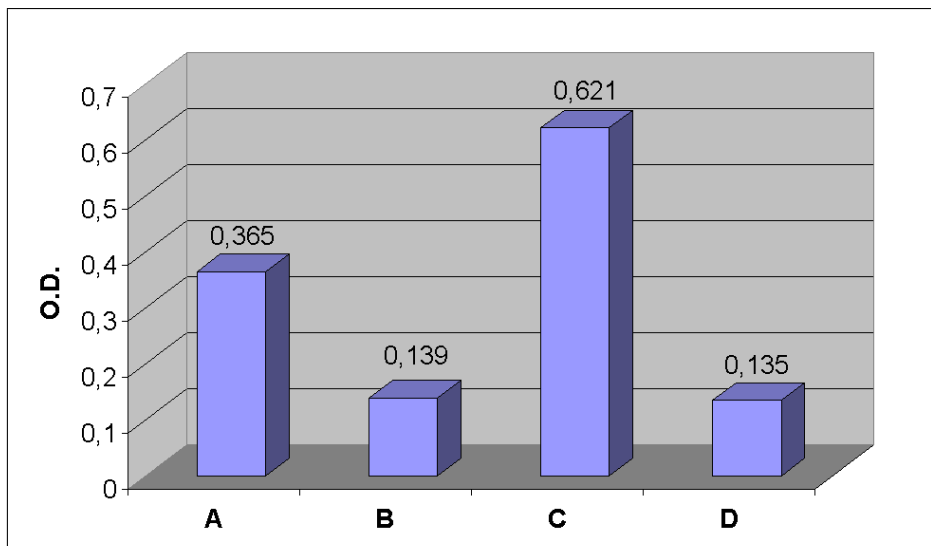


Abbildung IV.7.: O.D.-Werte von identischen Mengen an unverdaulichem PrP^{Sc}, das vor der Untersuchung mittels ELISA A) nicht weiter behandelt, B) mit SDS versetzt, C) mit Ultraschall behandelt oder D) mit SDS versetzt und mit Ultraschall behandelt wurde.

5. Zerschäumung von rekombinantem PrP^C

Neben dem Anreicherungsverhalten von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat wird auch das Verhalten von zellulärem Prionprotein (in Form von rekombinantem PrP^C) bei der Zerschäumung untersucht. Rekombinantes PrP^C (lyophilisiert) wird aus 20 mL Vorlage geschäumt, die aus PBS mit 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS und 0,2 ng rec. PrP^C/mL besteht. Nachdem sich die Schaumsäule langsam aufgebaut hat, wird sofort eine Schaumprobe entnommen, weitere nach je etwa 30 min. Dazwischen wird bei konstanter Schaumsäulenhöhe geschäumt. Das entnommene Spumatvolumen beträgt jeweils etwa 150 μL .

Abbildung IV.8 verdeutlicht, dass die O.D.-Werte in der ersten Spumatfraktion am größten, in den nachfolgenden hingegen deutlich geringer sind. Die Konzentration an rekombinantem PrP^C ist folglich am höchsten in der ersten Spumatfraktion, die unmittelbar nach dem Erreichen der maximalen Schaumsäulenhöhe entnommen wird. Mit der sinkenden PrP^C-Konzentration in der Vorlage sinken in den weiteren Spumatfraktionen auch die Mengen des angereicherten Prionproteins.

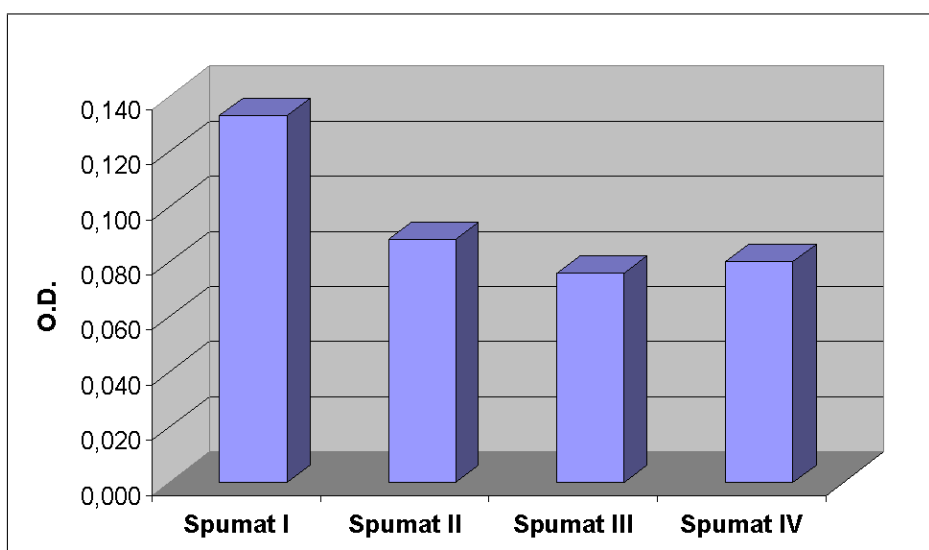


Abbildung IV.8.: O.D.-Werte (entsprechend der PrP^C-Konzentration) vier aufeinander folgender Spumate bei der Zerschäumung von rekombinantem PrP^C in PBS mit SDS als Schäumungshilfsmittel. Das erste Spumat wird sofort nach dem Schaumsäulenaufbau entnommen, die weiteren Spumatfraktionen jeweils nach 30 min Schäumen bei konstanter Schaumsäulenhöhe.

6. Zerschäumung von verdaulichem und unverdaulichem Hirnhomogenat

Um die Anreicherbarkeit von pathologischem Prionprotein in der unverdaulichem, nativen Form (PrP^{Sc} (33–35 kDa) mit der verdaulichem (PrP^{27-30}) zu vergleichen, wird zum einen natives pathologisches Hirnhomogenat zerschäumt, zum anderen, unter gleichen Bedingungen, bereits verdaulichem Hirnhomogenat.

6.1. Verdaulichem Hirnhomogenat

Natives Hirnhomogenat wird entsprechend dem Protokoll im Roboscreen Test Kit verdaulichem. Das gewonnene Pellet wird im gleichen Volumen gelöst, das zuvor an nativem Hirnhomogenat eingesetzt wurde.

150 μL PK-verdaulichem Hirnhomogenat werden in 15 mL PBS mit 83 mg/L SDS homogenisiert und geschäumt. Die Zerschäumungsdauer zwischen Entnahme der Proben aus der Vorlage und der des Spumates beträgt jeweils 20–30 min, die Schaumsäule kollabiert zwischen den einzelnen Spumat- bzw. Sumpfontnahmen. Es werden jeweils 200 μL Spumat abgenommen. Zur Analyse werden von der Vorlage und von den Spumaten 200 μL eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung IV.9.

Diese Abbildung zeigt, dass bei der Zerschäumung von verdaulichem Hirnhomogenat eine sehr geringe Anreicherung von PrP^{Sc} im Spumat und eine minimale Abreicherung in der Vorlage auftritt.

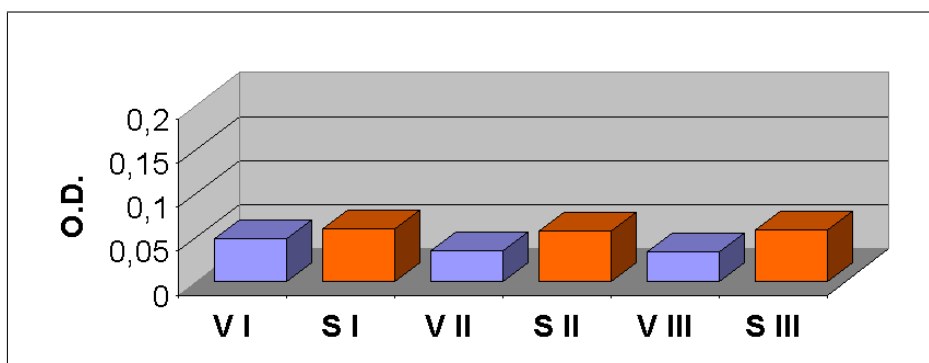


Abbildung IV.9.: O.D.-Werte (entsprechend den PrP^{Sc} -Gehalten) von Vorlagen („V“, blaue Säulen) und Spumaten („S“, orange Säulen) aus der Zerschäumung von verdaulichem Hirnhomogenat bei sukzessiver Probenahme nach jeweils ca. 25 min Schäumens.

6.2. Unverdautes (natives) Hirnhomogenat

150 μL natives Hirnhomogenat werden in 15 mL PBS mit 83 mg/L SDS homogenisiert und geschäumt. Die Zerschäumungsdauer zwischen der Entnahme der Proben aus der Vorlage und des Spumates beträgt jeweils 20–30 min. Die Schaumsäule kollabiert zwischen den einzelnen Entnahmen von Spumat und Vorlage. Es werden jeweils etwas über 200 μL Spumat abgenommen. Zur Quantifizierung des PrP^{Sc} -Gehaltes mittels ELISA werden sowohl aus dem Sumpf (von der Vorlage) als auch von den einzelnen Spumatfraktionen 200 μL der jeweiligen Probe eingesetzt. Resultate dieser Zerschäumung zeigt Abbildung IV.10.

Bei dieser Zerschäumung von unverdaulichem Hirnhomogenat kommt es zu einer starken Anreicherung des PrP^{Sc} . Bereits die erste Spumatfraktion weist einen deutlich höheren PrP^{Sc} -Gehalt auf als die erste Vorlage. In den weiteren Spumatfraktionen wird eine noch wesentlich höhere Menge an PrP^{Sc} gemessen, trotz Abnahme der Konzentration von PrP^{Sc} in der Vorlage. Das heißt, dass sowohl der Anreicherungsfaktor als auch die absolute Konzentration von pathologischem Prionprotein in den späteren Spumatfraktionen deutlich höher ist als in der ersten (S1).

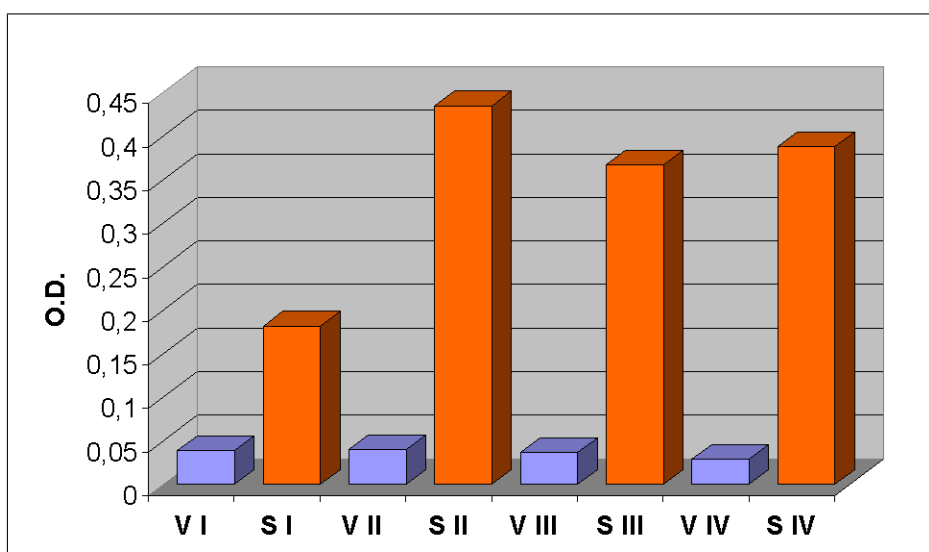


Abbildung IV.10.: O.D.-Werte (entsprechend den PrP^{Sc} -Gehalten) von Vorlagen („V“, blaue Säulen) und Spumaten („S“, orange Säulen) aus der Zerschäumung von unverdaulichem Hirnhomogenat bei sukzessiver Probenahme nach jeweils ca. 25 min Schäumens.

In den beiden Abbildungen IV.9 und IV.10 (auf den Seiten 81 und 82) in diesem Abschnitt liegen die O.D.-Werte der Proben aus dem Sumpf z.T. knapp unterhalb des als untere Messgrenze festgelegten Wertes von 0,05. Dies ist vertretbar, da der ermittelte lineare Messbereich für das PrP^{Sc} diese Werte noch einschließt. Um das Anreicherungsverhalten zu verdeutlichen, werden diese Werte im Diagramm dargestellt. Zu einer Quantifizierung oder Berechnung einer Anreicherung werden sie nicht herangezogen.

7. Zerschäumung von verschnittenem Hirnhomogenat

Die folgenden Diagramme (Abbildung IV.11 bis IV.14) zeigen auf, wie die Anreicherung des PrP^{Sc} bei der Zerschäumung vom Anteil des (BSE-positiven) Hirnhomogenates an der Vorlage abhängt.

Die Angaben der Anteile des pathologischen Hirnhomogenates (z.B. 1/97, 1/161 etc.) benennen den volumenbezogenen Anteil des pathologischen Hirnhomogenates an der Vorlage. Die Gewinnung der Spumate erfolgt jeweils ca. 30 min nach Beginn des Schäumens bzw. nach der letzten Spumatentnahme. Das Volumen der entnommenen und mittels ELISA untersuchten Spumatfraktionen beträgt jeweils etwa 100 μL , die Probenvolumina aus der Vorlage je nach PrP^{Sc}-Konzentration in dieser Vorlage zwischen 250 μL und 5,4 mL.

Die in den folgenden Diagrammen angegebenen PrP^{Sc}-Konzentrationen beziehen sich auf das reine, unverdaute Hirnhomogenat, dem die Konzentration 1 zugeordnet wird. Eine tatsächliche, objektive Quantifizierung des PrP^{Sc} ist nicht möglich, da das Prionprotein nicht in reiner Form zur Verfügung steht und daher nur eine Kalibrierkurve im Bezug auf eine selbst gewählte Probe möglich ist.

Ausgangskonzentration 1/97 natives Hirnhomogenat in PBS

Für die Zerschäumung einer Lösung mit 1/97 Hirnhomogenat in der Vorlage wird eine Lösung aus PBS mit 230 mg/L SDS hergestellt und mit 1/97 Hirnhomogenat versetzt. Von der Vorlage werden 12 mL zur Zerschäumung eingesetzt (Abbildung IV.11, Seite 85).

In den ersten drei Spumatfraktionen sinken die PrP^{Sc}-Konzentrationen. Beim vierten Spumat wird eine höhere Konzentration im Spumat erzeugt als bei der zweiten und dritten. Die Anreicherungsfaktoren steigen von einer Spumatfraktion zur nächsten jeweils deutlich an.

Ausgangskonzentration 1/161 natives Hirnhomogenat in PBS

Als Lösungsmittel für die Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in der Verdünnung 1/161 wird PBS mit 230 mg/L SDS verwendet, 1/161 des Vorlagevolumens ist Hirnhomogenat. Von diesem Gemisch werden 12 mL als Vorlage zur Zerschäumung eingesetzt.

Sowohl die gefundenen PrP^{Sc}-Konzentrationen als auch die Anreicherungsfaktoren (Abbildung IV.12 auf Seite 85) steigen von einer Spumatfraktion zur jeweils 30 Minuten später gewonnenen deutlich an.

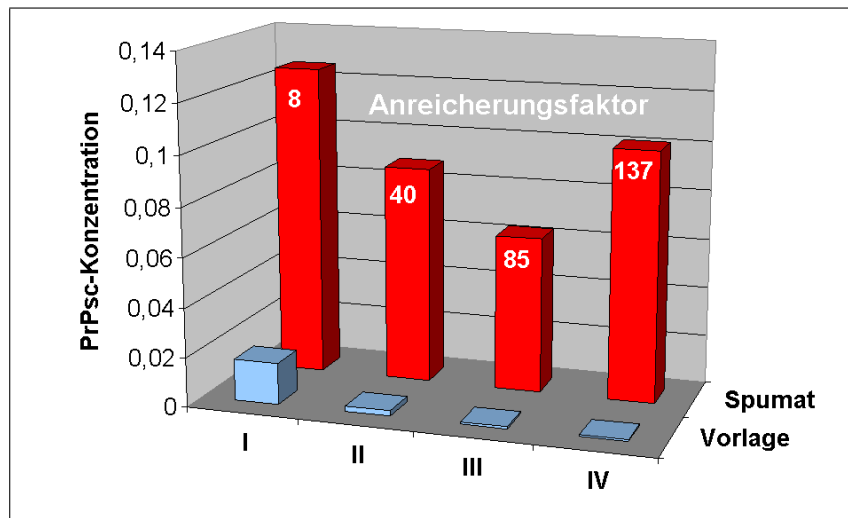


Abbildung IV.11.: PrP^{Sc}-Konzentrationen (bezogen auf reines Hirnhomogenat) in Vorlagen und Spumaten bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit SDS als Schäumungshilfsmittel. 1/97 des Vorlagevolumens ist Hirnhomogenat. Der Anreicherungsfaktor ist der Quotient aus der PrP^{Sc}-Konzentration im Spumat und der PrP^{Sc}-Konzentration in der Vorlage.

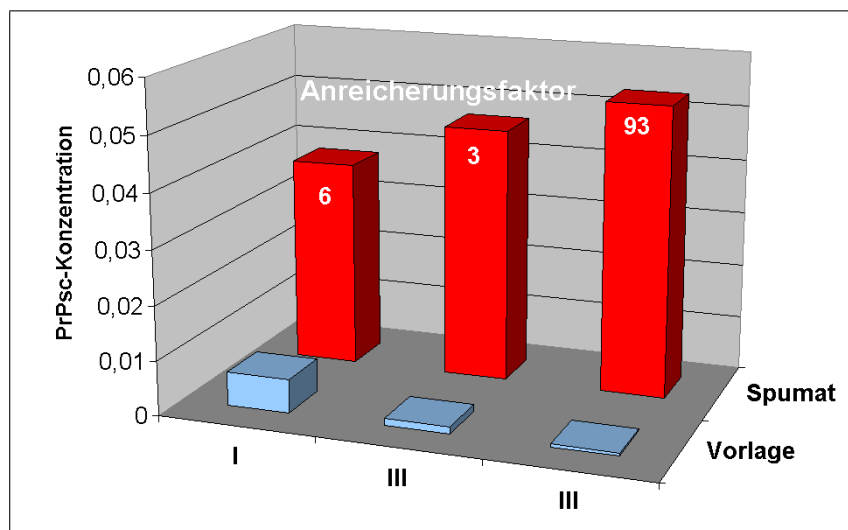


Abbildung IV.12.: PrP^{Sc}-Konzentrationen in Spumaten und Vorlagen (bezogen auf reines Hirnhomogenat) in Vorlagen und Spumaten bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit SDS als Schäumungshilfsmittel. 1/161 des Vorlagevolumens ist Hirnhomogenat. Der Anreicherungsfaktor ist der Quotient aus der PrP^{Sc}-Konzentration im Spumat und der PrP^{Sc}-Konzentration in der Vorlage.

Ausgangskonzentration 1/309 natives Hirnhomogenat in PBS

Die Zerschäumung einer Vorlage mit 1/309 an PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat erfolgt in PBS mit 230 mg/L SDS. Als Vorlagevolumen werden 25 mL eingesetzt, da für die Quantifizierung in der Vorlage bei starker Verdünnung größere Volumina notwendig sind.

Die Anreicherungs-faktoren und die absoluten Konzentrationen steigen bei den ersten drei Spumaten an (Abbildung IV.13).

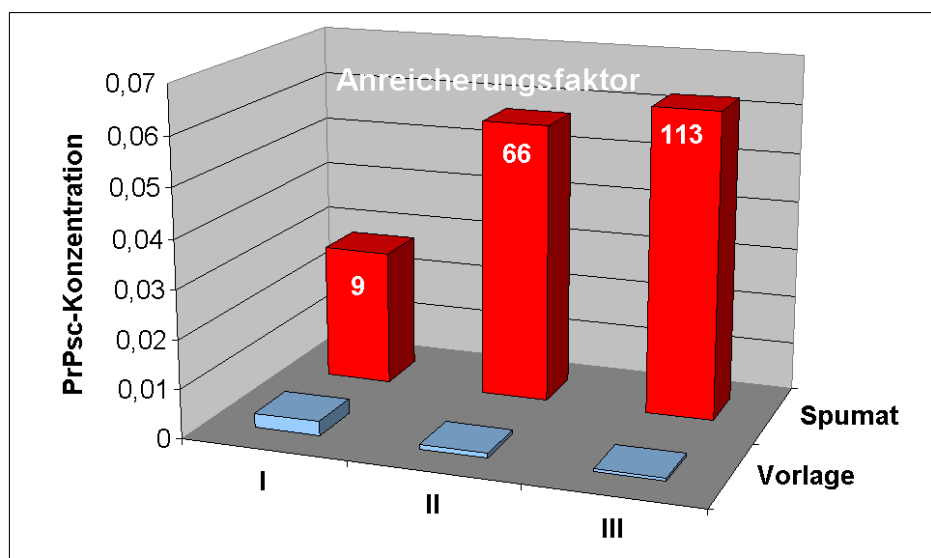


Abbildung IV.13.: PrP^{Sc}-Konzentrationen in Spumaten und Vorlagen (bezogen auf reines Hirnhomogenat) bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit SDS als Schäumungshilfsmittel. 1/309 des Vorlagevolumens ist Hirnhomogenat. Der Anreicherungsfaktor ist der Quotient aus der PrP^{Sc}-Konzentration im Spumat und der PrP^{Sc}-Konzentration in der Vorlage.

Ausgangskonzentration 1/376 natives Hirnhomogenat in PBS

Bei dieser Zerschäumung wird ein Anteil von 1/376 an nativem Hirnhomogenat in einem Gemisch von PBS mit 2,5 mg SDS/mL hergestellt. Als Vorlage werden 15 mL von diesem Gemisch eingesetzt und zerschäumt. Die Entnahme der Spumate erfolgt jeweils nach 30-minütigem Schäumen. Die resultierenden PrP^{Sc}-Konzentrationen in den Vorlagen und den Spumatfraktionen zeigt Abbildung IV.14 auf Seite 87.

Die Anreicherung im zweiten Spumat kann nicht mehr quantifiziert werden, das PrP^{Sc} im Sumpf ist so stark abgereichert, dass eine Messung des Gehaltes nicht mehr möglich ist. Eine mindestens erzielte Anreicherung kann beziffert werden, denn bei einem O.D.-Wert von 0,05 (das ist die untere Grenze des für photometrische Messungen herangezogenen linearen Messbereiches) betrüge die Anreicherung 140. Der reale ER muss höher liegen, da der O.D.-Wert unter 0,05 liegt.

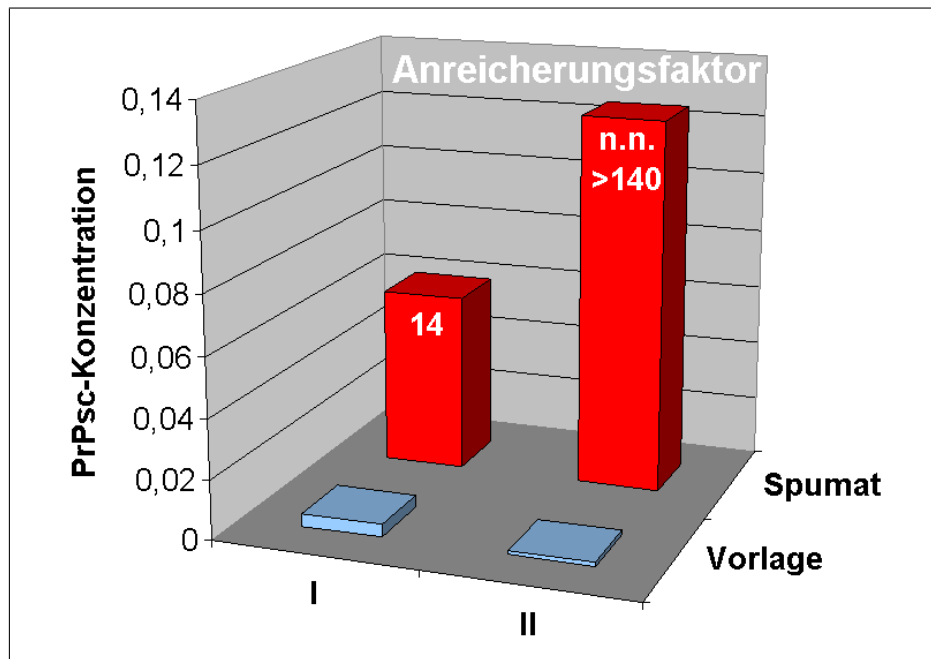


Abbildung IV.14.: PrP^{Sc}-Konzentrationen in Spumaten und Vorlagen (bezogen auf reines Hirnhomogenat) bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit SDS als Schäumungshilfsmittel. Die Ausgangskonzentration des Hirnhomogenates in der Vorlage beträgt 1/376. Der Anreicherungsfaktor ist der Quotient aus der PrP^{Sc}-Konzentration im Spumat und der PrP^{Sc}-Konzentration in der Vorlage.

8. Zerschäumung von Gemischen aus Hirnhomogenat

8.1. Anreicherung bei unterschiedlichen Anteilen an BSE-positivem Hirnhomogenat im Gehirngemisch

BSE-positives und BSE-negatives Hirnhomogenat werden mit den Anteilen 1/1, 3/4, 1/2 sowie 1/4 an BSE-positivem Gehirn gemischt. Davon werden jeweils 100 μL resp. 90 μL (bei 1/4) in 12 mL PBS homogenisiert. Als Schäumungshilfsmittel dient SDS (13,3 mg/L). Vor Gewinnung der Spumate wird 30 min geschäumt, es werden etwas mehr als 100 μL Spumat gewonnen. Im Diagramm IV.15 (Seite 88) sind die Anreicherungsfaktoren für PrP^{Sc} dargestellt, die bei den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von BSE-positivem zu BSE-negativem Hirnhomogenat im ersten Spumat auftreten.

Die Anreicherung ist abhängig vom Mischungsverhältnis des gesunden mit dem pathologischen Gehirn. Je niedriger der Gehalt von BSE-positivem Hirnhomogenat und somit von PrP^{Sc} im Gemisch ist, desto niedriger ist die in der ersten Spumatfraktion erzielte Anreicherung.

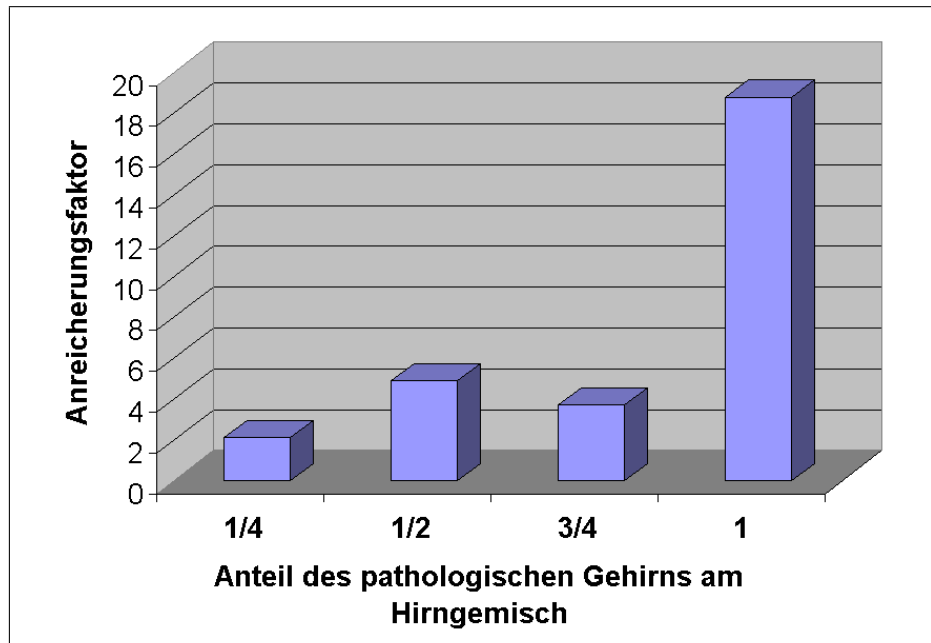


Abbildung IV.15.: Anreicherungs faktoren von PrP^{Sc} bei der Zerschäumung von gemischtem Hirnhomogenat mit verschiedenen Anteilen BSE-positiven Hirnhomogenats. Der Anreicherungs faktor ist der Quotient aus der PrP^{Sc}-Konzentration im Spumat und der PrP^{Sc}-Konzentration in der Vorlage. Dargestellt sind die ERs in der jeweils ersten Spumatfraktion. Der Quotient auf der Abszisse (1/4, 1/2, 3/4, 1/1) gibt an, wie hoch der Anteil an BSE-positivem Hirnhomogenat im Gemisch aus pathologischem und gesundem Hirnhomogenat ist.

8.2. Detektion von PrP^{Sc} in BSE-negativ getestetem Rinderhirn nach Zerschäumung

BSE-positives wird mit BSE-negativem Hirnhomogenat auf eine Konzentration von 1/85 an positivem Hirnhomogenat verschnitten, so dass dieses Gemisch laut BSE-Test als BSE-negativ einzustufen ist (O.D.-Wert unter 0,2). Dieses Gehirngemisch entspricht in der Zusammensetzung dem Stammhirn eines Schlachtviehs, das sich bei der Schlachtung in einer frühen Phase der Erkrankung befand.

Zur Herstellung dieses Gemisches werden 3,995 mL negatives Hirnhomogenat mit 47 μL stark positivem Hirnhomogenat gemischt und homogenisiert (In Abbildung IV.16 ist dies anhand der grünen Säule „HHmix“ dargestellt). Dieses Gemisch wird mit 11,1 mL PBS verdünnt und mit 6,7 mg SDS/L versetzt und dient so als Vorlage für die Zerschäumung. Bei der Zerschäumung wird der Gasvolumenstrom so reguliert, dass sich die Schaumsäule sehr langsam aufbaut und die erste Spumatfraktion nach ca. 20 min gewonnen wird. Weitere Fraktionen werden jeweils nach 20 min stationären Schäumens entnommen. Die Schaumsäule bleibt zwischen den Entnahmen der Spumatproben erhalten. Die Volumina der Spumatproben betragen jeweils etwas über 300 μL .

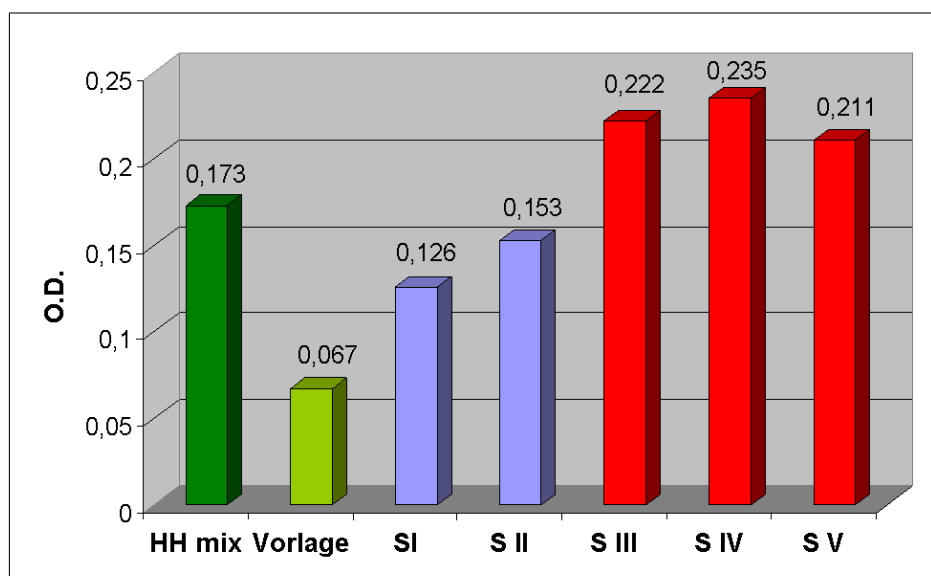


Abbildung IV.16.: O.D.-Werte (entsprechend dem Gehalt an PrP^{Sc}) bei der Zerschäumung eines Gemisches aus BSE-positivem und gesundem Hirnhomogenat. HHmix ist das verdünnte Gemisch aus pathologischem und gesundem Gehirn; die Vorlage ist das zur Zerschäumung mit Puffer verdünnte HHmix; S I bis S V sind die einzelnen, sukzessiv entnommenen Spumatfraktionen.

Die O.D.-Werte der ersten und zweiten Fraktion (S I und S II) in Abbildung IV.16 liegen in dem Bereich, der vom BSE-Test Kit als negativ eingestuft wird. Die folgenden drei Spumatfraktionen S III bis S V liegen oberhalb der Grenze von 0,2, d.h. sie sind positiv (bzw. als fragwürdig einzustufen). Die Maßgabe zur Interpretation der Ergebnisse (als Grenzwert gilt ein O.D.-Wert von 0,2) aus dem BetaPrion[®] BSE EIA Test Kit sind im praktischen Teil beschrieben.

8.3. Zerschäumung von Gehirn-Gemisch mit sehr geringem Anteil an pathologischem Hirnhomogenat

Zur Herstellung eines Gehirn-Gemisches aus pathologischem und gesundem Gehirn mit einem Anteil von 1/81 BSE-positivem Gehirn werden 60 μL BSE-positives Hirnhomogenat mit 4,80 mL gesundem Hirnhomogenat gemischt und homogenisiert. 4,46 mL dieses Gemisches werden in 10 mL PBS mit 7,6 mg SDS/L gegeben und homogenisiert.

Bei der Zerschäumung dieses Gemisches (Abbildung IV.17) werden sukzessiv nach jeweils etwa 30 min ca. 400 μL Spumat abgenommen. Nach Verdau und Fällung der einzelnen Spumatfraktionen wird das Pellet in 300 mL Lösungs-Puffer gelöst, davon 100 μL im ELISA untersucht (Vorgehen entsprechend Test-Kit).

Gegenüber der Vorlage (hellblaue Säule, „Vorl.“) sind die Spumate S I bis S VIII deutlich angereichert (Abbildung IV.17). Ab der neunten Spumatfraktion fällt der O.D.-Wert und damit die PrP^{Sc}-Konzentration unter die der Vorlage. Die maximale Anreicherung wird in den Spumaten S IV bis S VI erreicht.

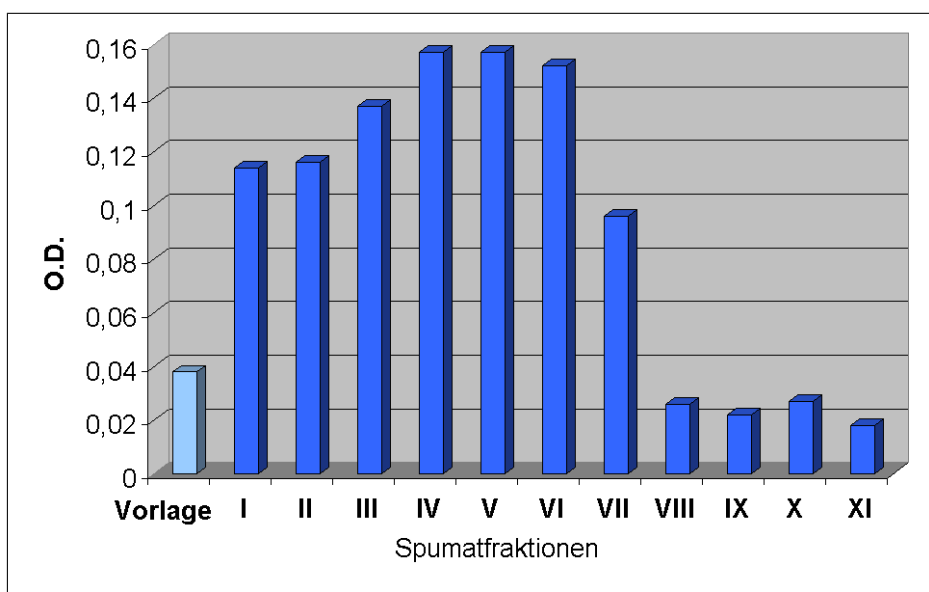


Abbildung IV.17.: O.D.-Werte (entsprechend der Menge an PrP^{Sc}) von Vorlage und Spumatfraktionen aus der Zerschäumung eines Gemisches aus pathologischem und gesundem Hirnhomogenat mit 1/81 BSE-positivem Hirnhomogenat.

V. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) aus Körperflüssigkeiten und -geweben möglichst stark anzureichern, um die Empfindlichkeit des Nachweises Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien zu erhöhen. Zunächst wurden hierzu Vorversuche durchgeführt, um die Zerschäumungsapparatur so zu gestalten, dass sie den speziellen Anforderungen des Arbeitens mit infektiösen Materialien genügt. In der entsprechend konstruierten Apparatur wurde dann mit verschiedenen Hilfsmitteln, variierten Parametern und Modifikationen zerschäumt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden zur Optimierung eines Protokolls für die Zerschäumung verwendet, mit dem maximale Anreicherungsfaktoren des PrP^{Sc} erzielt werden können. Nachfolgend werden sowohl die Konstruktion der Apparatur als auch die Entwicklung und Optimierung der Arbeitsmethode beschrieben.

1. Zerschäumung von infektiösem Material

Die Zerschäumung von PrP^{Sc} bzw. von vergleichbar gefährdenden Stoffen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Im Hinblick auf ein sicheres Arbeiten mit dem pathologischen Prionprotein mussten an den bislang zur Zerschäumung eingesetzten Apparaturen einige grundlegende Veränderungen vorgenommen werden. Die Notwendigkeit für diese Veränderungen resultiert aus der Infektiosität und Pathogenität des anzureichernden PrP^{Sc} (im Grundlagenteil beschrieben).

Eine Skizze der Apparatur ist im Teil Materialien abgebildet (Abbildung III.1, Seite 62), eine fotografische Aufnahme befindet sich im Anhang (Abbildung A.1, Seite 115).

1.1. Inaktivierung des PrP^{Sc} und Reinigung der Apparatur

Aufgrund der gesundheitsgefährdenden Eigenschaften des PrP^{Sc} ist es notwendig, die Zerschäumungsapparatur mit geeigneten Mitteln und Maßnahmen von infektiösen Verunreinigungen zu befreien sowie infektiöses Material zu inaktivieren.

Die gesamte Anlage wurde aus Materialien konstruiert, die autoklavierbar sind. Mit Ausnahme der Verschraubungen, der Dichtungen und des Septums wurde daher Glas als Material verwendet.

Glas, Kunststoffverschraubungen sowie die teflonbeschichteten Silikongummidichtungen und das Septum aus Silikongummi sind gegenüber Natriumhypochlorit (NaOCl) und konzentrierter Natronlauge (NaOH) genügend beständig. Diese beiden Chemikalien sind sehr gut für die Inaktivierung von PrP^{Sc} geeignet [HÖRNLIMANN 2001a]. Obwohl in der Literatur zumeist NaOCl als Inaktivierungsreagenz beschrieben ist, wurde in dieser Arbeit auf das ebenso wirksame NaOH zurückgegriffen, da dieses im Gegensatz zum NaOCl keine gesundheitsschädlichen Auswirkungen auf die Atemwege hat.

Die Zerschäumungsapparatur wurde nach jeder Zerschäumung für mindestens 18 Stunden in ein Bad mit 4 M NaOH gegeben. Gerätschaften wie Spritzen, Kanülen und Reaktionsgefäße o.ä. wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

Zur thermischen Inaktivierung des PrP^{Sc} wurde eine halbstündige Autoklavierung bei 134 °C und 2 bar durchgeführt. Dies wurde als sicheres Verfahren beschrieben [OBERTHÜR 2001]. Im Falle von PrP^{Sc}-haltigen Flüssigkeiten wurde der Vorgang zur Sicherstellung der genügenden Erhitzung des gesamten Volumens wiederholt. Entsprechend dem üblichen Vorgehen im BSE-Labor wurde die Flüssigkeit nach dem Abkühlen für 24 h mit der Hälfte des eigenen Volumens an 20 %-igem NaOCl versetzt.

1.2. Aerosolbildung des PrP^{Sc}

Bei der Zerschäumung könnte PrP^{Sc} ein Aerosol bilden und in die umgebende Atmosphäre gelangen. Der zur Generierung des Schaumes notwendige Gasstrom darf daher nicht ungereinigt in die Atmosphäre entweichen. Deshalb wird dieser aus dem Spumatsammelgefäß zunächst zur Inaktivierung durch eine Gaswaschflasche mit 4 M NaOH-Lösung und anschließend durch eine Kältefalle mit flüssigem Stickstoff (−196 °C) geleitet, wo möglicherweise entstandene Aerosole gefrieren und ausfallen.

Weiterhin müssen die Beschickung der Zerschäumungsapparatur und die Probenahme ohne Kontakt des infektiösen Mediums zur Umgebung erfolgen. Dazu wurde am Vorlagegefäß (Sumpf) ein Drehhahn aus Glas angebracht, durch den dieses mit Hilfe einer Spritze befüllt sowie nach der Zerschäumung problemlos entleert werden kann.

Zur Entnahme der Spumatproben wurde am Spumatsammelgefäß ein Septum angebracht, durch das mit Spritze und geeigneter Kanüle Spumat entnommen wird.

Anschaulich wird dies in der Abbildung III.1, Seite 62, und Abbildung A.1 auf Seite 115 im Anhang.

1.3. Dimensionierung der Zerschäumungsapparatur

Da das pathologische Hirnhomogenat nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung steht, wurde versucht, eine möglichst klein dimensionierte Apparatur zu konstruieren.

Vorversuche zeigten, dass eine stabile Schaumsäule, die gute Drainageeffekte aufweist und

langsam kollabiert, bei der Zerschäumung von Hirnhomogenat in sehr kleinen Apparaturen (Vorlagevolumen um 1 mL) nicht generiert werden kann.

Für den ELISA ist ein Volumen von etwa 100 μL notwendig. Da mehrere Spumatfraktionen dieses Volumens, sowie Proben aus dem Sumpf, nacheinander entnommen werden mussten, wurden jeweils 7 bis 15 mL verdünntes Hirnhomogenat zerschäumt.

Als optimal für die in der Laminar-Flow Sterilbank (maximal nutzbare Höhe 600 mm) durchgeführten Zerschäumungsexperimente erwies sich eine Höhe von 500 mm für die gesamte Zerschäumungsapparatur, wobei 100 mm auf den Vorlagebereich entfallen, die aufgesetzte Säule 350 mm misst und der Bogen zur Überleitung in das Spumatsammelgefäß 50 mm hoch ist. Der Durchmesser der Glasrohre beträgt jeweils 18 mm.

Obwohl aus der Literatur Modifikationen der Zerschäumungsapparaturen bekannt sind, die z.B. die Drainage durch den Einbau von Abschnitten mit erhöhtem Querschnitt in die Säule verbessern und so die Anreicherung erhöhen [SARKAR 1987], wurde die Apparatur prinzipiell möglichst einfach gestaltet.

Um mit der beschriebenen Apparatur eine gute Drainage zu erreichen, wird die Zerschäumungsdauer verlängert, d.h. der Gasvolumenstrom wird so reguliert, dass ein ausreichender Rücklauf im Schaum stattfinden kann. Eine genaue Beschreibung dieses Vorgehens erfolgt in der Diskussion unter 7 (Seite 98).

2. Quelle des pathologischen Prionproteins

Als relevantes Untersuchungsmaterial kann ausschließlich Hirngewebe aus der Obexregion des Hirnstammes BSE-erkrankter Tiere (in erster Linie von Rindern) verwendet werden, denn nur dort ist das PrP^{Sc} in ausreichender Konzentration für Untersuchungen vorhanden. Die vielen Begleitstoffe und die komplexe Matrix des eingesetzten Hirngewebes beeinflussen Verlauf und Resultat der Zerschäumung massiv.

Die Konzentration des PrP^{Sc} im entnommenen Stammhirngewebe ist stark vom Individuum und Stadium der Erkrankung abhängig. Auch die Verteilung des PrP^{Sc} im Hirngewebe ist inhomogen, d.h. die einzelnen Portionen der Gehirnproben eines Individuums haben stark variierende Gehalte an PrP^{Sc} .

Trotz mehrfacher Wiederholung des Homogenisierungsvorganges („ribulizing“) sind noch Gewebestrukturen vorhanden, die nicht zerkleinert werden können, daher ist das Hirnhomogenat bezüglich des PrP^{Sc} -Gehaltes inhomogen. Deshalb steht keine standardisierte Referenzprobe zur Verfügung, auf welche die Quantifizierung von PrP^{Sc} bezogen werden könnte.

Das verwendete Hirngewebe ist nach der Homogenisierung aufgrund seiner Viskosität und Struktur nicht ohne weiteres zerschäumbar und muss deshalb stark verdünnt werden. Die mit einer Verdünnung verbundene Verringerung der Konzentration des PrP^{Sc} ist sinnvoll, denn in anderen Gewebearten oder Körperflüssigkeiten liegt dieses in wesentlich geringeren Konzentrationen vor als im Stammhirn. Verdünntes Hirnhomogenat dient somit als

Modellsubstrat für die Zerschäumung und Anreicherung von PrP^{Sc} aus Medien wie Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit.

Obwohl seit einigen Jahren über eine Methode zur Vermehrung von PrP^{Sc} berichtet wird, die PMCA (protein misfolding cyclic assay) [SOTO 2002], kann damit gewonnenes PrP^{Sc} derzeit noch nicht in Reinform beschafft werden. Auch diese Methode bietet daher keine Alternative zur Verwendung von pathologischem Stammhirn erkrankter Rinder als Quelle für das pathologische Prionprotein.

3. Lösungsmittel für die Zerschäumung

Die Verdünnung des homogenisierten Stammhirnes bzw. des rekombinanten Prionproteins rPrP erfolgt mit Phosphat-gepuffertes, physiologischer Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS). Die physiologische Lösung ist den Bedingungen in Körpermedien ähnlicher als reines Wasser, in dem, bei empfindlichen Proteinen, Veränderungen auftreten können. Außerdem stellt das Zerschäumen in diesem gepufferten System einen konstanten pH-Wert sicher.

4. Generieren des Schaumes

Stickstoff als Zerschäumungsgas

Für die Generierung des Schaumes wird bei allen Zerschäumungen inertes Stickstoffgas verwendet. Chemische Veränderungen durch das Zerschäumungsgas (z.B. Oxidation durch Luft oder O₂) oder Beeinflussung des pH-Wertes (z.B. durch CO₂) sind damit ausgeschlossen. N₂ ist außerdem wesentlich kostengünstiger als andere verwendbare Inertgase (z.B. Helium).

Porosität der Fritte

Schaum, der mit Glasfritten der Porosität 4 generiert wird, weist das günstigste Verhalten auf. Bei Fritten mit gröberer Porosität entstehen zu große Blasen und es kann kein stabiler Schaum aufgebaut werden.

Mit feineren Fritten wird ein Schaum erzeugt, der sehr ungünstiges Verhalten aufweist. Er ist so stabil, dass er kaum mehr kollabiert und die Drainage sehr langsam abläuft. Das Ergebnis ist eine stabile Schaumsäule, die nahezu ohne Anreicherungseffekt unmittelbar ins Spumatsammelgefäß überführt wird.

Weiterhin lassen sich feinere Fritten nach Gebrauch nicht mehr zuverlässig reinigen, dadurch unterscheidet sich der resultierende Schaum von einer Zerschäumung zur nächsten sehr stark.

5. Schäumungshilfsmittel SDS

Wie unter II.2.2 Grundlagen der Zerschäumungsanalyse (ab Seite 45) beschrieben, ist für die erfolgreiche Durchführung einer Zerschäumungsanalyse oftmals der Zusatz von Schäumungshilfsmitteln erforderlich, wenn die anzureichernden Inhaltsstoffe in der Vorlage nicht oberflächenaktiv genug sind und andere Inhaltsstoffe mit Tensidwirkung in zu geringen Mengen vorhanden sind.

Das Gehirn besteht v.a. aus Wasser, Lipiden (Cholesterin, Phospho- u. Glykolipide, wenig Cholesterinester und Neutralfette), Eiweiß (mit relativ hohem Gehalt an freien Aminosäuren) sowie wenig Kohlenhydraten (v.a. Glykogen) [ROCHE 2006]. Hirngewebeproteine sind oberflächenaktiv und ermöglichen grundsätzlich eine Schaumbildung. Durch die notwendige Verdünnung des Hirnhomogenates sinkt jedoch die Konzentration an oberflächenaktiven Bestandteilen stark. Um den Aufbau einer Schaumsäule, speziell für die Gewinnung mehrerer Spumate aus einer Vorlage zu ermöglichen, ist daher die Zugabe eines Tensides notwendig.

Der Vergleich verschiedener Schäumungshilfsmittel erfolgt einerseits nach den Gesichtspunkten des Schaumverhaltens (Beschaffenheit, Stabilität, Drainage) und andererseits anhand der erzielten Anreicherung von pathologischem Prionprotein. Der Aufbau der Schaumsäule ist entscheidend für den Erfolg der Zerschäumung. Das Schaumverhalten kann jedoch, anders als die Anreicherung, nicht quantifiziert werden.

Wie aus Abbildung IV.3 (Seite 74) ersichtlich, führt bei der Zerschäumung von verdünnter Magermilch mit rekombinantem PrP als Modellsubstrat unter Zusatz von BSA, SDS und Tween 20, lediglich SDS zu einer Anreicherung. Weiterhin zeigt die Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit den Tensiden CTAB, SDS und einem Gemisch aus SDS und Tween 20, dass auch beim PrP^{Sc} die beste Anreicherung mit SDS erzielt werden kann.

BSA und Tween 20 sowie deren Gemisch bewirken die Bildung eines sehr feuchten Schaums, der schnell kollabiert. Der Aufbau einer Schaumsäule kann nicht erreicht werden, daher erfolgen weder ein Rücklauf abgereicherter Flüssigkeit (Drainage) noch die Bildung von Lamellenschaum.

Bei der Zerschäumung mit SDS hingegen treten starke Drainageeffekte auf. Im Frontbereich der Schaumsäule liegt stark entwässerter Polyederschaum vor. Die Drainage zwischen den Oberflächen der Stickstoffblasen, vor allem in den Gibbs-Kanälen, und somit das Entstehen eines trockenen Schaums ist die Hauptursache für die erzielbare Anreicherung mit SDS als Schäumungshilfsmittel.

Als weitere Ursache für die besten Resultate bei der Zerschäumung mit SDS muss auch eine Veränderung der Struktur des PrP^{Sc} durch dieses spezielle Tensid in Erwägung gezogen werden.

Tenside können bei Proteinen eine Denaturierung bewirken, und gerade die Veränderung der Sekundär-, Tertiär- und evtl. auch Quartärstruktur sowie das Auffalten an der Pha-

sengrenzfläche haben bei der Zerschäumung großen Einfluss auf das Schaumverhalten und die Anreicherung der Proteine [CLARKSON 1999, KINSELLA 1987]. Die stark anionischen Eigenschaften des SDS können beim PrP^{Sc} möglicherweise eine Strukturveränderung bewirken, die die Anreicherung im Schaum begünstigt. Suzuki [SUZUKI 2002] stellte bei Zerschäumungen eines Proteingemisches mit SDS fest, dass dieses Tensid aufgrund seiner Wirkung auf Proteine zur selektiven Anreicherung einer Komponente führte.

5.1. SDS-Konzentration

Ein hoher SDS-Zusatz verringert einerseits die Anreicherung von PrP^{Sc} bei der Zerschäumung in Magermilch (Abbildung IV.4, Seite 75) und bewirkt andererseits beim ELISA etwas geringere O.D.-Werte (Abbildungen IV.5, Seite 76 und IV.6, Seite 78). Daher wurde bei den Zerschäumungen in dieser Arbeit gerade genug SDS zugegeben, um die sukzessive Gewinnung mehrerer Spumatfraktionen zu ermöglichen. Die Entnahme mehrerer Spumatfraktionen ist notwendig, weil hohe Anreicherungsfaktoren erst in den späteren Fraktionen erzielt werden. Die Ursachen hierfür werden noch erörtert.

Die Beeinträchtigung des ELISA-Signales durch SDS bei den in dieser Arbeit eingesetzten SDS-Konzentrationen im Bereich von 230 mg SDS/L ist geringfügig und wird deshalb in der Diskussion nicht berücksichtigt.

5.1.1. Auswirkung von SDS auf die Anreicherung von PrP^{Sc}

Chang [CHANG 2000] stellte bei der Zerschäumung eines Phosphates fest, dass diejenige Konzentration des Tensids für die Anreicherung am günstigsten ist, die gerade noch eine ausreichende Schaumbildung ermöglicht. Optimale Anreicherungsfaktoren wurden auch bei der Zerschäumung von Zinkionen mit möglichst geringem Tensidzusatz erzielt [KONDURU 1992].

Nimmt man an, dass die oberflächenaktiven Verbindungen entsprechend ihrer Affinität zur Grenzfläche angelagert werden, wie beispielsweise bei Schnepf [SCHNEPF 1959] beschrieben, so erscheint es plausibel, dass ein Überschuss an Tensid zu einer Verdrängung anderer anzureichernder Komponenten von der Phasengrenzfläche führt. Überschuss bedeutet, dass mehr Tensid zugegeben wird, als zur Generierung des Schaumes notwendig ist. Das Verhältnis der Mengen von Zielsubstanz (z.B. PrP^{Sc}) und Tensid (z.B. SDS) in der Vorlage hat Einfluss auf das Verhältnis, in dem die Anlagerung beider Komponenten an die Phasengrenzfläche erfolgt. Je höher der Anteil einer der Komponenten im Gemisch ist, desto höher ist bei gleicher Affinität dessen Anteil an der Phasengrenzfläche. Gerade bei den Tensiden, die i.d.R. eine sehr viel stärkere Affinität zur Phasengrenzfläche haben als Proteine, wirkt sich eine erhöhte Konzentration verringernd auf den Anteil der Proteine an der Grenzfläche aus.

Der Effekt steigender SDS-Konzentration in der Vorlage auf die Anreicherung im Schaum

ist in Abbildung IV.4 auf Seite 75 zu erkennen. Die drei Vorlagen sind in der Zusammensetzung, abgesehen vom variierenden Gehalt an SDS, identisch. Bei steigender SDS-Konzentration (Variation über eine Größenordnung) sinkt der O.D.-Wert und somit die Anreicherung im Spumat.

5.1.2. Auswirkung von SDS auf den ELISA

SDS beeinflusst auch die Quantifizierung des PrP^{Sc} mittels ELISA. Dies wurde mit pathologischem Hirnhomogenat unter Zusatz verschiedener Mengen an SDS untersucht. In den Proben, die in Abbildung IV.6 (Seite 78) dargestellt sind, wurde eine SDS-Konzentration von 230 mg SDS/L eingestellt, wie sie auch zur Zerschäumung verwendet wird. Gegenüber der Kontrollprobe ohne Zugabe von SDS verringert sich der O.D.-Wert nur marginal. Bei dem ELISA, der in Abbildung IV.5 (Seite 76) dargestellt ist, wurde SDS in etwa der doppelten Konzentration (500 mg SDS/L) eingesetzt, was eine deutliche Verringerung des Signals bewirkt.

Die Ursache für geringere Signale (O.D.-Werte) liegt in der Denaturierung des Prionproteins, die bei Zusatz von hohen Mengen an SDS auftritt.

5.1.3. Wirkung des SDS auf das pathologische Prionprotein

Die Denaturierung durch das anionische SDS führt dazu, dass die Infektiosität des PrP^{Sc} verringert wird [HÖRNLIMANN 2001a]. Diese teilweise Inaktivierung wird allerdings erst bei Konzentrationen um 3 % SDS erreicht.

Riesner [RIESNER 2001a] beschreibt, dass das PrP^{Sc} nicht länger infektiös ist, wenn es in eine lösliche Form gebracht wird, z.B. durch SDS.

Ob die Infektiosität bereits bei den hier eingesetzten geringen Konzentrationen des SDS verringert wird, könnte nur durch einen Bioassay (Tierversuch) zuverlässig überprüft werden. Die Tatsache, dass die ELISA-Antikörper das PrP^{Sc} binden, lässt alleine noch keine Aussage darüber zu, ob es noch infektiös ist. Wie oben beschrieben, wird in dieser Arbeit eine Abhängigkeit sowohl des Signals im ELISA als auch der Anreicherung bei der Zerschäumung von der SDS-Konzentration sichtbar. Dies belegt eine Veränderung der Struktur des PrP^{Sc} durch das anionische SDS auch bei Konzentrationen weit unter 3 %.

5.2. SDS und Ultraschallbehandlung von PrP^{Sc}

In den Abbildungen IV.5 (Seite 76) und IV.6 (Seite 78) sind die Auswirkungen von SDS und Ultraschall auf das Quantifizierungsergebnis von PrP^{Sc} mittels ELISA dargestellt. Ultraschall bei gleichzeitiger Anwesenheit von SDS soll eine Auflösung von PrP^{Sc}-Assoziaten bewirken [RIESNER 2001a]. Die Zerteilung großer Assoziate durch Ultraschall

führt zu einem höheren O.D.-Wert im ELISA, SDS hingegen verringert den O.D.-Wert (s.o.). Eine Ultraschallbehandlung vor der Zerschäumung ergibt somit keinen Sinn, da das Schäumungshilfsmittel SDS im Zusammenwirken mit dem Ultraschall das Signal im ELISA verringert.

6. Zentrifugationsverhalten von PrP^{Sc}

Hirnhomogenat wurde in dieser Arbeit aus zwei Gründen zentrifugiert: zum einen, um Aufschluss über den Aggregations- bzw. Assoziationszustand des PrP^{Sc} zu gewinnen, zum anderen, um PrP^{Sc} vom begleitenden Hirnmaterial zu trennen.

Das als Modell für die Anreicherung von PrP^{Sc} aus begleitstoffarmem *Liquor cerebrospinalis* dienende pathologische Hirnhomogenat sollte weitgehend von Matrixbestandteilen befreit werden, denn diese beeinträchtigen die Effektivität der Zerschäumung stark.

Wie aus Abbildung IV.5 (Seite 76) und Tabelle IV.1 (Seite 77) ersichtlich ist, befindet sich das PrP^{Sc} nach der Zentrifugation stets im Sediment (Zentrifugat). Die Abreicherung im Überstand nimmt nach jedem Zentrifugationsvorgang zu (siehe Abbildung IV.5, Seite 76). Der überwiegende Anteil des PrP^{Sc} sedimentiert zusammen mit den partikulären Bestandteilen des Hirnhomogenates, d.h. unter den angewandten Zentrifugationsbedingungen kann das PrP^{Sc} nicht von den Begleitstoffen aus dem Hirnhomogenat getrennt werden.

Das Sedimentationsverhalten bei der Zentrifugation zeigt weiterhin, dass das pathologische PrP^{Sc} entweder an Fragmente oder Komponenten des Hirngewebes aggregiert ist oder in einer assoziierten Form vorliegt. Es kann ausgeschlossen werden, dass das pathologische Prionprotein monomer gelöst ist.

7. Stationäre Zerschäumung

Für die Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat zur Anreicherung des PrP^{Sc} erwies es sich als günstig, nach dem Aufbau der Schaumsäule eine definierte Zeit bei konstanter Schaumsäulenhöhe zu zerschäumen („stationäre Zerschäumung“). Dazu wird zunächst der Gasvolumenstrom so geregelt, dass sich langsam eine Schaumsäule bis zu der Biegung des Zerschäumungsrohres aufbaut (siehe Abbildung III.1, Seite 62). Dann wird der Gasstrom reduziert, so dass die Schaumsäule bei dieser Höhe stehen bleibt. Dieser Zustand, in dem ein Gleichgewicht zwischen Kollabieren und Schaumbildung besteht, wird über eine definierte Zeitspanne aufrecht erhalten. Der Aufbau der Schaumsäule und die stationäre Schäumung zusammen werden etwa 20 min lang durchgeführt. Nach dieser Zerschäumungsdauer wird der Gasvolumenstrom erhöht und Schaum in das Spumatsammelgefäß überführt.

Vor allem im Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Zerschäumungsverlaufes ist die stationäre Zerschäumung günstig, weil die Höhe der Schaumsäule ein gut durch den Volumenstrom regulierbarer und konstant haltbarer Parameter ist. Versuche, bei einzelnen Zerschäumungen mit gleichem, konstantem Volumenstrom zu arbeiten, führten zu sehr unterschiedlichen Zeitspannen, bis eine Schaumsäule aufgebaut wurde und Spumat gesammelt werden konnte, was nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Dies ist auf die Inhomogenität des Substrates, die Veränderung der Fritte sowie auf weitere Parameter zurückzuführen, wie z.B. die Temperatur, die nicht konstant gehalten werden können. Wie Bartsch [BARTSCH 1926] beschrieb, sind Schaumsysteme einer Vielzahl von Einflüssen gegenüber sehr empfindlich, u.a. der Temperatur.

Neben dem eben beschriebenen praktischen Vorteil sollte die stationäre Zerschäumung auch eine Verbesserung der Anreicherung bewirken. Der Rückfluss abgereicherter Flüssigkeit sowie Koaleszenz und Kollabieren des Schaumes an der Schaumsäulenfront stellen die maßgeblichen Voraussetzungen für eine hohe Anreicherung im Schaum dar. Diese drei Vorgänge erfolgen beim stationären Schäumen verstärkt.

Stationäres Schäumen führt zu einem erhöhten Transport von Phasengrenzfläche, so dass sich eine Komponente mit stärkerer Affinität zur hydrophoben Phasengrenzfläche an der Front der Schaumsäule mit fortschreitender Zerschäumungsdauer stärker anreichern kann, als wenn die Schaumsäule nur aufgebaut und dann sofort Spumat abgenommen wird. Denn angereichertes Fluid (Kollabat) fließt in den Schaum zurück und tritt in Wechselwirkung mit der bereits angereicherten Phasengrenzfläche. So stellt sich an der Phasengrenzfläche ein neues Gleichgewicht zwischen den angereicherten Substanzen ein, das zu Gunsten der Komponente mit der höheren Affinität, die im Rücklauf schon stärker angereichert vorliegt, verschoben ist. Die stationäre Zerschäumung sollte daher auch zu einem verbesserten Separationseffekt beitragen.

Die Zerschäumung führt bei vielen Proteinen zu einer Denaturierung an der Phasengrenzfläche, was die Affinität des Proteins zur Phasengrenzfläche noch steigern kann [KINSELLA 1987]. Auch dies könnte beim stationären Schäumen die Anreicherung verstärken, vergleichbar einer Rückführung des Spumates in die Zerschäumung (Zerschäumung im Kreislauf).

Diese theoretisch betrachteten Effekte der verbesserten Anreicherung und Separation durch stationäre Zerschäumung konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht detailliert untersucht werden. Bei Hirnhomogenat kann, aufgrund der komplexen Matrix, keine eindeutige Erkenntnis zum Verhalten der Anreicherungsfaktoren des PrP^{Sc} gewonnen werden. Dies müsste anhand der Zerschäumung einer Modellösung mit nur wenigen Komponenten detailliert überprüft werden.

8. Proteaseaktivität und Verdauungsstabilität von PrP^{Sc}

Als selektiver Schritt für die Unterscheidung des pathologischen vom zellulären Prionprotein wird eine Verdauung mit Proteinase K durchgeführt. Neben der weitgehenden Stabilität des pathologischen Prionproteins gegenüber einer Verdauung mit Proteinase K [RIESNER 2001b] muss auch ein völliger Abbau des zellulären PrP sichergestellt sein, damit dieses im ELISA nicht an die unspezifischen Anti-PrP-Antikörper bindet und als PrP^{Sc} quantifiziert wird.

In verschiedenen Proben aus Spumat oder Vorlage sind sehr unterschiedliche Mengen an PrP^{Sc} sowie stark schwankende Mengen an Matrixmaterial und Proteinen enthalten. Die zur Verdauung zugegebene Menge an Proteinase K kann nicht an die vorliegenden Gehalte an verdaubarem Material und PrP^{Sc} angepasst werden, da diese nicht bekannt sind.

Damit die Messergebnisse aus dem ELISA Aussagekraft erhalten, dürfen die unterschiedlichen Voraussetzungen der Probenzusammensetzung keinen Einfluss auf die Quantifizierung des PrP^{Sc} ausüben. Um dies sicherzustellen wurden Proben mit konstantem PrP^{Sc}-Gehalt aber verschiedenen Gehalten an Matrixbestandteilen hergestellt. Zu diesen wurden variierende Mengen an Proteinase K gegeben und die Inkubationsdauer der Proteinase K gegenüber der Anweisung des Testkits leicht verändert. Im ELISA resultierten daraus keine unterschiedlichen O.D.-Werte. Die Stabilität von PrP^{Sc} ist folglich auch noch bei einem stärkeren Überschuss an Proteinase K und bei verlängerter Inkubationszeit gewährleistet. Zugleich erfolgt bei verringerter PK-Menge oder bei verkürzten Inkubationszeiten sowie bei erhöhtem Anteil an Matrixmaterial der völlige Abbau des PrP^C und des übrigen Proteins der Matrix.

9. Zerschäumungsverhalten der Matrix Hirnhomogenat

Um die Einflüsse zu ermitteln, welche die Matrix des Hirnhomogenats bei der Zerschäumung ausübt, wird neben den Zerschäumungen von pathologischem Hirnhomogenat, das dann auf den Gehalt an PrP^{Sc} untersucht wird, nach demselben Protokoll Stammhirnhomogenat eines gesunden Rindes zerschäumt. Die Spumate und entsprechenden Proben aus dem Sumpf wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht.

Die Bestandteile des Hirnhomogenates haben starke Auswirkungen auf den Verlauf und Erfolg der Zerschäumung. Auch die Anreicherung des pathologischen PrP^{Sc} wird durch den Separationseffekt der Zerschäumungsanalyse auf die Matrix beeinflusst.

Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Anwesenheit von Zuckern und Salzen [TOWNSEND 1983, DESOUZA 1991], anwesende Proteine [BROWN 1998, MARUYAMA 2000] und andere in der Vorlage befindliche Stoffe oder Teilchen beeinflussen das Anreicherungs- und Separationsverhalten bei der Zerschäumung.

9.1. Separation dispergierter Zellfragmente

Bei der Zerschäumung von Hirnhomogenat ist in der ersten Vorlage stets eine Trübung zu erkennen während die Trübung der Vorlage verschwindet. Je nach Konzentration des Hirnhomogenates sind diese unterschiedlich stark ausgeprägt. Ursächlich sind die partikulären Bestandteile der Matrix. Durch die Zerschäumung werden diese in der ersten oder den ersten beiden Spumatfraktionen angereichert, abhängig von der Menge an zugegebenem Homogenat. Die partikulären Zellbestandteile, die suspendiert in einer Lösung von Proteinen vorliegen, werden bevorzugt auch gegenüber kleinen Proteinen mit hoher Affinität zur Phasengrenzfläche abgeschäumt. Wie im Elektropherogramm in Abbildung IV.1 (Seite 72) ersichtlich ist, sind in den ersten Spumatfraktionen alle Proteinkomponenten in geringerer oder maximal gleicher Menge enthalten wie in der Vorlage. Das bedeutet, dass zu Beginn der Zerschäumung die partikulären Komponenten im Spumat bevorzugt angereichert, die löslichen Proteine hingegen abgereichert werden.

Die vorrangige Flotation der partikulären Zellbestandteile zeigt sich auch bei der Quantifizierung des pathologischen Prionproteins durch den ELISA: in Abbildung IV.17 (Seite 90), die das Ergebnis aus der Zerschäumung eines Gemisches aus pathologischem mit viel gesundem Hirnhomogenat darstellt, wird die maximale PrP^{Sc}-Konzentration erst in späteren Spumatfraktion erreicht als bei der Zerschäumung von unverschnittenem pathologischem Hirnhomogenat. Die Konsequenz aus einem sehr hohen Anteil an dispergierten Zellfragmenten (durch die Zugabe einer sehr großen Menge an BSE-negativem Hirnhomogenat) ist die Verzögerung der Anreicherung des pathologischen PrP^{Sc} hin zu späteren Spumatfraktionen.

Ein weiterer Beleg für die beschriebene Verzögerung der Anreicherung des Prionproteins durch Zellfragmente wird im Vergleich der Zerschäumungen mit pathologischem Hirnhomogenat zu derjenigen ganz ohne Begleitstoffe (Abbildung IV.8, Seite 80) deutlich. Hier wird reines rekombinantes PrP aus einer Lösung von PBS mit SDS geschäumt. PrP^C und PrP^{Sc} weisen keine identische Struktur auf und unterscheiden sich in für die Zerschäumung wichtigen Eigenschaften, können also nicht direkt verglichen werden. Doch als Modell für eine Zerschäumung ohne begleitende Zellfragmente ist diese Variante zur Abtrennung nur einer Komponente aus der Vorlage sehr aufschlussreich. Weil hier keine Proteine oder Partikel vorliegen, die bevorzugt an der Phasengrenzfläche mit in den Schaum getragen werden, kann das Anreicherungsverhalten von Protein ohne Matrixeffekte betrachtet werden.

Das rekombinante PrP wird in der ersten Fraktion auf die absolut höchste Konzentration angereichert, in allen folgenden Spumaten nimmt die Konzentration ab. Der Verlauf der Anreicherung in den einzelnen Spumatfraktionen zeigt deutlich, dass die Anreicherung bei der Zerschäumung aus einer Vorlage ohne Begleitstoffe zur höchsten Menge an PrP in der ersten Spumatfraktion führt. Ganz anders verlaufen die Zerschäumungen, bei denen die partikulären Matrixbestandteile des Hirnhomogenates die Anreicherung des PrP^{Sc} in den ersten Spumatfraktionen beeinträchtigen.

Es findet bei der Zerschäumung von Hirnhomogenat durch Flotation eine selektive Abtrennung der Zellfragmente in den ersten Spumaten statt.

Bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat ist daher zu beachten, dass das PrP^{Sc} erst nach Abschäumen der Zellfragmente effektiv angereichert wird.

Definitionsgemäß handelt es sich bei dieser Abtrennung von partikulären Zellbestandteilen um eine Flotation, weil der angereicherte Stoff nicht echt gelöst sondern partikulär ist und suspendiert in der Lösung vorliegt. Das ist daran zu erkennen, dass diese Zellfragmente sowohl in Ruhe als auch bei der Zentrifugation rasch sedimentieren.

Für eine Anreicherung von PrP^{Sc} aus einer Körperflüssigkeit wie *Liquor cerebrospinalis* lässt dieses Verhalten sehr gute Anreicherungsfaktoren bereits in den ersten Spumatfraktionen erwarten, da in solchen Medien kaum Begleitstoffe und keine partikulären Bestandteile vorhanden sind. Im Falle der Zerschäumung von homogenisiertem Blut ist ein Separationseffekt der zerkleinerten Blutbestandteile zu erwarten.

9.2. Proteinseparation

In der Literatur existieren bereits Untersuchungen zum Separationsverhalten von Proteinen bei der Zerschäumung [SUZUKI 2002, SALEH 2001, ANAND 1995]. Es beruht auf den verschiedenen Affinitäten der Proteine zur Phasengrenzfläche, die durch Größe, Struktur sowie Ladungszustand festgelegt sind. Struktur und Ladungszustand werden u.a. vom pH-Wert bedingt. Auch Tenside können den Ladungszustand beeinflussen und eine Veränderung im Anreicherungsverhalten bewirken [SUZUKI 2002].

Die Abbildungen IV.1 (Seite 72) und IV.2 (Seite 73) zeigen die Elektropherogramme der Spumate und Vorlagen aus der Zerschäumung von Stammhirnhomogenat eines gesunden Rindes. Bei den Spumaten ist ersichtlich, dass es durch die Zerschäumung zu einer deutlichen Anreicherung von Proteinen kommt. Diese betrifft nicht das gesamte Proteingemisch gleichermaßen. Unterschiedliche Proteine bzw. Gruppen von Proteinen werden bevorzugt in früheren oder späteren Spumatfraktionen angereichert. Das komplexe Gemisch aus Proteinen und Zellbestandteilen erfährt durch die Zerschäumung eine Separation.

Die Elektropherogramme lassen keine explizite Aussage über das Anreicherungsverhalten speziell von pathologischem Prionprotein zu. Sie zeigen jedoch anschaulich, wie unterschiedlich stark sich verschiedene Proteine in den sukzessiv entnommenen Spumaten anreichern.

Proteine mit einer Größe bis etwa 60 kDa liegen in den früher gewonnenen Spumaten, abgesehen vom ersten, in der höchsten Konzentration vor. Größere Proteine sind in der zuletzt aufgezeigten Spumatfraktion maximal angereichert, in den ersten hingegen stark abgereichert.

Die Tendenz, dass kleinere Proteine besser schäumbar sind als größere, beschreibt auch Dickinson [DICKINSON 1989].

Sehr deutlich ist in dem Elektropherogramm der Spumate (Abbildung IV.1, Seite 72) zu erkennen, dass in der ersten Spumatfraktion bei keinem der getrennten Proteine eine Anreicherung auftritt. Die Ursache hierfür liegt in der vorrangigen Abtrennung von partikulären Zellbestandteilen des Gehirngewebes (s.o.).

9.3. Art der Aggregation des PrP^{Sc}

Wie oben beschrieben, ist das PrP^{Sc} im Hirnhomogenat nicht monomer gelöst. Nachfolgend wird erörtert, in welcher aggregierten oder assoziierten Form es vorliegt.

9.3.1. Aggregation des PrP^{Sc}

Das PrP^{Sc} ist zum Zeitpunkt der Zerschäumung nicht mehr überwiegend an größere Zellfragmente aggregiert. In diesem Fall müssten die Konzentrationen des PrP^{Sc} mit der Trübung einhergehen, und so auch in dem resp. den ersten Spumat(en) am höchsten sein, da dort die stärkste Trübung auftritt (s.o.).

Weiterhin dürfte im Falle einer Aggregation des PrP^{Sc} an Partikel oder Zellfragmente bei Zerschäumungen mit steigenden Hirnhomogenat-Konzentrationen in der Vorlage keine Verschlechterung der PrP^{Sc}-Anreicherung im ersten Spumat auftreten, wie sie in den Abbildungen IV.11 bis IV.14 (Seiten 85 bis 87) abzulesen ist. Noch deutlicher zeigen die Abbildungen IV.15 (Seite 88) und V.2, (Seite 108), dass die Anreicherung im ersten Spumat abnimmt, je mehr Zellfragmente sich in der Vorlage befinden.

PrP^{Sc} liegt im Hirnhomogenat somit nicht an Zellfragmente aggregiert vor.

9.3.2. Assoziation des PrP^{Sc}

PrP^{Sc} assoziiert unter physiologischen Bedingungen, sobald es aus den „rafts“ gelöst wird [RIESNER 1996]. Es liegt unabhängig von der Verdauung als Assoziat vor.

Bei der Zerschäumung von 1/308 pathologischem Hirnhomogenat in PBS mit SDS (Abbildung IV.13, Seite 86) entspricht die Konzentration an pathologischem Hirnhomogenat in der Vorlage der des Elektropherogramms in Abbildung IV.1 (Seite 72). Bei der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat treten die höchsten Mengen an PrP^{Sc} in frühen Spumatfraktionen auf, jedoch nicht in der ersten. Auf die höchste Konzentration wird es nach den partikulären Zellbestandteilen angereichert, doch diese Anreicherung überschneidet sich mit derjenigen der partikulären Zellfragmente und der kleinen Proteine.

Die Ursache für dieses Anreicherungsverhalten in der Zerschäumung scheint darin zu liegen, dass die Assoziate des pathologischen Prionproteins bevorzugt gegenüber bzw. teilweise zusammen mit den gelösten kleinen monomeren Proteinen abgeschäumt werden. Die PrP^{Sc}-Assoziate werden jedoch überwiegend nach den Zellfragmenten abgeschäumt, die gleich zu Beginn in die erste(n) Spumatfraktion(en) gelangen. Im Allgemeinen treten bei der Zerschäumung bzw. Flotation keine scharfen Trenngrenzen auf, daher überlappt die Anreicherung der PrP^{Sc}-Assoziate sowohl mit den davor abgeschäumten partikulären Matrixbestandteilen als auch mit der Aufkonzentrierung der löslichen Proteine.

10. Auswirkungen der Proteolyse des Hirnhomogenates auf die Zerschäumung

Die Auswirkungen einer Proteinase K-Verdauung des Hirnhomogenates auf die Zerschäumung sind in den Abbildungen IV.9 (Seite 81) resp. IV.10 (Seite 82) im Ergebnisteil ersichtlich. Dort sind die erzielten Anreicherungen des PrP^{Sc} bei einer PK-Verdauung des Hirnhomogenates vor der Zerschäumung resp. der Zerschäumung von unbehandeltem Hirnhomogenat dargestellt. Um die Unterschiede in einem direkten Vergleich deutlich zu machen, sind beide Diagramme einander in Abbildung V.1 (Seite 105) gegenübergestellt.

Für einen Nachweis von PrP^{Sc} nach der Anreicherung durch die Zerschäumung wäre es günstig, wenn man das Hirnhomogenat bereits vor der Zerschäumung verdauen würde. Die Proteolyse könnte in einer Charge durchgeführt und die Spumate nach der Schäumung direkt im ELISA untersucht werden. Erfolgt die Verdauung hingegen nach der Zerschäumung, so müssen alle Spumatfraktionen sowie Rückstandsproben aus dem Sumpf vor dem Immunoassay einzeln verdaut werden.

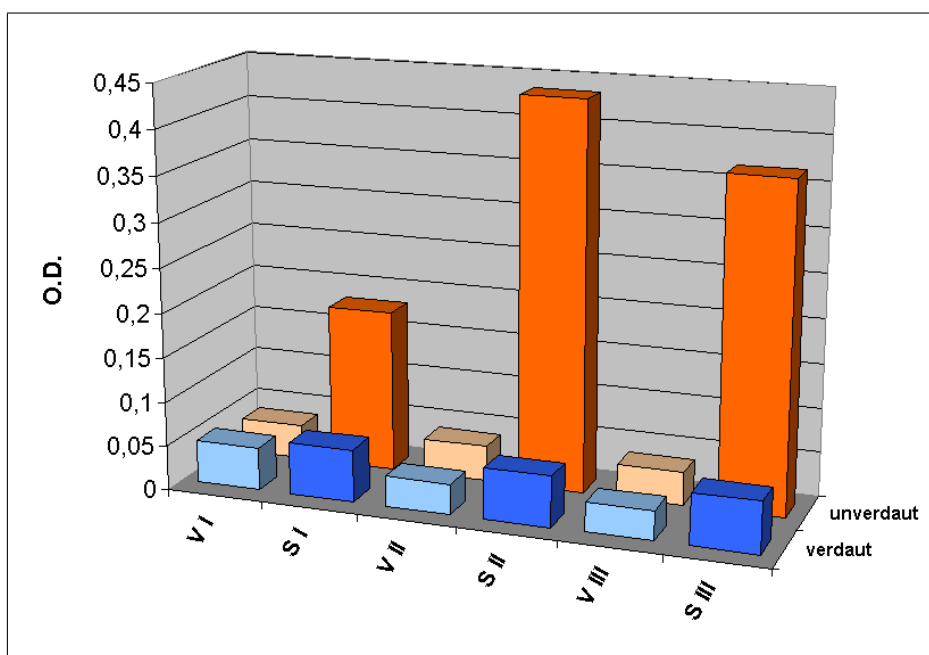


Abbildung V.1.: Zerschäumung von verdaulichem und nativem pathologischem Hirnhomogenat: Gegenüberstellung von Proben aus dem Sumpf (V) und Spumats bzgl. des PrP^{Sc}-Gehaltes. Die blauen Balken stammen vom verdaulichem PrP^{Sc}, die orangenen vom nativem pathologischen Hirnhomogenat.

Bezüglich der Veränderung der Struktur und Form des PrP^{Sc} durch die Verdauung ist Folgendes bekannt:

Das unverdaulichem PrP^{Sc} hat vor einer Verdauung und Assoziation im nativem Hirngewebe ein Molekulargewicht von 33 bis 35 kDa zuzüglich GPI-Anker (PrP³³⁻³⁵+GPI, siehe Abbildung II.1, Seite 14). Laut Shaked [SHAKED 2002] ist es durch einen GPI-Anker in den sog. *rafts* an der Zelloberfläche verankert. Sobald das PrP^{Sc} diese durch Verdauung des Proteins oder denaturierende Einflüsse auf die *rafts* verlässt, bildet es Assoziate verschiedener Ausformung.

Die Zerkleinerung durch das „Ribulizen“, wie es in dieser Arbeit erfolgt, ist wahrscheinlich ausreichend effektiv, so dass die Zellwand zerkleinert wird und das PrP^{Sc} nicht mehr an größeren Zellwandfragmenten verankert vorliegt. Auch das SDS wirkt denaturierend auf die *rafts* [NASLAVSKY 1997, TARABOULOS 1995]. Ob die eingesetzte SDS-Konzentration von etwa 230 mg/L schon genügt, um diese Denaturierung der *rafts* zu bewirken oder ob die Homogenisierung die Ursache für die Freisetzung ist, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Es wurde bereits belegt, dass das PrP³³⁻³⁵+GPI zum überwiegenden Teil nicht mehr an Fragmente der Zellwand aggregiert ist.

Bei der Verdauung des nativem Hirnhomogenates entsteht durch die proteolytische Wirkung der Proteinase K aus dem pathologischen Prionprotein (PrP³³⁻³⁵+GPI) das verkürz-

te pathologische Prionprotein PrP²⁷⁻³⁰. Sowohl GPI-Anker als auch N-Terminus werden durch die Protease abgetrennt [PRUSINER 1998] (siehe Abbildung II.1, Seite 14). Das resultierende PrP²⁷⁻³⁰ liegt in Aggregaten verschiedener Ausformung vor [RIESNER 2001a]. Das Sedimentationsverhalten bei der Zentrifugation weist deutlich darauf hin, dass es in Form von Aggregaten vorliegt, die im Schwerefeld abgetrennt werden. Wie weit diese Assoziate durch das SDS wieder in Lösung gebracht werden, ist nicht klar.

Wie die Ergebnisse aus der Zerschäumung zeigen, kann die unverdaute Form des Prionproteins PrP³³⁻³⁵+GPI aus unverdaulichem Hirnhomogenat im Rahmen der Zerschäumung wesentlich besser angereichert werden als das proteolytisch verkürzte PrP²⁷⁻³⁰, obwohl beide assoziiert vorliegen. Da PrP²⁷⁻³⁰ räumlich anders strukturiert ist als PrP³³⁻³⁵+GPI, weist es auch in aggregierter Form eine andere Struktur auf, die das Anreicherungsverhalten mit bedingt. Welche Formen das pathologische Prionprotein bei den in dieser Arbeit angewandten Prozessen unter den vorliegenden Bedingungen annimmt, und wie es assoziiert, kann der Literatur nicht entnommen werden.

Einige Proteine sind bzgl. der Änderung ihres Verhaltens bei der Zerschäumung nach einer Proteolyse beschrieben. Bei diesen führt die Verdauung stets zu einer Verbesserung der Schaumbildung und zu einer Verringerung der Schaumstabilität, beruhend auf der Änderung der molekularen Struktur und Größe der Proteine [KINSELLA 1987].

Dieses Verhalten bezüglich der Größe bestätigt die vorliegende Arbeit für lösliche Proteine aus gesundem Rinderstammhirn. Im Elektropherogramm (Abbildung IV.1, Seite 72) sind bevorzugt – also bereits in früheren Spumatfraktionen – kleinere Proteine angereichert. Dickinson [DICKINSON 1989] beschreibt, dass partielle Hydrolyse zu einer Verbesserung der Schäumbarkeit führt, einerseits wegen der resultierenden geringeren Molekülgrößen, andererseits, weil zuvor verborgene hydrophobe Reste nach außen gewandt werden.

Im Falle der Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat führt die Proteolyse hingegen zu einer Verschlechterung der Anreicherung des pathologischen Prionproteins. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu den beschriebenen Beobachtungen früherer Untersuchungen. Denn die von Kinsella [KINSELLA 1987] und Dickinson [DICKINSON 1989] beschriebenen Proteine sind wasserlöslich und werden bei der Verdauung proteolysiert, das pathologische Prionprotein hingegen ist hydrophob und weitgehend stabil gegenüber einem Abbau durch Proteolyse. Das bedeutet, dass es beim Verdauen von pathologischem Prionprotein nicht zur Zerkleinerung des Polypeptides PrP^{Sc} zu Oligopeptiden oder einzelnen Aminosäuren kommt, da das PrP²⁷⁻³⁰ nicht weiter proteolysiert wird. Das PrP^{Sc} liegt vor und nach der Verdauung in Form von Assoziaten vor.

Die Unterschiede der Strukturen von $\text{PrP}^{33-35}+\text{GPI}$ (mit N-Terminus und GPI-Anker) und verdaulichem PrP^{27-30} bewirken eine veränderte Affinität zur Phasengrenzfläche, so dass sich das Anreicherungsverhalten durch eine Proteolyse verändert.

In erster Linie beruht die schlechtere Anreicherung des Prionproteins nach der Verdauung jedoch eher auf der Verdrängung des PrP^{Sc} von der Phasengrenzfläche durch die zahlreichen kleinen Proteinfragmente und Aminosäuren, die durch die Proteolyse von Proteinen des Hirnhomogenates in großer Menge entstehen.

In Abbildung V.1 (Seite 105) ist zu sehen, dass bei der Zerschäumung des unverdaulichem Hirnhomogenates die PrP^{Sc} -Konzentration schon im zweiten Spumat sehr stark ansteigt, sobald die Zellfragmente abgeschäumt sind. Beim verdaulichem Hirnhomogenat hingegen bleibt die Anreicherung sehr gering, weil vorrangig gegenüber den verdaulichem PrP^{27-30} -Assoziaten die zahlreichen proteolysierten Teile der Matrixproteine angereichert werden.

11. Konzentration der Zielkomponente in der Vorlage

In Abbildung V.2 (Seite 108) sind die Abbildungen IV.11 bis IV.14 (Seiten 85 bis 87) der Zerschäumung von Hirnhomogenat mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen an pathologischem Hirnhomogenat in einer Darstellung zusammengefasst. So können die gemessenen absoluten Konzentrationen im Spumat und die Anreicherungen in Abhängigkeit von der Konzentration des Hirnhomogenates in der Vorlage bei den jeweils sukzessiv gewonnenen Fraktionen verglichen werden.

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der erzielten Anreicherungsfaktoren von der Konzentration des pathologischen Hirnhomogenates in der Vorlage. Außerdem spielt es eine entscheidende Rolle, wie viele Spumatfraktionen aus einer Vorlage bereits entnommen wurden. In beiden Fällen führt eine geringere Konzentration des PrP^{Sc} in der jeweiligen Vorlage zu einer höheren Anreicherung in der entsprechenden Spumatfraktion.

Die Begleitstoffe aus dem Hirnhomogenat, deren Auswirkungen oben bereits abgehandelt wurden, bewirken bei diesen Versuchen nur einen geringen Effekt im Vergleich zur Zerschäumung von verschnittenem Hirnhomogenat. Das Verhältnis von pathologischem PrP^{Sc} zu störendem Begleitmaterial ist hier bei allen Verdünnungsstufen gleich, denn eine Vermischung mit BSE-negativem Hirnhomogenat unterbleibt. Dennoch führt bei konstantem entnommenem Spumatvolumen ein höherer Gehalt an Hirnhomogenat zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Anreicherung des PrP^{Sc} in dem / den ersten Spumat(en), denn die absolute Menge an Zellfragmenten ist bei höherem Gehalt an Hirnhomogenat in der Vorlage größer.

Der maßgebliche Einfluss, der die Zunahme des Anreicherungsfaktors ER (Quotient aus den Konzentrationen in Spumat und Vorlage) bedingt (Abbildung V.2, Seite 108), ist die Abhängigkeit der erzielbaren Anreicherung des PrP^{Sc} von dessen Konzentration in

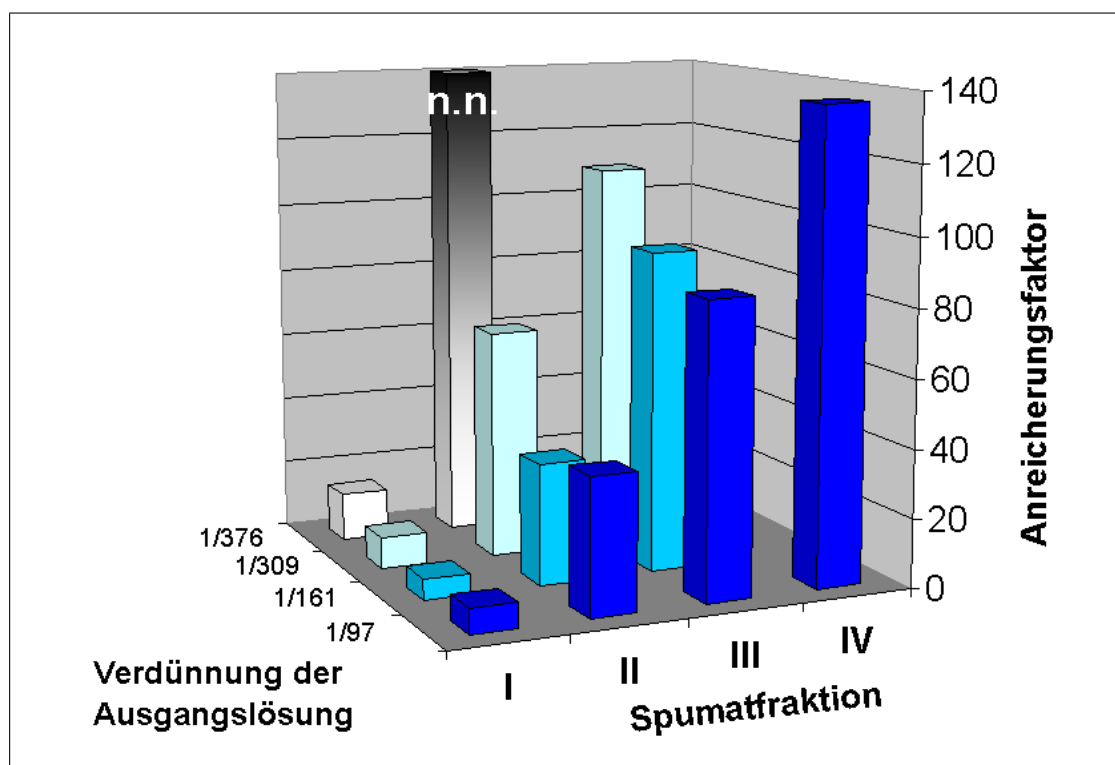


Abbildung V.2.: Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat. Für die verschiedenen Verdünnungen in der Ausgangslösung (1/97, 1/161, 1/309 und 1/376) und die jeweils sukzessiv nach 30 min Schäumen entnommenen 2 bis 4 Spumatfraktionen (I, II, III und IV) sind die Anreicherungs-faktoren des pathologischen Prionproteins dargestellt. Bei der zweiten Spumatfraktion der Verdünnungsstufe 1/376 (farblich hervorgehoben) ist ein Mindestwert angezeigt, der geringer ist als die reale Anreicherung, die jedoch nicht genau quantifiziert werden kann. Genauer beschrieben ist dies unter V.12 Maximal erzielbare Anreicherung auf Seite 109.

der Vorlage. Wie vielfach in der Literatur beschrieben (z.B. [SCHNEPF 1959]), steigt die Anreicherung eines Stoffes durch Zerschäumung, je geringer seine Konzentration in der Vorlage ist. Denn bei konstantem Volumenstrom und konstanter Blasengröße kann eine bestimmte Menge an Molekülen an die Phasengrenzfläche angelagert werden. Nimmt man eine von der Konzentration in der Vorlage wenig abhängige Menge der Substanz an, die an die Phasengrenzfläche angelagert wird, so wächst der ER mit der Abnahme der Konzentration in der Vorlage.

Die sehr hohen Anreicherungen von PrP^{Sc} können bei der Zerschäumung des pathologischen Hirnhomogenates entweder dann erzielt werden, wenn sehr wenig Hirnhomogenat zugegeben wird, oder in späteren Spumaten, bei denen das PrP^{Sc} im Sumpf bereits sehr stark angereichert ist. In dieser Arbeit bestätigt sich, dass die Effizienz der Zerschäumung

bzgl. der Anreicherung dann zum Tragen kommt, wenn Substanzen angereichert werden, die in sehr geringen Konzentrationen in der Vorlage vorhanden sind. Große Volumina und starke Verdünnungen stellen kein Problem für diese Methode dar, sondern sind gerade ihre Stärke.

Die Aussage, dass eine Vorlage mit sehr niedriger Konzentration an PrP^{Sc} zu hohen Anreicherungs-faktoren führt, bezieht sich auf die Verdünnung in einer wässrigen Lösung, jedoch nicht auf die Verringerung der Konzentration an PrP^{Sc} durch die Vermischung mit gesundem Hirnhomogenat oder anderen Matrices. Denn in diesem Fall beeinträchtigen die Matrixbestandteile die verbesserte Anreicherung.

Bezüglich der Konzentration des pathologischen Prionproteins in der Vorlage lassen die eben erläuterten Ergebnisse darauf schließen, dass die Zerschäumungsanalyse gut geeignet ist, um PrP^{Sc} aus Körperflüssigkeiten anzureichern, in denen das pathologische Prionprotein in minimalen Mengen vorliegt.

12. Maximal erzielbare Anreicherung

Abbildung V.2 zeigt deutlich den Anstieg der Anreicherung von einer Spumatfraktion zur jeweils nächsten bei der sukzessiven Gewinnung von Spumaten aus einer Vorlage. Diese klar ersichtliche Tendenz lässt den Schluss zu, dass noch wesentlich höhere Anreicherungen erzielt werden könnten, wenn noch weiter verdünnte oder abgereicherte Vorlagen zerschäumt werden. Somit ist der in dieser Arbeit maximal erzielte Anreicherungsfaktor von $\text{ER} = 140$ (Anreicherung auf das 140-fache) nicht die Obergrenze, sondern lediglich eine Grenze für die Analytik, die in dieser Arbeit nicht überwunden werden kann. Der Anreicherungsfaktor von 140 (bei der 1/376 Verdünnung, Abbildung V.2, Seite 108) wird erzielt, wenn die Konzentration des PrP^{Sc} in der Vorlage bereits so gering ist, dass sich der O.D.-Wert der Vorlage unterhalb des in dieser Arbeit als linear herangezogenen Messbereichs befindet. Für die Berechnung dieses ER wird hier der kleinste Wert dieses linearen Bereichs verwendet. Die tatsächlich vorliegende Konzentration in der Vorlage ist jedoch noch geringer, da das in der Arbeit als linearer Messbereich verwendete Intervall enger gewählt wurde als der lineare Bereich der Kalibrierkurve tatsächlich ist. Das bedeutet, die reale Anreicherung liegt höher.

13. Anwendung der Zerschäumung zur Probenaufarbeitung in der BSE-Diagnostik

Wie im Ergebnisteil beschrieben (Abbildung IV.17, Seite 90), kann nach einer Anreicherung mittels Zerschäumungsanalyse das PrP^{Sc} empfindlicher detektiert werden, als das bislang mit einem BSE-Test ohne vorhergehende Anreicherung möglich war. D.h. das pathologische Prionprotein kann in einem Gehirn detektiert werden, das laut BSE-Test aufgrund der niedrigen PrP^{Sc}-Konzentration als BSE-negativ gilt.

Durch Mischung von pathologischem und gesundem Stammhirnhomogenat (Verschneiden) wurde ein Hirnhomogenat konstruiert, das in der Zusammensetzung, speziell im Gehalt an PrP^{Sc}, einem sehr schwach infektiösen Rindergehirn entspricht. Das Mischungsverhältnis wurde so gewählt, dass das verschnittene Gehirn laut Überprüfung mit einem zugelassenen BSE-Test als BSE-negativ einzustufen ist. Dieses (als BSE-negativ getestete) Gemisch wurde zerschäumt. Die O.D.-Werte der gewonnenen Spumate sind in Abbildung IV.16 (Seite IV.16) dargestellt. Ab dem dritten Spumat liegt ein O.D.-Wert vor, der (bei wiederholtem Auftreten) als BSE-positiv zu bewerten ist.

Ein Rind in einem solch frühen Stadium der Erkrankung und der Ausbreitung des pathologischen Prionproteins im Gehirn gelänge nach negativem Test in die Nahrungsmittelkette oder in Kosmetika. In diesem Fall könnte durch eine Voranreicherung mittels Zerschäumungsanalyse erkannt werden, dass sich infektiöses PrP^{Sc} in seinem Organismus befindet.

14. Relevanz der entwickelten Zerschäumungsmethode bei der Analyse PrP^{Sc}-haltiger Körperflüssigkeiten und -gewebe

Nach den beschriebenen Leistungen der Zerschäumungsanalyse – Abtrennung von Zellfragmenten, Proteinseparation und Anreicherung des PrP^{Sc} – wird im Folgenden die Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf Gewebe oder Körperflüssigkeiten diskutiert, mit denen eine *ante mortem*-Diagnostik, der Lebendtest für Prionkrankheiten, möglich sein könnte.

Hirn- und Nervengewebe, lymphoretikuläres Gewebe

Die Ausbreitung des PrP^{Sc} erfolgt überwiegend im zentralen Nervensystem sowie im lymphoretikulären Geweben. Die Ablagerung erfolgt im Hirngewebe, vor allem in der Obex-region des Stammhirns [RIESNER 2001b]. Die auftretenden Abweichungen dieses Verteilungsmusters bei einzelnen Spezies sind hier nicht von Interesse.

Das Gehirn, für das es schon zuverlässige Methoden bzgl. eines TSE-Nachweises gibt, soll hier nicht weiter beleuchtet werden.

Im Falle von peripherem Nervengewebe oder lymphoretikulären Geweben wäre die Entnahme einer relevanten Menge für einen Nachweis am lebenden Individuum problematisch. Zudem handelt es sich bei beiden um zelluläres Körpergewebe, das nach einer Homogenisierung ähnliches Verhalten bei der Zerschäumung zeigen würde wie das Hirnhomogenat. Es wäre möglich, dass durch die Zerschäumung eine Anreicherung erzielt werden kann, die einen Nachweis ermöglicht, vergleichbar der Zerschäumung von verschnittenem Hirnhomogenat.

Muskelgewebe

Bei einigen Spezies kann PrP^{Sc} im Muskelgewebe nachgewiesen werden [THOMZIG 2004]. Dieser Nachweis ist nur unter speziellen Bedingungen durchführbar. Eine Verallgemeinerung dieser Beobachtung auf beliebige Spezies scheint nicht zulässig. Zieht man eine Anreicherung des pathologischen Prionproteins aus Muskeln in Betracht, so muss bedacht werden, dass die Menge des PrP^{Sc} im Muskelgewebe im Bezug auf die Menge an Begleitmaterial derart gering ist, dass Matrixeffekte eine effektive Anreicherung durch die Zerschäumung verhindern würden. Wie beschrieben, haben große Mengen an partikulären Zellbestandteilen einen negativen Effekt bei der Zerschäumung zur Anreicherung des PrP^{Sc}.

Weiterhin wäre aufgrund der minimalen Spuren an PrP^{Sc} im Muskelgewebe die Entnahme einer Gewebemenge nötig, die am lebenden Probanden Schaden anrichten würde.

Urin

Im Urin von Mäusen mit chronischer Nierenentzündung, die mit Scrapie infiziert waren, konnten pathologische Prionproteine nachgewiesen werden [SEEGER 2005]. Bei BSE-infizierten Mäusen ohne Nierenentzündung hingegen konnte entsprechendes nicht nachgewiesen werden. Es ist in einem Organismus jedoch nicht auszuschließen, dass auch bei gesunden Individuen eine sehr geringe Menge an PrP^{Sc} in den Urin gelangen könnte. In diesem Fall wäre die Zerschäumung eine sehr effektive Methode zur Anreicherung, denn es stehen große Volumina zur Verfügung, in denen minimalste Konzentrationen an PrP^{Sc} und wenig störende Begleitsubstanzen vorliegen. Sofern PrP^{Sc} auch regulär mit dem Urin ausgeschieden wird, wäre dies eine aussichtsreiche Anwendung der Zerschäumungsanalyse.

Milch

Bei einer an BSE erkrankten Kuh, die an Mastitis litt, konnte Prionprotein in der Milch nachgewiesen werden [LIGIOS 2005]. Die Verfügbarkeit ist bei Milchkühen ähnlich günstig wie die von Urin. Bezüglich der Zerschäumung sind noch die Bestandteile der Milch zu berücksichtigen, die bei geringen Mengen an PrP^{Sc} die Anreicherung ungünstig beeinflussen würden.

Blut

Blut ist ein Medium, aus dem PrP^{Sc} angereichert werden könnte. Im Blutserum konnte eine sehr geringe, in der Leukozytenmanschette eine wesentlich höhere Infektiosität nachgewiesen werden [BROWN 1999].

Für eine Anreicherung des PrP^{Sc} relevant wäre eine Zerschäumung der Leukozytenmanschette, die vorab homogenisiert werden müsste. Nach einer Verdünnung, am besten mit dem auch geringfügig PrP^{Sc}-haltigen Serum, könnte eine diagnostisch relevante Anreicherung zu erzielen sein. Die vorliegenden Matrixbestandteile könnten ähnlich wie beim Hirnhomogenat separiert werden.

Auch die Zerschäumung von Serum alleine könnte einen Erfolg bringen, sofern nennenswerte Mengen an PrP^{Sc} darin vorliegen. Es sind darin keine partikulären Bestandteile enthalten, die die Anreicherung negativ beeinflussen würden. Eine sehr niedrige Konzentration an PrP^{Sc} stellt bei der Zerschäumung kein Problem dar.

Blut kann vom lebenden Individuum problemlos in relativ großen Mengen entnommen werden.

Cerebrospinalflüssigkeit

Cerebrospinalflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*, kurz Liquor) ist neben dem Blut diejenige Körperflüssigkeit, auf die die Zerschäumung in dieser Arbeit ausgelegt war. In Liquor erkrankter Individuen wurde Infektiosität nachgewiesen, PrP^{Sc} ist in sehr geringen Mengen enthalten [BROWN 1994].

Liquor kann vom lebenden Individuum im Rahmen einer Lumbal-, Subokzipital- oder Ventrikelpunktion entnommen werden, wobei die Lumbalpunktion ungefährlich ist. Bezüglich der Zusammensetzung wäre Liquor für die Zerschäumung sehr günstig. Er enthält kaum Zellen, 150–250 mg Protein/L, Glucose (400–600 mg/L), Phosphatide (etwa 10 mg/L), Phosphate (30–50 mg/L) sowie Cholesterin und Chloride [ROCHE 2006].

Der erwachsene Mensch verfügt über 120–200 mL *Liquor cerebrospinalis* [ROCHE 2006]. Ohne Schäden zu riskieren, können davon bis zu einigen Millilitern entnommen werden.

Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Zusammensetzung von Liquor nicht geeignet ist, um daraus ohne Zusatz eines oberflächenaktiven Agens zu schäumen. Ein Zusatz von SDS als Schäumungsmittel führt zu einem guten Schaumverhalten.

Im Hinblick auf die Zusammensetzung und das Schaumverhalten nach Zugabe von SDS ähneln sich *Liquor cerebrospinalis* und das mit PBS verdünnte Hirnhomogenat. Somit sollte es möglich sein, ohne Beeinträchtigung durch Matrixbestandteile oder -effekte, eine Anreicherung von PrP^{Sc} aus Spinalflüssigkeit zu erzielen. Eine Einschränkung besteht möglicherweise in der verfügbaren Menge an Liquor, die bei dem vermuteten minimalen PrP^{Sc}-Gehalt nötig wäre.

VI. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde pathologisches Prionprotein (PrP^{Sc}), Erreger der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien, durch Anwendung der Zerschäumungsanalyse auf das mehr als 140-fache der Ausgangskonzentration angereichert.

Die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (Prionkrankheiten) sind neuropathologische, letal endende Krankheiten wie z.B. die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen oder die Bovine Spongiforme Enzephalopathie beim Rind. Eine zuverlässige Diagnose dieser Erkrankungen ist bislang nur *post mortem* möglich, da für den immunologischen Nachweis des Erregers ein Teil des Stammhirns benötigt wird. Hinsichtlich Prävention und Therapie ist eine Erkennung von Prionkrankheiten *ante mortem* Voraussetzung. Für einen Lebendtest muss die Diagnose somit anhand anderer Körperorgane oder -flüssigkeiten als dem Stammhirn durchgeführt werden. Versucht man, die Erkrankung anhand des Erregerproteins direkt zu diagnostizieren, so sind Körperflüssigkeiten wie Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit prinzipiell relevante Medien. Sie können vom lebenden Individuum entnommen werden und enthalten das pathologische Prionprotein in minimalen Mengen. Diese sind jedoch für einen Routinenachweis zu gering.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine effektive Anreicherungsmethode zu entwickeln, mit der das Prionprotein so stark angereichert werden kann, dass es mit routinediagnostischen Verfahren nachweisbar ist.

Eine bislang wenig beachtete Methode zur Anreicherung bzw. Separation von Substanzen, besonders aus hochverdünnten Lösungen, ist die Zerschäumungsanalyse. Die Anreicherung erfolgt bei dieser Methode aufgrund des hydrophoben Charakters von Substanzen. Daher sollte die Zerschäumung für die Anreicherung von pathologischem Prionprotein geeignet sein, denn dieses ist stark hydrophob und liegt in den o.g. Körperflüssigkeiten in sehr geringen Konzentrationen vor.

Als Modelllösung für die Zerschäumung diente Stammhirnhomogenat BSE-erkrankter Rinder in phoshatgepufferter Kochsalzlösung.

Um die Zerschäumung adäquat durchführen zu können, wurde zunächst eine Zerschäumungsapparatur konstruiert, die ein steriles Arbeiten mit infektiösem Material ermög-

lichte. Anhand zahlreicher Zerschäumungsversuche wurden geeignete Hilfsmittel, Vorgehensweisen und Prozessparameter ermittelt. So wurden aus einer Vorlage jeweils sukzessiv mehrere Spumatfraktionen bei stationärer Zerschäumung gewonnen. Bezüglich der Prozessparameter wurden die Geometrie der Apparatur, das Vorlagevolumen, die Porosität der Fritte, der Volumenstrom des Stickstoffes zur Erzeugung der Blasen und die Zerschäumungsdauer optimiert, um das PrP^{Sc} maximal anreichern zu können. Als Hilfsmittel zur Schaumbildung lieferte SDS (Natriumdodecylsulfat) in möglichst geringer Konzentration die besten Resultate. Der Nutzen einer Behandlung des Hirnhomogenates durch Proteolyse, Ultraschall oder Zentrifugation vor der Zerschäumung wurde ebenfalls überprüft, was sich jedoch als nicht hilfreich erwies.

Der Prionengehalt in den Proben wurde mittels ELISA quantifiziert.

Die Matrixbestandteile des Hirnhomogenates beeinflussten maßgeblich den Ablauf und das Resultat der Zerschäumung. In erster Linie übten partikuläre Zellbestandteile des homogenisierten Stammhirngewebes einen Einfluss auf die Anreicherung aus. Diese wurden vorrangig gegenüber dem PrP^{Sc} und anderen Proteinen in den Schaum transferiert. Je höher der Anteil dieser suspendierten Bestandteile war, desto stärker verzögerte sich die Anreicherung des PrP^{Sc}.

Die löslichen Proteine des Hirnhomogenates beeinträchtigten die Anreicherung des PrP^{Sc} nicht, unterlagen jedoch selbst einer Separation. Die kleineren Proteine wurden eher im Schaum angereichert als größere.

Unterzog man das pathologische Hirnhomogenat vor der Zerschäumung einer Proteolyse, so bewirkten die daraus resultierenden Produkte eine Verzögerung der Anreicherung des PrP^{Sc}, das weitgehend resistent gegen proteolytischen Abbau ist.

Ein anschauliches Beispiel für die Leistungsfähigkeit der Zerschäumung ist die Anwendung auf die Analyse von PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat. Sehr schwach infektiöses Rinderhirn, das laut Routinediagnostik BSE-negativ getestet wurde, konnte nach der Anwendung der Zerschäumungsanalyse als BSE-positiv erkannt werden.

Somit kann festgestellt werden, dass die Zerschäumung eine deutliche Separation von partikulären Komponenten und Proteinen aus Hirnhomogenat bewirkt.

Die Anreicherung des infektiösen PrP^{Sc} auf das mindestens 140-fache der Ausgangskonzentration belegt das hohe Potential dieser Methode.

Im Hinblick auf die Entwicklung von Methoden für die Diagnostik von Prionkrankheiten *ante mortem* eröffnet die Zerschäumungsanalyse aufgrund der hohen erzielten Anreicherungs-faktoren von pathologischem Prionprotein neue Perspektiven.

A. Anhang

1. Fotografie der Zerschäumungsapparatur für pathologisches Hirnhomogenat



Abbildung A.1.: Fotografie der Zerschäumungsapparatur für pathologisches Hirnhomogenat

2. Tabellen zu den Abbildungen im Ergebnisteil

Tabelle A.1.: Messwerte zu Abbildung IV.3: Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein aus verdünnter Magermilch mit BSA, SDS und Tween 20.

Vorlage	Probe	O.D.
MMG, PrP ^C mit BSA (2 g/L)	BSA Vorlage	0,151
	BSA Spumat	0,150
MMG, PrP ^C mit SDS (16 mg/L)	SDS Vorlage	0,157
	SDS Spumat	0,250
MMG, PrP ^C mit Tween 20 (0,4 g/L)	Tween 20 Vorlage	0,177
	Tween 20 Spumat	0,166

Tabelle A.2.: Messwerte zu Abbildung IV.4: Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein aus verdünnter Magermilch mit verschiedenen SDS-Konzentrationen.

Probe	O.D.
Eichpunkt 4 ng/mL	0,143
Vorlage 3,3 mg SDS/L MMG	0,121
Spumat 3,3 mg SDS/L MMG	0,229
Vorlage 10 mg SDS/L MMG	0,112
Spumat 10 mg SDS/L MMG	0,215
Vorlage 30 mg SDS/L MMG	0,121
Spumat 30 mg SDS/L MMG	0,207
Eichpunkt 100 ng/mL	0,595

Tabelle A.3.: Messwerte zu Abbildung IV.5: Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
Vorlage	0,244
Pellet I	0,565
Überstand I	0,205
Pellet II	0,34
Überstand II	0,198
Pellet III	0,39
Überstand III	0,136

Tabelle A.4.: Messwerte zu Abbildung IV.6: Einfluss von SDS und Ultraschall auf den Nachweis von PrP^{Sc} in verdautem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
Hirnhomogenat verdaut	0,444
Hirnhomogenat verdaut + SDS	0,425
Hirnhomogenat verdaut, Ultraschall	0,463
Hirnhomogenat verdaut + SDS, Ultraschall	0,441

Tabelle A.5.: Messwerte zu Abbildung IV.7: Einfluss von SDS und Ultraschall auf den Nachweis von PrP^{Sc} in nativem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
natives Hirnhomogenat	0,365
natives Hirnhomogenat + SDS	0,139
natives Hirnhomogenat, Ultraschall	0,621
natives Hirnhomogenat + SDS, Ultraschall	0,135

Tabelle A.6.: Messwerte zu Abbildung IV.8: Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein in PBS mit SDS.

Schäumungsdauer	O.D.
0 min	0,133
15 min	0,088
60 min	0,076
90 min	0,080

Tabelle A.7.: Messwerte zu Abbildung IV.9: Zerschäumung von verdautem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
Kalibrierung Hirnhomogenat verdaut I/20	0,148
Vorlage verdaut I/100	0,048
Spumat verdaut I	0,059
Sumpf verdaut II	0,034
Spumat verdaut II	0,057
Sumpf verdaut III	0,033
Spumat verdaut III	0,058

Tabelle A.8.: Messwerte zu Abbildung IV.10: Zerschäumung von nativem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
Kalibrierung nativ I/20	0,056
Vorlage nativ I	0,039
Spumat nativ I	0,182
Sumpf nativ II	0,040
Spumat nativ II	0,435
Sumpf nativ III	0,037
Spumat nativ III	0,367

Tabelle A.9.: Messwerte zu Abbildung IV.11: Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/97.

Probe	Untersuchungsvolumen [μL]	O.D.
Kalibrierung 1/6	60	0,947
Vorlage 1/97	250	0,336
Spumat I	68	0,815
Sumpf II	900	0,098
Spumat II	95	0,776
Sumpf III	2700	0,100
Spumat III	100	0,562

Tabelle A.10.: Messwerte zu Abbildung IV.12: Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/161.

Probe	Untersuchungsvolumen [μL]	O.D.
Kalibrierung 1/10	100	0,294
Vorlage 1/161	500	0,214
Spumat I	100	0,296
Sumpf II	1400	0,085
Spumat II	90	0,330
Sumpf III	2700	0,044
Spumat III	90	0,393

Tabelle A.11.: Messwerte zu Abbildung IV.13: Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/309.

Probe	Untersuchungsvolumen [μL]	O.D.
Kalibrierung 1/6	50	0,965
Kalibrierung 1/161	500	0,217
Vorlage 1/309	500	0,078
Spumat I	180	0,326
Sumpf II	3600	0,080
Spumat II	90	0,344
Sumpf III	5400	0,074
Spumat III 1	95	0,444

Tabelle A.12.: Messwerte zu Abbildung IV.14: Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/376.

Probe	Untersuchungsvolumen [μL]	O.D.
Kalibrierung 1/4	100	0,312
Kalibrierung 1/8	100	0,201
Kalibrierung 1/160	100	0,025
Kalibrierung 1/240	100	0,033
Vorlage 1/376	400	0,050
Spumat I	100	0,102
Sumpf II	1200	0,033
Spumat II	100	0,171

Tabelle A.13.: Messwerte zu Abbildung IV.15: Zerschäumung eines Gemisches von pathologischem und gesundem Hirnhomogenat: ER der ersten Spumatfraktion.

Anteil des pathologischen Gehirns	Anreicherungsfaktor
1/4	2,1
1/2	4,9
3/4	3,7
1/1	18,8

Tabelle A.14.: Messwerte zu Abbildung IV.16: Zerschäumung eines negativ getesteten Hirnhomogenat-Verschnittes.

Probe	O.D.
Hirnhomogenat Verschnitt	0,173
Vorlage	0,067
Spumat I	0,126
Spumat II	0,153
Spumat III	0,222
Spumat IV	0,235
Spumat V	0,211

Tabelle A.15.: Messwerte zu Abbildung IV.17: Zerschäumung von Hirnverschnitt mit 1/81 positivem Hirnhomogenat.

Probe	O.D.
Vorlage	0,038
Spumat I	0,114
Spumat II	0,116
Spumat III	0,137
Spumat IV	0,157
Spumat V	0,157
Spumat VI	0,152
Spumat VII	0,096
Spumat VIII	0,026
Spumat IX	0,022
Spumat X	0,027
Spumat XI	0,018

Literaturverzeichnis

- [AGUZZI 2004] AGUZZI, A., ET AL. (2004). *Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases*. J. Clin. Invest., 114:153–160.
- [AHMAD 1975] AHMAD, S.I. (1975). *Laws of foam formation and foam fractionation I & II*. Separation Science, 10:673–700.
- [ALPERS 1966] ALPERS, T., ET AL. (1966). *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochem. Biophys Res. Commun., 22:278–284.
- [ALPERS 1979] ALPERS, M. (1979). *Epidemiology and ecology of kuru*. In: PRUSINER, S.B. ET AL., Hrsg.: *Slow transmissible disease of the nervous system (Vol. 1)*, S. 76. Academic Press, New York, NY.
- [ANAND 1995] ANAND, K., ET AL. (1995). *Kinetics of Adsorption of Lysozyme and Bovine Serum Albumin at the Air–Water Interface from a Binary Mixture*. J. Colloid and Interface Sci., 176:63–73.
- [ANDERSON 1996] ANDERSON, R.M., ET AL. (1996). *Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle*. Nature, 382:779–788.
- [BAARSON 1963] BAARSON, R.E., ET AL. (1963). *Precipitate Flotation — A New Metal Extraction and Concentration technique*. Petrol. Eng. Symp., Dallas.
- [BACKLEH 2001] BACKLEH, M. (2001). *Zur Effizienz der Zerschäumungsanalyse bei der Anreicherung von Inhaltstoffen aus pflanzlichen Lebensmitteln, Dissertation*. TU München.
- [BANERJEE 1993] BANERJEE, R. ET AL. (1993). *Purification of Alkaline Protease of Rhizopus Oryzae by foam Fractionation*. Journal of Bioprocess Engineering, 9:245–248.
- [BARTSCH 1926] BARTSCH, O. (1926). *Über Schaumsysteme*. Kolloidchemische Beihefte, 10.
- [BASLER 1986] BASLER, K., ET AL. (1986). *Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene*. Cell, 46:417–428.

- [BÜELER 1992] BÜELER, H.R., ET AL. (1992). *Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 356:577–582.
- [BELITZ 2001] BELITZ, H.-D. ET AL. (2001). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag, Berlin.
- [BELLON 2003] BELLON, A., ET AL. (2003). *Improved conformation-dependent immunoassay : suitability for human prion detection with enhanced sensitivity*. J. Gen. Virol., 84:1921–1925.
- [BENDHEIM 1992] BENDHEIM, P.E. (1992). *Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein*. Neurology, 42:149–156.
- [BIESCHKE 2000] BIESCHKE, J., ET AL. (2000). *Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets*. Proc. Natl. Acad. Sci., 97:5468–5473.
- [BRANDNER 1996] BRANDNER, S., ET AL. (1996). *Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13148–13151.
- [BRENIG 2002] BRENIG, B., ET AL. (2002). *Cellular nucleic acids in serum and plasma as new diagnostic tools*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochr., 115:122–144.
- [BRENIG 2003] BRENIG, B., ET AL. (2003). *Surrogate marker test for live cattle*. New Food, 4:21–23.
- [BRITTEN 1992] BRITTEN, M., ET AL. (1992). *Foaming Properties of Proteins as Affected by Concentration*. Journal of Food Science, 57:1219–1222.
- [BROTHERSTON 1968] BROTHERSTON, J.G. (1968). *Spread of scrapie by contact to goats and sheep*. J. Comp. Path., 78:9–17.
- [BROUSOLLE 1989] BROUSOLLE, E., ET AL. (1989). *Reversible Creutzfeldt–Jakob–like syndrome induced by lithium plus levodopa treatment (letter)*. J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry., 52:686–687.
- [BROWN 1998] BROWN, A.K. ET AL. (1998). *Continuous Foaming for Protein Recovery, Part I & Part II*. Biotechnology and Biochemical Engineering, 62:278–300.
- [BROWN 1999] BROWN, P., ET AL. (1999). *Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt–Jakob disease in humans*. Transfusion, 39:1169.

- [BROWN 2001] BROWN, P., ET AL. (2001). *Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt–Jakob Disease : Background, Evolution, and Current Concerns*. *Emerging Infectious Diseases*, 7:6–16.
- [BROWN 1994] BROWN, P. ET AL. (1994). *Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease*. *Ann. Neurol.*, 35:513–529.
- [BRUCE 1989] BRUCE, M. E., ET AL. (1989). *Precise targeting of the pathology of theialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie*. *Neuroscience Letters*, 102:1–6.
- [BRUCE 1987] BRUCE, M.E., ET AL. (1987). *Biological evidence that scrapie agent has an independent genome*. *J. Gen. Virol.*, 69:79–89.
- [BRUCE 1991] BRUCE, M.E., ET AL. (1991). *Scrapie strain variations and its implications*. In: CHESBORO, B.W., Hrsg.: *Transmissible spongiform encephalopathies*, S. 125. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
- [BUDKA 1998] BUDKA, H. (1998). *Iatrogene Creutzfeldt–Jakob–Krankheit*. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 110:451–454.
- [BUDKA 2001a] BUDKA, H. (2001a). *Portrait der Creutzfeldt–Jakob–Krankheit*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 147–150. Walter de Gruyter, Berlin.
- [BUDKA 2001b] BUDKA, H. (2001b). *Portrait der letalen familiären Schafflosigkeit (FFI)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 362–364. Walter de Gruyter, Berlin.
- [BUDKA 2001c] BUDKA, H. (2001c). *Portrait des Gerstmann–Sträussler–Scheinker–Syndroms (GSS)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 158–161. Walter de Gruyter, Berlin.
- [BULL 1972] BULL, B.B. (1972). *J. Colloid Interfac. Sci.*, 41:305–310.
- [BURGER 1965] BURGER, D., ET AL. (1965). *Encephalopathy of mink — 2. Experimental and natural transmission*. *J. Infect. Dis.*, 115:393–399.
- [CASALONE 2004] CASALONE, C., ET AL. (2004). *Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy : Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:3065–3070.
- [CASTILLA 2005] CASTILLA, J., ET AL. (2005). *In vitro Generation of Infectious Scrapie Prions*. *Cell*, 121:195–206.

- [CAUGHEY 1992] CAUGHEY, B., ET AL. (1992). *Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red*. J. Neurochem., 59:768–771.
- [CAUGHEY 1993a] CAUGHEY, B., ET AL. (1993a). *Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin*. J. Virol., 77:5499–5502.
- [CAUGHEY 1993b] CAUGHEY, B., ET AL. (1993b). *Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells*. J. Virol., 67:643–650.
- [CERVENAKOVA 2003] CERVENAKOVA, L., ET AL. (2003). *Failure of immunocompetitive capillary electrophoresis assay to detect disease-specific prion protein in buffy coat from humans and chimpanzees with Creutzfeldt–Jakob disease*. Electrophoresis, 24:853–859.
- [CHANG 2000] CHANG, Z., ET AL. (2000). *Foam separation of tributyl phosphate from aqueous solutions*. Separation and Purification Technology, 19:131–136.
- [CHARM 1972] CHARM, S.E. (1972). *Foam Separation of Enzymes and other Proteins*. In: R., LEMLICH, Hrsg.: *Adsorptive Bubble Separation Techniques*, S. 157–174. Academic Press, New York.
- [CHIESA 2005] CHIESA, R., ET AL. (2005). *Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease*. PNAS, 102:238–243.
- [CLARKSON 1999] CLARKSON, J.R. ET AL. (1999). *Protein Denaturation in Foam, II Surface Activity and Conformational Change*. Journal of Colloid and Interface Science, 215:333–338.
- [COLLINGE 1996] COLLINGE, J., ET AL. (1996). *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD*. Nature, 383:685.
- [CREUTZFELDT 1920] CREUTZFELDT, H.G. (1920). *Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems*. Z. Ges. Neurol. Psychiatr., 57:1–8.
- [CUILLE 1936] CUILLE, J., ET AL. (1936). *La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable*. C. R. Acad. Sci. Paris, 203:1552–1554.
- [CUILLE 1938] CUILLE, J., ET AL. (1938). *La tremblante du mouton est bien inoculable*. C. R. Acad. Sci. Paris, 206:78–79.
- [DARTON 2004] DARTON, R.C., ET AL. (2004). *Development of a Multistage Foam Fractionation Column*. Chemical Engineering and Processing, 43:477–482.
- [DAUDE 2003] DAUDE, N., ET AL. (2003). *Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs*. J. Cell. Sci., 116:2775–2779.

- [DELASNERIE-LAUPRETRE 1995] DELASNERIE-LAUPRETRE, N., ET AL. (1995). *Creutzfeldt–Jakob Disease in Europe (letter)*. *Lancet*, 346:898.
- [DESOUZA 1991] DESOUZA, A.H.G., ET AL. (1991). *The Effekt of pH and Gas Composition on the Bibble Fractionation of Proteins*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29:655–662.
- [DETWILER 2001] DETWILER, L. (2001). *Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 165–172. Walter de Gruyter, Berlin.
- [DICKINSON 1989] DICKINSON, E. (1989). *Protein adsorption of Liquid Interfaces and the relationship to Foam Stability*. In: *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. Springer Verlag, London.
- [DICKINSON 1971] DICKINSON, A.G., ET AL. (1971). *Host–genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent*. *Mol. Gen. Genet.*, 112:73–79.
- [DIMITZ 1913] DIMITZ, L. (1913). *Bericht des Vereins für Psychiatrie und Neurologie in Wien. Vereinsjahr 1912/13, Sitzung vom 11. Juni 1912*. *Jahrb. Psychiatr. Neurol.*, 34:384.
- [DOGNON 1941] DOGNON, A., ET AL. (1941). *Foam separation*. In: SCHOEN, H.M., Hrsg.: *New Chemical Engineering Techniques*. Interscience, New York.
- [DORMANN 1965] DORMANN, D.C., ET AL. (1965). *Separation of Liquid Mixtures by Non–Foaming Bubble Fractionation*. *Nature*, 207:145–146.
- [DOYLE 2003] DOYLE, F.M. (2003). *Ion Flotation — its potential for hydrometallurgical operations*. *Internat. J. Miner. Process.*, 72:387–399.
- [ENARI 2001] ENARI, M., ET AL. (2001). *Scrapie prion protein accumulation by scrapie–infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:9295–9299.
- [FISCHER 2000] FISCHER, M.B., ET AL. (2000). *Binding of disease–associated prion protein to plasminogen*. *Nature*, 408:479–483.
- [FORD 1996] FORD, B.J., ET AL. (1996). *BSE — the facts (mad cow disease and risk to mankind)*. Gorgi books, Transworld Publications, London.
- [FRASER 1992] FRASER, H., ET AL. (1992). *Transmission of bovine spongiforme encephalopathy and scrapie to mice*. *J.Gen. Virol.*, 73:1891–1897.

- [FURUKAWA 2004] FURUKAWA, H., ET AL. (2004). *A pitfall in the diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins.* J. Biol. Chem., 279:23661–23667.
- [GAJDUSEK 1966] GAJDUSEK, D.C. ET AL. (1966). *Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanses.* Nature, 209:794–796.
- [GAUDIN 1957] GAUDIN, A.M. (1957). *Flotation.* McGraw–Hill, New York.
- [GERSTMANN 1928] GERSTMANN, J. (1928). *Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems.* Wien. Medizin. Wochenschr., 78:906–908.
- [GERSTMANN 1936] GERSTMANN, J. (1936). *Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns.* Z. Ges. Neurol. Psychiat., 154:736–762.
- [GONI 2005] GONI, F., ET AL (2005). *Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route.* Neuroscience, 133:413–21.
- [GREEN 2001] GREEN, A.J., ET AL. (2001). *Use of 14–3–3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt–Jakob disease.* J. Neurol. neurosurg. Psychiatry, 70:744–748.
- [GRIEVES 1982] GRIEVES, R.B. (1982). *Adsorptive Bubble Separation Methods.* Treatise on Analytical Chemistry, 1:371–448.
- [GROSCHUP 2002] GROSCHUP, M. H., ET AL. (2002). *BSE- und Scrapie-Diagnostik in Deutschland.* Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 115:106–110.
- [GUILLAUME 2003] GUILLAUME, E. ET AL. (2003). *A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease.* Proteomics, 3:1495–1499.
- [HADLOW 2001] HADLOW, W.J. (2001). *Portrait der übertragbaren spongiformen Hirndegeneration der Nerze (TME).* In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 191–196. Walter de Gruyter, Berlin.
- [HADLOW 1982] HADLOW, W.J. ET AL. (1982). *Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus.* J. Infect. Dis., 146:657–664.
- [HARALAMBIEV 1973] HARALAMBIEV, H., ET AL. (1973). *An attempt to induce scrapie in local sheep in Bulgaria.* Zbl. Vet. Med. (B), 20:701–709.

- [HARRINGTON 1986] HARRINGTON, M.G. ET AL. (1986). *Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt–Jakob disease*. N. Engl. J. Med., 315:279–283.
- [HARTSOUGH 1965] HARTSOUGH, G.R., ET AL. (1965). *Encephalopathy of mink — 1. Epizootiologic*. J. Infect. Dis., 115:387–392.
- [HEPPNER 2001] HEPPNER, F.L. ET AL. (2001). *Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion antibodies*. Science, 294:178–182.
- [HEWICKER-TRAUTWEIN 2001] HEWICKER-TRAUTWEIN, M. (2001). *Portrait der übertragbaren spongiformen Hirndegeneration Katzen (FSE)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 197–199. Walter de Gruyter, Berlin.
- [HORNSHAW 1995a] HORNSHAW, M.P. ET AL. (1995a). *Copper binding to the N-terminal tabdem repeat region of mammalian and avian prion protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 207:621–629.
- [HORNSHAW 1995b] HORNSHAW, M.P. ET AL. (1995b). *Copper binding to the N-terminal tabdem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 214:993–999.
- [HOURRIGAN 1979] HOURRIGAN, J. ET AL. (1979). *Epidemiology of scrapie in the United States*. In: PRUSINER, S.B., ET AL., Hrsg.: *Slow transmissible disease of the nervous systems (Vol.1)*, S. 331. Academic Press, New York.
- [HÖRNLIMANN 2001a] HÖRNLIMANN, B. (2001a). *Die chemische Desinfektion und Inaktivierung von Prionen*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 381–388. Walter de Gruyter, Berlin.
- [HÖRNLIMANN 2001b] HÖRNLIMANN, B. (2001b). *Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 4–20. Walter de Gruyter, Berlin.
- [HÖRNLIMANN 2001c] HÖRNLIMANN, B. (2001c). *Portrait der BSE beim Rind*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 173–180. Walter de Gruyter, Berlin.
- [HÖRNLIMANN 2001d] HÖRNLIMANN, B. (2001d). *Portrait der Kuru*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 141–146. Walter de Gruyter, Berlin.
- [JAKOB 1921a] JAKOB, A.M. (1921a). *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose*

- *Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden*). Dtsch. Z. Nervenheilk., 70:132–146.
- [JAKOB 1921b] JAKOB, A.M. (1921b). *Über eine der Multiplen Sklerose nahestehenden Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswerten anatomischen Befunde*. Medizinische Klinik, 13:372.
- [JEFFREY 1988] JEFFREY, M., ET AL. (1988). *Spongiform encephalopathy in a nyala (Tragelaphus angasi)*. Vet. Pathol., 25:389–399.
- [KARGER 1968] KARGER, B.B., ET AL (1968). *General survey of adsorptive bubble separation processes*. Separation science, 3:393–424.
- [KÜBLER 2003] KÜBLER, E. ET AL. (2003). *Diagnosis of prion diseases*. Br. Med. Bull., 66:267.
- [KINOSHITA 2003] KINOSHITA, T. ET AL. (2003). *A Study on Gold(III)Recovery Via Foam Separation with Nonionic Surfactand in Batch Mode*. Journal of Minerals & Materials Charakterisation & Engineering, 2:71–82.
- [KINSELLA 1987] KINSELLA, J.E., ET AL. (1987). *Film, Foaming, and Emulsifying Properties of Food Proteins: Effects of Modification*. In: *Proteins at Interfaces*. American Chemical Society, Washington, DC.
- [KIRKWOOD 2001] KIRKWOOD, J.K. (2001). *Portrait der Prionkrankheiten bei Zootieren*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 191–196. Walter de Gruyter, Berlin.
- [KITAMOTO 1988] KITAMOTO, T. ET AL. (1988). *Immunohistochemical verification of senile and kuru plaques in Creutzfeldt–Jakob Disease and the allied disease*. Ann. Neurol., 24:537–542.
- [KLEIN 2001] KLEIN, M.A., ET AL. (2001). *Complement faciliates early prion pathogenesis*. Nat. Med., 7:488–492.
- [KONDURU 1992] KONDURU, R. (1992). *Adsorptive studies of aquaeous zinc ions by Foam fractionation in simple mode*. J. Chem. Engineering of Japan, 25:555–560.
- [KORTH 1997] KORTH, C., ET AL. (1997). *Prion (PrPsc)–specific epitope defined by a monoclonal antibody*. Nature, 390:74–77.
- [KRETZSCHMAR 1986] KRETZSCHMAR, H., ET AL. (1986). *Scrapie prion proteins are synthesized in neurons*. Am. J. Pathol., 122:1023.

- [LANE 2003] LANE, A. ET AL. (2003). *Polimeric ligands with specificity for aggregated prion proteins*. Clin. Chem., 49:1774–1775.
- [LANGE 1972] LANGE, H. (1972). *Schäume und ihre Stabilität*. VDI.Berichte, Nr.182:71–77.
- [LAPLANCHE 1994] LAPLANCHE, J.L., ET AL. (1994). *Molecular enetics of prion disease in France*. Neurology, 44:2347–2351.
- [LASCH 2003] LASCH, P., ET AL. (2003). *Antemortem Identification of Bovine Spongiform Encephalopathy from Serum Using Infrared Spectroscopy*. Anal. Chem., 75:6673–6678.
- [LEGNAME 2004] LEGNAME, G., ET AL. (2004). *Synthetic mammalian prions*. Science, 305:673–676.
- [LEMLICH 1972] LEMLICH, R. (1972). *Adsubble Methods*. Recent Development in Separation Science, 1:113–127.
- [LIBERSKI 1992] LIBERSKI, P.P., ET AL. (1992). *Comparative ultrastructural neuropathology of naturally occuring bovine spongiform encephalopathy and experimentally induced scrapie and Creutzfeldt–Jakob Disease*. J.Comp. Path., 106:361–381.
- [LIGIOS 2005] LIGIOS, C., ET AL. (2005). *PrPsc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis*. Nature Medicine, 11:1137–1138.
- [LIMA 1994] LIMA, V., ET AL. (1994). *Foam Fractionation of Proteins*. Annals of the New York Academy of Science, 782:375–390.
- [LIU 1995] LIU, H.-S. ET AL. (1995). *Concentrating Bovine Serum Albumin by Foam Separation*. Journal of the Chinese Colloid and Interface Society, 18:53–60.
- [LO 2001] LO, Y.M. (2001). *Circulationg nucleic acids in plasma and serum: an overview*. Ann. NY Acad. Sci., 945:1–7.
- [LUGARESI 1986a] LUGARESI, E., ET AL. (1986a). *Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease*. Rev. Neurol., 142:791–792.
- [LUGARESI 1986b] LUGARESI, E., ET AL. (1986b). *Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei*. N. Engl. J. Med., 315:997–1003.
- [MAAS 1974] MAAS, K. (1974). *Adsorptive Bubble Separation Methods*. In: KORTE, F., Hrsg.: *Methodicum Chemicum (Vol.1)*, S. 165–171. Academic press, New York.
- [MACRITCHIE 1978] MACRITCHIE, F. (1978). Adv. Prot. Chem., 32:283–315.

- [MAHNE 1971] MAHNE, E.J. (1971). *Foam separation processes*. Chemistry in Canada, 23:32–33.
- [MAISSEN 2001] MAISSEN, M., ET AL. (2001). *Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species*. Lancet, 357:2026–2028.
- [MANEGOLD 1953] MANEGOLD, E. (1953). *Schaum*. Chemie und Technik Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- [MARSH 1993] MARSH, R.F., ET AL. (1993). *Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy*. Dev. Biol. Stand., 80:111–118.
- [MARUYAMA 2000] MARUYAMA, H. ET AL. (2000). *Adsorption of Water-Soluble Proteins onto Bubbles in Continuous Foam Separation*. J. Colloid and Interface Sci., 224:76–83.
- [MASTERS 1981] MASTERS, C.L. ET AL. (1981). *Creutzfeldt–Jakob Disease virus isolation from the Gerstmann–Sträussler syndrome; with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies*. Brain, 104:559–588.
- [MCGOWAN 1922] MCGOWAN, J.P. (1922). *Scrapie in sheep*. Scottish J. Agric., 5:365–375.
- [MCKILEY 1983] MCKILEY, M.P., ET AL. (1983). *A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion*. Cell, 35:57–62.
- [MEHLHORN 1996] MEHLHORN, I., ET AL. (1996). *High-level expression and characterization of purified 142-residue polypeptide of the prion protein*. Biochemistry, 35:5528–5537.
- [MEIER 2003] MEIER, P., ET AL. (2003). *Soluble dimeric prion protein binds PrP^{Sc} in vivo and antagonizes prion disease*. Cell, 113:49–60.
- [MERZ 1981] MERZ, P.A., ET AL. (1981). *Abnormal fibrils from scrapie-infected brain*. Acta Neuropathol., 54:63–74.
- [MESTRE FRANCES 1979] MESTRE FRANCES, N., ET AL. (1979). *Prion immunoreactivity in Brain, tonsil, gastrointestinal epithelial cells, and blood and lymph vessels in lumerian zoo primates with spongiform encephalopathy*. CR Acad. Sci. III, 320:971–979.
- [MIELE 2001] MIELE, G., ET AL. (2001). *A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies*. Nat. Med., 7:361–364.
- [MOKUNO 1983] MOKUNO, K., ET AL. (1983). *Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases*. J. Neurol. Sci., 60:443–451.

- [MONTERO 1993] MONTERO, G.A., ET AL. (1993). *Bubble and foam concentration of cellulase*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 39/40:467–475.
- [MOSER 1995] MOSER, M. ET AL. (1995). *Developmental expression of the prion protein gene in glial cells*. Neuron., 14:509–517.
- [NASLAVSKY 1997] NASLAVSKY, N., ET AL. (1997). *Charakterisation of detergent-insoluble containing the cellular prion protein and its scrapie isoform*. J. Biol.Chem., 272:6324–6331.
- [NEWS 2004] NEWS, MICROSENS BIOTECHNOLOGY (2004). <http://www.microsens.co.uk/press3.html>. Pressemitteilung.
- [NOBLE 1998] NOBLE, M. ET AL. (1998). *Protein Recovery using Gas-Liquid Dispersion*. Journal of Chromatography B, 711:31–43.
- [OBERTHÜR 2001] OBERTHÜR, R.C. (2001). *Die Inaktivierung von Prionen durch Hitze*. In: HÖRNLMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 389–398. Walter de Gruyter, Berlin.
- [OESCH 1985] OESCH, B. ET AL. (1985). *A cellular gene encodes scrapie PrP27–30 protein*. Cell, 40:735–746.
- [O.I.E. 2004] O.I.E., Hrsg. (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Bd. 5. Auflage. O.I.E., Paris.
- [OSTWALD 1936] OSTWALD, W., ET AL. (1936). *Über Zerschäumungsanalyse*. Kolloid-Zeitschrift, 76:33–46.
- [OSTWALD 1940] OSTWALD, W., ET AL. (1940). *Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie III*. Kolloid-Zeitschrift, 90:205–215.
- [OSTWALD 1925] OSTWALD, W. (1925). Kolloid-Zeitschrift, 36:342.
- [OSTWALD 1941] OSTWALD, W. ET AL. (1941). *Zerschäumungsanalyse*. In: HÖRNLMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Fermentforschung*, S. 1467–1474.
- [PALMER 1991] PALMER, M.S. ET AL. (1991). *Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt–Jakob Disease*. Nature, 353:340–342.
- [PAN 1993] PAN, K.M., ET AL. (1993). *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 90:10962–10966.

- [PARCHI 1997] PARCHI, P., ET AL. (1997). *Typing prion isoforms*. Nature, 386:232–233.
- [PATTISON 1972] PATTISON, I.H., ET AL. (1972). *Spread from scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep*. Vet. Rec., 90:465–468.
- [PATTISON 1974] PATTISON, I.H., ET AL. (1974). *Further observation os the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep*. Br. Vet. J., 130:65–67.
- [PERETZ 2001] PERETZ, D., ET AL. (2001). *Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity*. Nature, 412:739–743.
- [PETERS 1952] PETERS, D. (1952). *Zerschäumungsanalyse kristalliner Serumalbumine*. Die Naturwissenschaften, 39:88–89.
- [PIENING 2005] PIENING, N., ET AL. (2005). *Breakage of PrP aggrgares is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 326:339–343.
- [PRINS 1988] PRINS, A. (1988). *Principles in Foam Stability*. In: *Advances in Food Emulsions and Foam*. Applied Sciens Publishers Ltd.
- [PRIOLA 2000] PRIOLA, S.A., ET AL. (2000). *Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds*. Science, 287:1503–1506.
- [PRUSINER 1982] PRUSINER, S.B. (1982). *Novel proteinacous infectious particles cause scrapie*. Science, 216:136–144.
- [PRUSINER 1991] PRUSINER, S.B. (1991). *Molecolar biology of prion diseases*. Science, 252:1515–1522.
- [PRUSINER 1998] PRUSINER, S.B. (1998). *Prions*. Proc. Natl. Acad. Sci., 95:13363–13383.
- [PRUSINER 2001] PRUSINER, S.B. (2001). *Die Geschichte der Erforschung von Prionen*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 36–49. Walter de Gruyter, Berlin.
- [PUCKETT 1991] PUCKETT, C., ET AL. (1991). *Genomic structure of the human prion protein gene*. Am. J. Hum. Genet., 49:320–329.
- [PURDEY 1994] PURDEY, M. (1994). *Are organophosphate pesticides involved in the causation of bovine spongiforme enzephalopathy (BSE)? Hypothesis based upon a literature review and limeted trials on BSE cattle*. J. Nutr. Med., 4:43–82.

- [PURDEY 1996] PURDEY, M. (1996). *The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein) – 2. an an epidemiological perspective*. Med. Hypotheses, 46:445–454.
- [RIESNER 2001a] RIESNER, D. (2001a). *Die Scrapie-Isoform des Prion-Proteins PrP^{Sc} im Vergleich zur zellulären Isoform PrP^C*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 81–91. Walter de Gruyter, Berlin.
- [RIESNER 2001b] RIESNER, D. (2001b). *Die verschiedenen Erreger-Hypothesen*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 53–60. Walter de Gruyter, Berlin.
- [RIESNER 1996] RIESNER, D., ET AL. (1996). *Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity*. J. Virol., 70:1714–1722.
- [RÖMPP 2005] RÖMPP, LEXIKON (2005). <http://www.roempp.com/prod/index1.html>. Internet, Juni 2005.
- [ROCHE 2006] ROCHE, LEXIKON (2006). <http://145.253.118.170/roche5/index.html>. Internet, Mai 2006.
- [SAFAR 1993] SAFAR, J., ET AL. (1993). *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein*. J. Biol. Chem., 268:20276–20248.
- [SALEH 2001] SALEH, Z.S., ET AL. (2001). *A study of the separation of proteins from multicomponent mixtures by a semi-batch foaming process*. Chem. Engin. a. Processing, 40:371–378.
- [SALVATORE 1994] SALVATORE, M., ET AL. (1994). *Polymorphism of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt–Jakob Disease*. Hum. Genet., 94:375–379.
- [SARKAR 1987] SARKAR, P. ET AL. (1987). *Isolation and Purification of Protease from Human Placenta by Foam Fractionation*. Biotechnology and Bioengineering, 29:943–940.
- [SARNATARO 2004] SARNATARO, D., ET AL. (2004). *PrP^C Assoziation with Lipid Rafts in the Early Secretory Pathway Stabilizes Its Cellular Conformation*. MBC, 15:4031–4042.
- [SCHICKER 2001] SCHICKER, E. (2001). *Die Klinik der BSE*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 275–283. Walter de Gruyter, Berlin.
- [SCHLADITZ 1999] SCHLADITZ, C., ET AL. (1999). *Amyloid- β -Sheet Formation at the Air–Water Interface*. Biophysical Journal, 77:3305–3310.

- [SCHMERR 1999] SCHMERR, M.J., ET AL. (1999). *Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy.* J. Chromatogr. A, 853:207–214.
- [SCHNEPF 1959] SCHNEPF, R.W. (1959). *Foam Fractionation of Proteins: Concentration of Aqueous Solutions of Bovine Serum Albumin.* J. Biochem. and Microbiolog. Techn. and Engineering, 1:1–8.
- [SCHONFELD 1967] SCHONFELD, E., ET AL. (1967). *Improving Strontium Removal from Solution by Controlled Reflux Foam Separation.* Journal of Nuclear Applications, 3:353–359.
- [SCHÜTZ 2005] SCHÜTZ, E., ET AL. (2005). *Bov-tA Short Interspersed Nucleotide Element Sequences in Circulating Nucleic Acids from Sera of Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and Sera of cattle Exposed to BSE.* Clin. Diagnost. Lab. Immunol., 12:814–820.
- [SCHÄTZL 1995] SCHÄTZL, H.M. ET AL. (1995). *Prion protein variation among promates.* J. Mol. Biol., 145:362–374.
- [SEBBA 1962] SEBBA, F. (1962). *Ione Flotation.* Elsevir, New York.
- [SEEGER 2005] SEEGER, H., ET AL. (2005). *Coincident Scrapie Infection and Nephritis Lead to Urinary Prion Excretion.* Science, 310:324–326.
- [SERBEC 2003] SERBEC, V.C., ET AL. (2003). *Monoclonal antibody against a peptide of Human prion protein discriminates between Creutzfeldt–Jacob´s disease–affected and normal brain tissue.* J. Biol. Chem., 279:3694–3698.
- [SHAKED 2001] SHAKED, G.M., ET AL. (2001). *A Proteinase–resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases.* J. Biol. Chem., 276:31479–31428.
- [SHAKED 2002] SHAKED, Y. ET AL. (2002). *The binding of prion proteins to serum components is affected by detergent extraction conditions.* Journal of Neurochemistry, 82:1–5.
- [SHANKAR 2005] SHANKAR, S.K., ET AL. (2005). *Did BSE in the UK originate from the Indian subkontinent?.* Lancet, 366:790–791.
- [SHAPIRO 1983] SHAPIRO, B., ET AL. (1983). *Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease.* Cancer, 51:2116–2120.

- [SOTO 2002] SOTO, C., ET AL. (2002). *Cyclic amplification of protein misfolding : application to prion-related disorders and beyond*. Trends Neurosci., 25:390–394.
- [SOTO 2005] SOTO, C., ET AL. (2005). *Pre-symptomatic detection of prions by amplification of protein misfolding*. FEBS Letters, 579:638–642.
- [SOUAN 2001] SOUAN, L., ET AL. (2001). *Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization*. Eur. J. Immunol., 31:2338–2346.
- [STAHL 1987] STAHL, N., ET AL. (1987). *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid*. Cell, 51:229–240.
- [STAHL 1991] STAHL, N., ET AL. (1991). *Prions and prion proteins*. FASEB J., 5:2799–2807.
- [STAHL 1994] STAHL, N., ET AL. (1994). *The tails of two proteins: the scrapie prion protein and the ciliary neurotrophic factor receptor, ray*. J. Med. Biol. Res., 27:297–301.
- [STAMP 1959] STAMP, J.T., ET AL. (1959). *Further studies on scrapie*. J. Comp. Path., 69:268–280.
- [STÖCKEL 1998] STÖCKEL, J., ET AL. (1998). *Prion protein selectiveöy binds copper (II) ions*. Biochemistry, 37:7185–7193.
- [SUPATTAPONE 2001] SUPATTAPONE, S., ET AL. (2001). *Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells*. J. Virol., 75:3453–3461.
- [SUZUKI 2002] SUZUKI, A., ET AL. (2002). *Selective Foam Sepatration of Binary Protein Solution by SDS Complexation Method*. J. Colloid a. Interface Sci., 253:402–408.
- [TADROS 2005] TADROS, T.F. (2005). *Applied Surfactabts*. WILEY–VCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- [TAGLIAVINI 1997] TAGLIAVINI, F., ET AL. (1997). *Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters*. Science, 276:1119–1122.
- [TARABOULOS 1995] TARABOULOS, A., ET AL. (1995). *Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequebceof the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform*. J. Cell. Biol., 129:121–132.
- [TATEISHI 1995] TATEISHI, J., ET AL. (1995). *First experimental transmission of fatal familial insomnia*. Nature, 376:434–435.
- [TATEISHI 1997] TATEISHI, J. ET AL. (1997). *Transmission of chronic spongiform encephalopathy with kuru plaques and leucomalia from humans to small rodents*. Ann. Neurol., 5:581–584.

- [THOMZIG 2004] THOMZIG, A., ET AL. (2004). *Discriminating scrapie and BSE isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein*. J. Biol. Chem., 279:33847–33854.
- [TOWNSEND 1983] TOWNSEND, A., ET AL. (1983). *Relationship Between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins*. J. of Food Sci., 48:588–594.
- [URIAZEE 1995] URIAZEE, F., ET AL. (1995). *Foam-based separation of proteins*. In: SINGH, R.K., ET AL., Hrsg.: *Bioseparation Process in Foods*, S. 175–225.
- [VILES 1999] VILES, J., ET AL. (1999). *Copper binding to the prion protein : structural implications of four identical cooperative binding sites*. Proc. Natl. Acad. Sci., 96:2042–2047.
- [WEBER 1997] WEBER, T., ET AL. (1997). *Diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease and related human spongiform encephalopathies*. Biomed. Pharmacother, 51:381–387.
- [WELLS 1987] WELLS, G.A., ET AL. (1987). *A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle*. Vet. Rec., 121:419–420.
- [WHITE 2003] WHITE, A.R., ET AL. (2003). *Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease*. Nature, 422:80–83.
- [WILESMITH 1991] WILESMITH, J.W., ET AL. (1991). *Bovine spongiforme enzephalopathy: epidemiological studies on the origin*. Vet. Rec., 128:199–203.
- [WILESMITH 1994] WILESMITH, J.W. (1994). *An epidemiologist's view of bovine spongiforme enzephalopathy*. Philos. Trans. R. Soc. (London) B. Biol. Sci., 343:357–361.
- [WILESMITH 1996] WILESMITH, J.W. (1996). *Recent observations on the epidemiology of bovine spongiforme enzephalopathy*. In: GIBBS, C.J.JR., Hrsg.: *Bovine spongiforme Enzephalopathy — the BSE dilemma*, S. 45. Springer, New York.
- [WILL 1996] WILL, R.G., ET AL. (1996). *A new variant of Creutzfeldt–Jakob Disease in the UK*. Lancet, 347:921–925.
- [WILL 2001] WILL, R.G. (2001). *Portrait der neuen Variante der Creutzfeldt–Jakob–Krankheit (nvCJK)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 152–157. Walter de Gruyter, Berlin.
- [WILLIAMS 1980] WILLIAMS, E.S., ET AL. (1980). *Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy*. J. Wildl. Dis., 16:89–98.
- [WILLIAMS 2001] WILLIAMS, S.W. (2001). *Portrait der chronisch zehrenden Krankheit der Hirschartigen (CWD)*. In: HÖRNLIMANN, B., ET AL., Hrsg.: *Prionen und Prionkrankheiten*, S. 186–190. Walter de Gruyter, Berlin.

- [WINDL 1996] WINDL, O., ET AL. (1996). *Genetic basis of Creutzfeldt–Jakob Disease in the United Kingdom : a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene*. Hum. Genet., 98:259–264.
- [WISNIEWSKI 1996] WISNIEWSKI, H.M., ET AL. (1996). *Mites as Vectors for scrapie (letter)*. Lancet, 347:1114.
- [WYATT 1990] WYATT, J.M., ET AL. (1990). *Spongiform encephalopathy in cat*. Vet. Rec., 126:513.
- [ZERR 2002] ZERR, I., ET AL. (2002). *clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD*. APMIS, 110:88–98.
- [ZHANG 2006] ZHANG, C.C., ET AL. (2006). *Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal*. Proc. Natl. Acad. Sci., 103:2184–2189.
- [ZIGAS 1957] ZIGAS, V., ET AL (1957). *Kuru: clinical study of a new syndrom resembling Paralysis Agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea*. Med. J. Aust., 2:245–254.
- [ZIGAS 1990] ZIGAS, V. (1990). *Laughing death — the untold story of kuru*. Humana Press, Clifton, NJ.
- [ZOU 2004] ZOU, W.-Q., ET AL. (2004). *Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein*. Proc. Natl. Acad. Sci., 101:1380–1385.

Abbildungsverzeichnis

II.1. Schematische Darstellung von Hamster-Prionprotein SHaPrP [PRUSINER 1998]	14
II.2. Strukturmodell des rekombinanten Prionproteins rPrP(90–231) von syrischem Hamster (SHa) [PRUSINER 1998]	15
II.3. Modell der Tertiärstruktur des humanen infektiösen Prionproteins huPrP ^{Sc} [PRUSINER 1998]	16
II.4. Elektropherogramm von unverdautem sowie PK-verdautem PrP ^C und PrP ^{Sc} [PRUSINER 1998].	18
II.5. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) [SOTO 2002].	32
II.6. Zeitlicher Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien 1986 bis 2000 [BROWN 2001].	37
II.7. Die unterschiedlichen adsorptiven Gasblasentrennmethode nach Lemlich [LEMLICH 1972].	43
II.8. Entwicklung und Verhalten des Schaumes während der Zerschäumung (Quelle: http://www.maths.tcd.ie/~simoncox/Foamarchive/images/im_str/cilliers.gif , Mai 2006, modifiziert)	46
II.9. Verhalten von Tensidmolekülen inner- und außerhalb Flüssigkeit (Quelle: http://www.sita-messtechnik.de/schaum/bilder/entstehung.jpg , März 2006)	47
II.10. Schematische Skizze einer Zerschäumungsapparatur während der Zerschäumung (Quelle: eigene Darstellung)	49
II.11. Polyederschaum (Quelle: http://www.iit.edu/~wasan/fl.jpg , März 2006)	50
II.12. Darstellung eines Gibbs-Kanals (Plateau-Rand) [GRIEVES 1982].	51
III.1. Schematische Darstellung der konstruierten Zerschäumungsapparatur	62
IV.1. Elektropherogramm der Spumate aus der Zerschäumung von BSE-negativem Gehirn	72
IV.2. Elektropherogramm der Rückstände aus der Zerschäumung von BSE-negativem Gehirn	73
IV.3. Zerschäumung von rekombinantem PrP in verdünnter Magermilch mit BSA, SDS und Tween 20	74

IV.4. Zerschäumung von rPrP in verdünnter Magermilch mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen	75
IV.5. Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat	76
IV.6. Einfluss von SDS und Ultrabeschallung auf den Nachweis von verdaulichem PrP ^{Sc}	78
IV.7. Einfluss von SDS und Ultrabeschallung auf den Nachweis von unverdaulichem PrP ^{Sc}	79
IV.8. Zerschäumung von rekombinantem PrP ^C in PBS mit SDS	80
IV.9. Zerschäumung von verdaulichem Hirnhomogenat in PBS mit SDS	81
IV.10. Zerschäumung von unverdaulichem Hirnhomogenat in PBS mit SDS	82
IV.11. Zerschäumung mit einer Ausgangskonzentration von 1/97 unverdaulichem Hirnhomogenat	85
IV.12. Zerschäumung mit einer Ausgangskonzentration von 1/161 unverdaulichem Hirnhomogenat	85
IV.13. Zerschäumung mit einer Ausgangskonzentration von 1/309 unverdaulichem Hirnhomogenat	86
IV.14. Zerschäumung mit einer Ausgangskonzentration von 1/376 unverdaulichem Hirnhomogenat	87
IV.15. Zerschäumung eines Gemisches von pathologischem und gesundem Hirn: Anreicherungs-faktoren der ersten Spumatfraktionen	88
IV.16. Zerschäumung eines BSE-negativ getesteten Gemisches aus Hirnhomogenat	89
IV.17. Zerschäumung von Gehirn-Gemisch mit einem Anteil von 1/81 pathologischen Hirnhomogenates	90
V.1. Zerschäumung von verdaulichem und unverdaulichem (nativem) pathologischem Hirnhomogenat	105
V.2. Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat in den Verdünnungen 1/97, 1/161, 1/309 und 1/376	108
A.1. Fotografie der Zerschäumungsapparatur für pathologisches Hirnhomogenat	115

Tabellenverzeichnis

II.1. Überblick über die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSEs) [HÖRNLIMANN 2001b]	5
II.2. BSE-Fälle in Großbritannien und anderen Ländern bis 2000 [BROWN 2001]	35
II.3. Anzahl der bestätigten BSE-Fälle in der Bundesrepublik Deutschland (BRD), nach Bundesländern seit 2000. (Quelle: http://www.bmelv.de/cln_044/nn_752016/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/BSE , August 2006)	36
II.4. Anzahl der Fälle Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE) im United Kingdom. (Quelle: http://www.oie.int/eng/info/en_esbru.htm , Mai 2006)	38
II.5. Anzahl der CJK-Verdachtsfälle unter 50 Jahren zwischen 1996 und 31.12.2005 sowie Anzahl der Todesfälle als Folge der vCJK bis 31.12.2005. (Quelle: http://www.eurocjd.ed.ac.uk/vCJK.htm , Mai 2006)	39
II.6. Überwiesene CJK-Fälle, gesicherte und vermutete CJK-Todesfälle in Großbritannien (Stand: 30. Juni 2006). (Quelle: http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm , Juli 2006)	40
III.1. Protokoll für die Herstellung von Sammel- und Trenngel für die PAGE . .	64
III.2. Protokoll für die Durchführung der Silberfärbung	65
IV.1. Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat	77
A.1. Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein aus verdünnter Magermilch mit BSA, SDS und Tween 20	116
A.2. Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein aus verdünnter Magermilch mit verschiedenen SDS-Konzentrationen	116
A.3. Zentrifugation von pathologischem Hirnhomogenat	116
A.4. Einfluss von SDS und Ultraschall auf den Nachweis von PrP ^{Sc} in verdautem Hirnhomogenat	117
A.5. Einfluss von SDS und Ultraschall auf den Nachweis von PrP ^{Sc} in nativem Hirnhomogenat	117
A.6. Zerschäumung von rekombinantem Prionprotein in PBS mit SDS	117
A.7. Zerschäumung von verdautem Hirnhomogenat	117
A.8. Zerschäumung von nativem Hirnhomogenat	118
A.9. Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/97 . . .	118

A.10. Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/161 . .	118
A.11. Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/309 . .	119
A.12. Zerschäumung von pathologischem Hirnhomogenat; Verdünnung 1/376 . .	119
A.13. Zerschäumung eines Gemisches von pathologischem und gesundem Hirn- homogenat: ER der ersten Spumatfraktion	119
A.14. Zerschäumung eines negativ getesteten Hirnhomogenat-Verschnittes	120
A.15. Zerschäumung von Hirnverschnitt mit 1/81 positivem Hirnhomogenat . . .	120