

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**RT-QuIC-Assay zur Detektion von BSE
in Rindern im Vergleich zu anderen
Proteinaggregat-Detektionsverfahren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Barbara Charlotte Schiller

aus

Heidelberg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in: Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „RT-QuIC-Assay zur Detektion von BSE in Rindern im Vergleich zu anderen Proteinaggregat-Detektionsverfahren“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Proteinaceous Infectious Particle</i>	1
1.2 Die Prion-Hypothese.....	4
1.3 Transmissible Spongiforme Encephalopathien.....	4
1.4 TSE als Zoonosen.....	5
1.5 TSE beim Menschen.....	6
1.6 Bovine spongiforme Encephalopathie.....	8
1.7 Nachweismethoden von Prionerkrankungen	9
1.7.1 Histopathologischer und immunhistologischer Nachweis	11
1.7.2 PET-Blot.....	12
1.7.3 PMCA.....	13
1.7.4 RT-QuIC.....	13
1.7.5 Membran-Adsorptionsassay	14
1.8 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Verwendete Antikörper.....	18
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Datenauswertung.....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Entnahme von Hirngewebeproben.....	21
2.2.2 Herstellung von Hirnhomogenaten.....	22
2.2.3 Gewinnung von bovinem rekombinantem PrP	22
2.2.4 RT-QuIC.....	24
2.2.5 DNase-Verdau	25
2.2.6 Proteinase K-Verdau.....	25
2.2.7 MAA	25
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Optimierung des RT-QuIC-Assays	27
3.1.1 Vergleichende Betrachtung unterschiedlicher Substrate.....	28
3.1.2 Einfluss von Salz auf die <i>Seeding</i> -Aktivität.....	32
3.1.3 Substratkonzentration.....	32
3.1.4 Ultraschallbehandlung	33
3.1.5 Hitzedenaturiertes rekombinantes PrP	35
3.1.6 Aufhebung der Adhäsion durch Beschichtung	36

3.1.7	Oberflächenvergrößerung mittels Glasperlen.....	37
3.2	Anwendung von RT-QuIC und MAA zur Detektion von BSE in Rinderhirnen	37
3.3	Anwendung verschiedener Proteinaggregat-Detektionsverfahren zur Detektion von BSE in unterschiedlichen Hirnregionen	43
3.3.1	Detektion von PrP ^{Sc} im Cerebellum	45
3.3.2	Detektion von PrP ^{Sc} in den Basalganglien	46
3.3.3	Detektion von PrP ^{Sc} im Diencephalon.....	47
3.3.4	Detektion von PrP ^{Sc} im Hirnstamm	48
3.4	Vergleichende Betrachtung der Proteinaggregat-Detektionsverfahren	48
4	Diskussion.....	51
4.1	Anwendbarkeit von RT-QuIC zur Detektion von BSE	51
4.1.1	Optimierung des RT-QuIC Assays	51
4.1.2	Schnelltestcharakter von RT-QuIC.....	53
4.2	Anwendung von RT-QuIC und MAA zur Detektion von BSE in Rinderhirnen	54
4.3	Anwendung verschiedener Proteinaggregat-Detektionsverfahren zur Detektion von BSE in unterschiedlichen Hirnregionen	54
4.4	Vergleichende Betrachtung von Proteinaggregat-Detektionsverfahren.....	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von PrP ^c und PrP ^{Sc}	3
Abbildung 2: Hirnschnitt eines an CJD erkrankten Patienten.....	11
Abbildung 3: PET-Blot eines mit BSE infizierten Tieres.....	12
Abbildung 4: Elutionsprofil der Aufreinigung von recPrP mittels FPLC.....	24
Abbildung 5: Vergleich unterschiedlicher Substrate.....	29
Abbildung 6: Vergleich der <i>Seeding</i> -Aktivität unterschiedlicher Chargen.....	31
Abbildung 7: Einfluss von Salz auf die <i>Seeding</i> -Aktivität.....	32
Abbildung 8: Einfluss der Substratmenge auf die <i>Seeding</i> -Aktivität.....	33
Abbildung 9: Einfluss von Ultraschall auf die <i>Seeding</i> -Aktivität.....	34
Abbildung 10: Einfluss der Anwendung von hitzedenaturiertem recPrP.....	35
Abbildung 11: Auswirkung von Adhäsionsaufhebung.....	36
Abbildung 12: Oberflächenvergrößerung mittels <i>Beads</i>	37
Abbildung 13: RT-QuIC der Proben 30 bis 35.....	38
Abbildung 14: MAA der Proben 1 bis 70.....	39
Abbildung 15: RT-QuIC verschiedener Hirnregionen von Tier A.....	43
Abbildung 16: MAA der verschiedenen Hirnregionen der Tiere A bis O.....	44
Abbildung 17: <i>Lag</i> -Phase verschiedener Verdünnungsstufen.....	49
Abbildung 18: <i>Lag</i> -Phase verschiedener Hirnregionen.....	49
Abbildung 19: <i>Lag</i> -Phase von klassischer und atypischer BSE.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien	16
Tabelle 2: Verwendete Materialien.....	17
Tabelle 3: Verwendete Geräte	18
Tabelle 4: Verwendete Antikörper.....	18
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Gewinnung von rekombinantem PrP	19
Tabelle 6: RT-QuIC-Puffer.....	20
Tabelle 7: Puffer und Lösungen für den MAA.....	21
Tabelle 8: RT-QuIC und MAA der Proben 1 bis 70.	40
Tabelle 9: Nachweis von PrP ^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Cerebellum.	45
Tabelle 10: Nachweis von PrP ^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot in den Basalganglien.	46
Tabelle 11: Nachweis von PrP ^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Diencephalon.....	47
Tabelle 12: Nachweis von PrP ^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Hirnstamm.	48

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
aThTFU	<i>Average ThT fluorescent units</i>
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
C-BSE	Klassische BSE-Form vom C-Typ
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
DOC	<i>Sodium deoxycholate</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
MAA	Membran-Adsorptionsassay
PET-Blot	<i>Paraffin embedded tissue blot</i>
PK	Proteinase K
PMCA	<i>Protein misfolding cyclic amplification</i>
PrP	Prionprotein
PrP ^c	Zelluläre nicht-pathologische Form des Prionproteins, c für <i>cellular</i>
PrP ^{res}	Proteinase K-resistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	Pathologische Isoform des Prionproteins, sc für Scrapie gemäß Erstbeschreibung
rbovPrP	Rekombinantes bovines Prionprotein
recPrP	Rekombinantes Prionprotein
RT-QuIC	<i>Real-time quaking-induced conversion assay</i>
sCJD	Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ThT	Thioflavin T
ThTFU	<i>ThT fluorescent units</i>
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
vCJD	Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

1 Einleitung

1.1 *Proteinaceous Infectious Particle*

Im Jahre 1982 wurde von Prusiner der Begriff des *Proteinaceous Infectious Particle* oder Prion eingeführt. Dieser beschreibt Aggregate eines kleinen Proteins, welche erstmals in Gehirnen von an Scrapie erkrankten Schafen nachgewiesen wurden (Bolton et al. 1982). Scrapie gehört dem Formenkreis der transmissiblen spongiformen Encephalopathien (TSE) oder Prionerkrankungen an, bei denen es sich um infektiöse neurodegenerative Erkrankungen handelt. Sie treten bei einer Vielzahl von Säugetieren auf und führen unweigerlich zum Tode.

Als auslösendes Agens der TSE wird derzeit das bei der Aufreinigung des Scrapie-Agens isolierte Prion angesehen (Prusiner 1982), welches auch zum Nachweis der Erkrankung herangezogen wird. Es werden verschiedene Konformationen des Prionproteins (PrP) unterschieden, wobei die eine das ubiquitär im Körper vorkommende zelluläre und nicht pathologische PrP^c (c für *cellular*) ist (Linden et al. 2008). Weiterhin existieren pathologische, infektiöse Formen (PrP^{Sc}; Sc für Scrapie, nach der erstbeschriebenen Prionerkrankung).

Bei PrP^c handelt es sich um ein membrangebundenes Sialoglykoprotein, welches außer in Neuronen noch in einer Reihe von anderen Geweben exprimiert wird (Brown et al. 1990; Brown et al. 1998b). Es weist dabei höchste Konzentrationen im zentralen Nervensystem auf (Oesch et al. 1985), wobei hier eine unterschiedliche Expression in den verschiedenen Hirnarealen zu beobachten ist (Brown et al. 1996; Brown et al. 1998a; Giese et al. 1998). PrP^c kommt sowohl intra- als auch extrazellulär vor und weist im adulten Körper, in dem es überwiegend in Neuronen an synaptischen Membranen lokalisiert ist (Herms et al. 1999), eine andere Verteilung als im Neugeborenen auf, bei dem PrP^c homogener im Gewebe auftritt (Fournier et al. 1998; Li et al. 2001; Ford et al. 2002; Miele et al. 2003).

Obwohl die Funktion von PrP^c bisher noch nicht hinreichend geklärt werden konnte, gibt es Hinweise auf eine Interaktion mit Kupfer-Ionen (Brown et al. 1997b; Kramer et al. 2001). Die Bindung an Kupfer ermöglicht dem PrP^c wahrscheinlich antioxidativ zu wirken und vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen (Brown et al. 1997a; Watt et al. 2005). Auch eine Beteiligung im Metabolismus von Mangan (Kralovicova et al. 2009) und Zink (Watt und Hooper 2003) wird angenommen. Weiterhin werden die Funktion als Hitzeschockprotein und eine mögliche Beteiligung bei der Modulation intrazellulärer Signale beschrieben (Solis et al. 2013). So konnte etwa gezeigt werden, dass PrP^c eine Rolle in der Verarbeitung sensorischer Reize durch das olfaktorische System spielt (Le Pichon et al. 2009). Auch in die Instandhaltung von Myelin (Bremer et al. 2010) sowie in die Neurogenese und neuronale Differenzierung (Steele et al. 2006) ist PrP^c involviert. Weiter konnte an Muskelgewebe von Mäusen eine Beteiligung an der Muskelregeneration gezeigt werden (Stella et al. 2010).

Evolutionär zeigt die Untersuchung von PrP^c verschiedener Mammalier eine hohe Übereinstimmung in der Proteinstruktur und Aminosäuresequenz (Calzolari et al. 2005; Gossert et al. 2005; Lysek et al. 2005), wobei letztere bis hin zu 87–90 % identisch ist (Gabriel et al. 1992). Auch PrP^{Sc} weist dieselbe Sequenz und Primärstruktur wie die zelluläre Isoform auf (Stahl et al. 1993).

Das humane *PRNP*-Gen, welches auf Exon 2 für PrP^c codiert, ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 auf Position 13 lokalisiert (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986), während sich das bovine Gen auf Exon 3 des Chromosoms 13 befindet (Ryan und Womack 1993). Strukturell kennzeichnend für das humane PrP^c ist eine Aminosäurekette mit einer Länge von 253 Aminosäuren (AS). Beim Rind wird eine Länge von 264 AS angegeben (Murdoch und Murdoch 2015).

Nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum erfolgt im Golgi-Apparat im Zuge der posttranslationalen Modifikation eine Kürzung der primären Proteinsequenz auf 209 AS (PrP^c 23–231) und anschließend der Transport zur Zelloberfläche (Taraboulos et al. 1992). Das Molekulargewicht des fertigen Proteins beträgt etwa 35 kDa. Die Verankerung an der Zelloberfläche erfolgt über einen Glykophosphatidylinositol-Anker, welcher die 23 C-terminalen AS ersetzt. Von dort kann PrP^c wieder endocytiert und gegebenenfalls modifiziert erneut eingebaut werden (Caughey und Raymond 1991).

Am N-terminalen Ende des Proteins befinden sich zwei Glykosylierungspunkte (Asparagin 181 und 197 beim humanen PrP^c) (Rogers et al. 1990), welche im Western Blot oder ELISA die drei charakteristischen Glykosylierungsformen di-, mono- und unglykosyliert bedingen und so eine Differenzierung zwischen pathologischer und zellulärer Isoform ermöglichen. Weiterhin befindet sich N-terminal eine repetitive Sequenz aus acht AS (*Octarepeat*), welche eine Bindung an Kupfer-Ionen ermöglicht.

Die Sekundärstruktur von PrP^c besteht aus drei α -Helices und zwei kurzen antiparallelen β -Faltblättern. Zwischen Helix eins und drei besteht eine Disulfidbrücke. Das N-terminale Ende bildet einen *Random coil* (Riek et al. 1997). PrP^{Sc} unterscheidet sich hiervon durch einen höheren β -Faltblatt-Anteil (Riesner 2003), welcher zusammen mit der Neigung zur Aggregatbildung die partielle Resistenz gegen Proteinase K (PK) bedingt (Jendroska et al. 1991; Johnson et al. 2011). Eine schematische Darstellung von PrP^c und PrP^{Sc} zeigt Abbildung 1.

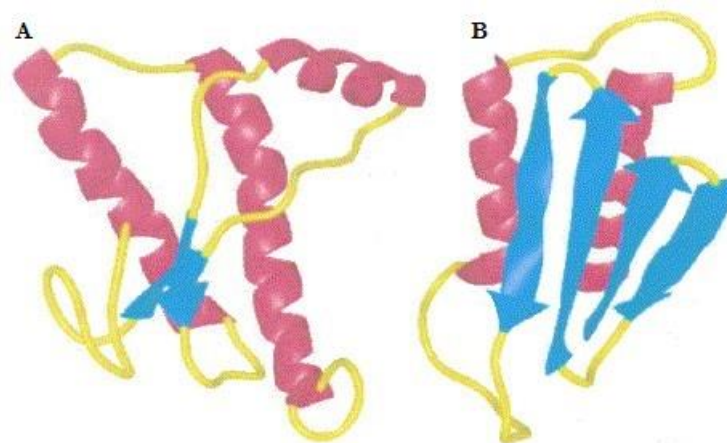


Abbildung 1: Struktur von PrP^c und PrP^{Sc}. Schematische Darstellung der Struktur von PrP^c (A) und PrP^{Sc} (B) (Cohen 1999). α -Helices sind in rot, β -Faltblattstrukturen in blau dargestellt. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags (modifiziert).

Während PrP^c vollständig von dem Enzym abgebaut wird, ist PrP^{Sc} durch seine strukturellen Unterschiede in seinem Kern vor dem enzymatischen Abbau geschützt. Dieser wird als PrP^{res} (res für PK resistant) bezeichnet und kann mit PrP-spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden (Caughey et al. 2009).

Weiterhin kann man mit Hilfe der PK-Spaltstellen verschiedene Priontypen voneinander differenzieren (Bessen und Marsh 1992; Monari et al. 1994; Parchi et al. 1999). Zusammen mit weiteren konformationsmodifizierenden Faktoren werden diese für die Existenz zahlreicher Subtypen der gleichen Prionerkrankung verantwortlich gemacht und generieren unterschiedliche klinische, pathologische und molekulare Erscheinungsbilder (Bessen und Marsh 1994; Bessen et al. 1995; Safar et al. 1998; Bruce 2003; Baron GS et al. 2011; Parchi et al. 2012). Bei der bovinen Form der TSE etwa wurden so drei unterschiedliche Typen (C, H und L) identifiziert (Jacobs et al. 2007).

In den letzten Jahren wurde vermehrt die Rolle von RNA bzw. microRNA und der Pathogenese von Prionerkrankungen untersucht. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von RNA und der Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} festgestellt werden (Deleault et al. 2003; Deleault et al. 2005), was als entscheidender Mechanismus in der Pathophysiologie der Erkrankung angesehen wird. Ebenso gibt es Hinweise für eine Beteiligung von Phospholipiden wie etwa Phosphatidylethanolamin (Deleault et al. 2012) an der Amplifikation von PrP^{Sc}.

PrP weist eine Resistenz gegen herkömmliche bakterizide, fungizide und auch antivirale Dekontaminationsverfahren auf (Ward et al. 1974; Alper et al. 1978; Prusiner et al. 1981; Diener et al. 1982; Caughey et al. 1991; Neary et al. 1991), ist aber sensibel auf Behandlung mit proteinkonformationsverändernden Verfahren. Die Inaktivierung des infektiösen PrP^{Sc} kann daher mit Hilfe von chaotropen Salzen, Säuren oder alkalischen Lösungen oder Autoklavieren bei 134 °C erfolgen (World Health Organization 1999; Rutala et al. 2010).

1.2 Die Prion-Hypothese

Auf der Suche nach dem Scrapie-auslösenden Agens, welches die nach anfänglich langer Inkubationszeit rasch progredienten Encephalitiden bei infizierten Schafen auslöst, war zunächst ein Virus diskutiert worden (Sigurdsson et al. 1957). Nach der Entdeckung, dass PrP aber nicht durch herkömmliche Nukleinsäure-Inaktivierungsprozesse wie etwa ionisierende oder ultraviolette Strahlung zu zerstören ist (Alper et al. 1978; Gibbs et al. 1978), formulierte Prusiner die Prion-Hypothese (*protein-only hypothesis*). Diese besagt, dass TSE durch ein infektiöses Protein, das PrP^{Sc}, hervorgerufen werden (Prusiner 1982). Nachdem die mRNA von PrP auch in Zellen nichtinfizierter Säuger nachgewiesen werden konnte (Chesebro et al. 1985), postulierte er, dass ein fehlgefaltetes Prion die Umfaltung eines anderen Prionproteins induzieren kann (Prusiner et al. 1978) und somit infektiös ist (Bolton et al. 1982).

Die Rolle von DNA und RNA bei der Entstehung von Prionproteinaggregaten ist noch Gegenstand der Forschung. So gibt es Hinweise darauf, dass Nucleinsäuren und Nucleinsäure-bindende Proteine an der Umfaltung von PrP^c zu PrP^{Sc} beteiligt sind (Sklaviadis et al. 1993; Caughey und Kocisko 2003; Deleault et al. 2003; Lima et al. 2006; Marques et al. 2009). Die Übertragung der Erkrankung von einem Individuum auf ein anderes ist aber mit dem fehlgefalteten Protein allein möglich.

1.3 Transmissible Spongiforme Encephalopathien

Prionerkrankungen oder Transmissible spongiforme Encephalopathien sind neurodegenerative Erkrankungen, die sich bei einer Vielzahl von Säugetieren manifestieren und als deren auslösendes Agens das Prionprotein angesehen wird (Prusiner 1982). Im Unterschied zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen sind sie infektiös und können auch von einer auf eine andere Spezies übertragen werden. Bis heute gibt es keine Therapie und der Verlauf ist stets tödlich.

Zu den TSE zählen unter anderem Scrapie bei Schafen, Bovine spongiforme Encephalopathie (BSE) bei Rindern, *Chronic wasting disease* bei Hirschartigen und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen. Weiterhin werden die bei Nerzen und Katzen auftretenden *Transmissible mink encephalopathy* (Marsh et al. 1969) bzw. die Feline spongiforme Encephalopathie zu den TSE gerechnet (Aldhous 1990). Auch bei katzenartigen Zootieren sind TSE beschrieben (Kirkwood und Cunningham 1994). Unter den Nutztieren stellen Dromedare eine weitere betroffene Art dar (Babelhadj et al. 2018).

Die Erstbeschreibung einer Prionerkrankung datiert zurück ins 18. Jahrhundert (Rüdiger 1710; Brown und Bradley 1998). Das damals beschriebene Krankheitsbild der Scrapie äußert sich durch Koordinationsverluste und Verhaltensänderungen bei den Tieren. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Umfaltung von PrP^c in die pathologische Isoform PrP^{Sc} angenommen. Letzteres induziert die Zusammenlagerung von oligomeren Strukturen,

welche im zentralen Nervensystem Proteinaggregate bilden (Merz et al. 1981; Walsh und Selkoe 2004; Silveira et al. 2005). Es entstehen schwammartige Hirngewebeveränderungen zum Teil mit amyloiden Plaques (Prusiner et al. 1983), welche die Struktur der Nervenzellen schädigen (DeArmond et al. 1985). Charakteristisch für TSE sind Gliose, Untergang neuronaler Zellen und Spongiose im Hirnparenchym. Es kommt zu stark variierenden mitunter jahrzehntelangen Inkubationszeiten (Collinge et al. 2006).

Die Infektion mit PrP^{Sc} erfolgt unter anderem auf exogenem Wege etwa durch die Nahrungskette. Über den oberen Gastrointestinaltrakt erreicht es unbeschadet von der Magensäure und den Lipasen im Duodenum den unteren Verdauungstrakt, von wo aus es in die Mukosazellen aufgenommen wird. Der Aufstieg ins Gehirn erfolgt über das autonome Nervensystem (Beekes et al. 1998). Zuvor scheint eine Infiltration des Lymphsystems, im Besonderen der Milz bzw. des gastrointestinalen lymphatischen Systems von Bedeutung für die Replikation von PrP^{Sc} zu sein (Brown und Mabbott 2014).

1.4 TSE als Zoonosen

Unter Zoonosen versteht man Krankheiten, die sich von einer Spezies auf den Menschen und umgekehrt übertragen lassen und Erreger wie etwa Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze und Prionen umfassen. Zu den bekanntesten und für den Menschen gefährlichen Vertretern gehören etwa Ebola oder Tollwut. Auch TSE gehören zu dieser Gruppe und ihre Übertragungswege erstrecken sich unter anderem vom Rind zum Menschen.

Das bei Schafen und Ziegen auftretende Scrapie wurde erstmals 1922 wissenschaftlich fundiert beschrieben (McGowan 1922) und 1936 als infektiös eingestuft (Cuille und Chelle 1936). Kurz darauf folgte die Einordnung als auf andere Spezies übertragbare Erkrankung (Cuille und Chelle 1939), aufgrund erfolgreicher Übertragung auf Nagetiere und Totenkopffäffchen (Zlotnik und Rennie 1962; Zlotnik und Rennie 1965; Gibbs et al. 1980).

Die beim Menschen durch PrP^{Sc} ausgelösten TSE sind vor allem nach den 1990er Jahren durch den großen Ausbruch von BSE in Großbritannien in den Fokus der breiten Massen gerückt.

In Nordamerika, aber auch in Teilen Europas, ist eine Übertragung von TSE auf den Menschen durch die Krankheitsausbreitung in hirschartigen Tieren problematisch (Williams und Young 1980). Die bei den Tieren als *Chronic wasting disease* bezeichnete Erkrankung steht in der Diskussion durch den Verzehr oder den Kontakt mit infizierten Tieren auf den Menschen übertragen zu werden. Eine unzureichende Untersuchung auf das Vorliegen dieser Erkrankung ist vor allem bei selbsterlegten Tieren problematisch.

Eine Übertragung innerhalb einer Spezies, aber auch auf andere Spezies, kann vermutlich auch über Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Urin und Exkremente erfolgen, wobei Prionproteinaggregate in die Umwelt und damit in den Boden gelangen und dann von anderen Tieren etwa über die Nahrung aufgenommen werden (Brown und Gajdusek 1991;

Chesebro 2003; Johnson et al. 2006). PrP^{Sc} wird im Boden konserviert, welcher dann mehrere Jahre als Reservoir für PrP^{Sc} fungieren kann (Brown und Gajdusek 1991). Weidetiere infizieren sich auf diesem Wege indirekt an Exkrementen oder den Überresten verstorbener Tiere und können damit eine Infektionsquelle für den Menschen darstellen. Eine neuere experimentelle Studie zeigt jedoch, dass PrP^{Sc} zwar lange Zeit im Boden konserviert wird, die Ausbreitung jedoch gering ist, wenn kein Vektor involviert ist bzw. keine Verteilung durch Regenwasser erfolgt (Somerville et al. 2019).

Die Übertragung von TSE ist bei nah verwandten Arten effizienter (Pattison 1965). Eine Speziesbarriere bei entfernteren Arten behindert die Verbreitung der Krankheit zunächst. Erst in weiteren Passagen in einer neuen Spezies infizieren sich die Tiere untereinander effizient und Prionstämme lassen sich wieder identifizieren (Kimberlin et al. 1987; Bruce 2003). Hierfür wird ein anfänglich ablaufender und nötiger Anpassungsprozess verantwortlich gemacht (Chesebro 2003). Transgene Mäuse, die ein transgenes, fremdes PrP exprimieren, sind erhöht anfällig für TSE dieser Spezies (Scott et al. 1989; Telling et al. 1994). Daher wird vermutet, dass die Ähnlichkeit von PrP in den Spezies untereinander eine tragende Rolle bei der Speziesbarriere einnimmt (Carlson et al. 1986).

In der Forschung macht man sich die Übertragungsmöglichkeit von Prionerkrankungen auf andere Arten zu Nutze. So dienen experimentell mit Scrapie infizierte Mäuse (Chandler 1961) oder etwa mit BSE infizierte Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) als Tiermodelle. Letztere fungieren als Modell für die Übertragung von BSE auf den Menschen (Holznagel et al. 2013).

1.5 TSE beim Menschen

Es sind mehrere verschiedenartige humane Formen der TSE bekannt, wobei ca. 90 % der Fälle sporadisch, ca. 10 % hereditär und nur ca. 1 % erworben sind (Geschwind 2015). Die sporadische CJD hat dabei eine Inzidenz von 1–2:1 000 000 (Masters et al. 1979). Zu den durch genetische Prädispositionen verursachten Prionerkrankungen zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (Gerstmann et al. 1935) und die Fatale Familiäre Insomnie (Lugaresi et al. 1986). Auch kann eine Infektion übertragen durch andere an einer TSE erkrankte Individuen Ursache sein. Als exogene Faktoren können etwa eine mögliche perorale Aufnahme infektiösen Agens in Nahrungsmitteln oder ein anderweitiger Kontakt mit infiziertem Material ätiologischer Hintergrund sein. Eine hieraus resultierende Krankheit ist Kuru, welche eine in Papua-Neuguinea beschriebene Krankheit ist und auf Todesriten zurückgeführt wird (Gajdusek und Zigas 1957). Weiter gibt es die iatrogene CJD, welche durch akzidentielle Übertragung von CJD etwa durch infiziertes OP-Besteck (Hamaguchi et al. 2009), Bluttransfusionen (Llewelyn et al. 2004) oder durch Hirnhaut- oder Corneatransplantate ausgelöst wird (Duffy et al. 1974; Fradkin et al. 1991; Will 1993). Eine weitere humane Form ist die variante CJD (vCJD), die durch perorale Aufnahme von mit BSE infizierter Nahrung ausgelöst wird (Will et al. 1996; Lasmézas et al. 2005) und

hauptsächlich junge Menschen betrifft (Britton et al. 1995; Will et al. 1996; Belay und Schonberger 2002). Ein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Suszeptibilität für akquirierte Prionerkrankungen konnte im Mausmodell gezeigt werden. Jüngere Individuen entwickelten im Vergleich zu älteren Artgenossen sehr viel häufiger eine klinisch apparente Prionerkrankung (Brown und Mabbott 2014).

Initial manifestiert sich die vCJD mit psychiatrischen Symptomen wie Depression, akustischen oder visuellen Halluzinationen und Wahnvorstellungen (Zeidler et al. 1997b). Später eintretende Symptome umfassen rasch progrediente neurologische Störungen wie Demenz, Ataxie, unwillkürliche Bewegungen sowie akinetischen Mutismus (Zeidler et al. 1997a). Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 14 Monate (Heath et al. 2011).

Die Inkubationszeiten der auf diese unterschiedlichen Weisen erworbenen Krankheiten variieren stark und können etwa für Kuru über 50 Jahre betragen (Collinge et al. 2008). Die durch den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln hervorgerufene vCJD hat in den 1990 Jahren nicht die befürchtete Krankheitswelle nach sich gezogen, weswegen aufgrund der langen Inkubationszeit bei Kuru nun eine ähnlich lange Inkubation (Collinge et al. 2006) zusammen mit einer genetischen Prädisposition diskutiert wird (Saba und Booth 2013). Ein bekannter genetischer Risikofaktor ist ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im Codon 129 des *PRNP*-Gens, welcher entweder für Methionin oder Valin codiert (Collinge et al. 1991). Fast alle Fälle von vCJD in der UK, welche einer genetischen Testung unterzogen wurden, waren homozygot für Methionin (Mercier et al. 2008). Bei einem mutmaßlichen vCJD-Fall lag eine Heterozygotie vor (Kaski et al. 2009).

Im Tiermodell konnte bei der experimentellen Übertragung von BSE auf Javaneraffen gezeigt werden, dass es bei oraler sowie intracerebraler Inokulation zu variablen Inkubationszeiten kommt (Montag et al. 2013). Der Beginn der Erkrankung wurde an Verhaltensänderungen der Tiere bemessen und konnte *post mortem* bei allen Tieren mittels Western Blot bestätigt werden. Ein Vergleich der Glykosilierungsmuster von Affen-adaptiertem BSE mit dem von vCJD zeigte starke Übereinstimmungen. Vor dem Auftreten klinischer Symptome konnten bei mit BSE infizierten Javaneraffen bereits Hinweise auf atypisches PrP^{Sc} gefunden werden, was zukünftig die Diagnosestellung entscheidend beeinflussen könnte (Holznagel et al. 2013).

Bei der vCJD wurden bis heute nur verhältnismäßig wenige Fälle beobachtet. Seit der ersten Fallbeschreibung 1996 sind bis März 2021 weltweit 232 Fälle bekannt geworden (Watson et al. 2021). Hierfür wird, neben dem beschriebenen Einfluss einer variierenden Inkubationszeit und der genetischen Prädisposition, auch eine Barriere bei der Übertragung zwischen den unterschiedlichen Spezies verantwortlich gemacht (Anderson et al. 1996).

Da von einer Vielzahl asymptomatischer Träger auszugehen ist (Gill et al. 2013), welche eine potentielle Gefahr für Andere durch iatrogene Übertragung darstellen, werden Möglichkeiten untersucht, eine Detektion von PrP^{Sc} bereits in der asymptomatischen Phase zu gewährleisten.

1.6 Bovine spongiforme Enzephalopathie

BSE ist die bei Rindern auftretende Form der TSE und wird auch als „Rinderwahnsinn“ (*Mad cow disease*) bezeichnet. Im Jahre 1986 entdeckt (Wells et al. 1987), geriet sie in den 1990er Jahren in den Fokus der Öffentlichkeit. Damals wurde vor allem in Großbritannien ein Ausbruch dieser Krankheit mit fast 200 000 infizierten Tieren beobachtet, was zu einer präventiven Euthanasie von über 4 Millionen Rindern führte (Brown et al. 2001).

Inzwischen wurden neben der damals aufgetretenen klassischen BSE-Form (C-Typ) noch zwei atypische Formen (H- und L-Typ) beschrieben (Biacabe et al. 2004; Casalone et al. 2004). Letztere sind selten und scheinen sporadische, spontan auftretende Formen der BSE darzustellen (Brown et al. 2006). Für den H-Typ wurde jedoch auch eine Mutation an Codon-Position E211K im *PRNP*-Gen beschrieben, welche eine genetische Variante als mögliche Ursache nahelegt (Nicholson et al. 2008; Richt und Hall 2008). Bei der genetischen Form der humanen CJD ist die häufigste Ursache eine Mutation an der homologen Codon-Position E200K (Kovács et al. 2005).

Die atypischen Formen von BSE manifestieren sich anscheinend bevorzugt bei älteren Individuen (Harris 2012). Abzugrenzen sind sie vom C-Typ auch durch ihre molekularen Eigenschaften, das resultierende Krankheitsbild, Inkubationszeit und Neuropathologie (Lombardi et al. 2008; Fukuda et al. 2009; Okada et al. 2011). Möglicherweise lassen sich die atypischen Formen noch weiter untergliedern (Masujin et al. 2008). Zur Differenzierung der unterschiedlichen Priontypen dient das Bandenmuster im Western Blot, welches nach PK-Verdau im Gel beobachtet wird und neben der Größe des PK-resistenten Fragmentes auf einer unterschiedlichen Verteilung von glykosylierten und unglykosylierten Molekülen im PrP^{res} der drei Typen beruht (Baron T et al. 2011; Torres et al. 2011).

Für BSE wird hauptsächlich eine durch orale Aufnahme von PrP^{Sc} ausgelöste Infektion angenommen (Gough und Maddison 2010). Als Ursprung erscheint die Verunreinigung von Futter durch eine genetische Variante von BSE wahrscheinlich (Richt und Hall 2008). Eine beschleunigte Verbreitung wurde anschließend vermutlich durch die Verwertung von infizierten Rindergeweben begünstigt (Nathanson et al. 1997). Eine Übertragung von BSE auf Kälber konnte in Zusammenhang mit der Verfütterung von Milchersatz mit tierischen Fetten beobachtet werden (Clauss et al. 2006).

Weiter wird auch eine horizontale Übertragung von einer sporadischen, durch einen atypischen Prionstamm verursachten Form als Epidemie auslösend diskutiert (Buschmann et al. 2006). Im Mausmodell konnte bei mit dem H-Typ infizierten Tieren eine Veränderung

der Charakteristika des Prionstammes hin zur klassischen C-Variante beobachtet werden, was eine möglich Entstehung von C-BSE aus einer atypischen Form möglich erscheinen lässt (Baron T et al. 2011; Torres et al. 2011).

Die Verfütterung von tierischem Protein ist seit 1988 aufgrund der BSE-Epidemie untersagt. Der 1. April 1996 gilt als Stichtag für die flächendeckende Umsetzung dieser Maßnahme. In Großbritannien sind seitdem insgesamt noch 184 BSE-Fälle bei nach dem Stichtag geborenen Rindern aufgetreten (Animal and Plant Health Agency 2021). In Deutschland wurden im Zeitraum von 2000 bis 2020 416 BSE-Fälle bestätigt, während bei den 988 629 in der Europäischen Union im Jahre 2020 getesteten Rindern insgesamt 4 Fälle von atypischer BSE und kein Fall von klassischer BSE nachgewiesen werden konnten (European Food Safety Authority 2021).

Symptomatisch werden beim Vollbild von BSE bei den Tieren Verhaltensauffälligkeiten wie Lichtscheue, verändertes Berührungsempfinden, starke Reaktion auf Lärm und Gangunsicherheit beobachtet, außerdem ist ein Tremor und Gewichtsverlust zu verzeichnen (Wilesmith et al. 1988; Braun et al. 1998; Cockcroft 2004). Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen von BSE werden die Tiere euthanasiert und *post mortem* auf das tatsächliche Vorliegen der Erkrankung getestet. Histopathologisch zeigen sich neuronale Vakuolen im Stammhirn sowie Gliose und ein Untergang neuronaler Zellen (Simmons et al. 1996).

C-BSE löst beim Menschen vermutlich durch den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln vCJD aus (Will et al. 1996). Im Tiermodell gelang allerdings auch eine Übertragung atypischer BSE-Formen auf Primaten (Comoy et al. 2008). Im Mausmodell wurden Hinweise dafür gefunden, dass der L-Typ eine höhere Virulenz sowie eine lymphotrope Wirkung im Menschen haben könnte (Kong et al. 2008). Eine Übertragung des L-Typs von Maus zu Maus, welche das humane PrP exprimieren, erscheint hingegen wenig effizient (Wilson et al. 2013).

1.7 Nachweismethoden von Prionerkrankungen

Zur Diagnose von Prionerkrankungen gehört der Nachweis von PrP^{Sc} in Geweben infizierter Individuen. Eine rein klinische Diagnose ist nicht sicher. Nach Auftreten von Symptomen erfolgt die *in vitro* Detektion von PrP^{Sc} mittels Immunhistologie oder biochemisch. Die Kombination verschiedener Verfahren ermöglicht eine zuverlässige Diagnosestellung sowie nähere Charakterisierung (Wemheuer et al. 2013). Immunhistologisch sind Proteinaggregate im Gehirn diagnostisch wegweisend.

Die biochemischen Eigenschaften von PrP können ebenfalls zum Nachweis von TSE genutzt werden. So verwendet man etwa Antikörper, welche spezifisch an PrP binden in Western Blot, ELISA oder PET-Blot (*Paraffin-embedded tissue blot*) (Moh et al. 2010). Eine vorherige Differenzierung zwischen PrP^c und PrP^{Sc} wird durch PK-Verdau erwirkt. PrP^c wird dabei vollständig durch das Enzym abgebaut, während bei PrP^{Sc} eine partielle Resistenz

besteht und somit ein Teil des Proteins, das PrP^{res}, erhalten bleibt (Oesch et al. 1985; Madec et al. 1997). PrP^{res} lässt sich über die Größe des PK-resistenten Fragmentes und weiter über seine spezifischen Glykoformen im Western Blot charakterisieren (Haraguchi et al. 1989). Mono-, di- und unglykosilierte Formen weisen je nach TSE bzw. Prionstamm ein spezifisches Verhältnis zueinander auf (Parchi et al. 1996; Vorberg und Priola 2002). Bei der monoglykosilierten Form lassen sich weiter verschiedene Längen differenzieren, welche ebenfalls zur Unterscheidung dienen (Parchi et al. 1999). Anhand des isoelektrischen Punkts können die Glykoformen in der Gelelektrophorese weiter aufgetrennt werden, wodurch eine Vielzahl an Isoformen zu unterscheiden sind (Castagna et al. 2002).

Weiterhin wird in einigen Nachweisverfahren die Eigenschaft von PrP^{Sc} zur Aggregatbildung genutzt, um kleinste Mengen in ein sichtbares Level zu überführen. Zu den meist angewendeten zählen PMCA (*Protein misfolding cyclic amplification*) und RT-QuIC (*Real time quaking-induced conversion*) (Green und Zanusso 2018).

Zur Objektivierung von Infektiosität haben sich Bioassays bewährt. Hierfür wird infektiöses Material etwa in Mäuse oder Hamster appliziert. Auch kann hierdurch eine Titration erfolgen (Field und Shenton 1973).

Eine sichere Diagnose lässt sich *ante mortem* durch einer Hirnbiopsie stellen. Im Tiermodell konnte bei Hamstern auch mit in der Peripherie gewonnenem Material ein PrP^{Sc}-Nachweis mittels *in vitro* Assay erfolgen (Wilham et al. 2010).

Eine Herausforderung bei der Detektion von PrP^{Sc} ist, neben der Entwicklung eines sensitiven und spezifischen Assays, auch die reproduzierbare Anwendbarkeit für unterschiedliche Prionstämme (Parchi et al. 2012).

Nachfolgend werden einige Nachweismethoden näher erläutert.

1.7.1 Histopathologischer und immunhistologischer Nachweis

Bei an TSE erkrankten Individuen lassen sich im Hirnparenchym die mit einer Neurodegeneration assoziierten spongiformen Auflockerungen darstellen. Diese sind mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung erkennbar (vgl. Abbildung 2).

Proteinaggregate im Gewebe, welche hauptsächlich aus PrP^{Sc} bestehen, können mit anti-PrP Antikörpern nachgewiesen werden. Die immunhistologische Detektion von PrP-Ablagerungen im Gehirn ist derzeit der Gold-Standard für den Nachweis einer vorliegenden TSE (Watts et al. 2006). Unter dem Mikroskop werden hierbei in Paraffin gebettete oder kryokonservierte Hirnschnitte auf charakteristische Ablagerungen hin untersucht. Gewonnen wird das Ausgangsgewebe dabei entweder mittels Biopsie oder erst *post mortem*. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Aufarbeitung und Fixation der Proben sowie des gewählten Antikörpers und der daraus resultierenden Sensitivität bzw. Spezifität (Hardt et al. 2000).

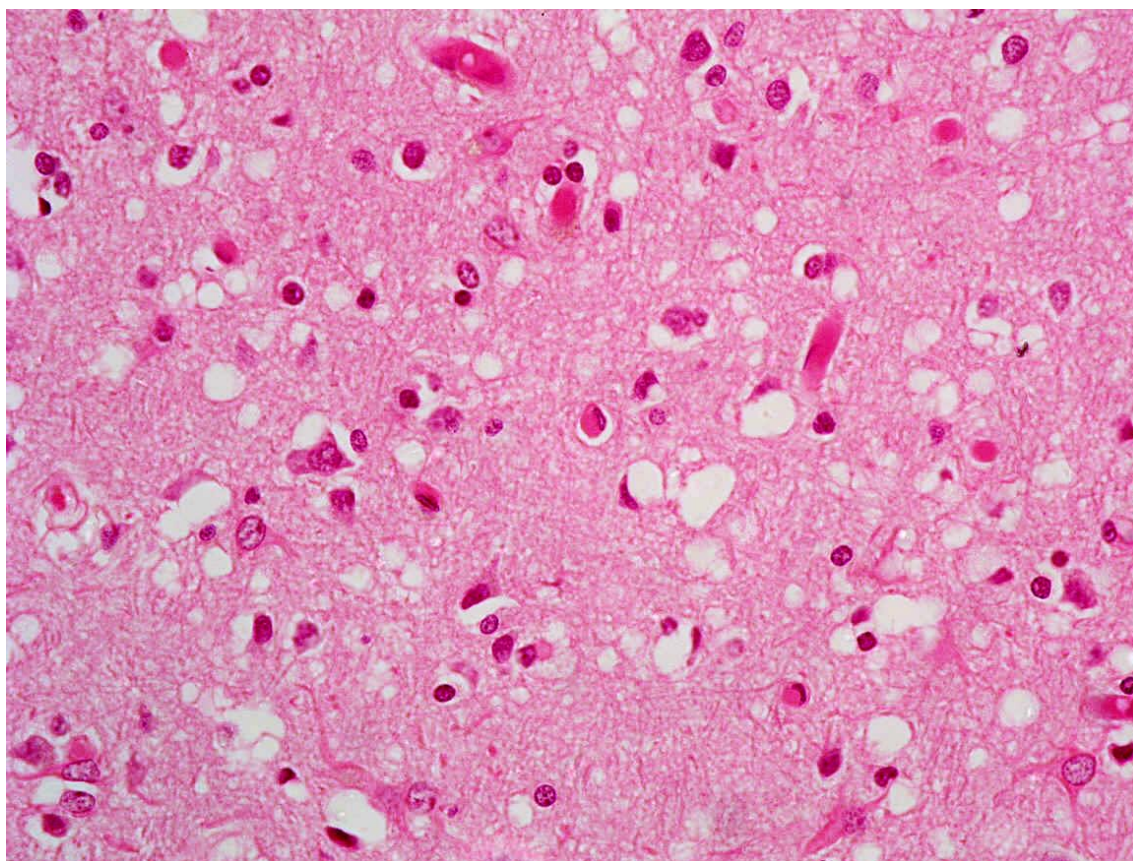


Abbildung 2: Hirnschnitt eines an CJD erkrankten Patienten. Es sind die spongiformen Auflockerungen der Gewebematrix, eine Gliose und ein Nervenzellverlust erkennbar. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer.

1.7.2 PET-Blot

Als weitere Methode zur Detektion von PrP^{Sc} im Hirnparenchym und den krankheitsbedingten mikroskopischen Korrelaten kann auch der *Paraffin embedded tissue blot* (PET-Blot) herangezogen werden. Hirngewebeschnitte werden auf eine Nitrozellulosemembran aufgezogen, die physiologischen Proteine werden mit Proteinase K verdaut und die an die Nitrocellulose gebundenen Proteinaggregate mittels Antikörperreaktion detektiert.

Beim PET-Blot handelt es sich um ein hoch sensitives und spezifisches Verfahren, welches sich zum Nachweis von TSE bereits bewährt hat. Eine vergleichende Betrachtung mit anderen Nachweismethoden ergab hier eine Sensitivität des PET-Blots von 100 % bei Biopsie- und 96,3 % bei Autopsie-Präparaten, bei lediglich 50 % (Biopsie) bzw. 80 % (Autopsie) mit Immunhistochemie (Wemheuer et al. 2013). Bei sCJD gelang mit dem PET-Blot auch der sonst schwierige Nachweis von PrP^{Sc} in Hirnarealen wie etwa der unteren Olive (Schulz-Schaeffer et al. 2000b).

Weiter fand der PET-Blot bereits Anwendung zur Detektion von BSE (Schulz-Schaeffer et al. 2000a) sowie zur Differenzierung zwischen Scrapie und experimentell auf Schafe übertragenem BSE (Webb et al. 2011). Abbildung 3 zeigt beispielhaft den PET-Blot eines mit BSE infizierten Rindes.



Abbildung 3: PET-Blot eines mit BSE infizierten Tieres. Der Hirnschnitt stammt aus dem Obex eines Rindes mit BSE im Vollstadium. Die braune Farbreaktion mit dem Antikörperprodukt visualisiert die Formazanreaktion. Freundlicherweise von Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer zur Verfügung gestellt.

1.7.3 PMCA

Bei der PMCA (*Protein misfolding cyclic amplification*) handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren, das sich zum hochsensitiven Nachweis von PrP^{Sc} etabliert hat (Saá et al. 2005). Natives Hirnhomogenat wird dabei mit PrP^{Sc}-haltigem Probenmaterial inkubiert. Dabei wirkt das infektiöse PrP^{Sc} als Aggregatkern und Triggerung für die Umfaltung von PrP^c zu PrP^{Sc}. Mittels Ultraschall werden die neu gebildeten Aggregate dann in regelmäßigen Abständen wieder zertrümmert, wodurch ein Verstärkungseffekt der Aggregatbildung erwirkt wird (Saborio et al. 2001). Durch das Aufbrechen der gebildeten Proteinaggregate steht mit jeder Runde mehr PrP^{Sc} zur Verfügung, um die Konversion hin zu PrP^{Sc} weiter anzutreiben. Mit der PMCA lassen sich geringste Mengen PrP^{Sc} bis zu einer Verdünnungsstufe von 10⁻¹² des Hirngewebes nachweisen, was einem einzigen Partikel PrP^{Sc} entspricht und damit die Sensitivität von Bioassays überschreitet (Saá et al. 2006; Makarava et al. 2012). Die durch die PMCA getriggerte Konversion resultiert in infektiösem Prionprotein (Moudjou et al. 2013).

Die gleichzeitige Aufarbeitung einer größeren Anzahl an Proben wird durch die Ultraschallbehandlung, die in separaten Gefäßen und einzeln für jede Probe erfolgt, limitiert. Zusätzlich kann es eine Herausforderung darstellen, diese in kontrolliertem Umfang auszuführen. Die Assaydauer variiert zwischen 12 und 96 Stunden (Giaccone und Moda 2020).

Die PMCA könnte möglicherweise Anwendung zur präklinischen Detektion von PrP^{Sc} im Blut finden, um Blutprodukte sicherer zu machen (Lacroux et al. 2014; Concha-Marambio et al. 2016)

1.7.4 RT-QuIC

Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) basiert auf der Messung der Fluoreszenzänderung eines in die durch PrP^{Sc} ausgelöste Aggregatbildung von rekombinantem PrP^c interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (Atarashi et al. 2007). Diese Methode wurde von Mitarbeitenden des Labors von Byron Caughey entwickelt und ermöglicht einen in seiner Sensitivität dem Bioassay vergleichbaren Nachweis geringster Mengen PrP^{Sc} bei gleichzeitig stark verringertem Zeitaufwand (Wilham et al. 2010).

Rekombinant hergestelltes PrP (recPrP) wird mit kleinsten Mengen von infektiösem Material, dem sogenannten *Seed*, versetzt. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) kann die durch den *Seed* sowie durch intermittierendes Schütteln und durch eine Temperatur von 42 °C angeregte Fibrillenbildung des recPrP mit einem Fluoreszenz-Reader sichtbar gemacht werden. ThT wird dabei in den Komplex eingelagert und ändert hierdurch seine Fluoreszenz. Die Proteinaggregation beruht dabei wohl nicht auf der Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc}, vielmehr handelt es sich um eine Anlagerung (Colby et al. 2007). Bei der RT-QuIC-Reaktion scheint kein zusätzliches infektiöses Agens zu entstehen (McGuire et al. 2012), jedoch konnte eine Prion-ähnliche Pathologie bei Mäusen ausgelöst werden (Sano et al. 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität und die Spezifität des Assays von verschiedenen Parametern wie etwa dem eingesetzten rekombinanten Substrat oder der verwendeten Salzkonzentration abhängt (Atarashi et al. 2011a; Orrú et al. 2011). Neben extremer Sensitivität und Spezifität, imponiert als weiterer Vorteil der Schnelltestcharakter der Methode, da in kurzer Zeit große Probenmengen auf das Vorliegen von PrP^{Sc} untersucht werden können (Atarashi et al. 2008).

RT-QuIC fand unter anderem bereits erfolgreich Anwendung bei der Detektion von PrP^{Sc} in Geweben und Körperflüssigkeiten von infizierten Hamstern, Rotwild und Creutzfeldt-Jakob-Patienten (Orrú et al. 2009; Atarashi et al. 2011b; Orrú et al. 2012). Auch zur Detektion von BSE wird die Methode angewendet und ermöglicht sogar eine Unterscheidung zwischen atypischem und typischem BSE (Orrú et al. 2015a).

1.7.5 Membran-Adsorptionsassay

Der Membran-Adsorptionsassay (MAA) ist ein Mikrofiltrationsassay, der sich sowohl die Protease-Resistenz, als auch die Aggregatbildung von PrP^{Sc} zunutze macht (Winklhofer et al. 2001). Es handelt sich um ein *Slot-Blot*-Verfahren, bei dem die Proben nach entsprechender Vorbehandlung mit Proteinase K und DNase über eine Vakuumpumpe durch eine Membran gesaugt werden. Anschließend erfolgt der Nachweis von PrP^{res} über PrP-spezifische Antikörper.

Der MAA fand bereits Anwendung zur Detektion von PrP^{Sc} bei sCJD, Fataler Familiärer Insomnie und dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, wobei eine Sensitivität von 100 % in Biopsie- und 96 % in Autopsiepräparaten beschrieben wurde (Wemheuer et al. 2013). Bei der in der gleichen Studie durchgeführten vergleichenden Betrachtung mit anderen Nachweismethoden wie der Immunhistochemie und dem PET-Blot, erwies sich der MAA als überlegen bzw. ebenbürtig. Auch zur Detektion von klassischem und atypischem Scrapie wurde der MAA bereits erfolgreich angewendet (Wemheuer et al. 2009).

1.8 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden aus Rinderhirnen stammende Gewebeproben auf das Vorliegen von BSE hin untersucht. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme zweier auf unterschiedlichen Mechanismen beruhender Nachweismethoden für PrP^{Sc}, der RT-QuIC und dem MAA.

In einem ersten Teil der Arbeit sollte zunächst eine Adaptation und Etablierung der RT-QuIC für die Detektion von BSE vorgenommen werden. Hierfür sollte experimentell die Auswirkung von variierenden Konzentrationen von im Reaktionsansatz enthaltener Komponenten untersucht werden, um deren unterschiedliche Eignung für den Einsatz in der RT-QuIC mit BSE-haltigen Proben zu evaluieren. Zusätzlich sollten weitere mögliche Einflussgrößen auf den Reaktionsablauf der RT-QuIC näher charakterisiert werden.

Anschließend sollte die Testung der von BSE-infizierten und nicht-infizierten Rindern stammenden Proben mit beiden Nachweismethoden erfolgen. RT-QuIC und MAA sollten abschließend bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen werden. Weiter sollten beide Methoden auf ihre Anwendungsmöglichkeit zur Detektion von klassischem und atypischem BSE hin untersucht werden. Auch die unterschiedliche Eignung zur Detektion von PrP^{Sc} in unterschiedlichen Hirnarealen sollte betrachtet werden. Hierfür wurden Proben aus Cerebellum, Basalganglien, Diencephalon und Hirnstamm mit RT-QuIC und MAA untersucht und diese Ergebnisse mit denen des PET-Blots verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
<i>Acetic acid</i> Rotipuran® 100 %	Carl Roth
BugBuster® <i>Master mix</i>	Novagen™
Calciumchlorid Dihydrat > 99,5 %	Fluka
CDP-Star, <i>ready to-use</i>	Roche
Chloramphenicol	Cal Biochemistry
DNAse	Sigma
EDTA	Carl Roth
<i>Guanidine Thiocyanate pure</i>	Amresco
HCl 30 %	AppliChem
Kanamycin	AppliChem
Laktose	Carl Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat >99,0 %	Sigma Aldrich
Methanol Roth Rotislov >99,8 %	Ultra LC-MS
Natriumchlorid	Merk
NuPage LDS <i>sample buffer</i> (4x)	Thermo Fisher Scientific
NuPage MES-SDS- <i>Running buffer</i> (20x)	Life Technologies
NuPage <i>Transfer Buffer</i> (20x)	Life Technologies
N2 <i>Media supplement</i> (100x)	Gibco
Proteinase K <i>from</i> Engyodontium album	Sigma Aldrich
Roentogen <i>liquid</i>	Tetenal
Roentogen <i>superfix</i>	Tetenal
Roti®-Block <i>ready-to-use</i> , 10x Konzentrat	Roth
Sigmacote	Sigma Aldrich
<i>Sodium deoxycholate</i> (DOC)	Sigma Aldrich
Spectra™ <i>Multicolor broad range protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal®	Thermo Fisher Scientific
Thioflavin T (ThT)	Sigma Aldrich
TRIS PUFFERAN® > 99,9 %	Roth
Tropix® I-BLOCK	Applied Biosystems™
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem
100 % <i>Ethanol absolute for analysis</i>	Millipore

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare Limited
Biosphere <i>Filter Tips</i> , verschiedene Größen	Sarstedt
DeckWorks <i>Pipet tips</i> 1000 µl	Corning
Diamond ECO-Pack™ 10 µl <i>Tip</i>	Glison
DNA LoBind <i>Tube</i> 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Einmalspritzen 10 ml Norm-Ject	Henke Sass Wolf
<i>Extra thick blot paper, Filter paper</i>	BIO-RAD
Glasperlen 1 mm	B. Braun
LDS- <i>Sample buffer</i> (4x)	Thermo Fisher Scientific
Membran Nitrocellulose 0,45 µm Porengröße	Biorad
MicroAmp <i>optical adhesive film</i>	ABI
Ni-NTA <i>Superflow</i>	QIAGEN
NP MES-SDS- <i>Running buffer</i> 20x	Thermo Fisher Scientific
NuPage 12 % Bis/Tris Gele NP0342Box	LifeTechnologie
Protein LoBind <i>Tube</i> 1,5 und 2 ml	Eppendorf
PTFE Homogenisator mit Pistill	Schütt-Biotec
<i>Snake skin dialysis tubing</i>	ThermoScientific
Spritzenfilter CA-Membran 0,20 µm	Heinemann
Transfermembran PVDF <i>Pore Size</i> 0,45 µm	Millipore
Vernichtungsbeutel	Sarstedt
XK 16/20 <i>Column</i>	GE Healthcare Life Sciences
96 Well <i>optical bottom plate, black</i>	Thermo/Nunc
96 Well <i>optical bottom plate, clear</i>	Thermo/Nunc
100 kD Filter	Pall

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Bio®-Dot SF <i>Microfiltration Apparatus</i>	Bio-Rad
Fluostar Optima	BMG Labtech
FPLC-Maschine	Äkta Avant25
DUOMAX 1030	Heidolph
Homogenisator Precellys 24-Dual	VWR
Membran-Vakuumpumpe	VACDUSBRAND GmbH
Mikroplatten Absorptions- und Fluoreszenzleser	TECAN GENios
Spektrophotometer für kleine Volumina	Nanodrop
Thermomixer 5436	Eppendorf

2.1.1 Verwendete Antikörper

Nachfolgende Antikörper wurden zur Detektion von PrP^{Sc} im MAA verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
F89 monoklonal	1:3000	O'Rourke et al. 1998
L42 monoklonal	1:3000	Salguero et al. 2006
Anti-Maus IgG monoklonal	1:2000	

2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Carl Roth bezogen.

2.1.2.1 Puffer und Lösung zur Gewinnung von rekombinantem PrP

Nachfolgende Puffer und Lösungen sind in der Reihenfolge ihrer Anwendung in der Gewinnung und Aufreinigung von bovinem rekombinantem PrP (rbovPrP) angegeben.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Gewinnung von rekombinantem PrP

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1000x <i>Trace metal solution</i>	FeCl ₃ 50 mM, CaCl ₂ 20 mM, MnCl ₂ 10 mM, ZnSO ₄ 10 mM, CoCl ₂ 2 mM, CuCl ₂ 2 mM, NiCl ₂ 2 mM, Na ₂ MoO ₄ 2 mM, Na ₂ SeO ₃ 2 mM, H ₃ BO ₃ 2 mM
ZYM-5052 Autoinduktionsmedium	Caseinhydrolysat 1 % (w/v), Hefeextrakt 0,5 % (w/v), Na ₂ HPO ₄ 25 mM, KH ₂ PO ₄ 25 mM, NH ₄ Cl 50 mM, Na ₂ SO ₄ 5 mM, MgSO 42 mM, <i>Trace metal solution</i> 0,2x, Glycerin 0,5 % (w/v), Glukose 0,05 % (w/v) Als Pulver nach dem Autoklavieren: Laktose 0,2 % (w/v)

Tabelle 5: Fortsetzung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Denaturierungs-Puffer pH = 8,0	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 0,19 M, Na ₂ HPO ₄ 0,06 M, 0.06 M Tris 0,12 % (w/v), Guanidin-HCl 57,3 % (w/v) pH einstellen mit HCl
Rückfaltungs-Puffer pH = 8,0	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 0,1 M, Na ₂ HPO ₄ 0,005 M, Tris 0,12 % (w/v) pH einstellen mit HCl
Elutions-Puffer pH = 5,8	Na ₂ HPO ₄ 0,008 M, NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 0,09 M, Tris 0,12 % (w/v), Imidazol 3,4 % (w/v) pH einstellen mit HCl
Dialyse-Puffer pH = 5,8	Na ₂ HPO ₄ 0,0008 M, NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 0,009 M, pH einstellen mit HCl
10x PBS pH = 6,9	Na ₂ HPO ₄ 1,13 % (w/v), NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 1,2 % (w/v), NaCl 7,59 % (w/v) pH einstellen mit H ₂ PO ₄

2.1.2.2 Puffer und Lösungen für RT-QuIC

Alle Stocklösungen und Puffer, welche in der RT-QuIC Anwendung fanden, wurden zunächst mit einem 0,2 µm Spritzenfilter filtriert, bevor sie zum Reaktionsansatz hinzugegeben wurden.

Tabelle 6: RT-QuIC-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
RT-QuIC-Puffer	PBS 1x, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, ThT 10 µM, recPrP (filtriert mit 100 kD Filter) 0,1 mg/ml

2.1.2.3 Puffer und Lösungen für den MAA

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für den MAA

Puffer	Zusammensetzung
10x TMC-Puffer	0,5 M Tris/HCl pH = 8,0, 25 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O, 25 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O
PK-Verdau-Puffer	10 mM Tris HCl pH = 7,8, 100 mM NaCl, 0,1 % Brij 35
10x TBS	60,5 g Tris, 85 g NaCl, 1000 ml Bidest pH = 7,6 einstellen mit HCl

2.1.3 Datenauswertung

Die Aufzeichnung der Messergebnisse des Fluoreszenz-*Readers* der RT-QuIC erfolgte mit Hilfe von OPTIMA 2.20R2. Die Daten dieser Messungen wurden mittels Excel Microsoft 2010 aufgearbeitet. Die statistische und graphische Auswertung der RT-QuIC-Daten erfolgte mit GraphPad Prism 5.0. Die Plausibilität aller Daten wurde nach dem Import erneut geprüft. Es erfolgte eine deskriptive und analysierende statistische Datenauswertung. Zur Visualisierung metrischer Variablen wurde ein *Box-Plot*-Diagramm gewählt. Für die verwendeten Nachweismethoden wurde ein binärer Klassifikationstest durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme von Hirngewebeproben

Aus schockgefrorenen Hirnschnitten wurden Gewebeproben für den Nachweis von PrP^{Sc} gewonnen. Diese stammten von Schlachttieren sowohl von mit BSE-infizierten als auch von nicht-infizierten Rindern.

Makroskopisch wurden in den Hirnschnitten verschiedene Hirnregionen identifiziert. Hieraus wurde dann in gefrorenem Zustand mit einem Skalpell jeweils ca. 0,5 g aus Cerebellum, Diencephalon, Basalganglien und Hirnstamm exzidiert. Die Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt, gewogen und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Gewebeproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer und Prof. Dr. med. vet. M. H. Groschup zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Herstellung von Hirnhomogenaten

Die gewonnenen Hirngewebsproben wurden zur Anwendung in RT-QuIC und MAA zu Homogenaten weiterverarbeitet. Hierzu wurden zehnpromtente Hirnhomogenate hergestellt, indem jede Probe zunächst mit dem neunfachen Volumen 1x PBS versetzt wurde. Mit Hilfe von Precellys *Beads* mit einem Precellys Homogenisator wurden die Proben erst bei 5500 rpm für zweimal 20 s mit 15 s Pause geschüttelt. Anschließend wurde für 2 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Die so gewonnenen Homogenate wurden bei -80 °C gelagert.

Aus den Homogenaten wurden je nach Versuchssetting Verdünnungsreihen hergestellt mit 10 mM DOC in 1x PBS als Puffer. Beispielsweise enthalten 2 µl einer Verdünnung von 10⁻¹ folglich 1 µg Hirnhomogenat-Äquivalent.

2.2.3 Gewinnung von bovinem rekombinantem PrP

2.2.3.1 Expression von bovinem rekombinantem PrP in *Rosetta*-Bakterien

Das zu exprimierende bovine rekombinante PrP lag bereits in das Plasmid pET41a ligiert und in das Bakterium *Rosetta* transformiert in Kultur vor. Zur Animpfung einer Vorkultur wurden 5 ml Zym-Autoinduktionsmedium mit 50 µl der Rückstellprobe angeimpft, mit Kanamycin versetzt und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Auf gleiche Weise wurde hieraus die eigentliche Vorkultur für die Expression herangezüchtet. Für die Expressionskultur wurde ein 1,5 ml Aliquot der Vorkultur in 150 ml Zym-Medium überführt und mit laktosefreiem Kanamycin und Chloramphenicol versetzt. Die Kultur wurde erneut über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert und anschließend bei 3000 g bei 4 °C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die gewonnenen Pellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, für 15 min in einem 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut und erneut in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.2 *Inclusionbody*-Präparation aus *Rosetta*-Bakterien

Das aus der Expressionskultur gewonnene, in gefrorenem Zustand vorliegende Zellpellet wurde bei 37 °C für 10 min in einem Wasserbad aufgetaut. Für den weiteren Verlauf wurden 4 g dieses Pellets in 20 ml auf Raumtemperatur äquilibrierten 1 x BugBuster *Master mix* resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit einem Glashomogenisator homogenisiert und für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Die Suspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 13200 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 20 ml 1 x BugBuster *Master mix* aufgenommen und für 15 min auf dem Drehrad inkubiert. Es wurde mit 0,1 x BugBuster *Master mix* auf 35 ml aufgefüllt, erneut in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 8000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 ml 0,1 x BugBuster *Master mix* resuspendiert und wie zuvor homogenisiert. Das Volumen wurde auf 40 ml aufgefüllt und bei 3500 g für 1 h bei 4 °C

zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet aus aufgereinigten *Inclusionbodies* bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Aufreinigung von bovinem rekombinantem PrP

Das aus *Rosetta* in Form von *Inclusionbodies* gewonnene Protein wurde an einer Ni-NTA-Säule mit Hilfe einer vollautomatischen FPLC-Maschine (FPLC für *fast protein liquid chromatography*) aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst das gefrorene *Inclusionbody*-Pellet in 15 ml 8 M Guanidine resuspendiert und für 50 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Die Lösung wurde dann aliquotiert, für 5 min bei 16 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und die gelöste *Inclusionbodies* enthaltenden Überstände gepoolt. Der so gewonnene proteinhaltige Pool wurde mit 20 g des mit Denaturierungspuffer für 50 min auf einer Wippe äquilibrierten Säulenmaterials auf dem Drehrad für 40 min inkubiert. Nach erfolgter Bindung des Proteins an das Säulenmaterial wurde die Säule manuell unter Vermeidung von Lufteinschlüssen gepackt. Anschließend wurde die fertige Säule an die FPLC-Maschine angeschlossen, gewaschen und eluiert.

Der Waschvorgang erfolgte mit 100 % Denaturierungspuffer + 0 % Rückfaltungspuffer zu 0 % Denaturierungspuffer + 100 % Rückfaltungspuffer für 240 min und weiter mit 100 % Rückfaltungspuffer für 30 min bei einer Flussgeschwindigkeit von je 0,75 ml/min.

Zur Elution wurden 100 % Rückfaltungspuffer + 0 % Elutionspuffer und 0 % Rückfaltungspuffer + 100 % Elutionspuffer für 240 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,75 ml/min verwendet.

Der anschließende Waschvorgang wurde mit 0,5 M NaOH für 120 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min durchgeführt.

Die Äquilibration erfolgte mit NPI-10 mit gleichbleibender Flussgeschwindigkeit für 120 min.

Abschließend erfolgte eine Konservierung mit 25 % Ethanol bei 2,5 ml/min für 40 min.

Das Säulenmaterial wurde bis zur Wiederverwendung bei 4 °C gelagert.

Anhand des Elutionsprofils wurden die proteinhaltigen zu je 2 ml portionierten Fraktionen identifiziert und mittels Spektrophotometer für kleine Volumina die jeweiligen Proteinkonzentrationen bestimmt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 4 dargestellt.

Anhand dieser Werte wurden die proteinhaltigsten Fraktionen eruiert und anschließend gepoolt. Das gewonnene Material wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

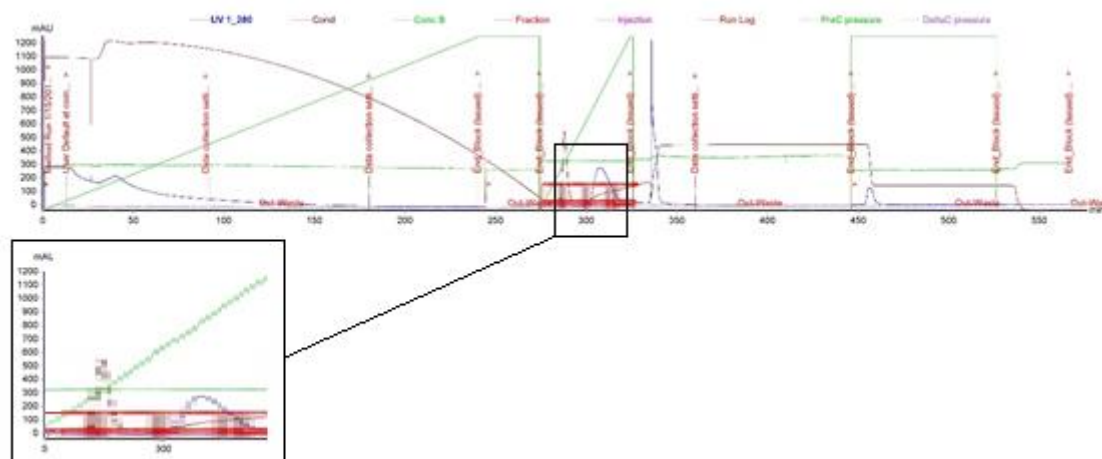


Abbildung 4: Elutionsprofil der Aufreinigung von recPrP mittels FPLC. Die obere Bildhälfte zeigt das Chromatogramm eines FPLC-Laufes, wobei die blaue Kurve der Absorptionmessung entspricht. Der untere Abbildungsteil zeigt die Vergrößerung des Elutionspeaks.

2.2.3.4 Dialyse

Der mit Hilfe der FPLC-Maschine gewonnene proteinhaltige Pool wurde zunächst durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert und anschließend mit dem dreifachen Volumen an Dialysepuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Verteilung auf zwei Dialyseschläuche. Über Nacht wurde gegen 5 l Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert. Der Pool wurde erneut durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert und mit dem Spektrophotometer für kleine Volumina eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml eingestellt. Das so gewonnene bovine rekombinante PrP wurde aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.4 RT-QuIC

Der Umgang mit PrP^{Sc} erfordert die biologische Sicherheitsstufe SII, mit BSE Material die Stufe SIII (Bistaffa et al. 2017). Die notwendigen Sicherheitsvorkehrungen wurden bei der hier durchgeführten Datengewinnung stets eingehalten.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde die RT-QuIC wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

In eine 96-Well-Platte wurden 98 µl des RT-QuIC-Puffers vorgelegt. Die zuvor hergestellten und bei -80 °C gelagerten Hirnhomogenate wurden aufgetaut und bei 2000 g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 1x N2 Media Supplement in 15 mM DOC im Verhältnis 1:20 verdünnt. Alle weiteren Verdünnungsstufen wurden hieraus entsprechend der gewünschten Endkonzentration hergestellt. Vom so entstandenen *Seed* wurden in jedes *Well* 2 µl pipetiert, womit sich ein Endvolumen von 100 µl pro *Well* ergab. Die Messung der Proben erfolgte stets in Quadruplika und in mindestens zwei getrennten Versuchen mit jeweils derselben Positiv- und Negativkontrolle.

Die Platte wurde mit einem adhäsiven Film verschlossen und für die Dauer von mindestens 48 h in einen Fluoreszenz-Platten-Reader gestellt und intermittierend geschüttelt, wobei das Intervall für Schüttel- bzw. Ruhephasen je 1 min betrug. Messungen erfolgten ca. alle 45 min. Die Fluoreszenz wurde bei 450 +/- 10 nm Exzitation und 480 +/- 10 nm Emission gemessen und in *ThT fluorescent units* (ThTFU) mit einem Maximum von 65 000 ThTFU angegeben.

In der graphischen Auswertung wird die mittlere ThTFU (*Average ThT fluorescent units*) der Quadruplika über 48 h gemessen dargestellt. Eine Probe wurde ab einem Wert von 40 000 ThTFU als positiv definiert. Dieser Wert liegt knapp drei Standardabweichungen vom aus 60 Messungen der Negativkontrolle ermittelten Mittelwert und über eine Standardabweichung vom maximal gemessenen Wert entfernt.

2.2.5 DNase-Verdau

Das Enzym DNase ist eine Endonuklease und spaltet Phosphodiesterbindungen, wodurch eine Zerteilung von DNA und damit die Eliminierung eines Störfaktors im Reaktionsansatz erfolgt.

Der DNase-Verdau wurde als Vorbereitung für den MAA durchgeführt.

Der Verdau erfolgte mit 5 µg Enzym auf 50 µg Hirnhomogenat. Anschließend wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Hitzedenaturierung.

2.2.6 Proteinase K-Verdau

Wie bereits beschrieben kann die Differenzierung von PrP^c und PrP^{Sc} über einen Verdau mit dem zu den Peptidasen gehörenden Enzym Proteinase K erfolgen. Während die zelluläre Isoform vollständig denaturiert wird, bleibt ein Kern von PrP^{Sc} aufgrund der Strukturunterschiede erhalten. Auch beim Nachweis von PrP^{Sc} mittels MAA wird die Wirkung der Proteinase K genutzt.

Die Hirnhomogenate wurden im Verhältnis 1:10 mit Proteinase K-Puffer und Proteinase K versetzt und bei 37 °C als optimale Funktionstemperatur für 35 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben weiter für ihre Anwendung im MAA mit TBS auf 10⁻³ bis 10⁻⁴ verdünnt.

2.2.7 MAA

Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um ein *Slot-Blot*-Verfahren, bei dem die Proben nach entsprechender Vorbehandlung über eine Vakuumpumpe durch eine Membran gesaugt werden. Anschließend erfolgt der Nachweis von PrP^{Sc} über Antikörper.

Die Proben wurden zunächst wie oben beschrieben DNase verdaut und anschließend mit Proteinase K behandelt. Die in TBS-Puffer aufgenommenen Hirnhomogenate kamen in einer Verdünnung von 10⁻³ und 10⁻⁴ zum Einsatz. Für den *Blot* wurden die Proben auf eine

zuvor für 10 min mit Rotiblock inkubierte Nitrocellulose-Membran aufgetragen. Nach Auftragen der Proben wurden diese mithilfe einer Membran-Vakuumpumpe und eines Mikrofiltrations-Apparats durch die Membran gesaugt. Die *Slots* wurden vor und nach dem Auftragen der Proben mit 0,1 % DOC gespült. Die Membran wurde anschließend gewaschen und für 30 min in Guanidinthiocyanat dekontaminiert. Es folgte das Blocken der Membran mit 3 % Wasserstoffperoxid und 0,2 % Casein I-BLOCK.

Als erste Antikörper wurden L42 und F89 in einer Verdünnung von je 1:3000 für 60 min bei Raumtemperatur verwendet. Als zweiter Antikörper diente ein *Goat anti-mouse* Antikörper. Die Sichtbarmachung erfolgte mit Roentogen *liquid* und Roentogen *superfix*. Abgelesen wurde das Ergebnis nach 15 min. Als positiv wurde eine Probe gewertet, wenn sich beide Verdünnungsstufen sichtbar machen ließen.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Detektion von BSE in Hirngewebsproben von Rindern mittels RT-QuIC und MAA mit anschließender vergleichender Betrachtung beider Assays untereinander, sowie mit Ergebnissen des PET-Blots bezüglich der Eignung zum Nachweis von PrP^{Sc} in verschiedenen Hirnarealen. Hierzu war zunächst eine Adaptation der RT-QuIC notwendig, um eine reproduzierbare und sensitive Detektion von PrP^{Sc} zu gewährleisten. Anschließend konnten Proben, die sowohl von Rindern mit typischer als auch mit atypischer BSE stammten, auf das Vorliegen von BSE hin mit MAA und RT-QuIC getestet werden.

Die Vielzahl möglicher Ansätze bei der Detektion von Prionerkrankungen beruht unter anderem auf den biochemischen Eigenschaften des Proteins. Es haben sich unter anderem bereits Verfahren etabliert, welche auf Nachweis mittels Antikörper beruhen oder sich etwa die Eigenschaft zur Aggregatbildung von PrP^{Sc} zunutze machen. Eine Anpassung des RT-QuIC-Verfahrens unter Berücksichtigung der besonderen Eigenschaften von PrP^{Sc} und PrP^C bietet daher einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Optimierung.

BSE stellt ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild, sowohl für Rinder als auch für den Menschen dar. Die humane Form von BSE, vCJD, ist eine stets tödliche und mit dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln assoziierte Erkrankung. Um den Menschen als Konsumenten zu schützen, ist es notwendig, schnellere und nach Möglichkeit sensitivere Testverfahren zu entwickeln als sie bisher zur Verfügung stehen.

3.1 Optimierung des RT-QuIC-Assays

Das RT-QuIC-Verfahren basiert auf der Aggregatbildung des rekombinant hergestellten PrP, wodurch eine Fluoreszenzänderung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) hervorgerufen wird. Diese Komplexierung von recPrP wird durch das in einer Gewebeprobe eines infizierten Individuums enthaltene PrP^{Sc} induziert. Durch die Messung der resultierenden Fluoreszenzänderung des im Reaktionsansatz enthaltenen ThT ist die Detektion von PrP^{Sc} in einer Probe möglich. Um einen sensitiven, reproduzierbaren Assay zur Detektion von BSE-auslösendem PrP^{Sc} in Gewebeproben von Rindern zu etablieren, galt es zunächst, optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen. Hierfür wurden verschiedene Parameter der RT-QuIC adaptiert.

Unter Einsatz des auf die oben in 2.2.3 beschriebene Weise gewonnenen recPrP wurden Optimierungen in der Zusammensetzung des für die RT-QuIC verwendeten Reaktionsansatzes vorgenommen. Hierbei wurden unter anderem Komponenten des eingesetzten Puffergemischs variiert. Für die Etablierung des Testsystems wurden zunächst Proben mit bekanntem BSE-Status genutzt. Im Verlauf wurde stets dieselbe Positiv- und Negativkontrolle verwendet. Auf diese Weise wurden in einem ersten Schritt Bedingungen ermittelt, die eine reproduzierbare und sensitive Detektion von PrP^{Sc} zulassen. Die für diesen Schritt der Anpassung verwendeten Proben fungierten später bei der Testung von Proben

mit verblindetem BSE-Status als Kontrollen. Gemessen wurde stets in Quadruplika und in Zweifachbestimmung. Als positives Ergebnis wurde ein Fluoreszenzsignal von über 40 000 ThTFU festgelegt.

3.1.1 Vergleichende Betrachtung unterschiedlicher Substrate

Um die Anpassung der RT-QuIC für die Detektion von BSE umzusetzen, musste zunächst recPrP, welches im Reaktionsansatz der RT-QuIC verwendet werden konnte, hergestellt werden. Zwei verschiedene bovine rekombinante Proteine wurden produziert, ein langes die AS 23–231 umfassendes Protein (rbovPrP₂₃₋₂₃₁) und eine kürzere Variante bestehend aus den AS 90–231 (rbovPrP₉₀₋₂₃₁). Die jeweils korrespondierenden DNA-Sequenzen lagen bereits in einen pET41a Expressionsvektor kloniert in *E. coli* vor.

Es erfolgte die Expression in *E. coli* mit anschließender Extraktion der *Inclusionbodies* und Proteinaufreinigung mittels vollautomatischer FPLC wie in 2.2.3 beschrieben.

Die beiden bovinen Formen des Proteins wurden zusätzlich mit einem Hamster-Schaf chimären Protein (Hamster/Schaf chimäres recPrP) in ihrer Anwendbarkeit in der RT-QuIC verglichen. Verdünnungsstufen von Hirnhomogenaten je einer Positiv- und einer Negativkontrolle wurden mit den drei unterschiedlichen Substraten getestet (vgl. Abbildung 5). Das die AS 90–231 umfassende Proteinsubstrat zeigte auch bei der Negativkontrolle hohe Fluoreszenzsignale, bei 1 µg Hirnhomogenat-Äquivalent sogar bis über 40 000 ThTFU. Sowohl mit dem chimären als auch mit rbovPrP₂₃₋₂₃₁ konnte PrP^{Sc} detektiert werden, wobei mit letzterem der Nachweis geringster Mengen von 10 ng gelang.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Auswahl von rbovPrP₂₃₋₂₃₁ als Substrat zur weiteren Verwendung in den nachfolgenden Versuchen. In mehreren Herstellungsprozessen wurden nun mehrere Chargen rekombinanten Proteins hergestellt.

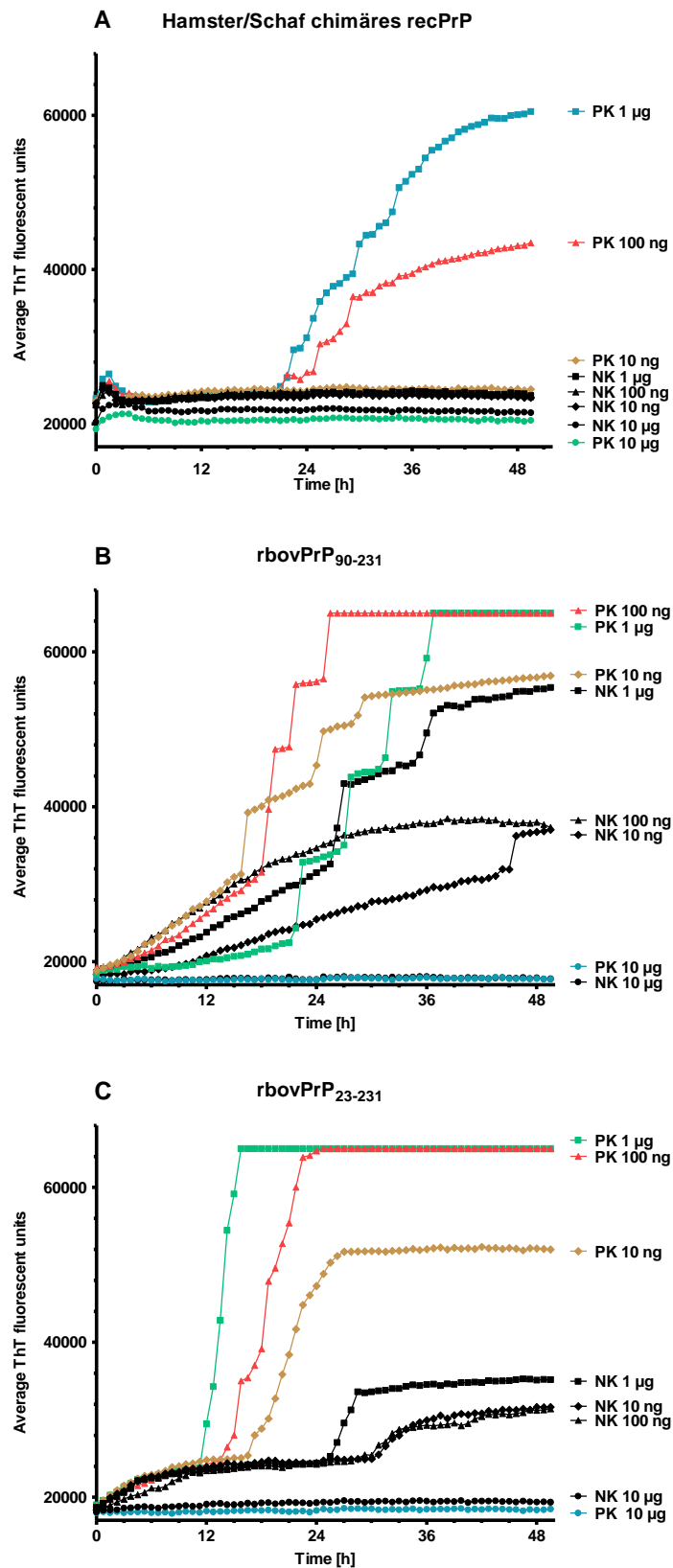


Abbildung 5: Vergleich unterschiedlicher Substrate. Hamster/Schaf chimäres recPrP (A), rbovPrP₂₃₋₂₃₁ (B) und rbovPrP₉₀₋₂₃₁ (C) wurden mit je 1 µg, 100 ng und 10 ng *Seed* mit Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) in ihrer Eignung zum Einsatz in RT-QuIC getestet.

Der RT-QuIC-Assay ermöglicht die Messung der durch die *Seed*-Probe ausgelösten Aggregatbildung des recPrP anhand des Fluoreszenzfarbstoffes ThT. Eine sich konstant verhaltende Aggregatbildung des recPrP ist folglich essenziell für die Reproduzierbarkeit des Assays. Um zu untersuchen, ob sich trotz identischer Aufarbeitung die Qualität des recPrP unterscheidet und aufgrund dessen Auswirkungen auf die Sensitivität der RT-QuIC festzustellen sind, wurden die Konversionseigenschaften dreier Chargen experimentell verglichen. Hierfür wurden die Chargen 1, 2 und 3 vom hergestellten rbovPrP₂₃₋₂₃₁ mit den Kontrollproben getestet. Das *Seed* wurde in Verdünnungen von 10 µg bis 100 ng eingesetzt. Im Vergleich der drei Chargen zeigten sich allenfalls mäßige Unterschiede. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, wurde bei der ersten Verdünnungsstufen von 10 µg bei allen drei Chargen innerhalb von 25 h (\pm 0.85 h) ein positives Ergebnis erreicht (nachfolgend als *Lag*-Phase bezeichnet) und in allen vier *Wells* eine maximale Fluoreszenz gemessen. Auch bei 1 µg Hirnhomogenat-Äquivalent wurde mit allen drei Chargen PrP^{Sc} in allen vier *Wells* ein maximales Fluoreszenzsignal detektiert, aber innerhalb eines variierenden Zeitrahmens. Bei der größten Verdünnungsstufe wurde die Variation der *Lag*-Phase und Anzahl an positiven *Wells* noch stärker ersichtlich. Insgesamt gelang jedoch mit allen drei Chargen eine zuverlässige Detektion von PrP^{Sc} in allen Verdünnungsstufen. Die Chargen waren somit vergleichbar, vor allem da nach erfolgter Etablierung des Assays eine *Seed*-Menge von 1 µg im Reaktionsansatz der RT-QuIC verwendet und diese Messungen zum Vergleich der Ergebnisse mit den anderen Detektionsverfahren herangezogen wurden. Niedrigere Konzentrationen wurden lediglich zur weiteren Veranschaulichung und näheren Charakterisierung der Detektion von PrP^{Sc} mittels RT-QuIC durchgeführt.

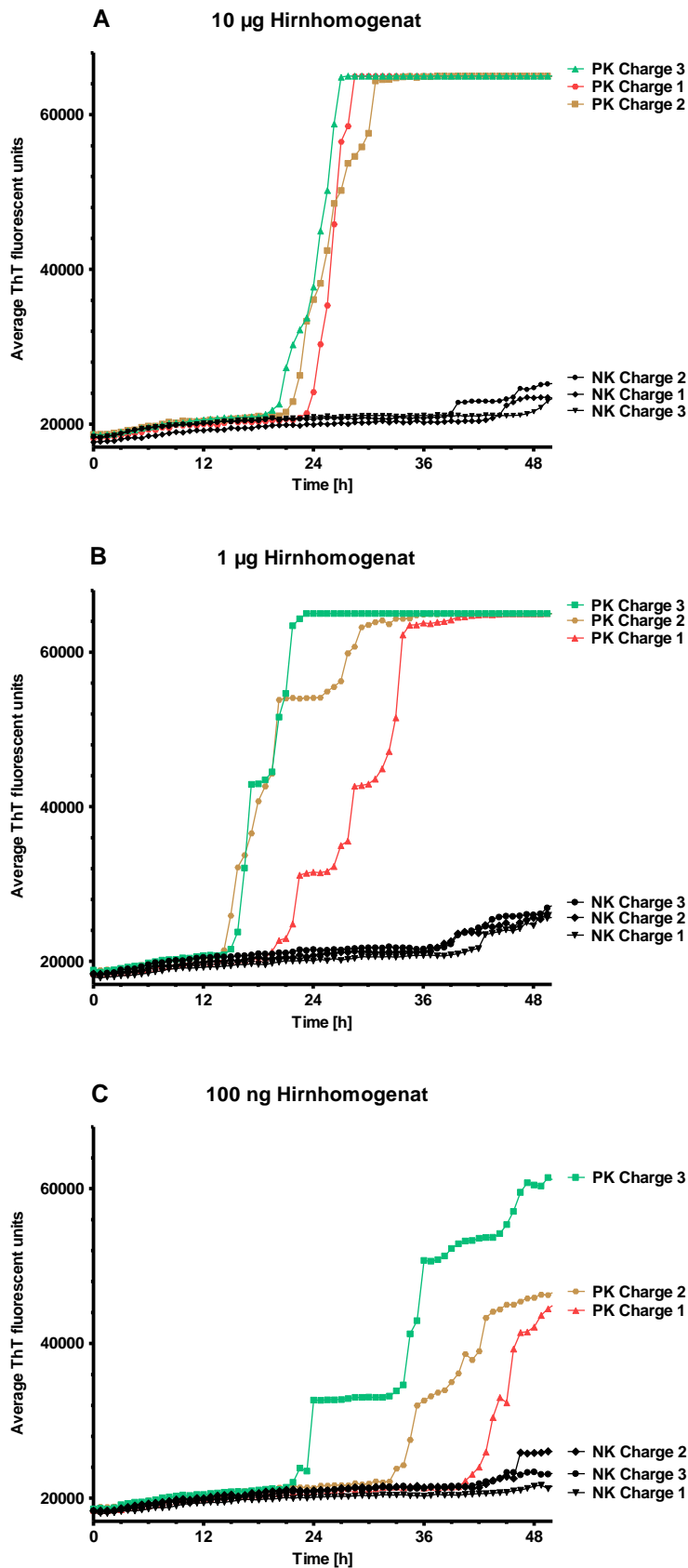


Abbildung 6: Vergleich der *Seeding*-Aktivität unterschiedlicher Chargen. Charge 1, 2 und 3 mit je 10 µg (A), 1 µg (B) und 100 ng (C) Hirnhomogenat-Äquivalent der Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK).

3.1.2 Einfluss von Salz auf die *Seeding*-Aktivität

Weiter sollte die Auswirkung der Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen untersucht werden. Hierfür wurden Konzentrationen zwischen 1200 mM und 300 mM NaCl gegeneinander getestet. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich wird, zeigte sich in der kürzesten Zeit das stärkste Fluoreszenzsignal bei einer Salzkonzentration von 900 mM NaCl im Reaktionsansatz. Ein ähnlich gutes Ergebnis konnte mit Konzentrationen von 1200 mM und 750 mM NaCl erreicht werden, jedoch mit längerer *Lag*-Phase sowie ohne Erreichen des Fluoreszenzmaximums in allen *Wells*.

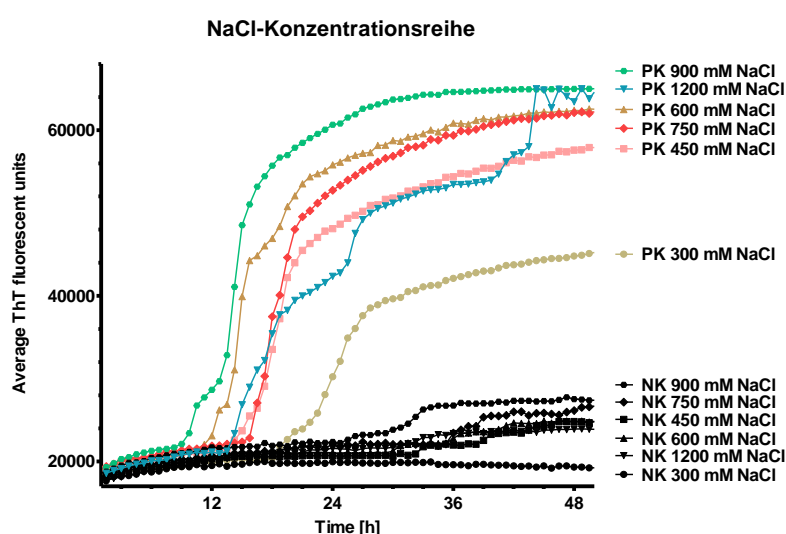


Abbildung 7: Einfluss von Salz auf die *Seeding*-Aktivität. Verwendet wurden NaCl-Konzentrationen zwischen 1200 und 300 mM mit 15 mM DOC und 1 μg *Seed* mit jeweils Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK).

3.1.3 Substratkonzentration

Gleichzeitig sollte die Auswirkung der Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen untersucht werden. Hierfür wurden Konzentrationen von 12,5 μg , 10 μg , 7,5 μg und 5 μg recPrP pro *Well* im Reaktionsansatz eingesetzt (vgl. Abbildung 8). Mit allen Substratkonzentrationen konnte mit 1 μg Hirnhomogenat-Äquivalent eine Aggregatbildung nachgewiesen werden. Dabei wurden bei einer Substratkonzentration von 7,5 μg eine *Lag*-Phase von nur 20 h und ein steiler Fluoreszenzanstieg beobachtet, wohingegen bei 12,5 μg erst nach 24,2 h und bei 10 μg nach 23,2 h der positive Schwellenwert erreicht war. Bei 5 μg Substrat oder zunehmender Verdünnung war ein weiterer Verlust und eine Verzögerung des Fluoreszenzsignals zu beobachten, wobei höhere Substratkonzentrationen sich dennoch als sensitiver erwiesen.

Im vorherigen Versuch hatte sich gezeigt, dass auch eine niedrigere Salzkonzentration bei gleichbleibender Substratmenge zu einem Signalverlust führte (vgl. Abbildung 7). Basierend auf den gewonnenen Daten lässt dies einen Zusammenhang zwischen eingesetzter Salzmenge und im RT-QuIC-Puffer enthaltener Substratkonzentration vermuten.

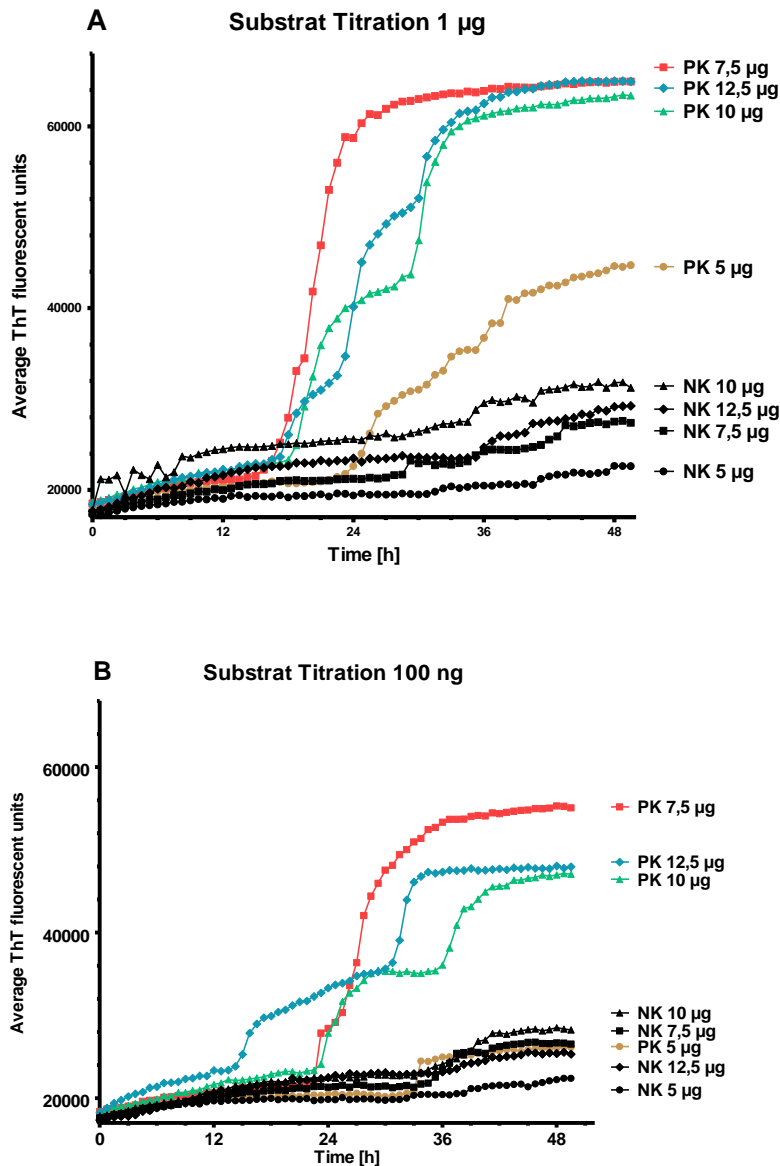


Abbildung 8: Einfluss der Substratmenge auf die *Seeding*-Aktivität. Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) wurden mit Substratkonzentrationen von 12,5 μg bis 5 μg mit 15 mM DOC, 900 mM NaCl und 1 μg (A) bzw. 100 ng (B) *Seed* getestet.

3.1.4 Ultraschallbehandlung

Wie bereits beschrieben ist die PMCA höchst sensitiv durch einen Verstärkungseffekt der Aggregation und Konversion von PrP, der durch das Aufbrechen der Aggregate mittels Ultraschalls erreicht wird. Vor diesem Hintergrund wurde nun Hirnhomogenat vor dem Einsetzen in der RT-QuIC mit Ultraschall behandelt, um die im Hirngewebe erkrankter Tiere vorliegenden Aggregate aufzuschließen und so möglicherweise eine Verstärkung der Aggregatbildung und damit eine Steigerung der Sensitivität zu erzielen.

Es wurden *Seed*-Mengen von 10 μg , 1 μg und 100 ng eingesetzt. Abbildung 9 zeigt, dass nach Ultraschallbehandlung eine Reaktion stattfand. Unter Verwendung einer *Seed*-Menge von 100 ng zeigte sich eine deutlich verlängerte *Lag*-Phase. Auch wurde nur in einem *Well* ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet. Auch mit einer *Seed*-Menge von 1 μg konnte lediglich in zwei *Wells* ein Signal detektiert werden. Im Vergleich hierzu wurde mit allen drei unbehandelten *Seed*-Mengen in vier von vier *Wells* das Fluoreszenzmaximum erreicht. Bei den mit Ultraschall behandelten Proben konnte nur mit einer *Seed*-Menge von 10 μg ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

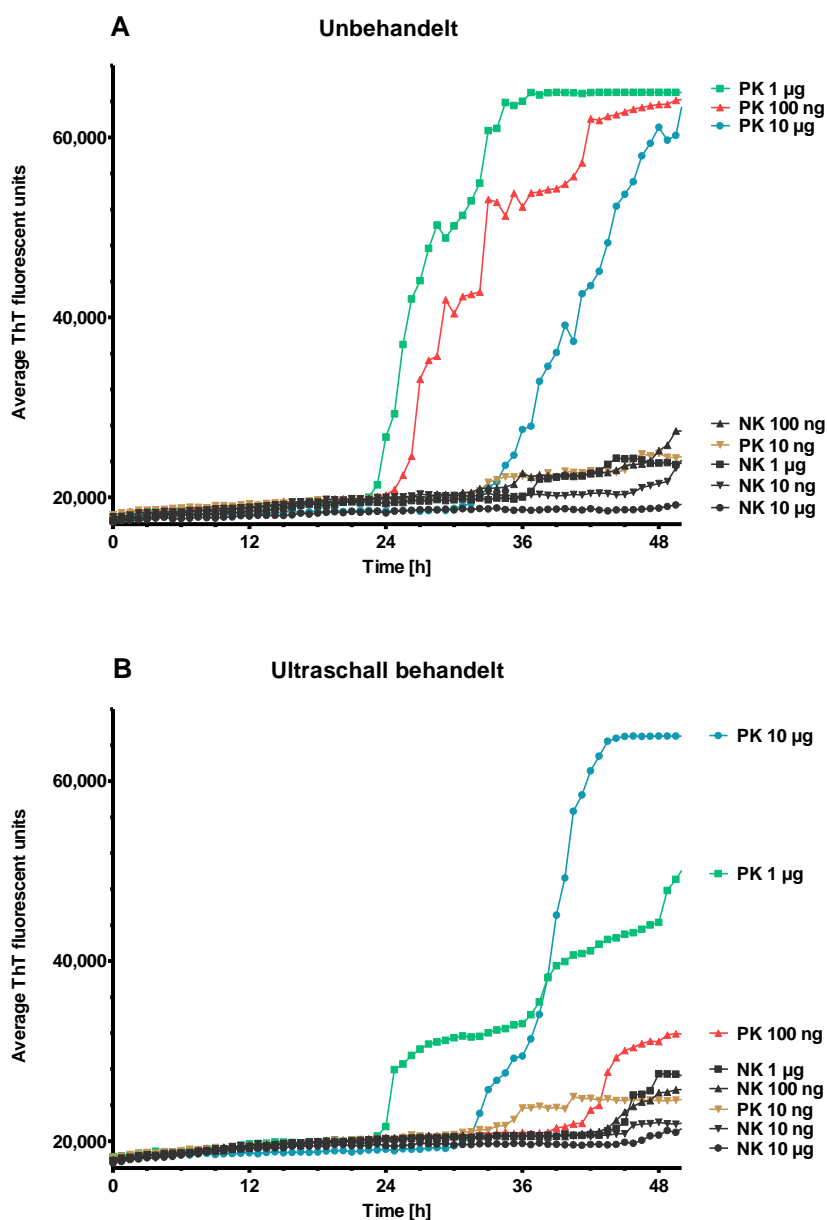


Abbildung 9: Einfluss von Ultraschall auf die *Seeding*-Aktivität. Mit Ultraschall behandelte (B) und unbehandelte (A) *Seed*-Proben von je einer Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) wurden in einer Verdünnung von 10 μg , 1 μg und 100 ng getestet.

3.1.5 Hitzenaturiertes rekombinantes PrP

Der den Prionerkrankungen zugrunde liegende Pathomechanismus wird als Konversionsreaktion beschrieben. PrP^{Sc} ist in der Lage das an α -Helices reiche PrP^c in eine β -faltblattreiche Form zu überführen, in der es in Geweben akkumuliert. Dieser Mechanismus wird auch als Grundlage von Nachweisverfahren wie PMCA und RT-QuIC angesehen. Die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins ist demnach entscheidend für das Gelingen der Reaktion.

Das recPrP wurde für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, um zu versuchen, die Proteinstruktur aufzubrechen und damit weitere Einblicke in den Reaktionsmechanismus der RT-QuIC zu erlangen. Die Abkühlung erfolgte anschließend bei Raumtemperatur. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird, war die Reaktion sowohl mit hitzenaturiertem als auch mit unbehandeltem rekombinantem PrP vorhanden. Bei der ersten Verdünnungsstufe waren jedoch nur drei von vier *Wells* positiv mit jeweils einer maximal erreichten Fluoreszenz von unter 60 000 ThTFU. Auch in der zweiten Verdünnungsstufe fiel das Maximum des gemessenen Fluoreszenzsignals deutlich tiefer aus als bei dem unbehandelten Substrat, wobei das Gesamtergebnis weitgehend vergleichbar war.

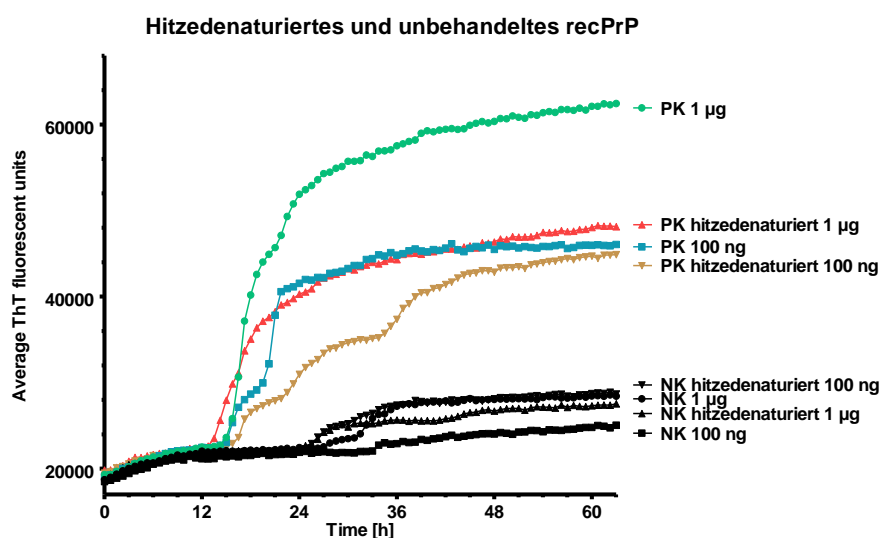


Abbildung 10: Einfluss der Anwendung von hitzenaturiertem recPrP. Für 10 min bei 95 °C hitzenaturiertes, sowie unbehandeltes recPrP wurden je mit Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) in einer Verdünnung von 1 µg und 100 ng getestet.

3.1.6 Aufhebung der Adhäsion durch Beschichtung

Die Qualität und Quantität der Aggregatbildung als ausschlaggebende Reaktion bei der RT-QuIC könnte einen Einfluss auf Sensitivität und Detektionsgeschwindigkeit haben. Eine Beeinflussung der Oberflächenadhäsion, um eine Veränderung der Aggregatbildung zu erzielen, scheint demnach ein weiterer möglicher Ansatzpunkt zur Optimierung der RT-QuIC.

Um obige Vermutung näher zu untersuchen, wurde eine 96-Well-Platte mit 300 μl Sigmacote befüllt und über 24 h stehen gelassen. Die Restflüssigkeit wurde abpipetiert. Es zeigte sich ein sichtbarer Effekt an der Well-Oberfläche im Sinne einer Beschichtung. Die Wells wurden nach erfolgter Beschichtung dreimal mit 300 μl 1x PBS gespült und anschließend mit dem RT-QuIC Reaktionsansatz befüllt. Es zeigte sich keine Reaktion, sowie ein sehr tiefes Grundsignal in den beschichteten Wells (vgl. Abbildung 11). Um den Einfluss von Sigmacote auf die Reaktion bzw. das Fluoreszenzsignal zu untersuchen, wurden weiter vier unbeschichtete Wells mit dem Reaktionsansatz der Positivkontrolle befüllt und es erfolgte eine zusätzliche Zugabe von 2 μl Sigmacote. Auch hier ließ sich über die gesamte Versuchszeit lediglich ein tiefes Grundsignal in den Wells messen (Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

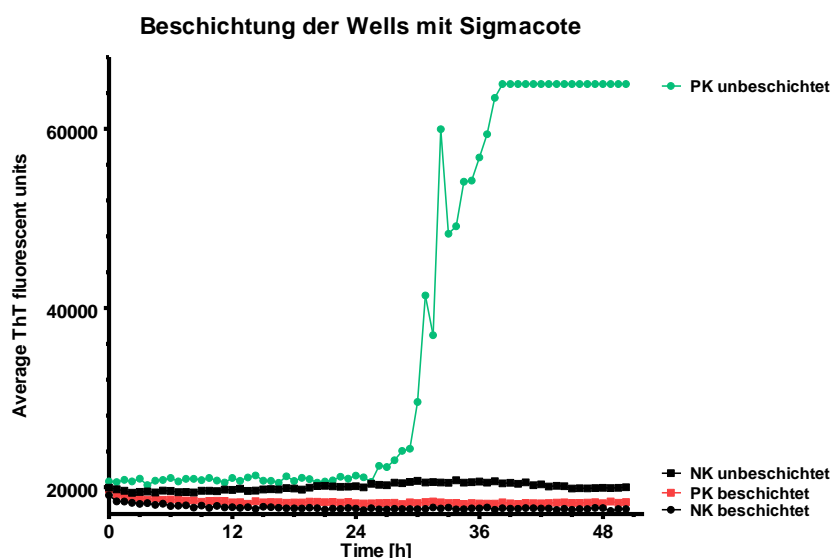


Abbildung 11: Auswirkung von Adhäsionsaufhebung. Unbeschichtete und mit Sigmacote beschichtete Wells wurden je mit Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) mit 10 μg Seed getestet.

3.1.7 Oberflächenvergrößerung mittels Glasperlen

In die als Reaktionsgefäße dienenden *Wells* wurden kleinste Glasperlen in unterschiedlicher Menge gefüllt. Hierdurch sollte eine Oberflächenvergrößerung, an welcher die Aggregatbildung stattfinden kann, erreicht werden. Die *Beads* hatten einen Durchmesser von 1 mm. Eingefüllt wurden zum Test je 5, 10 oder 20 Stück. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, war eine Detektion des Fluoreszenzsignals nur bei der geringsten Anzahl an *Beads* möglich. Das Grundsignal war mit Glasperlen höher und wies ein unruhiges Muster auf.

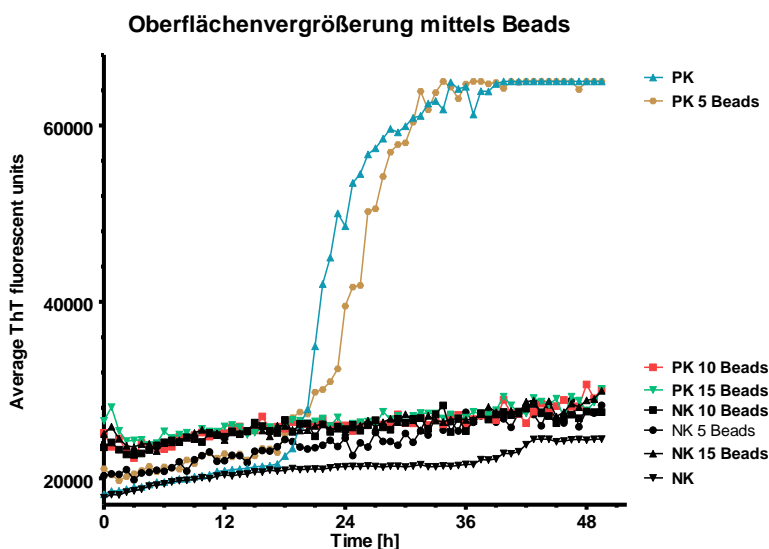


Abbildung 12: Oberflächenvergrößerung mittels *Beads*. Positiv- und Negativkontrolle (PK bzw. NK) wurden mit je 5, 10 und 15 Glasperlen pro *Well* und ohne in einer Verdünnung von 10 μg gemessen.

3.2 Anwendung von RT-QuIC und MAA zur Detektion von BSE in Rinderhirnen

Die experimentell ermittelten optimierten Bedingungen für die RT-QuIC von 900 mM NaCl, 15 mM DOC unter Verwendung von 7,5 μg Substrat im Reaktionsansatz wurden nun im größeren Maßstab an Hirngewebsproben getestet. Zur Verfügung standen hierfür Proben aus dem Stammhirn mit verblindetem BSE-Status von insgesamt 70 Tieren. Dabei wurde zum einen auf das Vorliegen von typischem und atypischem BSE hin mit RT-QuIC und MAA getestet. Außerdem wurde die Anwendbarkeit der Assays an verschiedenen Hirnregionen (Cerebellum, Basalganglien, Diencephalon und Hirnstamm) an 43 weiteren von 15 verschiedenen Tieren stammenden Proben getestet.

Im Falle der RT-QuIC lag per Definition ein positives Ergebnis wieder ab einem Fluoreszenzwert von 40 000 ThTFU in einem *Well* vor. Jede Probe wurde pro Messreihe in vier *Wells* gemessen. Als negativ wurde eine Probe gewertet, wenn in zwei unabhängigen

Messreihen kein *Well* ein positives Fluoreszenzsignal erbrachte. Die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgt wieder in Quadruplika.

Für sämtliche nachfolgenden Untersuchungen wurde dasselbe aus einer Charge stammende Substrat verwendet.

Der MAA wurde wie im Abschnitt 2.2.7 beschrieben in je zwei Verdünnungsstufen durchgeführt, wobei die Hirnhomogenate zuvor wie in 2.2.6 beschrieben mit Proteinase K verdaut wurden. Nur wenn beide Verdünnungsstufen eine positive Antikörperreaktion ergaben, wurde die Probe als BSE-haltig eingestuft.

Bei den Rindern, von denen die Proben stammten, handelte es sich durchweg um aufgrund von BSE-Verdacht euthanasierte Tiere. Die Proben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer (Proben A bis N) und Prof. Dr. med. vet. M. H. Groschup (Proben 1 bis 70) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden nun die von 70 verschiedenen Tieren mit verblindetem BSE-Status stammenden Proben mittels RT-QuIC und MAA untersucht. Abbildung 13 zeigt beispielhaft die graphische Auswertung der Messergebnisse der Proben 30 bis 35 mittels RT-QuIC Assay. Proben 30, 32 und 34 zeigen ein eindeutig positives Ergebnis und somit das Vorliegen von BSE. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des MAA der entsprechenden Proben.

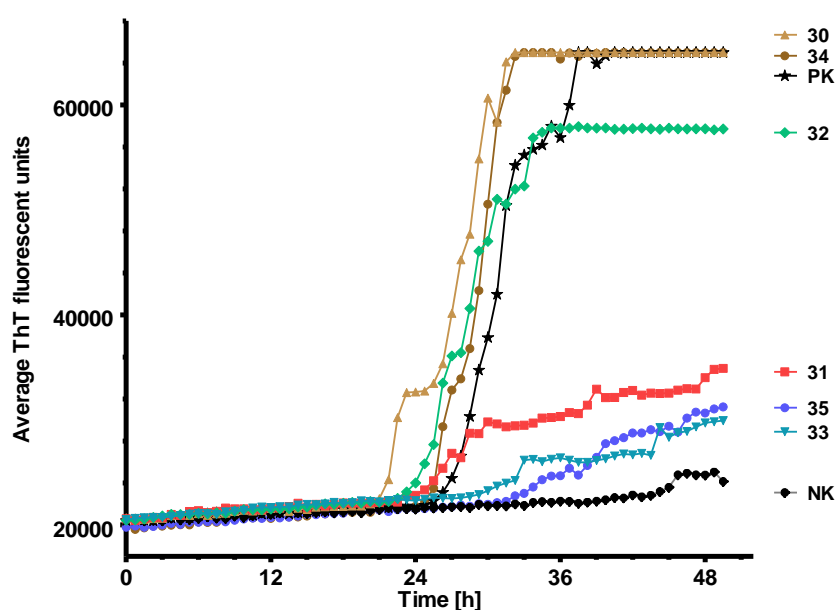


Abbildung 13: RT-QuIC der Proben 30 bis 35. Beispielhafte Darstellung der graphischen Auswertung der Messergebnisse der Proben 30 bis 35, sowie der Negativ- und Positivkontrolle (NK bzw. PK).

1	5	9	13	17	21	25	29	33	NK
2	6	10	14	18	22	26	30	34	PK
3	7	11	15	19	23	27	31	35	
4	8	12	16	20	24	28	32		

36	40	44	48	52	56	60	64	68	NK
37	41	45	49	53	57	61	65	69	PK
38	42	46	50	54	58	62	66	70	
39	43	47	51	55	59	63	67		

Abbildung 14: MAA der Proben 1 bis 70. Die Proben wurden auf zwei Membranen mit jeweiliger Negativ- und Positivkontrolle (NK bzw. PK) verteilt. Der obere Abschnitt eines jeden Feldes entspricht einer Verdünnung von 10^{-3} , der untere von 10^{-4} . Als erster Antikörper wurden F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

Ergebnisse von RT-QuIC und MAA sowie der histopathologisch bestimmte BSE-Status differenziert in C-BSE und atypische BSE sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Beide Assays lieferten stark übereinstimmende Ergebnisse. Die Reproduzierbarkeit der RT-QuIC ließ sich unter anderem anhand des Übereinstimmungsgrades der Zweifachbestimmungen beurteilen. Die Anzahl der positiven *Wells* war in beiden durchgeführten Messreihen meist stark kongruent. Bei acht Proben (8, 13, 40, 43, 46, 54, 61 und 63) wurde mittels RT-QuIC nur in einer der beiden Messreihen ein positives, meist in wenigen *Wells* vorhandenes Fluoreszenzsignal detektiert. Von diesen Proben stammten fünf tatsächlich von mit BSE-infizierten Tieren, wovon nur eine durch den MAA als richtig positiv erkannt wurde. Insgesamt ergab die Detektion von BSE mit RT-QuIC dreimal ein falsch positives (8, 43 und 63) und kein falsch negatives Ergebnis. Mittels MAA ergaben sich keine falsch positiven Ergebnisse, jedoch wurde fünfmal das Vorliegen von BSE nicht detektiert (13, 40, 54, 61 und 68).

Die Detektion von atypischem BSE gelang mit beiden Methoden, jedoch ist mit MAA lediglich die Detektion von BSE in drei der vier zur Verfügung stehenden Proben möglich.

Insgesamt konnte mit der RT-QuIC eine Sensitivität von 92,15 % (1. Messung allein 92,0 % bzw. 92,3 % in 2. Messung), mit dem MAA von 87,7 % erreicht werden. Die Spezifität lag bei 96,6 % für die RT-QuIC und bei 100 % beim MAA.

Tabelle 8: RT-QuIC und MAA der Proben 1 bis 70.

Proben	Diagnose	RT-QuIC	MAA
1	×	- / -	-
2	×	- / -	-
3	×	- / -	-
4	C-BSE	++++ / +++++	+
5	×	- / -	-
6	×	- / -	-
7	×	- / -	-
8	×	+ / -	-
9	×	- / -	-
10	C-BSE	+++ / +++++	+
11	×	- / -	-
12	×	- / -	-
13	C-BSE	- / ++	-
14	C-BSE	+ / +	+
15	×	- / -	-
16	×	- / -	-

Tabelle 8: Fortsetzung

Proben	Diagnose	RT-QuIC	MAA
17	×	- / -	-
18	×	- / -	-
19	C-BSE	++ / +++	+
20	C-BSE	++ / +++	+
21	C-BSE	++ / +	+
22	C-BSE	++ / +++++	+
23	×	- / -	-
24	×	- / -	-
25	×	- / -	-
26	×	- / -	-
27	×	- / -	-
28	×	- / -	-
29	×	- / -	-
30	C-BSE	++++ / +++++	+
31	×	- / -	-
32	C-BSE	+++ / +++++	+
33	×	- / -	-
34	C-BSE	++++ / +++	+
35	×	- / -	-
36	×	- / -	-
37	×	- / -	-
38	×	- / -	-
39	C-BSE	++++ / +++++	+
40	C-BSE	+ / -	-
41	C-BSE	++++ / +++++	+
42	×	- / -	-
43	×	- / +	-
44	×	- / -	-
45	C-BSE	+++ / +++++	+
46	C-BSE	- / +++++	+
47	×	- / -	-
48	×	- / -	-
49	C-BSE	++++ / +++++	+
50	×	- / -	-
51	×	- / -	-

Tabelle 8: Fortsetzung

Proben	Diagnose	RT-QuIC	MAA
52	×	- / -	-
53	C-BSE	++++ / +++++	+
54	C-BSE	- / +++	-
55	×	- / -	-
56	C-BSE	++ / +++	+
57	×	- / -	-
58	×	- / -	-
59	×	- / -	-
60	×	- / -	-
61	C-BSE	++++ / -	-
62	×	- / -	-
63	×	- / +	-
64	C-BSE	++++ / +++++	+
65	×	- / -	-
66	×	- / -	-
67	Atypisches BSE	++++ / +++	+
68	Atypisches BSE	++++ / +++++	-
69	Atypisches BSE	++++ / ++	+
70	Atypisches BSE	++++ / +++++	+

Das Ergebnis beider Messreihen der RT-QuIC ist durch einen Schrägstrich (/) getrennt. Der Anzahl positiver *Wells* wird durch Anzahl an Pluszeichen (+) entsprochen. Ein fehlender Nachweis von PrP^{Sc} wird mit einem Minuszeichen (-) symbolisiert. Ein negativer BSE-Status ist mit einem × gekennzeichnet. Beim MAA wurden als erster Antikörper F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

3.3 Anwendung verschiedener Proteinaggregat-Detektionsverfahren zur Detektion von BSE in unterschiedlichen Hirnregionen

Insgesamt 43 Proben aus vier verschiedenen Hirnarealen stammend wurden mit RT-QuIC und MAA untersucht. In Abbildung 15 ist exemplarisch die graphische Auswertung von vier Hirnregionen eines Tieres dargestellt. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis des MAA.

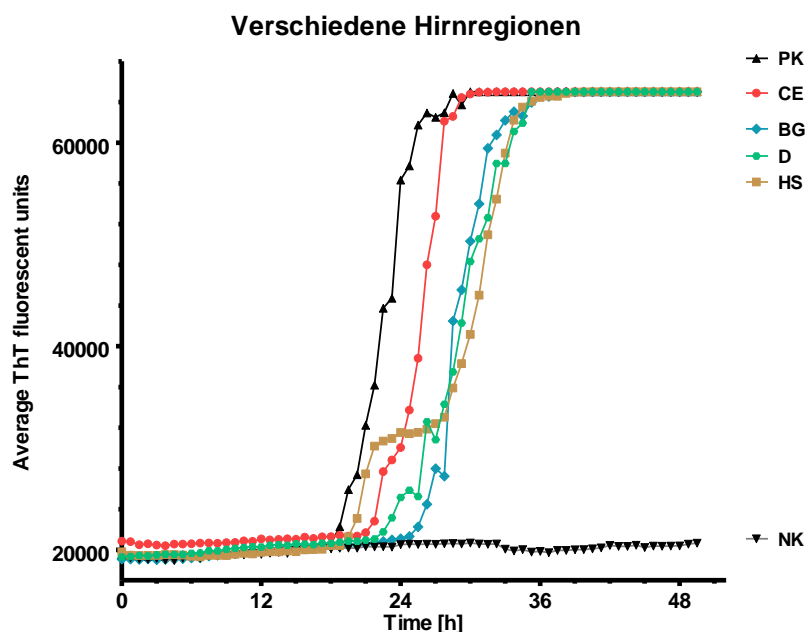


Abbildung 15: RT-QuIC verschiedener Hirnregionen von Tier A. Beispielhafte Darstellung der graphischen Auswertung der Messergebnisse von Cerebellum (CE), Diencephalon (D), Basalganglien (BG) und Hirnstamm (HS) des Tieres A mit Negativ- und Positivkontrolle (NK bzw. PK).

A _{CE}	B _{BG}	C _{HS}	E _D	G _{HS}	H _{BG}	J _{HS}	K _{BG}	L _D	M _D	N _D	NK
A _{BG}	B _D	D _{CE}	F _D	G _{CE}	I _{CE}	J _{CE}	K _D	M _{HS}	N _{HS}	O _{BG}	PK
A _{HS}	C _D	D _D	F _{BG}	H _{HS}	I _{BG}	J _{BG}	L _{CE}	M _{CE}	N _{CE}	O _D	
A _D	C _{BG}	E _{BG}	G _{BG}	H _{CE}	I _D	G _D	L _{BG}	M _{BG}	N _{BG}		

Abbildung 16: MAA der verschiedenen Hirnregionen der Tiere A bis O. Die entsprechende Hirnregion ist mit CE (Cerebellum), BG (Basalganglien), D (Diencephalon) und HS (Hirnstamm), die Negativ- und Positivkontrolle mit NK bzw. PK gekennzeichnet. Der obere Abschnitt eines jeden Feldes entspricht einer Verdünnung von 10^{-3} , der untere von 10^{-4} . Als erster Antikörper wurden F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

Nachfolgend sind die Ergebnisse für jeweils Cerebellum, Diencephalon, Basalganglien und Hirnstamm von RT-QuIC und MAA dargestellt und näher erläutert. Die RT-QuIC wurde hier in drei Verdünnungsstufen durchgeführt mit je 1 μ g, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent. Weiter ist zum Vergleich das PET-Blot-Ergebnis der entsprechenden Proben aufgeführt, welches dankenswerterweise von Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer zur Verfügung gestellt wurde. Beim BSE-Status wurde hier nur zwischen erkrankt und gesund unterschieden ohne weitere Spezifizierung in atypische und klassische Form.

Insgesamt war der BSE-Nachweis mit RT-QuIC und PET-Blot in allen vier Hirnregionen möglich. Mittels MAA gelang keine Detektion von BSE im Cerebellum.

3.3.1 Detektion von PrP^{Sc} im Cerebellum

Wie Tabelle 9 zeigt, konnte mit RT-QuIC im Cerebellum selbst bis zu einem Hirnhomogenat-Äquivalent von 10 ng BSE detektiert werden, wobei es in dieser niedrigsten Verdünnungsstufe ein falsch negatives Ergebnis gab. Mit dem MAA gelang kein BSE-Nachweis in dieser Hirnregion. Mittels PET-Blot konnte BSE detektiert werden. Drei mit dem PET-Blot falsch negativ getestete Proben zeigten auch im RT-QuIC Assay in der Verdünnungsreihe zunehmend schwache Fluoreszenzsignale.

Tabelle 9: Nachweis von PrP^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Cerebellum.

Tier	Diagnose	RT-QuIC			MAA	PET-Blot
		1 µg	100 ng	10 ng		
A	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	+++ / -	-	+
D	BSE	+++ / +++++	++ / +	- / -	-	-
E	×	- / -	- / -	- / -	-	-
G	BSE	++++ / +++++	++++ / +++	+++ / ++	-	+
H	BSE	++++ / +++++	++ / +++	- / +	-	+
I	BSE	++++ / +++++	++++ / +++	++ / +	-	-
J	×	- / -	- / -	- / -	-	-
L	BSE	++++ / +++	++ / -	- / +	-	-
M	BSE	++++ / +++++	++ / +++	+ / -	-	+
N	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++++ / ++	-	+

Das Ergebnis beider Messreihen der RT-QuIC ist durch einen Schrägstrich (/) getrennt. Es wurden drei Verdünnungsstufen (1 µg, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent) untersucht. Der Anzahl positiver *Wells* wird durch Anzahl an Pluszeichen (+) entsprochen. Ein fehlender Nachweis von PrP^{Sc} wird mit einem Minuszeichen (-) symbolisiert. Ein negativer BSE-Status ist mit einem × gekennzeichnet. Beim MAA wurden als erster Antikörper F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

3.3.2 Detektion von PrP^{Sc} in den Basalganglien

Auch in den aus den Basalganglien stammenden Proben konnte mit der RT-QuIC eine hochsensitive Detektion von BSE erzielt werden. Mit MAA und PET-Blot gelang ebenfalls der Nachweis von BSE, wobei sich letzterer mit nur drei im Vergleich zu fünf beim MAA falsch negativen Tests als sensitiver erwies. Die vollständigen Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Nachweis von PrP^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot in den Basalganglien.

Tier	Diagnose	RT-QuIC			MAA	PET-Blot
		1 µg	100 ng	10 ng		
A	BSE	++++ / +++	+++ / +++++	+ / -	-	+
B	BSE	++++ / +++++	++++ / ++	- / -	+	+
C	BSE	++++ / +++++	++++ / +++	++ / +	+	+
E	×	- / -	- / -	- / -	-	-
F	BSE	++++ / +++++	- / +	- / -	-	+
G	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	+++ / +++++	+	+
H	BSE	++++ / +++++	+++ / +++++	++++ / +++++	+	+
I	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++ / ++	-	-
J	×	- / -	- / -	- / -	-	-
K	BSE	++++ / +++++	++ / +++	+++ / +++	+	+
L	BSE	++++ / +++	+++ / ++	+ / +	-	-
M	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++ / +	+	+
N	BSE	++++ / +++++	+++ / +++++	++ / +++	+	+
O	BSE	++++ / +++++	+++ / +++	+ / +	-	-

Das Ergebnis beider Messreihen der RT-QuIC ist durch einen Schrägstrich (/) getrennt. Es wurden drei Verdünnungsstufen (1 µg, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent) untersucht. Der Anzahl positiver *Wells* wird durch Anzahl an Pluszeichen (+) entsprochen. Ein fehlender Nachweis von PrP^{Sc} wird mit einem Minuszeichen (-) symbolisiert. Ein negativer BSE-Status ist mit einem × gekennzeichnet. Beim MAA wurden als erster Antikörper F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

3.3.3 Detektion von PrP^{Sc} im Diencephalon

Im Diencephalon gelang die Detektion von BSE am sensitivsten mittels MAA. Wie aus Tabelle 11 unter anderem hervorgeht, konnte mittels PET-Blot bei vier und mit RT-QuIC in der niedrigsten Verdünnungsstufe bei zwei Proben fälschlicherweise das Vorliegen von BSE nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Nachweis von PrP^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Diencephalon.

Tier	Diagnose	RT-QuIC			MAA	PET-Blot
		1 µg	100 ng	10 ng		
A	BSE	++++ / +++++	++++ / +++	- / -	+	+
B	BSE	++++ / +++++	+++ / +++++	+++ / +++++	+	+
C	BSE	++++ / +++	++++ / +++++	+++ / +++++	+	+
D	BSE	- / -	- / -	- / -	+	-
E	×	- / -	- / -	- / -	-	-
F	BSE	++++ / +++++	++ / +++++	- / +++	+	+
H	BSE	+++ / +++++	++++ / +++	++++ / +	+	+
I	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++++ / +++++	+	-
J	×	- / -	- / -	- / -	-	-
K	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	- / ++	+	+
L	BSE	++++ / +++	++ / -	+ / +	+	-
M	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++++ / +++++	+	+
N	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	+ / +	+	+
O	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	+++ / ++	+	-

Das Ergebnis beider Messreihen der RT-QuIC ist durch einen Schrägstrich (/) getrennt. Es wurden drei Verdünnungsstufen (1 µg, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent) untersucht. Der Anzahl positiver *Wells* wird durch Anzahl an Pluszeichen (+) entsprochen. Ein fehlender Nachweis von PrP^{Sc} wird mit einem Minuszeichen (-) symbolisiert. Ein negativer BSE-Status ist mit einem × gekennzeichnet. Beim MAA wurden als erster Antikörper F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

3.3.4 Detektion von PrP^{Sc} im Hirnstamm

In den aus dem Hirnstamm stammenden Gewebeproben zeigten sich sowohl RT-QuIC bis zu einer Verdünnung von 100 ng Hirnhomogenat-Äquivalent als auch der PET-Blot als absolut geeignete Nachweismethode für die hier getesteten Proben. Mit dem MAA war der Nachweis von BSE ebenfalls möglich. Wie aus Tabelle 12 unter anderem hervorgeht, lieferte letzterer bei zwei Proben jedoch ein falsch negatives Ergebnis.

Tabelle 12: Nachweis von PrP^{Sc} mit RT-QuIC, MAA und PET-Blot im Hirnstamm.

Tier	Diagnose	RT-QuIC			MAA	PET-Blot
		1 µg	100 ng	10 ng		
A	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++++/++	+	+
C	BSE	++ / +++++	++++ / +++++	++ / +	+	+
G	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	++++/++++	+	+
H	BSE	++++ / +++	++ / +++	+ / -	-	+
J	×	- / -	- / -	- / -	-	-
M	BSE	+++ / +++	- / ++	- / -	-	+
N	BSE	++++ / +++++	++++ / +++++	+++/++++	+	+

Das Ergebnis beider Messreihen der RT-QuIC ist durch einen Schrägstrich (/) getrennt. Es wurden drei Verdünnungsstufen (1 µg, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent) untersucht. Der Anzahl positiver *Wells* wird durch Anzahl an Pluszeichen (+) entsprochen. Ein fehlender Nachweis von PrP^{Sc} wird mit einem Minuszeichen (-) symbolisiert. Ein negativer BSE-Status ist mit einem × gekennzeichnet. Beim MAA wurden als erster Antikörper F89 monoklonal und L42 monoklonal in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet; als zweiter Antikörper diente Anti-Maus IgG monoklonal in einer Verdünnung von 1:2000.

3.4 Vergleichende Betrachtung der Proteinaggregat-Detektionsverfahren

Wie aus den dargestellten Ergebnissen der Tabellen 9 bis 13 hervorgeht, eigneten sich RT-QuIC, MAA und PET-Blot in unterschiedlichem Maße zur Detektion von PrP^{Sc} und damit BSE in Rinderhirnen. In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich RT-QuIC in den ersten beiden Verdünnungsstufen zu 10 µg bzw. 100 ng Hirnhomogenat-Äquivalent in allen Hirnregionen als extrem geeignetes Detektionsverfahren zum Nachweis von PrP-Aggregaten. Beim PET-Blot und vor allem beim MAA zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Detektionsrate vom Ursprungsort des Gewebes. Mittels PET-Blot wurde vor allem im Hirnstamm eine sehr gute Nachweisbarkeit erzielt, mittels MAA hingegen im Diencephalon. Ein vollkommenes Ausbleiben einer Detektion von PrP-Aggregaten wurde nur mittels MAA bei den aus dem Cerebellum stammenden Proben beobachtet.

Beim RT-QuIC-Assay zeigte sich eine leichte Zunahme der falsch negativen Messwerte in der höchsten Verdünnungsstufe. Auch Dauer und Varianz der *Lag*-Phase, welche als Zeit bis zum Erreichen des positiven Schwellenwertes definiert wurde, wurden mit zunehmender Verdünnung größer (vgl. Abbildung 17). Während in der ersten Verdünnungsstufe die mittlere *Lag*-Phase noch bei ca. 27 h lag, stieg die mittlere Dauer auf 34 h bei einer Verdünnung von 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent an.

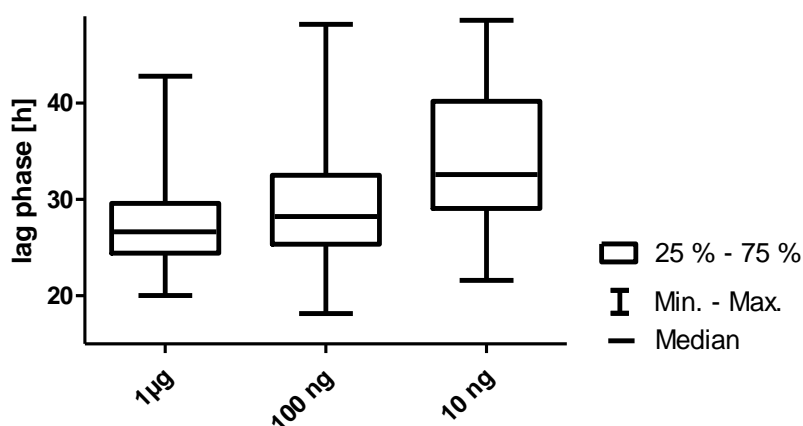


Abbildung 17: *Lag*-Phase verschiedener Verdünnungsstufen. Dargestellt sind die *Lag*-Phasen der Messungen der Tiere A bis O mit RT-QuIC in den drei verwendeten Verdünnungsstufen mit jeweils 1 µg, 100 ng und 10 ng Hirnhomogenat-Äquivalent.

Die Analyse der *Lag*-Phase der verschiedenen Hirnregionen ist in Abbildung 18 dargestellt. Die mittlere Dauer der *Lag*-Phase liegt bei den vier Hirngewebetypen zwischen ca. 30 h im Cerebellum und 25 h in den Basalganglien und dem Diencephalon mit hoher Varianz der Werte vor allem bei getesteten Hirnstammproben (mittlere *Lag*-Phase von ca. 28 h).

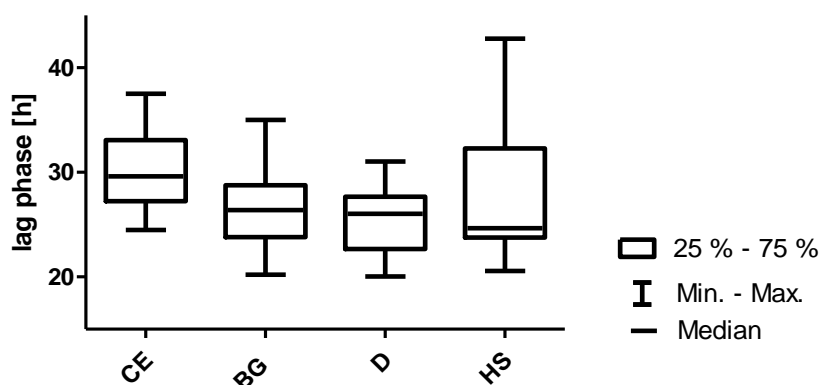


Abbildung 18: *Lag*-Phase verschiedener Hirnregionen. *Lag*-Phase der Messungen der RT-QuIC der Tiere A bis O mit 1 µg Hirnhomogenat-Äquivalent in den vier Hirnregionen Cerebellum (CE), Basalganglien (BG), Diencephalon (D) und Hirnstamm (HS).

Auch bei der Betrachtung der *Lag*-Phasen für klassische und atypische BSE konnte ein Unterschied festgestellt werden. So wurde hier bei atypischer BSE eine kürzere *Lag*-Phase gemessen als bei der klassischen Variante (vgl. Abbildung 19).

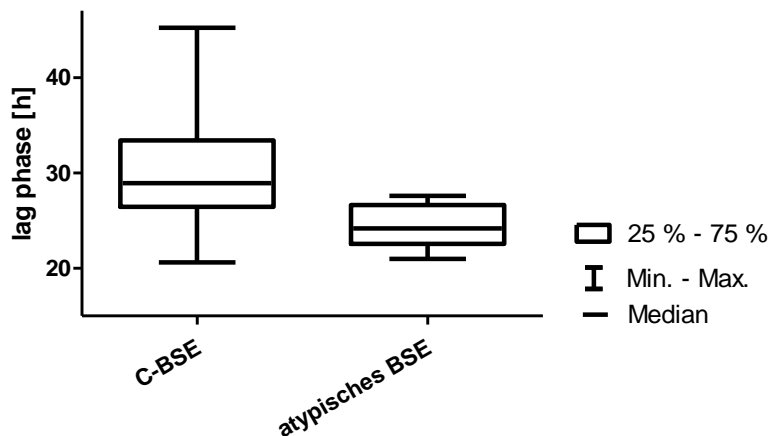


Abbildung 19: *Lag*-Phase von klassischer und atypischer BSE. Dargestellt sind die *Lag*-Phasen der Messungen der Proben 1 bis 70 mit RT-QuIC mit 1 μg *Seed*. C-BSE und atypisches BSE sind getrennt abgebildet.

Insgesamt erwies sich RT-QuIC als sensitivstes Verfahren zur Detektion von sowohl klassischer als auch atypischer BSE auch in aus unterschiedlichen Hirnregionen stammenden Geweben. Weder mit MAA noch PET-Blot gelang eine vergleichbar sensitive Detektion von BSE, allerdings eine höhere Spezifität.

4 Diskussion

Trotz sinkender Fallzahlen ist BSE als zoonotische neurodegenerative Erkrankung auch in Zukunft für den Menschen als Gefahr einzustufen (Budka und Will 2015). Daher wird weiterhin aktiv nach schnelleren und sensitiveren Testverfahren gesucht und an deren Standardisierung gearbeitet, um eine zuverlässige Detektion von sowohl der klassischen als auch der atypischen BSE-Form in Rindern zu gewährleisten (Gray et al. 2011; Hagiwara et al. 2017). Aktuell werden diese Tests mit *post mortem* gewonnenem, der Medulla oblongata entstammendem Hirngewebe durchgeführt (European Food Safety Authority 2007). Diese verwendeten Tests sind in ihrer Sensitivität nicht mit Bioassays vergleichbar und damit nicht ausreichend, um sämtliche Gefahrenquellen zu detektieren (Safar et al. 2002; Buschmann und Groschup 2005; Gray et al. 2012; Meloni et al. 2012).

Während klassische BSE beim Menschen vCJD auslöst, ist das Risiko einer Übertragung vom H- und L-Typ und deren Folgen beim Menschen noch Gegenstand der Forschung. Im Tiermodell konnte eine Übertragung von L-BSE auf Primaten und humanes PrP exprimierende Mäuse nachgewiesen werden, bei letzteren sogar ohne Nachweis einer Speziesbarriere (Béringue et al. 2008; Mestre-Francés et al. 2012). Eine Übertragung vom H-Typ auf Mäuse gelang in der gleichen Studie nicht. Es konnte eine höhere Pathogenität von L-BSE im Vergleich zu C-BSE in Mäusen und Hamstern gezeigt werden (Béringue et al. 2007; Capobianco et al. 2007; Nicot und Baron 2011). Diese Ergebnisse verdeutlichen das zoonotische Potential und die damit verbundene Notwendigkeit, das Risiko, welches die atypischen Formen von BSE darstellen, zu eliminieren, indem zukünftig auch atypische BSE standardisiert mit den verwendeten Assays detektiert wird.

Neben der Ausbreitung von BSE durch kontaminierte Nahrung tierischen Ursprungs ist weiter die Verteilung im Boden während des Verwesungsprozesses zu beachten. PrP^{Sc} kann über fünf Jahre im Boden nachgewiesen werden und verbreitet sich wohl hauptsächlich mittels Vektor oder durch Auswaschung mit Regenwasser (Somerville et al. 2019). Auch hier findet sich eine Anwendbarkeit von Testverfahren, bei denen eine gleichbleibende Qualität von Wichtigkeit ist, um die Sicherheit in der Landwirtschaft weiter zu erhöhen

4.1 Anwendbarkeit von RT-QuIC zur Detektion von BSE

4.1.1 Optimierung des RT-QuIC Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung von 900 mM NaCl, 15 mM DOC sowie von 7,5 µg rbovPrP₂₃₋₂₃₁ Substrat im Reaktionsansatz eine sensitive Detektion von BSE im Hirngewebe etabliert. In der RT-QuIC wird unterschiedlichstes recPrP zur Detektion von BSE mit gutem Erfolg verwendet, unter anderen recPrP von einer anderen Spezies stammend, chimäres, verkürztes oder auch bovines (Masujin et al. 2008; Masujin et al. 2016; Hwang et al. 2017a; Hwang et al. 2017b). Auch die hier getesteten unterschiedlichen

Substrate zeigten sich prinzipiell alle als mögliche Reaktionspartner in der RT-QuIC. Das hier verwendete rbovPrP₂₃₋₂₃₁ erwies sich unter den gewählten Reaktionsbedingungen jedoch als am geeignetsten.

Bei der Testung unterschiedlicher Substratmengen bei gleichzeitig variierenden Salzkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen eingesetzter Substratmenge und Salzkonzentration im Reaktionsansatz besteht. Eine höhere Salzmenge scheint eine vermehrte Konversion bzw. Interaktion der Proteine untereinander zu bedingen und damit die RT-QuIC-Reaktion zu erleichtern. Dies ist im Einklang mit bereits beschriebenen Ergebnissen (Horiuchi und Caughey 1999).

Während die RT-QuIC ohne die Verwendung von Ultraschall auskommt, ist dies bei der PMCA, einer aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bei der Anwendung zur Detektion von Prionerkrankungen aktuell stark beforschten Methode, ein wichtiger Schritt zur Amplifizierung der Reaktion und damit Verbesserung der Detektion von PrP^{Sc}. Durch die Ultraschallbehandlung erfolgt eine Zerkleinerung der Ausgangsaggregate und somit eine Oberflächenvergrößerung, an welcher eine Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} stattfinden kann. Initial wurde auch mit RT-QuIC mit Ultraschall experimentiert (Atarashi et al. 2007), jedoch wurde dieser Ansatz zur Vereinfachung des Assays verlassen (Atarashi et al. 2008). Der hiesige Versuch, die RT-QuIC-Reaktion mittels Ultraschalls zu beschleunigen, war unter den angewandten Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich. Möglicherweise könnte dies dafür sprechen, dass es sich bei der RT-QuIC eher um eine Anlagerungs- als um eine Konversionsreaktion handelt, bei der eine gewisse Aggregatgröße notwendig ist. Auch die Tatsache, dass eine Reaktion mit hitzedenaturiertem rekombinantem Prionprotein nachweisbar war, könnte für einen sich von der PMCA unterscheidenden Reaktionsmechanismus sprechen. Jedoch muss bei der Hitzedenaturierung bedacht werden, dass PrP und PrP^{Sc} über eine hohe Variationsbreite in ihrer möglichen Konformation verfügen (Donne et al. 1997; Riek et al. 1997) und zudem eine höhere Hitzestabilität als herkömmliche Proteine aufweisen (Kimberlin et al. 1983; Marín-Moreno et al. 2019). Eine Renaturierung nach Abkühlen der Proben ist demnach denkbar. Die vorhandene, aber abgeschwächte RT-QuIC-Reaktion könnte aber für eine zumindest zu Teilen erfolgte Denaturierung sprechen.

Für andere Optimierungsversuche der RT-QuIC wie etwa eine Vergrößerung der in der Reaktion zur Verfügung stehenden Oberfläche mittels Glasperlen, konnte nicht die erwartete positive Auswirkung auf die Detektion von BSE gezeigt werden. Vielmehr behinderten größerer Menge Glasperlen die Messung. *Beads* fanden bereits effektiv Anwendung in der PMCA, jedoch wurden hier Teflon-*Beads* verwendet (Gonzalez-Montalban et al. 2011a; Gonzalez-Montalban et al. 2011b). Der Versuch, die Adhäsion durch Beschichtung aufzuheben und damit weitere Einblicke in den Mechanismus der ablaufenden Reaktion zu erhalten, lässt vermuten, dass eine Unterbindung der Interaktion mit der *Well*-Wand bzw. auch die reine Zugabe von Sigmacote als adhärenzverhindernder Stoff eine Reaktion im *Well*

möglichweise verhindert. Auch dies spricht für die oben erwähnte potentielle Anlagerungsreaktion bei der RT-QuIC. Weiter unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass bisher nicht gezeigt werden konnte, dass bei RT-QuIC infektiöses PrP^{Sc} entsteht.

Weitere erst kürzlich beschriebene Optimierungsmöglichkeiten der RT-QuIC bestehen etwa in pH-Anpassung, Temperaturerhöhung oder Frequenzerhöhung beim Schütteln (Orrú et al. 2016) und bieten weiteren Entwicklungsraum bei der Detektion von BSE mittels RT-QuIC.

4.1.2 Schnelltestcharakter von RT-QuIC

Mit dem RT-QuIC Assay ist eine rasche gleichzeitige Testung vieler Proben ohne hohen technischen Aufwand möglich (Atarashi et al. 2011a). Auch in der vorliegenden Arbeit hat sich RT-QuIC als hervorragende Methode zur einfachen und zuverlässigen Testung vieler Proben zur gleichen Zeit erwiesen. Weiter zeigte sich RT-QuIC etwa auch als zeitsparender und simpler in der Durchführung im Vergleich zur Anwendung anderer Verfahren wie etwa der PMCA (Murayama et al. 2010; Murayama et al. 2014). Vor allem die Zerkleinerung von Aggregaten mittels Ultraschalls stellt hier einen verkomplizierenden Faktor dar.

Eine Anpassung der Detektionsdauer auf unter 48 h zur weiteren Verbesserung der Geschwindigkeit mit der der BSE-Status einer Probe definiert werden kann, wurde mit RT-QuIC bereits vorgenommen (Wilham et al. 2010). Die hier gewonnenen Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass eine wesentlich verkürzte Laufzeit aufgrund der Variation der *Lag*-Phase mit einem Sensitivitätsverlust einhergehen würde. Auch lässt sich aus dem hier vorgenommenen Vergleich mehrerer separat produzierter Chargen schließen, dass trotz sorgfältigster Produktion von recPrP eine Varianz im Fluoreszenzsignal auftreten kann und damit zumindest bei niedrigerer PrP^{Sc}-Konzentration eine nicht unerhebliche Rate an falsch negativen Ergebnissen produziert werden würde.

Ein standardisierter Test zur Detektion von BSE in aus der Peripherie gewonnenem Gewebe wäre wünschenswert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass beispielsweise in Milzen deutlich weniger PrP^{Sc} vorhanden ist als im Gehirn (Inoue et al. 2005). Dies lässt Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines solchen Testverfahrens vermuten. Jedoch zeigt sich RT-QuIC als vielversprechende Testmethode zur Entwicklung eines Standardtest, welcher BSE in Geweben mit wesentlich geringerem PrP^{Sc}, aber einem immer noch potentiell infektiösen Level detektieren kann und dabei aktuelle kommerziell erhältliche Tests in der Sensitivität übertrifft (Masujin et al. 2016). Für sporadische CJD im Menschen konnte RT-QuIC bereits erfolgreich als *ante mortem* Test mit peripher gewonnenen Testsubstanzen Anwendung finden (McGuire et al. 2012; Orrú et al. 2014; Orrú et al. 2015b).

RT-QuIC bietet außerdem noch vielfältige weitere Anwendungsmöglichkeiten. So kann der Assay etwa zur Quantifizierung von PrP^{Sc} (Wilham et al. 2010; Bessen et al. 2012; Shi et al. 2013; Chesebro et al. 2015; Henderson et al. 2015) oder zur Identifizierung von Inhibitoren

der Proteinaggregation genutzt werden (Schmitz et al. 2016) und so weiter zur Optimierung von Testverfahren und der weiteren Erforschung von TSE beitragen.

4.2 Anwendung von RT-QuIC und MAA zur Detektion von BSE in Rinderhirnen

In den hier getesteten aus dem Stammhirn stammenden Proben konnte BSE mit RT-QuIC und MAA mit einer Sensitivität von 92,15 % bzw. 87,7 % nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von atypischem BSE gelang hier sowohl mit RT-QuIC als auch mit dem MAA. Bei letzterem jedoch mit geringerer Sensitivität. Dies könnte mit dem dem MAA vorangestellten Proteinase K-Verdau in Zusammenhang stehen. Hierbei wird nämlich nicht nur die zelluläre Isoform denaturiert, sondern auch ein erheblicher Anteil des nachzuweisenden PrP^{Sc} (Cronier et al. 2008). Dies könnte möglicherweise auch einen Einfluss auf die zur RT-QuIC vergleichsweise höhere Spezifität des MAA haben. Einen weiteren Einflussfaktor hierauf stellt die Verwendung von PrP-spezifischen monoklonalen Antikörpern zur Detektion von PrP^{Sc} mit dem MAA dar.

Insgesamt zeigt sich der MAA bei der Detektion von BSE als weniger geeignet als es bereits bei humanen Formen von TSE beschrieben wurde (Wemheuer et al. 2013). Dies könnte unter anderem in einer unzureichenden Anpassung des Assays auf BSE begründet sein. Die in diagnostischen Tests häufig verwendeten Reagenzien haben einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die PK-Resistenz, die zwischen den verschiedenen Prionerkrankungen variiert (Breyer et al. 2012).

Bei der RT-QuIC wird in der Literatur eine unterschiedliche Zeitspanne bis zum Erreichen eines positiven Fluoreszenzsignals angegeben mit 16 h für L-BSE und 33 h bei klassischem BSE (Orrú et al. 2015a). Ein Unterschied der Länge der *Lag*-Phase zwischen atypischer und klassischer BSE konnte auch hier beobachtet werden mit einer durchschnittlichen *Lag*-Phase von 24 h bei atypischer BSE und 31 h bei C-BSE. Eine Diskrimination der unterschiedlichen BSE-Typen ist hierdurch aufgrund der großen Varianz der *Lag*-Phasen jedoch nicht eindeutig möglich. Auch ist die geringe Anzahl der hier getesteten Proben von mit atypischem BSE infizierten Rindern ein die Aussagekraft limitierender Faktor.

4.3 Anwendung verschiedener Proteinaggregat-Detektionsverfahren zur Detektion von BSE in unterschiedlichen Hirnregionen

Die höchste Expression von PrP^c im Körper ist im Hirngewebe. Auch für PrP^{Sc} wird eine unterschiedliche Verteilung unter anderem in den verschiedenen Hirnregionen und differierend unter den drei BSE-Typen beschrieben (Priemer et al. 2013). Eine Studie fand die höchste Konzentration an PrP^{Sc} im Hirnstamm (Iwata et al. 2006), was mit dem Aufstieg

von oral aufgenommenem PrP^{Sc} vom Darm über parasymphatische und sympathische Nerven vereinbar ist (Kaatz et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit gelang mit allen drei Nachweismethoden die sensitivste Detektion im Hirnstamm, was zusammen mit der dort gemessenen kürzesten mittleren *Lag*-Phase von 24,7 h eine hohe und damit leicht detektierbare PrP^{Sc}-Konzentration vermuten lässt. Dies ist im Einklang mit bereits beschriebenen Untersuchungen. Mit Gewebe aus dem Hirnstamm wurden kürzere *Lag*-Phasen gemessen als bei Proben aus anderen Hirnregionen, wobei Material aus dem Mittelhirn etwas längere und solches aus dem Cerebellum die längste *Lag*-Phase aufwies (Hwang et al. 2017a). Dieser Zusammenhang zwischen der entsprechenden *Lag*-Phase und der korrespondierenden Hirnregion wurde auch hier beobachtet. Überträgt man den Zusammenhang zwischen mittlerer *Lag*-Phase und PrP^{Sc}-Gehalt, ergibt sich die niedrigste Konzentration im Cerebellum, was unter anderem die schlechte Detektionsrate mittels MAA erklären könnte.

Die aus den hier gewonnenen Ergebnissen ermittelte unterschiedliche Sensitivität der drei verwendeten Nachweismethoden in den verschiedenen getesteten Hirnarealen spricht zum einen dafür, dass sich ein Nachweis in peripheren Geweben mit niedrigerer Konzentration erschwert darstellen könnte. Zum anderen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass in den verschiedenen Hirnarealen Substanzen in variierenden Konzentrationen enthalten sind, welche einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die jeweilige Reaktion der Nachweismethode haben. Es konnten mehrere Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Lipide und verschiedene Proteine als endogene Faktoren identifiziert werden, welche als Co-Faktoren bei der Konversionsreaktion bei Prionerkrankungen dienen (Caughey und Baron 2006). Die genaue Identität und Anzahl solcher Faktoren konnte bisher jedoch nicht determiniert werden (Supattapone 2010). Neben den essentiellen Co-Faktoren sind auch als sich auf die Reaktion inhibitorisch auswirkende Faktoren beschrieben (Abdel-Haq 2015; Hoover et al. 2017). Auch solche Störkomponenten würden neben einer niedrigeren Konzentration an PrP^{Sc} den fehlenden Nachweis von BSE im Cerebellum mittels MAA erklären. Bezüglich der niedrigeren Konzentration an PrP^{Sc} erschwert wie bereits erwähnt auch hier der dem MAA und auch dem PET-Blot vorangegangene Verdau mit Proteinase K die hoch sensitive Detektion.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Verdünnungsstufen bezüglich der *Lag*-Phase zeigte, dass zwar größerer Menge an Hirnhomogenat-Äquivalent und damit an PrP^{Sc} eine kürzere Zeit bis zum Erreichen des Grenzwertes für ein positives Fluoreszenzsignal benötigen, jedoch konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht wie andernorts beschrieben ein linearer Zusammenhang zwischen der Länge der *Lag*-Phase und dem Prion-Titer nachgewiesen werden (Henderson et al. 2015). Auch ist kein Rückschluss auf den Ursprung der Gewebeproben anhand der *Lag*-Phase möglich.

4.4 Vergleichende Betrachtung von Proteinaggregat-Detektionsverfahren

Drei verschiedene Nachweismethoden wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung zum Nachweis von BSE hin verglichen. RT-QuIC, MAA und PET-Blot sind in unterschiedlichem Maße zur Detektion von PrP^{Sc} im Hirngewebe geeignet. Der sensitivste Nachweis gelingt selbst bei kleinsten *Seed*-Mengen am zuverlässigsten mit der RT-QuIC. Aber auch MAA und PET-Blot eignen sich zur Detektion von PrP^{Sc}. Limitationen sind hier jedoch unter anderem durch die verschiedenen Gewebetypen gegeben, die scheinbar durch enthaltene Störkomponenten und unterschiedliche Konzentrationen an infektiösem PrP^{Sc} die Reaktion und somit den Nachweis negativ beeinflussen.

Im Falle der RT-QuIC können die unterschiedlichen Komponenten des Reaktionsansatzes als Stellschraube für weitere Anpassung auf variierende Herkunft der Proben dienen, um eine noch sensitivere Detektion auch in der Peripherie standardisiert möglich zu machen.

Der PET-Blot zeigte sich insgesamt als zuverlässig, jedoch nicht für ein Screening geeignet. Die Auswertung erfordert ein hohes Maß an Expertise. Anders als bei MAA und RT-QuIC gelingt keine rasche Testung großer Probenmengen.

Neben einer hohen Sensitivität darf auch die Spezifität eines Assays nicht außer Acht gelassen werden, um einen ethischen Umgang im Zusammenhang mit BSE in der Tierzucht zu gewährleisten und unbegründete Euthanasie zu vermeiden. Während sich RT-QuIC in der Gesamtheit aller durchgeführten Messungen als am sensitivsten erwiesen hat, waren sowohl MAA als auch PET-Blot bezüglich der Spezifität überlegen. Daraus ergibt sich, dass die RT-QuIC sich als geeignetes Screening-Verfahren erweist, während die beiden anderen Verfahren besser als Bestätigungsverfahren geeignet erscheinen.

Bei der Weiterentwicklung von Testverfahren ist die Minimierung des Kontakts mit infektiösem Material und somit die Sicherheit im Handling sowie die Vermeidung der Schaffung zusätzlicher, potenzieller Infektionsquellen, wie etwa bei der PMCA (Moudjou et al. 2013), erstrebenswert. Untersuchungen lassen schließen, dass die Generierung von Infektiosität von Prionen an das Vorhandensein von passenden Co-Faktoren geknüpft ist (Piro et al. 2011). Entscheidend ist jedoch vor allem die Wahl des Detektionsverfahrens. Weder bei der Verwendung von MAA noch PET-Blot entsteht zusätzliches infektiöses Material, da beide Nachweisverfahren auf dem Nachweis von PrP^{Sc} mittels Antikörper beruhen. Bei der RT-QuIC konnte eine Entstehung von infektiösem PrP^{Sc} bislang nicht gezeigt werden.

Neben der Forschung zur weiteren Etablierung neuer Testverfahren, um Prionerkrankungen noch zuverlässiger detektieren und damit ihre Ausbreitung verhindern zu können, sind zurzeit noch andere Lösungsansätze zur Eindämmung von TSE Gegenstand der Forschung. Unter anderem in Korea wird beispielsweise an Rindern geforscht, die aufgrund einer Sequenzvariation im *PRNP*-Gen scheinbar weniger anfällig für BSE sind (Choi et al. 2012).

Auch mit der Modifikationen in der Proteinstruktur von PrP^c konnten Erfolge verzeichnet werden, indem hierdurch die Übertragung verschiedener TSE verhindert werden konnte (Kurt et al. 2014). In bovinen Zellen gelang es außerdem das *PRNP*-Gen durch Gen-Editierung zu deletieren und somit ein Modell zur Erforschung weiterer Eigenschaften von bovinem PrP und BSE zu schaffen (Choi et al. 2015). Dies sind einige vielversprechende Ansätze, um zukünftig möglicherweise eine BSE-Testung aufgrund von unterbundener Übertragung weitgehend obsolet zu machen.

Aktuell stellt BSE jedoch weiterhin ein ernst zu nehmendes und tödliches Krankheitsbild für gleichermaßen Rind und Mensch dar, dessen Ausbreitung und Vorkommen es einzudämmen gilt. Um den Konsumenten zu schützen und um ethische Tierhaltung betreiben zu können, gilt es auch in Zukunft, nach noch schnelleren und sensitiveren Testverfahren zu suchen als sie bisher zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Optimierung des *Real-time quaking induced conversion assays* (RT-QuIC) und der anschließende Vergleich bezüglich der Eignung der Anwendung von RT-QuIC, Membran-Adsorptionsassay (MAA) und *Paraffin-embedded tissue blot* (PET-Blot) zur Detektion von infektiösem Prionprotein (PrP^{Sc}) im Hirngewebe von mit Boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) infizierten Rindern. Bei PrP^{Sc} handelt es sich um das auslösende Agens von Prionerkrankungen, zu denen unter anderem BSE zählt und welche neurodegenerativ sowie auf andere Spezies übertragbar sind. RT-QuIC basiert auf dem Nachweis von Aggregaten von infektiösem PrP^{Sc} mittels rekombinant hergestelltem Prionprotein (recPrP) durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff. Beim MAA handelt es sich dagegen um ein *Slot-Blot*-Verfahren, welches Antikörper zur Detektion von PrP^{Sc} nutzt. Auch der PET-Blot beruht auf einem Antikörpernachweis, wodurch in der Auflichtmikroskopie die krankheitsspezifischen Gewebeeinschlüsse in den dünnen in Paraffin gebetteten Schnitten sichtbar gemacht werden.

Unter Anpassung verschiedener Reaktionsparameter wie etwa Art des verwendeten recPrP, Salzkonzentration und Substratmenge konnten mit RT-QuIC reproduzierbare Ergebnisse beim Nachweis von BSE erzielt werden. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen im Reaktionsansatz verwendeter Substrat- und Salzmenge. Eine im Reaktionsansatz erhöhte Salzkonzentration scheint die RT-QuIC-Reaktion positiv zu beeinflussen. Für letztere scheint weiterhin das Andocken an die Gefäßwand notwendig zu sein, wodurch sich ein Ausbleiben einer Reaktion nach Zugabe eines Adhärenzverhindernden Stoffes erklären ließe. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis für einen sich von anderen Nachweismethoden unterscheidenden Reaktionsmechanismus sein, nämlich einer Anlagerungsreaktion im Gegensatz zu einer Konversionsreaktion, bei der zusätzliches infektiöses Material entsteht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Oberflächenvergrößerung mittels Glasperlen, von Hitzedenaturierung von recPrP sowie die Ultraschallbehandlung von Hirnhomogenaten auf die RT-QuIC-Reaktion untersucht.

Mit dem optimierten RT-QuIC-Assay sowie mit dem MAA wurden nun insgesamt 70 Proben von Rindern mit verblindetem BSE-Status getestet. Hierunter waren auch Tiere, welche an atypischer BSE, einer spontan und sporadisch auftretenden Sonderform von BSE, erkrankt waren. Mit beiden Nachweisverfahren ließ sich PrP^{Sc} zuverlässig mit einer Sensitivität von 92,15 % bzw. 87,7 % detektieren.

Weiter wurde aus den Regionen Cerebellum, Diencephalon, Basalganglien und Hirnstamm Hirngewebe von 46 Tieren mit RT-QuIC, MAA und zusätzlich dem PET-Blot auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} hin getestet. RT-QuIC erwies sich auch hier als sensitivste Methode zum Nachweis von BSE. Mit dem MAA gelang kein Nachweis von BSE im Cerebellum, was auf im Gewebe enthaltene Inhibitoren oder eine unzureichende Anpassung des Assays auf die Anwendung für BSE zurückgeführt werden könnte. Es wurde bereits ein

signifikanter Einfluss von im Reaktionsansatz verwendeten Detergenzien auf die Proteinase K-Resistenz, einer beim MAA genutzten Eigenschaft von PrP^{Sc}, beschrieben.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Messungen mittels RT-QuIC lassen einen Zusammenhang zwischen Zeitspanne bis zum Erreichen eines messbaren Ergebnisses und PrP^{Sc}-Konzentration vermuten. Außerdem scheint die *Lag*-Phase abhängig von der getesteten Hirnregion zu sein, was einen unterschiedlichen Gehalt an PrP^{Sc} im Gewebe nahelegt sowie als Hinweis auf eine unterschiedliche Verteilung von die Reaktion beeinflussenden Faktoren bewertet werden kann. Für atypisches BSE konnte eine kürzere *Lag*-Phase als für klassisches BSE ermittelt werden.

Insgesamt zeigen sich alle drei Detektionsverfahren als geeignete Methode zum Nachweis von PrP^{Sc}, wobei sich RT-QuIC als am sensitivsten sowohl in verschiedenen Hirnregionen als auch für atypisches BSE erwies. Weiter imponiert RT-QuIC durch die Möglichkeit der raschen gleichzeitigen und unkomplizierten Testung vieler Proben. Diese Eigenschaften machen RT-QuIC zu einem vielversprechenden Testverfahren, welches zum Screening von BSE angewandt werden könnte. Zukünftig könnte RT-QuIC standardisiert sogar in peripheren Geweben zur Detektion von BSE eingesetzt werden, um Mensch und Rind noch zuverlässiger zu schützen. Durch die hohe Spezifität von MAA und PET-Blot eignen sich diese Verfahren zur Bestätigung der Diagnose.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Haq H (2015): Factors intrinsic and extrinsic to blood hamper the development of a routine blood test for human prion diseases. *J Gen Virol* 96, 479–493
- Aldhous P (1990): BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature* 345, 194
- Alper T, Haig DA, Clarke MC (1978): The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J Gen Virol* 41, 503–516
- Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, et al. (1996): Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382, 779–788
- Animal and Plant Health Agency (2021): BSE Cases born after the reinforced feed ban (BARB cases). <https://www.gov.uk/government/publications/cattle-tse-surveillance-statistics>, Zugriff am 06.02.2022
- Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B (2007): Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4, 645–650
- Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B (2008): Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* 5, 211–212
- Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N (2011a): Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 5, 150–153
- Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, et al. (2011b): Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17, 175–178
- Babelhadj B, Di Bari MA, Pirisinu L, Chiappini B, Gaouar SBS, Riccardi G, Marcon S, Agrimi U, Nonno R, Vaccari G (2018): Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis* 24, 1029–1036
- Baron GS, Hughson AG, Raymond GJ, Offerdahl DK, Barton KA, Raymond LD, Dorward DW, Caughey B (2011): Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry* 50, 4479–4490
- Baron T, Vulin J, Biacabe A-G, Lakhdar L, Verchere J, Torres J-M, Bencsik A (2011): Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice. *PLoS ONE* 6, e15839
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986): Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417–428

-
- Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998): Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79, 601–607
- Belay ED, Schonberger LB (2002): Variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Clin Lab Med* 22, 849–862
- Béringue V, Andréoletti O, Le Dur A, Essalmani R, Vilotte J-L, Lacroux C, Reine F, Herzog L, Biacabé A-G, Baron T, et al. (2007): A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci* 27, 6965–6971
- Béringue V, Herzog L, Reine F, Le Dur A, Casalone C, Vilotte J-L, Laude H (2008): Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerging Infect Dis* 14, 1898–1901
- Bessen RA, Marsh RF (1992): Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66, 2096–2101
- Bessen RA, Marsh RF (1994): Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859–7868
- Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B (1995): Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375, 698–700
- Bessen RA, Wilham JM, Lowe D, Watschke CP, Shearin H, Martinka S, Caughey B, Wiley JA (2012): Accelerated shedding of prions following damage to the olfactory epithelium. *J Virol* 86, 1777–1788
- Biacabe A-G, Laplanche J-L, Ryder S, Baron T (2004): Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5, 110–115
- Bistaffa E, Rossi M, De Luca CMG, Moda F (2017): Biosafety of Prions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150, 455–485
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982): Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309–1311
- Braun U, Schicker E, Pusterla N, Schönmann M (1998): Clinical findings in 50 cows with bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 111, 27–32
- Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave K-A, Weis J, Aguzzi A (2010): Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13, 310–318
- Breyer J, Wemheuer WM, Wrede A, Graham C, Benestad SL, Brenig B, Richt JA, Schulz-Schaeffer WJ (2012): Detergents modify proteinase K resistance of PrP^{Sc} in different transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Vet Microbiol* 157, 23–31

-
- Britton TC, al-Sarraj S, Shaw C, Campbell T, Collinge J (1995): Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 346, 1155
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1996): Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380, 345–347
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997a): Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* 15, 961–972
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, et al. (1997b): The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684–687
- Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA (1998a): Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 9, 1425–1429
- Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA (1998b): Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* 75, 29–37
- Brown HR, Goller NL, Rudelli RD, Merz GS, Wolfe GC, Wisniewski HM, Robakis NK (1990): The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol* 80, 1–6
- Brown KL, Mabbott NA (2014): Evidence of subclinical prion disease in aged mice following exposure to bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 95, 231–243
- Brown P, Gajdusek DC (1991): Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 337, 269–270
- Brown P, Bradley R (1998): 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *BMJ* 317, 1688–1692
- Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L (2001): Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerging Infect Dis* 7, 6–16
- Brown P, McShane LM, Zanusso G, Detwiler L (2006): On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerging Infect Dis* 12, 1816–1821
- Bruce ME (2003): TSE strain variation An investigation into prion disease diversity. *Br Med Bull* 66, 99–108
- Budka H, Will RG (2015): The end of the BSE saga: do we still need surveillance for human prion diseases? *Swiss Med Wkly* 145, w14212
- Buschmann A, Groschup MH (2005): Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* 192, 934–942

-
- Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe A-G, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eiden M, Baron T, Casalone C, Groschup MH (2006): Atypical BSE in Germany - proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* 117, 103–116
- Calzolari L, Lysek DA, Pérez DR, Güntert P, Wüthrich K (2005): Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 651–655
- Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G, et al. (2007): Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog* 3, e31
- Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, Westaway D, Prusiner SB (1986): Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* 46, 503–511
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M (2004): Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3065–3070
- Castagna A, Campostrini N, Farinazzo A, Zanusso G, Monaco S, Righetti PG (2002): Comparative two-dimensional mapping of prion protein isoforms in human cerebrospinal fluid and central nervous system. *Electrophoresis* 23, 339–346
- Caughey B, Raymond GJ (1991): The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266, 18217–18223
- Caughey B, Kocisko DA (2003): Prion diseases: a nucleic-acid accomplice? *Nature* 425, 673–674
- Caughey B, Baron GS (2006): Prions and their partners in crime. *Nature* 443, 803–810
- Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE (1991): N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* 65, 6597–6603
- Caughey B, Baron GS, Chesebro B, Jeffrey M (2009): Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem* 78, 177–204
- Chandler RL (1961): Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378–1379
- Chesebro B (2003): Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 66, 1–20
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM (1985): Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331–333

-
- Chesebro B, Striebel J, Rangel A, Phillips K, Hughson A, Caughey B, Race B (2015): Early Generation of New PrP^{Sc} on Blood Vessels after Brain Microinjection of Scrapie in Mice. *MBio* 6, e01419-01415
- Choi S, Woo H-J, Lee J (2012): Sequence variations of the bovine prion protein gene (PRNP) in native Korean Hanwoo cattle. *J Vet Sci* 13, 127–137
- Choi W, Kim E, Yum S-Y, Lee C, Lee J, Moon J, Ramachandra S, Malaweera BO, Cho J, Kim J-S, et al. (2015): Efficient PRNP deletion in bovine genome using gene-editing technologies in bovine cells. *Prion* 9, 278–291
- Clauss M, Sauter-Louis C, Chaheer E, Pottgiesser C, Goebel S, Selhorst T, Wichmann H-E, Klee W, Kienzle E (2006): Investigations of the potential risk factors associated with cases of bovine spongiform encephalopathy in Bavaria, Germany. *Vet Rec* 158, 509–513
- Cockcroft PD (2004): The similarity of the physical sign frequencies of bovine spongiform encephalopathy and selected differential diagnoses. *Vet J* 167, 175–180
- Cohen FE (1999): Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 293, 313–320
- Colby DW, Zhang Q, Wang S, Groth D, Legname G, Riesner D, Prusiner SB (2007): Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20914–20919
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ (1991): Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337, 1441–1442
- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP (2006): Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* 367, 2068–2074
- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Frosh A, Mead S, Hill AF, Brandner S, Thomas D, Alpers MP (2008): A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3725–3739
- Comoy EE, Casalone C, Lescoutra-Etcheagaray N, Zanusso G, Freire S, Marcé D, Auvré F, Ruchoux M-M, Ferrari S, Monaco S, et al. (2008): Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS ONE* 3, e3017
- Concha-Marambio L, Pritzkow S, Moda F, Tagliavini F, Ironside JW, Schulz PE, Soto C (2016): Detection of prions in blood from patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med* 8, 370ra183
- Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (Vorläufige Mitteilung). *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 57, 1–18
- Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, Wadsworth JDF (2008): Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* 416, 297–305

-
- Cuille J, Chelle PL (1936): Pathologie animale. La maladie dite tremblant du mouton est-elle inoculable? Comptes rendus hebdomadaires des sciences de l'Academie des Sciences 203, 1552–54
- Cuille J, Chelle PL (1939): Transmission experimentale de la tremblante a la chevre. Comptes rendus hebdomadaires des sciences de l'Academie des Sciences 208, 1058–60
- DeArmond SJ, McKinley MP, Barry RA, Braunfeld MB, McColloch JR, Prusiner SB (1985): Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 41, 221–235
- Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003): RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425, 717–720
- Deleault NR, Geoghegan JC, Nishina K, Kasczak R, Williamson RA, Supattapone S (2005): Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* 280, 26873–26879
- Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, Supattapone S (2012): Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8546–8551
- Diener TO, McKinley MP, Prusiner SB (1982): Viroids and prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5220–5224
- Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (1997): Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13452–13457
- Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D (1974): Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290, 692–693
- European Food Safety Authority (2007): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on a protocol for the evaluation of new rapid BSE post mortem tests. *EFSA Journal* 5, 508
- European Food Safety Authority (2021): The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2020. *EFSA Journal* 19, e06934
- Field EJ, Shenton BK (1973): Immunological reactions in scrapie: the basis of a rapid titration method. *Pathol Biol* 21, 1051–1056
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM (2002): Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113, 177–192
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmézas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P (1998): Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res* 292, 77–84

-
- Fradkin JE, Schonberger LB, Mills JL, Gunn WJ, Piper JM, Wysowski DK, Thomson R, Durako S, Brown P (1991): Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *JAMA* 265, 880–884
- Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, et al. (2009): Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. *Microbiol Immunol* 53, 704–707
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992): Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9097–9101
- Gajdusek DC, Zigas V (1957): Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257, 974–978
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I (1935): Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 154, 736–762
- Geschwind MD (2015): Prion Diseases. *Continuum (Minneap Minn)* 21, 1612–1638
- Giaccone G, Moda F (2020): PMCA Applications for Prion Detection in Peripheral Tissues of Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Biomolecules* 10, 405
- Gibbs CJ, Gajdusek DC, Latarjet R (1978): Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 6268–6270
- Gibbs CJ, Amyx HL, Bacote A, Masters CL, Gajdusek DC (1980): Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis* 142, 205–208
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA (1998): Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8, 449–457
- Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, Boyes L, Linehan J, Simmons M, Webb P, Bellerby P, et al. (2013): Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* 347, f5675
- Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenk R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV (2011a): Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog* 7, e1001277
- Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV (2011b): Relationship between conformational stability and amplification efficiency of prions. *Biochemistry* 50, 7933–7940

- Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wüthrich K (2005): Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 646–650
- Gough KC, Maddison BC (2010): Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4, 275–282
- Gray JG, Dudas S, Czub S (2011): A study on the analytical sensitivity of 6 BSE tests used by the Canadian BSE reference laboratory. *PLoS ONE* 6, e17633
- Gray JG, Dudas S, Graham C, Czub S (2012): Performance analysis of rapid diagnostic tests on atypical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Diagn Invest* 24, 976–980
- Green AJE, Zanusso G (2018): Prion protein amplification techniques. *Handb Clin Neurol* 153, 357–370
- Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M (2017): Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion* 11, 113–127
- Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M (2009): The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures. *Neuropathology* 29, 625–631
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274, 1–13
- Hardt M, Baron T, Groschup MH (2000): A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122, 43–53
- Harris JR (Hrsg.): *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease (Subcellular Biochemistry)*. Springer 2012, 502-504
- Heath CA, Cooper SA, Murray K, Lowman A, Henry C, MacLeod MA, Stewart G, Zeidler M, McKenzie JM, Knight RSG, Will RG (2011): Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease: a retrospective analysis of the first 150 cases in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82, 646–651
- Henderson DM, Davenport KA, Haley NJ, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA (2015): Quantitative assessment of prion infectivity in tissues and body fluids by real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol* 96, 210–219
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schürmann P, Windl O, Brose N, Kretschmar H (1999): Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19, 8866–8875
- Holznagel E, Yutzy B, Schulz-Schaeffer W, Kruip C, Hahmann U, Bierke P, Torres J-M, Kim Y-S, Thomzig A, Beekes M, et al. (2013): Foodborne transmission of

- bovine spongiform encephalopathy to nonhuman primates. *Emerging Infect Dis* 19, 712–720
- Hoover CE, Davenport KA, Henderson DM, Zabel MD, Hoover EA (2017): Endogenous Brain Lipids Inhibit Prion Amyloid Formation In Vitro. *J Virol* 91, e02162-16
- Horiuchi M, Caughey B (1999): Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J* 18, 3193–3203
- Hwang S, West Greenlee MH, Balkema-Buschmann A, Groschup MH, Nicholson EM, Greenlee JJ (2017a): Real-Time Quaking-Induced Conversion Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy Prions in a Subclinical Steer. *Front Vet Sci* 4, 242
- Hwang S, Greenlee JJ, Nicholson EM (2017b): Use of bovine recombinant prion protein and real-time quaking-induced conversion to detect cattle transmissible mink encephalopathy prions and discriminate classical and atypical L- and H-Type bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One* 12, e0172391
- Inoue Y, Yamakawa Y, Sakudo A, Kinumi T, Nakamura Y, Matsumoto Y, Saeki K, Kamiyama T, Onodera T, Nishijima M (2005): Infection route-independent accumulation of splenic abnormal prion protein. *Jpn J Infect Dis* 58, 78–82
- Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, et al. (2006): Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59, 100–107
- Jacobs JG, Langeveld JPM, Biacabe A-G, Acutis P-L, Polak MP, Gavier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, et al. (2007): Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol* 45, 1821–1829
- Jakob A (1921): Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 64, 147–228
- Jendroska K, Heinzel FP, Torchia M, Stowring L, Kretzschmar HA, Kon A, Stern A, Prusiner SB, DeArmond SJ (1991): Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity. *Neurology* 41, 1482–1490
- Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA (2006): Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog* 2, e32
- Johnson CJ, Bennett JP, Biro SM, Duque-Velasquez JC, Rodriguez CM, Bessen RA, Rocke TE (2011): Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS ONE* 6, e19836

- Kaatz M, Fast C, Ziegler U, Balkema-Buschmann A, Hammerschmidt B, Keller M, Oelschlegel A, McIntyre L, Groschup MH (2012): Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *Am J Pathol* 181, 515–524
- Kaski D, Mead S, Hyare H, Cooper S, Jampana R, Overell J, Knight R, Collinge J, Rudge P (2009): Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet* 374, 2128
- Kimberlin RH, Walker CA, Millson GC, Taylor DM, Robertson PA, Tomlinson AH, Dickinson AG (1983): Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent: Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *Journal of the Neurological Sciences* 59, 355–369
- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA (1987): Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* 68 (Pt 7), 1875–1881
- Kirkwood JK, Cunningham AA (1994): Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec* 135, 296–303
- Kong Q, Zheng M, Casalone C, Qing L, Huang S, Chakraborty B, Wang P, Chen F, Cali I, Corona C, et al. (2008): Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virol* 82, 3697–3701
- Kovács GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, et al. (2005): Genetic prion disease: the EURO-CJD experience. *Hum Genet* 118, 166–174
- Kralovicova S, Fontaine SN, Alderton A, Alderman J, Ragnarsdottir KV, Collins SJ, Brown DR (2009): The effects of prion protein expression on metal metabolism. *Mol Cell Neurosci* 41, 135–147
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Römer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H (2001): Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* 276, 16711–16719
- Kurt TD, Bett C, Fernández-Borges N, Joshi-Barr S, Hornemann S, Rüllicke T, Castilla J, Wüthrich K, Aguzzi A, Sigurdson CJ (2014): Prion transmission prevented by modifying the β 2- α 2 loop structure of host PrPC. *J Neurosci* 34, 1022–1027
- Lacroux C, Comoy E, Moudjou M, Perret-Liaudet A, Lugan S, Litaise C, Simmons H, Jas-Duval C, Lantier I, Béringue V, et al. (2014): Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog* 10, e1004202
- Lasmézas CI, Comoy E, Hawkins S, Herzog C, Mouthon F, Konold T, Auvré F, Correia E, Lescoutra-Etcheagaray N, Salès N, et al. (2005): Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* 365, 781–783
- Le Pichon CE, Valley MT, Polymenidou M, Chesler AT, Sagdullaev BT, Aguzzi A, Firestein S (2009): Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* 12, 60–69

-
- Li R, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS (2001): The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* 207, 49–58
- Lima LMTR, Cordeiro Y, Tinoco LW, Marques AF, Oliveira CLP, Sampath S, Kodali R, Choi G, Foguel D, Torriani I, et al. (2006): Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry* 45, 9180–9187
- Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008): Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88, 673–728
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004): Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363, 417–421
- Lombardi G, Casalone C, D' Angelo A, Gelmetti D, Torcoli G, Barbieri I, Corona C, Fasoli E, Farinazzo A, Fiorini M, et al. (2008): Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog* 4, e1000075
- Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P (1986): Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315, 997–1003
- Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Güntert P, Wüthrich K (2005): Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 640–645
- Madec JY, Vanier A, Dorier A, Bernillon J, Belli P, Baron T (1997): Biochemical properties of protease resistant prion protein PrP^{Sc} in natural sheep scrapie. *Arch Virol* 142, 1603–1612
- Makarava N, Savtchenko R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV (2012): Fast and ultrasensitive method for quantitating prion infectivity titre. *Nat Commun* 3, 741
- Marín-Moreno A, Aguilar-Calvo P, Moudjou M, Espinosa JC, Béringue V, Torres JM (2019): Thermostability as a highly dependent prion strain feature. *Sci Rep* 9, 11396
- Marques AF, Cordeiro Y, Silva JL, Lima LMTR (2009): Enhanced prion protein stability coupled to DNA recognition and milieu acidification. *Biophys Chem* 141, 135–139
- Marsh RF, Burger D, Eckroade R, Zu Rhein GM, Hanson RP (1969): A preliminary report on the experimental host range of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Infect Dis* 120, 713–719
- Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Bernoulli C, Asher DM (1979): Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 5, 177–188

- Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T (2008): Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2, 123–128
- Masujin K, Orrú CD, Miyazawa K, Groveman BR, Raymond LD, Hughson AG, Caughey B (2016): Detection of Atypical H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy and Discrimination of Bovine Prion Strains by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol* 54, 676–686
- McGuire LI, Peden AH, Orrú CD, Wilham JM, Appleford NE, Mallinson G, Andrews M, Head MW, Caughey B, Will RG, et al. (2012): Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 72, 278–285
- Meloni D, Davidse A, Langeveld JPM, Varello K, Casalone C, Corona C, Balkema-Buschmann A, Groschup MH, Ingravalle F, Bozzetta E (2012): EU-approved rapid tests for bovine spongiform encephalopathy detect atypical forms: a study for their sensitivities. *PLoS ONE* 7, e43133
- Mercier G, Diéterlen F, Lucotte G (2008): Population distribution of the methionine allele at the PRNP codon 129 polymorphism in Europe and the Middle East. *Hum Biol* 80, 181–190
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K (1981): Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* 54, 63–74
- Mestre-Francés N, Nicot S, Rouland S, Biacabe A-G, Quadrio I, Perret-Liaudet A, Baron T, Verdier J-M (2012): Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy in primate model. *Emerging Infect Dis* 18, 142–145
- M’Gowan JP (1922): Scrapie in Sheep. *Scottish Journal of Agriculture* 5, 365–75
- Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M (2003): Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr* 11, 1–12
- Moh CF, Siedlak SL, Tabaton M, Perry G, Castellani RJ, Smith MA (2010): Paraffin-embedded tissue (PET) blot method: application to Alzheimer disease. *J Neurosci Methods* 190, 244–247
- Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B (1994): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2839–2842
- Montag J, Schulz-Schaeffer W, Schrod A, Hunsmann G, Motzkus D (2013): Asynchronous onset of clinical disease in BSE-infected macaques. *Emerging Infect Dis* 19, 1125–1127
- Moudjou M, Sibille P, Fichet G, Reine F, Chapuis J, Herzog L, Jaumain E, Laferrière F, Richard C-A, Laude H, et al. (2013): Highly infectious prions generated by a

- single round of microplate-based protein misfolding cyclic amplification. *MBio* 5, e00829-00813
- Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S (2010): Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS ONE* 5
- Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T (2014): Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol* 95, 2576–2588
- Murdoch BM, Murdoch GK (2015): Genetics of Prion Disease in Cattle. *Bioinform Biol Insights* 9, 1–10
- Nathanson N, Wilesmith J, Griot C (1997): Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol* 145, 959–969
- Neary K, Caughey B, Ernst D, Race RE, Chesebro B (1991): Protease sensitivity and nuclease resistance of the scrapie agent propagated in vitro in neuroblastoma cells. *J Virol* 65, 1031–1034
- Nicholson EM, Brunelle BW, Richt JA, Kehrl ME, Greenlee JJ (2008): Identification of a Heritable Polymorphism in Bovine PRNP Associated with Genetic Transmissible Spongiform Encephalopathy: Evidence of Heritable BSE. *PLoS One* 3, e2912
- Nicot S, Baron T (2011): Strain-specific barriers against bovine prions in hamsters. *J Virol* 85, 1906–1908
- O'Rourke KI, Baszler TV, Miller JM, Spraker TR, Sadler-Riggelman I, Knowles DP (1998): Monoclonal Antibody F89/160.1.5 Defines a Conserved Epitope on the Ruminant Prion Protein. *J Clin Microbiol* 36, 1750–1755
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735–746
- Okada H, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Czub S, Yokoyama T (2011): Experimental transmission of h-type bovine spongiform encephalopathy to bovinized transgenic mice. *Vet Pathol* 48, 942–947
- Orrú CD, Wilham JM, Hughson AG, Raymond LD, McNally KL, Bossers A, Ligios C, Caughey B (2009): Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP(res) detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng Des Sel* 22, 515–521
- Orrú CD, Wilham JM, Raymond LD, Kuhn F, Schroeder B, Raeber AJ, Caughey B (2011): Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *MBio* 2, e00078-00011

-
- Orrù CD, Hughson AG, Race B, Raymond GJ, Caughey B (2012): Time course of prion seeding activity in cerebrospinal fluid of scrapie-infected hamsters after intratongue and intracerebral inoculations. *J Clin Microbiol* 50, 1464–1466
- Orrù CD, Bongiani M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, Fiorini M, Pocchiari M, Monaco S, Caughey B, Zanusso G (2014): A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* 371, 519–529
- Orrù CD, Favole A, Corona C, Mazza M, Manca M, Groveman BR, Hughson AG, Acutis PL, Caramelli M, Zanusso G, et al. (2015a): Detection and discrimination of classical and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy by real-time quaking-induced conversion. *J Clin Microbiol* 53, 1115–1120
- Orrù CD, Groveman BR, Hughson AG, Zanusso G, Coulthart MB, Caughey B (2015b): Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid. *MBio* 6, e02451
- Orrù CD, Hughson AG, Groveman BR, Campbell KJ, Anson KJ, Manca M, Kraus A, Caughey B (2016): Factors That Improve RT-QuIC Detection of Prion Seeding Activity. *Viruses* 8, e140
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, et al. (1996): Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 39, 767–778
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, et al. (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46, 224–233
- Parchi P, de Boni L, Saverioni D, Cohen ML, Ferrer I, Gambetti P, Gelpi E, Giaccone G, Hauw J-J, Höftberger R, et al. (2012): Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathol* 124, 517–529
- Pattison IH (1965): Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec* 77, 1388–1390
- Piro JR, Wang F, Walsh DJ, Rees JR, Ma J, Supattapone S (2011): Seeding Specificity and Ultrastructural Characteristics of Infectious Recombinant Prions. *Biochemistry* 50, 7111–7116
- Priemer G, Balkema-Buschmann A, Hills B, Groschup MH (2013): Biochemical Characteristics and PrP(Sc) Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. *PLoS ONE* 8, e67599
- Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144

-
- Prusiner SB, Hadlow WJ, Garfin DE, Cochran SP, Baringer JR, Race RE, Eklund CM (1978): Partial purification and evidence for multiple molecular forms of the scrapie agent. *Biochemistry* 17, 4993–4999
- Prusiner SB, Groth DF, McKinley MP, Cochran SP, Bowman KA, Kasper KC (1981): Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4606–4610
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349–358
- Richt JA, Hall SM (2008): BSE Case Associated with Prion Protein Gene Mutation. *PLoS Pathog* 4, e1000156
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K (1997): NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413, 282–288
- Riesner D (2003): Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* 66, 21–33
- Rogers M, Taraboulos A, Scott M, Groth D, Prusiner SB (1990): Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology* 1, 101–109
- Rüdiger JF: *Der redlich- und aufrichtige Schäfer*. 1710, 208
- Rutala WA, Weber DJ, Society for Healthcare Epidemiology of America (2010): Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31, 107–117
- Ryan AM, Womack JE (1993): Somatic cell mapping of the bovine prion protein gene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle and sheep. *Anim Genet* 24, 23–26
- Saá P, Castilla J, Soto C (2005): Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol* 299, 53–65
- Saá P, Castilla J, Soto C (2006): Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* 281, 35245–35252
- Saba R, Booth SA (2013): The genetics of susceptibility to variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Public Health Genomics* 16, 17–24
- Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001): Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998): Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4, 1157–1165

- Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, Ball H, Legname G, Leclerc E, Solforosi L, et al. (2002): Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20, 1147–1150
- Salguero FJ, Díaz-San SF, Brun A, Cano MJ, Torres JM (2006): Comparison of three monoclonal antibodies for use in immunohistochemical detection of bovine spongiform encephalopathy protease-resistant prion protein. *J Vet Diagn Invest* 18, 106–109
- Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N (2014): Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol* 88, 11791–11801
- Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Candelise N, Müller-Cramm D, Varges D, Schulz-Schaeffer WJ, Zafar S, Zerr I (2016): Application of an in vitro-amplification assay as a novel pre-screening test for compounds inhibiting the aggregation of prion protein scrapie. *Sci Rep* 6, 28711
- Schulz-Schaeffer WJ, Fatzer R, Vandeveld M, Kretzschmar HA (2000a): Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol Suppl* 173–180
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000b): The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 156, 51–56
- Scott M, Foster D, Miranda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, et al. (1989): Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847–857
- Shi S, Mitteregger-Kretzschmar G, Giese A, Kretzschmar HA (2013): Establishing quantitative real-time quaking-induced conversion (qRT-QuIC) for highly sensitive detection and quantification of PrPSc in prion-infected tissues. *Acta Neuropathol Commun* 1, 44
- Sigurdsson B, Palsson P, Grimsson H (1957): Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol* 16, 389–403
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005): The most infectious prion protein particles. *Nature* 437, 257–261
- Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IW, Wells GA (1996): BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec* 138, 175–177
- Sklaviadis T, Akowitz A, Manuelidis EE, Manuelidis L (1993): Nucleic acid binding proteins in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5713–5717

-
- Solis GP, Radon Y, Sempou E, Jechow K, Stuermer CAO, Málaga-Trillo E (2013): Conserved roles of the prion protein domains on subcellular localization and cell-cell adhesion. *PLoS ONE* 8, e70327
- Somerville RA, Fernie K, Smith A, Bishop K, Maddison BC, Gough KC, Hunter N (2019): BSE infectivity survives burial for five years with only limited spread. *Arch Virol* 164, 1135–1145
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993): Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991–2002
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006): Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3416–3421
- Stella R, Massimino ML, Sandri M, Sorgato MC, Bertoli A (2010): Cellular prion protein promotes regeneration of adult muscle tissue. *Mol Cell Biol* 30, 4864–4876
- Supattapone S (2010): Biochemistry. What makes a prion infectious? *Science* 327, 1091–1092
- Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB (1992): Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* 3, 851–863
- Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, Sidle KC, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994): Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9936–9940
- Torres J-M, Andréoletti O, Lacroux C, Prieto I, Lorenzo P, Larska M, Baron T, Espinosa J-C (2011): Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerging Infect Dis* 17, 1636–1644
- Vorberg I, Priola SA (2002): Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J Biol Chem* 277, 36775–36781
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004): Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11, 213–228
- Ward RL, Porter DD, Stevens JG (1974): Nature of the scrapie agent: evidence against a viroid. *J Virol* 14, 1099–1103
- Watson N, Brandel J-P, Green A, Hermann P, Ladogana A, Lindsay T, Mackenzie J, Pocchiari M, Smith C, Zerr I, Pal S (2021): The importance of ongoing international surveillance for Creutzfeldt–Jakob disease. *Nat Rev Neurol* 17, 362–379
- Watt NT, Hooper NM (2003): The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* 28, 406–410

- Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WSS, Hooper NM (2005): Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 35914–35921
- Watts JC, Balachandran A, Westaway D (2006): The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog* 2, e26
- Webb PR, Denyer M, Gough J, Spiropoulos J, Simmons MM, Spencer YI (2011): Paraffin-embedded tissue blot as a sensitive method for discrimination between classical scrapie and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep. *J Vet Diagn Invest* 23, 492–498
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987): A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121, 419–420
- Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Schulze-Sturm U, Wemheuer WE, Hahmann U, Gawinecka J, Schütz E, Zerr I, Brenig B, et al. (2009): Similarities between Forms of Sheep Scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease Are Encoded by Distinct Prion Types. *Am J Pathol* 175, 2566–2573
- Wemheuer WM, Wrede A, Gawinecka J, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ (2013): Filtration of protein aggregates increases the accuracy for diagnosing prion diseases in brain biopsies. *J Neuropathol Exp Neurol* 72, 758–767
- World Health Organization (1999): Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies Report of a WHO Consultation Geneva, Switzerland. https://www.who.int/csr/resources/publications/bse/WHO_CDS_CSR_APH_2000_3/en/; Zugriff am 28.02.2019
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB (1988): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123, 638–644
- Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B (2010): Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 6, e1001217
- Will RG (1993): Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease. *Br Med Bull* 49, 960–970
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921–925
- Williams ES, Young S (1980): Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* 16, 89–98
- Wilson R, Dobie K, Hunter N, Casalone C, Baron T, Barron RM (2013): Presence of subclinical infection in gene-targeted human prion protein transgenic mice exposed to atypical bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 94, 2819–2827

- Winklhofer KF, Hartl FU, Tatzelt J (2001): A sensitive filter retention assay for the detection of PrP(Sc) and the screening of anti-prion compounds. *FEBS Lett* 503, 41–45
- Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA, et al. (1997a): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350, 903–907
- Zeidler M, Johnstone EC, Bamber RW, Dickens CM, Fisher CJ, Francis AF, Goldbeck R, Higgo R, Johnson-Sabine EC, Lodge GJ, et al. (1997b): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. *Lancet* 350, 908–910
- Zlotnik I, Rennie JC (1962): The pathology of the brain of mice inoculated with tissues from scrapie sheep. *J Comp Pathol* 72, 360–365
- Zlotnik I, Rennie JC (1965): Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *J Comp Pathol* 75, 147–157

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer für die umfassende Betreuung in allen Bereichen während des gesamten Projekts danken. Die vielen Gespräche, fachlichen Diskussionen und Erklärungen sowie die Hilfestellungen in sämtlichen Phasen meiner Dissertation waren sehr wertvoll für mich.

Weiter möchte ich mich bei Dr. rer. nat. D. Motzkus bedanken, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich stets motivierte.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. vet. M. H. Groschup für die Bereitstellung der Gewebeproben sowie die Einblicke, die ich in sein Labor erhalten durfte.

Weiterhin möchte ich mich bei der Georg-August-Universität Göttingen bedanken, welche mir als Stipendiatin des Jacob-Henle-Programms für Experimentelle Medizin mit der Durchführung dieses Dissertationsprojekts ermöglicht hat. Auch gilt mein Dank an dieser Stelle PD Dr. rer. nat. W. Albig für die gute Begleitung während des Promotionsprogramms.

Ebenfalls möchte ich meinen Dank dem Deutschen Primatenzentrum und Dr. med. vet. C. Stahl-Henning für die Möglichkeit der Mitarbeit in der Abteilung Infektionsmodelle aussprechen.

Auch wäre mir dieses Projekt nicht möglich gewesen ohne die technische Assistenz und herausragende Unterstützung während der experimentellen Phase durch Georgia Hesse, Angelina Schuder, Sabine Borchert und Manuela Becker.