



Publikationen des
Umweltbundesamtes

**Bewertung des
Vorkommens und der
Auswirkung von
infektiösen Biomolekülen
in Böden unter besonderer
Berücksichtigung ihrer
Persistenz**

Forschungsprojekt im Auftrag des
Umweltbundesamtes
FuE-Vorhaben
Förderkennzeichen 202 73 265 /
201 73 241

Dr. Björn Seidel
Dr. Werner Kördel
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie
und Angewandte Ökologie

**Umwelt
Bundes
Amt** 
Für Mensch und Umwelt

September 2007



Fraunhofer Institut
Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie

**Umweltforschungsplan
des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit**

Förderkennzeichen (UFOPLAN) 202 73 265 / 201 73 241

**Bewertung des Vorkommens und der Auswirkung von
infektiösen Biomolekülen in Böden unter besonderer
Berücksichtigung ihrer Persistenz**

Projektleitung

Dr. Björn Seidel

Dr. Werner Kördel

**Fraunhofer-Institut für
Molekularbiologie und Angewandte Oekologie
(Fraunhofer IME)**

Bereich: Angewandte Oekologie

Institutsleitung: Prof. Dr. Rainer Fischer

**IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES**

September 2007

Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Bewertung des Vorkommens und der Auswirkung von infektiösen Biomolekülen in Böden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Persistenz		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Seidel, Björn, Peters Rainer		8. Abschlussdatum 30.06.2007
		9. Veröffentlichungsdatum
6. Durchführende Institution Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie Abt. Oekologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg		10. UFOPLAN-Nr. 202 73 265 / 201 73 241
		11. Seitenzahl 111
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 1406, 06813 Dessau		12. Literaturangaben 88
		13. Tabellen und Diagramme 15
15. Zusätzliche Angaben		14. Abbildungen 52
16. Zusammenfassung Die Persistenz von infektiösen Biomolekülen im Boden ist von hoher Bedeutung, insbesondere in Hinblick auf Prionen, die verantwortlichen Agenzien für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) wie Scrapie oder der Chronic Wasting Disease (CWD). Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Prionen im Boden überleben können, ohne ihre biologische Aktivität zu verlieren. Die Ausbreitung von Prionen in die Umwelt kann durch verschiedene Ursachen erfolgen, wie z.B. durch infizierte Plazenta oder Fruchtwasser von Scrapie-infizierten Schafen. Weiterhin ist eine Umweltkontamination durch infizierten Speichel, Exkremente oder durch nicht ausreichend sterilisierten organischen Dünger vorstellbar. Scrapie-freie Herden können sich wiederum mit Scrapie infizieren, wenn diese auf Weiden gehalten werden, auf den zuvor Scrapie-Ausbrüche beobachtet wurden. Diese Befunde deuten auf eine nachhaltige Kontamination der Umwelt, insbesondere des Bodens hin. Um dies näher zu untersuchen, wurde am Fraunhofer IME, Schmallenberg, ein Forschungsvorhaben durchgeführt, welches die die Persistenz von Prionen im Boden genauer analysieren sollte. Durch den Einsatz von Freiland-Lysimetern, wurde die Kontamination eines Standardbodens unter der Verwendung des Hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K simuliert. Die Prionen wurden durch Westernblotting nachgewiesen und die Infektiosität mittels Bioassay mit Syrischen Goldhamstern untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Scrapie-Stamm 263K im Boden über einen Zeitraum von 29 Monaten nachweisbar ist und dieser Boden nach oraler Verfütterung hoch-infektiös ist. Auffallend war, dass nicht nur der kontaminierte Boden im Tierversuch eine sehr hohe Infektiosität aufwies, sondern dass auch wässrige Extrakte des kontaminierten Bodens, zu einer Scrapie-Erkrankung bei den Hamstern nach oraler Applikation führten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass PrP ^{Sc} , welches nach 21 Monaten aus dem Boden extrahiert wurde, als Ausgangsmaterial für die Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) Reaktion eingesetzt werden konnte. Die PMCA stellt daher eine Alternative dar, um die Nachweismöglichkeit von Prionen in Boden im freien Feld wesentlich zu verbessern.		
17. Schlagwörter Boden, Persistenz, infektiöse Biomoleküle, Bioassay, Prionen, Scrapie, TSE-Erreger, CWD, PMCA		
18. Preis	19.	20.

Report UBA-FB	2.	3.
4. Report Title Evaluating the existence and implication of infective biomolecules in soil, thereby particularly considering their persistence and infectivity		
5. Author(s), Family Name(s), First Name(s) Seidel, Bjoern; Peters Rainer		8. Report Date 30.06.2007
		9. Publication Date
6. Performing Organisation (Name, Address) Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology Dept. Ecology, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg, Germany		10. UFOPLAN - Ref. No. 202 73 265 / 201 73 241
		11. No. of Pages 111
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt (German Federal Environmental Agency) Postfach 1406, 06813 Dessau, Germany		12. No. of References 88
		13. No. of Tables 15
15. Supplementary Notes		14. No. of Figures 52
16. Abstract The persistence of infectious biomolecules in soil constitutes a substantial challenge. This holds particularly true with respect to prions, the causative agents of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) such as scrapie or chronic wasting disease (CWD). Various studies have indicated that prions are able to persist in soil for years without losing their pathogenic activity. Dissemination of prions into the environment can occur from several sources, e. g. infectious placenta or amniotic fluid of sheep. Furthermore, environmental contamination by saliva, excrements or non-sterilized agricultural organic fertilizer is conceivable. Scrapie-free sheep flocks can become infected on pastures where outbreaks of scrapie had been observed before. These findings point to a sustained contagion in the environment, and notably the soil. Due to these observations a research project has been conducted at the Fraunhofer IME. Schmallenberg, Germany, for analyzing the persistence of prions in soil more detailed. By using outdoor lysimeters we simulated a contamination of standard soil with hamster-adapted 263K scrapie prions and analyzed the presence and biological activity of the soil-associated PrPSc and infectivity by Western blotting and hamster bioassay, respectively. Our results showed that 263K scrapie agent can persist in soil at least over 29 months. Strikingly, not only the contaminated soil itself retained high levels of infectivity as evidenced by oral administration to Syrian hamsters, but also feeding of aqueous soil extracts was able to induce disease in the reporter animals. We could also demonstrate that PrPSc in soil, extracted after 21 months, provides a catalytically active seed in the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) reaction. PMCA opens therefore a perspective for considerably improving the detectability of prions in soil samples from the field.		
17. Keywords soil, persistence, infective bio molecules, Bioassay, prions, Scrapie, TSE, CWD, PMCA		
18. Price	19.	20.

Vorbemerkung der Autoren:

Dieser Bericht setzt sich aus den vom Umweltbundesamt geförderten F+E-Vorhaben (FKZ 201 73 241 und 202 73 265) und den entsprechenden Aufstockungen zusammen und repräsentiert die Gesamtübersicht der Tätigkeiten und Forschungsergebnisse für den Zeitraum 2001 bis 2007. Eine entsprechende Literaturstudie über die TSE-Nachweisverfahren wurde bereits 2003 publiziert, so dass auf diese Thematik in dem vorliegenden Bericht explizit nicht mehr eingegangen wird.

Dieser Bericht wurde nur in deutscher Sprache verfasst. Für die englische Zusammenfassung sei auf die Publikation von Seidel et al. 2007 [1] verwiesen, die einen exakten Überblick über das Gesamtprojekt gibt.

Schmallenberg, im September 2007

Dr. Björn Seidel / Rainer Peters

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	11
GLOSSAR.....	13
1 EINLEITUNG	16
1.1 TSE-ERKRANKUNGEN	16
1.1.1 <i>Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen.....</i>	<i>17</i>
1.1.2 <i>Spongiforme Enzephalopathien beim Tier.....</i>	<i>21</i>
1.2 NATUR DES TSE-ERREGERS	25
1.3 TSE-ERREGERSTÄMME	27
1.4 DIE "NATÜRLICHE" UND IATROGENE ÜBERTRAGBARKEIT DER PRIONEN- ERKRANKUNGEN	28
2 HINTERGRUND DES F+E-VORHABENS UND KENNTNISSTAND	31
2.1 TSE-ERREGER IN DER UMWELT / <i>KENNTNISSTAND</i>	31
2.1.1 <i>TSE-Erreger im Boden.....</i>	<i>31</i>
2.1.2 <i>Mögliche Eintragungspfade des TSE-Erregers</i>	<i>31</i>
2.1.3 <i>Persistenz der Erreger.....</i>	<i>33</i>
2.1.4 <i>Remobilisierung und proteolytischer Abbau des des Erregers</i>	<i>34</i>
2.1.5 <i>Rückübertragung von Scrapie.....</i>	<i>34</i>
2.2 STAND IN DER TSE-DIAGNOSTIK.....	39
3 ZIELSETZUNG DES F+E-VORHABENS UND VORGEHENSWEISE	41
3.1 ZIELSETZUNG	41
3.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE VORGEHENSWEISE	41
3.3 VERSUCHE MIT NICHT-INFEKTIÖSEM MATERIAL.....	43
3.3.1 <i>Auswahl des Bodenmaterials.....</i>	<i>43</i>
3.3.2 <i>Recherche und Überprüfung kommerzieller BSE-Testsysteme.....</i>	<i>43</i>
3.3.3 <i>Austestung verschiedener anti-PrP-Antikörper.....</i>	<i>44</i>
<i>Rekombinantes Prion-Protein.....</i>	<i>44</i>
<i>Schweine- und Mäusegehirnhomogenat.....</i>	<i>44</i>
3.3.4 <i>Inkubationsversuche mit nicht pathogenem Gehirnmateriale und Boden....</i>	<i>45</i>
3.4 VERSUCHE MIT INFEKTIÖSEM MATERIAL	46
3.4.1 <i>Inkubationsversuche über einen Zeitraum von 8 Wochen.....</i>	<i>47</i>

3.4.2	<i>Inkubationsversuche über einen Zeitraum von 29 Monaten in Freiland-Lysimetern</i>	47
3.4.3	<i>Durchführung des Bioassay mit syrischen Hamstern</i>	48
4	MATERIAL UND METHODEN	50
4.1	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	50
4.1.1	<i>Boden</i>	51
4.1.2	<i>Testmaterial</i>	51
4.1.3	<i>Antikörper</i>	52
4.1.4	<i>Extraktionspuffer</i>	53
4.1.5	<i>Bodenanalytik der Grundparameter</i>	54
4.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	54
4.2.1	<i>Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure 2,2'-Bichinoyl-4,4'-dicarbonsäure)</i>	55
4.2.2	<i>Gewebeaufarbeitung mit NOP- und RIPA-Puffer</i>	56
4.2.3	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	56
4.2.4	<i>Untersuchung der Proteinase K-Empfindlichkeit</i>	58
4.2.5	<i>Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot)</i>	58
4.2.6	<i>Ponceaurotfärbung von Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen</i>	59
4.2.7	<i>Färbung von SDS-Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue G 250</i>	59
4.2.8	<i>Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz</i>	59
4.2.9	<i>Immunodetektion von Proteinen durch alkalische Phosphatase</i>	60
4.2.10	<i>Vorbereitungen zur Durchführung der Freilandversuche</i>	60
4.3	BIOASSAY	61
4.3.1	<i>Durchführung der praktischen Versuche</i>	61
5	ERGEBNISSE	63
5.1	ERGEBNISSE DER LABORVERSUCHE	63
5.1.1	<i>Untersuchung des Testmaterials</i>	63
5.1.2	<i>Erste Bodeninkubationsversuche und Verifizierung der Extraktionsmethoden</i>	65
5.1.3	<i>Inkubationsversuche über eine Zeitraum von 42 Tagen</i>	68
5.1.4	<i>Untersuchung des murinen Kontrollmaterials</i>	71
5.1.5	<i>Untersuchung des infektiösen Gehirnmaterials</i>	73
5.1.6	<i>Inkubationsversuche über 8 Wochen im Labormaßstab</i>	75
5.2	ERGEBNISSE DER FREILANDVERSUCHE	77

5.2.1	<i>Zeitpunkte der Probennahme</i>	77
5.2.2	<i>Austestung der Nachweisempfindlichkeit</i>	77
5.2.3	<i>Wiederfindung</i>	78
5.3	INKUBATIONSVERSUCHE	79
5.3.1	<i>Langfristige Inkubationsdauern</i>	82
5.3.2	<i>Inkubationsversuche mit Bodenbakterien</i>	86
5.4	ERGEBNISSE DES BIOASSAY	87
5.4.1	<i>Vorversuche</i>	87
5.4.2	<i>Hauptversuch / Verfütterung des kontaminierten Bodens</i>	87
5.4.3	<i>Hauptversuch / Verfütterung des kontaminierten wässrigen Extraktes</i>	91
5.4.4	<i>Krankheitsverlauf</i>	91
5.5	BESTÄTIGUNG DER ERGEBNISSE DURCH ROBERT KOCH-INSTITUT UND FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT	93
5.6	PMCA	95
6	DISKUSSION	96
6.1	BODENANALYTIK	96
6.2	UNTERSUCHUNG VON KONTROLLMATERIAL	98
6.3	PORCINES PRP UND REKOMBINANTES PRP SIND PROTEINASE K-SENSITIV	99
6.4	SDS-PUFFER FÜHRT ZUR EFFIZIENTEN EXTRAKTION VON PROTEINEN	99
6.5	PERSISTENZ DES ERREGERS [1]	100
6.6	PROTEINASE K-RESISTENTES PROTEIN IST IM BODEN NACHWEISBAR	100
6.7	SCRAPIE BLEIBT IN FREILANDVERSUCHEN STABIL	101
6.8	NACHWEIS DER INFEKTIOSITÄT	101
6.8.1	<i>Bioassay</i>	102
6.9	SCREENING KONTAMINierter FLÄCHEN	102
7	AUSBLICK	103
8	ZUSAMMENFASSUNG	104
9	LITERATURVERZEICHNIS	105
10	ANHANG I ERFOLGSKONTROLLBERICHT	110
11	ANHANG II LITERATURVERÖFFENTLICHUNG	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TSE-Erkrankungen des Menschen	17
Tabelle 2: TSE-Erkrankungen der Tiere	21
Tabelle 3: Anzahl der bestätigten BSE-Fälle nach Bundesländern seit 2000 bis September 2007	23
Tabelle 4: Chemische Verbindungen, die nicht oder nur teilweise zu einer Inaktivierung des PrP ^{Sc} führen	26
Tabelle 5: Nomenklatur der Prion-Protein Isoformen	27
Tabelle 6: Informative Internetadressen.....	36
Tabelle 7: Getestete Puffer zur Prion-Protein-Extraktion aus Geweben nach [71].....	46
Tabelle 8: Tabellarische Auflistung der Geräte, Materialien und "Kits"	50
Tabelle 9: Eingesetzte primäre Antikörper	53
Tabelle 10: Eingesetzte sekundäre Antikörper	53
Tabelle 11: In Experimenten angewendete Puffer und Extraktionslösungen	54
Tabelle 12: Benötigte Puffer und Lösungen.....	55
Tabelle 13: Pipettierschema der Polyacrylamidgelelektrophorese.....	57
Tabelle 14: Aufgetragene Volumina.....	72
Tabelle 15: Aufgetragene Volumina.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zunahme der nvCJD-Fälle im Zusammenhang mit BSE.....	19
Abbildung 2: Histopathologische Untersuchung von Gehirnmateriale entnommen aus www.mad-cow.org .	20
Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit der Scrapie (entnommen aus [3])	29
Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit der BSE (entnommen aus [3])	29
Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit von Prionenkrankheiten des Menschen (entnommen aus [3])	30
Abbildung 6: Diskutierte Eintragswege von Prionen in Böden	35
Abbildung 7: Wandlungsmöglichkeiten des Prion-Proteins in kontaminierten Böden	35
Abbildung 8: Suchroutine I	37
Abbildung 9: Suchroutine II	37
Abbildung 10: Suchroutine III	38
Abbildung 11: Suchroutine in Patentdatenbanken	38
Abbildung 12: Testprinzip des Prionics Check (Prionics AG, Schweiz), verändert	40
Abbildung 13: Flussdiagramm der Vorgehensweise, Arbeiten mit nicht infektiösem Material	42
Abbildung 14: Flussdiagramme der Vorgehensweise, Arbeiten mit infektiösem Material	43
Abbildung 15: Fotos des vorbereiteten Freiland-Lysimeters, des Stahlkäfigs sowie das Schema der Probennahmestellen	48
Abbildung 16: Übersichtsschema des Bioassay mit syrischen Hamstern	49
Abbildung 17: Analyse von rekombinantem Prion-Protein mit anti-Prion-Protein Antikörper (6H4). Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3).....	63

Abbildung 18: Prion-Protein-Nachweis in Schweinegehirnhomogenat. 6H4 Antikörper. Alkalische Phosphatase-Entwicklung	64
Abbildung 19: Sensitivität des rec-HaPrP gegen Proteinase K.....	64
Abbildung 20: Untersuchung der Proteinase K-Sensitivität von porcinen PrP (rec-HaPrP als Kontrolle). Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3). Marker: Sigma Prestained .65	65
Abbildung 21: Analyse der Puffersysteme: Jeweils 100 µl 10%ige Schweinegehirnhomogenat-Lösung wurde mit 0,5 g Boden versetzt und für 1h bei 4°C inkubiert.....	67
Abbildung 22: Bodeninkubationsversuche: 100 ng rec-HaPrP und 100 µl 10%ige Schweinegehirnlösung wurden für 1 h in 0,5 g LUFA 2.2 Boden inkubiert (25 °C). Anschließend erfolgte Extraktion mit Wasser und SDS-Puffer. Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3).....	68
Abbildung 23: Bodeninkubationsversuche über verschiedene Zeiträume: 100 µl Schweinegehirnhomogenat in 0,5 g Boden (4°C + Proteinase-Inhibitoren). Extrahiert mit 1%igem SDS-Puffer (200 µl). Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3). Alkalische Phosphatase-Entwicklung.	69
Abbildung 24: Analyse des Glial Fibrillary Acidic Proteins (GFAP) aus Bodenextrakten nach verschiedenen Zeitabständen. Inkubation mit 100 µl Schweinegehirnhomogenat. Extraktionspuffer 1% SDS. Alkalische Phosphatase Entwicklung. Repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchsansätzen. ECL-Entwicklung.....	70
Abbildung 25: Analyse des β-Actins aus Bodenextrakten nach verschiedenen Zeitabständen. Inkubation mit 100 µl Schweinegehirnhomogenat. Extraktionspuffer 1% SDS. Repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchsansätzen.	71
Abbildung 26: Untersuchung von murinem Kontrollmaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt), stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Auftragsmenge auf Gesamtgehirnanteil berechnet. Drei Gehirnhomogenatlösungen in unterschiedlicher Menge wurden zusätzlich mit Proteinase K behandelt. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.	72
Abbildung 27: Untersuchung von infektiösem Hamstermaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt), stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Auftragsmenge auf Gesamtgehirnanteil berechnet. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.	74
Abbildung 28: Nachweis von PrP ^{Sc} in Hamstergehirnhomogenat nach Proteinase K-Behandlung. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.....	74
Abbildung 29: Untersuchung von infektiösem Hamstermaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt; stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Nach Bodeninkubationsversuchen. 0,5 g Boden wurde mit 200 µl verdünntem Gehirnhomogenat versetzt (entspricht 2 mg Gesamtgehirn). Nach entsprechender Inkubationszeit erfolgte Extraktion mittels 1%igem SDS-Puffer. Antikörper 6H4.....	75
Abbildung 30: Die Untersuchung von GFAP als Marker für neuronales Gewebe zeigt, dass GFAP bereits nach einem Tag Inkubation des Gehirns im unsterilen Boden nicht mehr nachweisbar ist.	76
Abbildung 31: Analyse der Wiederfindung. Boden wurde mit Gehirnhomogenat vermischt und anschließend mittels SDS-Puffer extrahiert. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.....	78
Abbildung 32: Westernblot-Ergebnisse. Untersuchung der Nachweisempfindlichkeit des anti-PrP-Antikörpers (MAB1562, Chemicon). Verdünnungsreihe infizierter Gehirnhomogenate. 1,25 µg Gehirn ist noch detektierbar.	79
Abbildung 33: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsexperimente. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl nach 1-monatiger Inkubationsdauer Prionen aus dem Boden extrahiert und	

nachgewiesen werden können. Schwache Banden in den Gazesäckchen-Proben sind auf anhaftende Bodenpartikel zurückzuführen. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.	80
Abbildung 34: Vergleich der Stabilität der Prionen aus Gehirnhomogenaten und Prionen, die aus Bodeninkubationsversuchen extrahiert werden. Unabhängig der eingesetzten Proteinase-K Konzentration bleiben die aus Boden extrahierten Prionen stabil.	81
Abbildung 35: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsexperimente. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl nach 3-monatiger und 6-monatiger Inkubationsdauer Prionen aus dem Boden extrahiert werden können.....	83
Abbildung 36: Aufnahmen der Probennahme vom 17.12.2003 (Monat 6).	83
Abbildung 37: Probennahme nach 1-jähriger Inkubationsdauer	84
Abbildung 38: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsversuche. Vergleich der Proben Monat 1, Monat, 3, Monat 6 und Monat 21. Deutlich zu erkennen ist, dass die Prionenkonzentration über den gesamten Zeitraum relativ konstant bleibt. Alkalische-Phosphatase-Entwicklung.	85
Abbildung 39: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsversuche. Probennahme nach 26..	85
Abbildung 40: Westernblot-Ergebnisse der Inkubation von Gehirnhomogenaten mit isolierten Bodenbakterien. Nach 21 Tagen ist eine deutliche Abnahme der Prionenkonzentration zu erkennen.	86
Abbildung 41: Schema der Vorversuche.....	87
Abbildung 42: Schema des Hauptversuches. Einstufung der Krankheitsstadien.....	88
Abbildung 43: Ergebnisse des Bioassays, 21 Wochen nach Verfütterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte	88
Abbildung 44 : Ergebnisse des Bioassays, 27 Wochen nach Verfütterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte	89
Abbildung 45: Westernblot-Ergebnisse erkrankter Tiere im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (nach Proteinase-K Verdau). Proteinase-K resistente Prionen sind in den erkrankten Tieren deutlich zu erkennen.	90
Abbildung 46: Westernblot-Analysen erkrankter Tiere und von Kontrolltieren. Deutlich zu erkennen ist, dass nach Proteinase-K Verdau in den erkrankten Tieren persistente Prionen nachweisbar sind, während die endogene, nicht-pathogenen Prionen in den Kontrollen völlig abgebaut werden.	90
Abbildung 47: Ergebnisse des Bioassays, 48 Wochen nach Verfütterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte	91
Abbildung 48: Krankheitsverlauf der Versuchstiere. Dargestellt sind die Mittelwerte von beobachteten Erstsymptomen, über Scrapie-Verdacht, Scrapie-Vollbild bis zur Tötung der Tiere.	92
Abbildung 49: Westerblot-Ergebnisse des RKI über den gesamten Verlauf der Inkubationsdauer der Bodenversuche	93
Abbildung 50: Westernblot-Ergebnisse des RKI. Untersuchung der Gehirnhomogenate erkrankter Tiere. Pathogene Prionen sind deutlich nachweisbar (repräsentative Ergebnisse).	94
Abbildung 51: Westernblot-Ergebnisse des FLI. Untersuchung der Gehirnhomogenate erkrankter Tiere (Boden und Extraktverfütterung) sowie Westernblot-Ergebnisse der Boden-Inkubationsversuche (Monat 18 und Monat 21). Pathogene Prionen sind deutlich nachweisbar.....	94
Abbildung 52: Westernblot-Ergebnisse der PMCA-Reaktion (RKI). Untersucht wurden Extrakte aus den Boden-Inkubationsversuchen (M21) in sehr geringer Konzentration. Deutlich zu erkennen, ist dass	

sich – abhängig von durchgeführten Cyclen – Prionen *in vitro* vervielfältigt werden können und dadurch sehr gut nachweisbar werden.....95

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat p-Toluidinsalz
BG	Bestimmungsgrenze
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CE	Kapillar Elektrophorese
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique
CJK/CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit/Disease
CMC	Critical Micell Concentration
Da	Dalton
DELFLIA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immuno Assay
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
CL	Enhanced Chemiluminescence
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Horse Raddish Peroxidase
i.c.	intrazerebrale Injektion (in das Gehirn)
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
I.E.	Infektiöse Einheit
IEM	Immuno Electron Microscopy
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
mAb	Monoklonaler Antikörper
Mk	Monoklonal
MM	Millimolar
MRI	Magnetic resonance imaging; Kernspintomographie
mRNA	Messenger RNA

MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NOP	Nonidet P-40, Nonylphenylethylenglycol
pAb	Polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
Pk	Polyklonal
PMCA	Protein-Misfolding-Cyclic-Amplification
PrP	Prion-Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rec-HaPrP	rekombinantes Hamster Prion-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAF	Scrapie-associated fibrils
SC	Scrapie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Spongiforme Enzephalopathie
SRM	Standard Reference Material
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD/nvCJD	Variant/new variant CJD
WB	Westernblot
ZNS	Zentrales Nervensystem

Glossar

Amyloid	stärkeähnlicher Eiweißkörper
Amyloidose	Gewebeschädigung bzw. Entartung durch Ablagerung von Amyloiden
Astrozyt	Makrogliazelle mit strahlenförmigen Fortsätzen
Ataxie	Verlust der Koordination von Muskelbewegungen
Bioassay	biologischer Funktionstest, beispielsweise der Nachweis von TSE/BSE-Infektiosität durch die Injektion des fraglichen Materials in die Gehirne einiger Empfängertiere
Bovidae	Familie der Hornträger
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie, schwammartige Gehirn-erkrankung bei Rindern, umgangssprachlich Rinderwahnsinn
CDP-Star	eingetragenes Warenzeichen von Tropix Inc. Nachweisreagenz für Chemilumineszenz
CJK/CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit/Disease des Menschen
Demenz	auf organischen Gehirnschädigungen beruhender andauernder Schwachsinn
Detergenz	Substanz mit hydrophilen und hydrophoben funktionellen Gruppen
ELISA	Abkürzung für Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Der ELISA-Test ist ein immunologisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern
Feliden	Familie der Katzen und katzenartigen Raubkatzen
Histopathologie	Wissenschaft von den krankhaften Gewebeveränderungen
histopathologisch	die Histopathologie betreffend; mikroskopische Diagnose aufgrund typischer Veränderungen im Gewebe
horizontale Übertragung	Ausbreitung einer Krankheit innerhalb einer Population (Herde) durch direkte oder indirekte Krankheitsübertragung von Tier zu Tier
iatrogen	durch ärztliche Einwirkung entstanden
ID50	Erregermenge (infektiöse Dosis), nach deren Verabreichung die Hälfte der Empfängertiere erkrankt Eine ID entspricht in etwa 0,05 pg PrP ^{Sc}
Immunohistochemie	Sichtbarmachung bestimmter Strukturen in Gewebeschnitten mit Hilfe von markierten Antikörpern
Inokulation	Einbringen von u.a. Krankheitserregern in den Organismus
Inzidenz	in der Epidemiologie die Anzahl neuer Erkrankungsfälle in einer bestimmten Zeiteinheit.
Mizelle	Kolloidteilchen, das aus zahlreichen Einzelmolekülen aufgebaut ist
nCJD/nvCJD	neue oder neue Variante der CJD des Menschen, vermutlich ausgelöst durch den Verzehr von BSE-kontaminierten Rindfleisch
N-terminal	Seite des Proteinmoleküls mit endständiger NH ₂ -Gruppe; bei PrP ^{Sc} wird dieser Teil durch Proteinase K abgebaut. Trotz der Abspaltung des N-Terminus bleibt die Infektiosität voll erhalten
PMCA	" <i>in vitro</i> "-Methode, die in Proben vorhandene Prionen in relativ kurzer Zeit exponentiell vervielfacht und damit in einen sehr empfindlichen Nachweis ermöglicht

Prion	Abkürzung für "proteinaceous and infectious particle", Protein-ähnliches, infektiöses Teilchen. Prionen (PrP) sind wahrscheinlich Auslöser der TSE-Krankheiten Prionen (PrP) kommen in natürlicher Form im Körper von Säugetieren, insbesondere im ZNS, vor. Durch Änderungen der Struktur des Prions (PrP), kommt es zu Ablagerungen im Gehirn mit Einhergehender Zerstörung des Gewebes. Bei einer TSE-Erkrankung liegt das Prion somit in zwei verschiedenen Formen vor, in der natürlichen zellulären Form (PrP ^C) sowie einer krankheitsauslösenden Form (PrP ^{Sc}).
PrP^C	Abkürzung für die normale, zelluläre, kurzlebige und lösliche Form des Prion-Proteins mit etwa 40% α -Helices und ohne β -Faltblatt-Anteil
PrP^{Sc}	Abkürzung für die BSE-, CJK-, oder Scrapie-typische, infektiöse Isoform des PrP ^C . PrP ^{Sc} stellt die proteaseresistente, unlösliche Form des Prion-Proteins mit reduziertem α -Helixanteil und etwa 40% β -Faltblatt-Anteilen
rekombinant	durch Rekombination, i.e.S. durch Transformation im Rahmen der Gentechnologie entstanden
rekombinantes Protein	Proteine, die von rekombinanten Genen durch gentechnische Verfahren hergestellt und exprimiert werden
Scrapie	BSE-ähnliche Krankheit bei Schafen und Ziegen (Traber-Krankheit), die seit etwa 200 Jahren bekannt ist und deren Ursachen bis heute unklar geblieben sind. Auf den Menschen ist Scrapie nicht übertragbar.
Separatorenfleisch	Separatorenfleisch ist mechanisch gewonnenes Restfleisch vom Knochen. Es wird am Ende des Schlachtprozesses maschinell vom Knochen gewonnen.
SRM	Specified risk material (engl.), in Hinblick auf BSE spezifiziertes Risikomaterial von Schlachttieren (v.a. ZNS)
Titer	Menge eines Antikörpers bzw. Antigens.
Tris Base	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tris-HCl	Tris-hydroxymethyl-aminomethanhydrochlorid
Triton	t-Octylphenooxypolyethoxyethanol
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien; übertragbare, schwammartige degenerative Gehirnkrankheiten Synonym: Prionenkrankheiten
Vakuole	Flüssigkeitsgefüllter Hohlraum bei pflanzlichen und tierischen Zellen
Verdau	englisch: digest; Bezeichnung für die Einwirkung von degradierenden Enzymen auf von ihnen akzeptierte Substrate
vertikale Übertragung	Übertragung von Krankheitserregern vom Muttertier auf die ungeborenen oder neugeborenen Nachkommen

Westernblot	methodisches Verfahren, mit dem bestimmte Proteine in einem Proteingemisch qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden können. Das Proteingemisch wird mittels Gelelektrophorese (häufig mittels Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese SDS-PAGE) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden aus dem Gel auf eine geeignete Membran positionsgenau übertragen (geblottet). Die dadurch erhaltene Membran (Westernblot) kann nun für den Nachweis, die Lokalisation und eventueller Quantifizierung bestimmter Proteine eingesetzt werden. So kann die Membran mit gegen bestimmte Proteine gerichtete Antikörpern inkubiert werden, und zur Visualisierung mit einem zweiten – z.B. enzym-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und die Proteine immunologisch nachgewiesen werden
Zentrales Nervensystem	ZNS, Zentralnervensystem: Gehirn, Hirnnerven, Rückenmark und bestimmte Teile der Augen

teilweise entnommen aus [2, 3]

1 Einleitung

Die TSE-Erkrankungen gehören nach wie vor zu einem Gebiet mit großem Forschungsbedarf. Unklarheiten bestehen in mehreren Bereichen. So ist die inzwischen zwar allgemein anerkannte Prionen-Theorie von Stanley Prusiner [4], wonach infektiöse Eiweißmoleküle die Auslöser der Krankheit darstellen, weitgehend akzeptiert, letztendlich jedoch noch nicht eindeutig bewiesen. Ebenso sind die Übertragungswege sowie die Replikations-Mechanismen teilweise immer noch ungeklärt. Die Bedeutung der TSE-Erreger für die Umwelt ist nach wie vor nur rudimentär erforscht, da meist davon ausgegangen wird, dass hierbei ein zu vernachlässigendes Risiko besteht. Derartige Annahmen sind jedoch lediglich darauf zurückzuführen, dass zurzeit keine Nachweismethoden empfindlich genug sind bzw. waren, um eine Kontamination der Umwelt schlüssig nachzuweisen. Insofern ist das Risiko, das von einer mit TSE-Erregern kontaminierten Umwelt ausgeht, derzeit noch nicht fundiert zu bewerten. Allerdings weisen verschiedene Befunde darauf hin, dass ein Risiko besteht. So zeigt z.B. gerade das weltweite periodische Auftreten von Scrapie bei Schafen oder der Anstieg von CWD bei Cerviden in Nordamerika und Korea, dass diese Prionen-assoziierten Krankheiten vermutlich durch eine kontaminierte Umwelt hervorgerufen werden. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften des TSE-Erregers ist davon auszugehen, dass diese in der Umwelt - zumindest für einen bestimmten Zeitraum - persistent bleiben und somit eine potenzielle Gefahr darstellen.

1.1 TSE-Erkrankungen

Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien (englisch für transmissible spongiform encephalopathies: TSEs) sind beim Menschen und verschiedenen Tierarten beschrieben worden [5-13]. Unabhängig der Spezies, handelt es sich um eine infektiöse Degenerationskrankheit des Gehirns, die nach einer Inkubationszeit von Jahren bis Jahrzehnten chronisch progressiv verläuft, zu schwerwiegenden histopathologischen Veränderungen des Gehirns führt und unweigerlich mit dem Tode der betroffenen Individuen endet. Allen TSE-Erkrankungen gemein ist die Akkumulation Proteinase K-resistenter Prion-Proteine und der damit zusammenhängenden Vakuolenbildung in Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) [14].

1.1.1 Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen

Zu den spongiformen Enzephalopathien des Menschen werden zahlreiche Krankheitsbilder gezählt, die in Tabelle 1 kurz dargestellt sind. Trotz der verschiedenen Krankheitsbilder - mit teilweise unterschiedlichen Leitsymptomen - steht bei allen beim Menschen auftretenden Erkrankungsformen die Schädigung des Gehirns im Vordergrund. Ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Krankheitsbildern wurde jedoch lange nicht erkannt. Unabhängig der Erkrankungsform konnte die Übertragbarkeit auf den Menschen bewiesen werden bzw. wird - wie im Falle der neuen Variante der CJD - vermutet. Bei der vCJD fehlt der Nachweis einer direkten Übertragbarkeit. Auf die Fatal Familiar Insomnia (FFI) sowie auf das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) wird aufgrund geringer Inzidenz nicht näher eingegangen.

Tabelle 1: TSE-Erkrankungen des Menschen

TSE-Erkrankungen des Menschen		
Erkrankung	Erstbeschreibung	Nachweis der Übertragbarkeit
Creutzfeldt-Jakob-Disease (CJD)	1920	1968
neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Disease (vCJD)	1996	?
Kuru	1957	1966
Fatal Familiar Insomnia (FFI)	1986	1995
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	1928	1981

CJD/CJK

Unabhängig voneinander wurde 1920/1921 von den Ärzten Creutzfeldt und Jakob erstmals eine neuartige degenerative Krankheit des Gehirns beschrieben, die aufgrund dessen als Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK, englisch Creutzfeldt Jakob Disease CJD) des Menschen bezeichnet wird [5, 10]. Heute unterscheidet man zwischen einer

sporadischen Form der CJD, die etwa 85 % aller Fälle umfasst, einer familiären, autosomal-dominant vererbten sowie einer iatrogenen, das heißt, durch ärztlichen Einwirkung entstandenen Form. CJD führt aufgrund der gravierenden Schädigungen des Zentralnervensystems (ZNS) innerhalb von zwei Monaten bis zwei Jahren nach Ausbruch der Krankheit zum Tode.

Der größte Anteil der Betroffenen (ca. 90%) stirbt innerhalb des ersten Jahres. Bisher wurde die CJD überwiegend bei älteren Menschen mit einem Durchschnittsalter von 65 Jahren diagnostiziert, wobei die Inkubationszeit prinzipiell unbekannt ist. Durch die Beobachtungen, die in Bezug auf Kuru bzw. der iatrogenen CJD gemacht wurden, wird eine Inkubationszeit von einigen Jahren bis Jahrzehnten angenommen.

vCJD / nvCJD

Die Krankheitsform, die in diesem Zusammenhang das größte Aufsehen erregte, war ein 1996 beschriebenes Krankheitsbild beim Menschen, das aufgrund seiner - im Vergleich zur herkömmlichen CJD - unterschiedlichen Leitsymptome und histopathologischen Befund, als neue Variante der CJD (new variant nvCJD oder variant vCJD) beschrieben wurde [11, 12, 15-17]. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird die vCJD durch den BSE-Erreger hervorgerufen, der unbeabsichtigt in die menschliche Nahrungskette gelangte. Der Zusammenhang zwischen den BSE und vCJD Erkrankungsfällen ist in Abbildung 1 dargestellt. Aufsehen erregte dieses Krankheitsbild auch deshalb, da nun überwiegend jüngere Menschen mit einem Durchschnittsalter unter 40 Jahren betroffen waren. In England sind inzwischen 114 Menschen an dieser neuen Form der CJD gestorben (Stand 2007, abgesicherte

Befunde, nach Angaben der "CJD surveillance unit Edinburgh"¹. Auf dem europäischen Festland sind bisher lediglich zwei Fälle in Italien und ein Fall in Frankreich bekannt geworden.

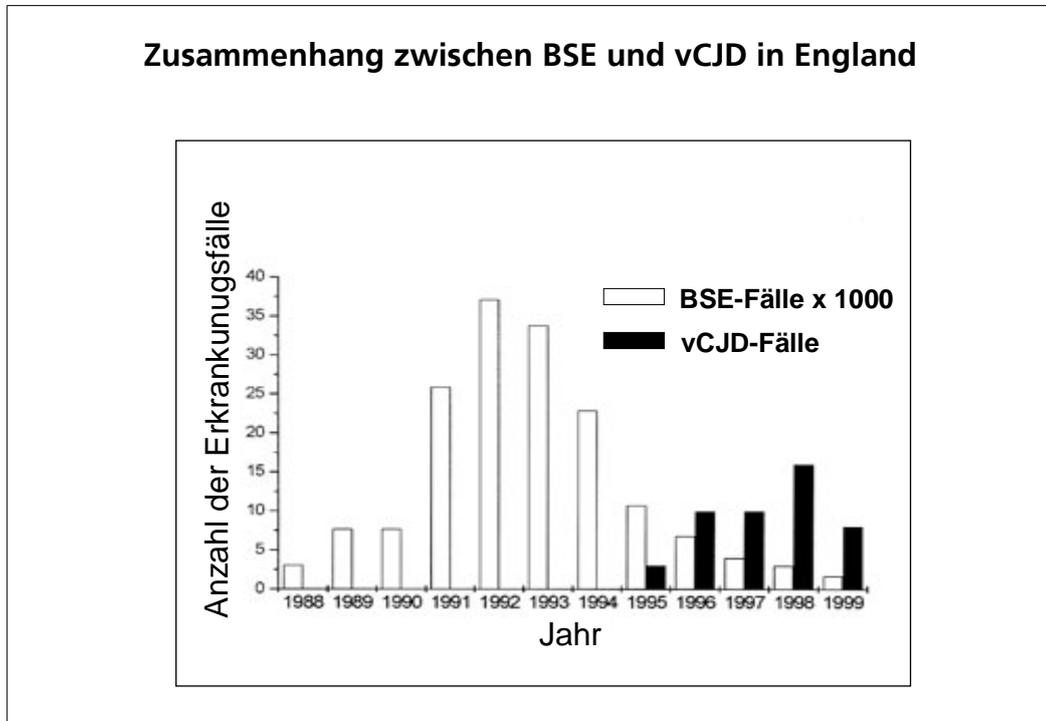


Abbildung 1: Zunahme der nvCJD-Fälle im Zusammenhang mit BSE

Einige Wissenschaftler vermuten allerdings, dass die wahren Zahlen höher liegen dürften, da insbesondere die nvCJD häufig nicht richtig diagnostiziert wird und die nvCJD anders als die CJD keine EEG-Auffälligkeiten aufweist. Darüber hinaus sind die Computertomographie (CCT) und die Magnetresonanztomographie (engl. MRI), beides

¹Die Gesamtzahl der an vCJD-Verstorbenen Menschen wird mit 161 angegeben, wobei bei 47 Fällen keine neuropathologische Bestätigung vorliegt.

bildgebende Verfahren im Bereich des Zentralnervensystems - abgesehen vom präfinalen Stadium - unauffällig.

Kuru

Von allen den Menschen betreffenden transmissiblen spongiformen Enzephalopathien nimmt die 1957 auf Papua-Neuguinea entdeckte "Kuru" eine Sonderstellung ein, da die Entdeckung dieser Krankheit als wichtigster Ausgangspunkt der Prionenforschung anzusehen ist [6]. Anhand von Kuru wurden zahlreiche Erkenntnisse zu den TSE-Erkrankungen allgemein gewonnen. Kuru war von den TSE-Erkrankungen des Menschen die erste, bei der eine experimentelle Übertragbarkeit auf Tiere gelang [18]. Kuru wurde bei dem Stamm der Fore entdeckt, die aus rituellen Gründen Kannibalismus betrieben und Teile ihrer Toten - insbesondere das Gehirn - verspeisten. Zunächst ging man von einer Viruserkrankung aus. Erst als Hadlow eine signifikante Ähnlichkeit zwischen Gehirnpräparaten von Kuru-Opfern und der bei Schafen vorherrschenden infektiösen Scrapie erkannte (Abbildung 2), wurde versucht, auch Kuru experimentell zu übertragen, um einen möglichen Zusammenhang zu beweisen, was schließlich auch gelang [18-20].

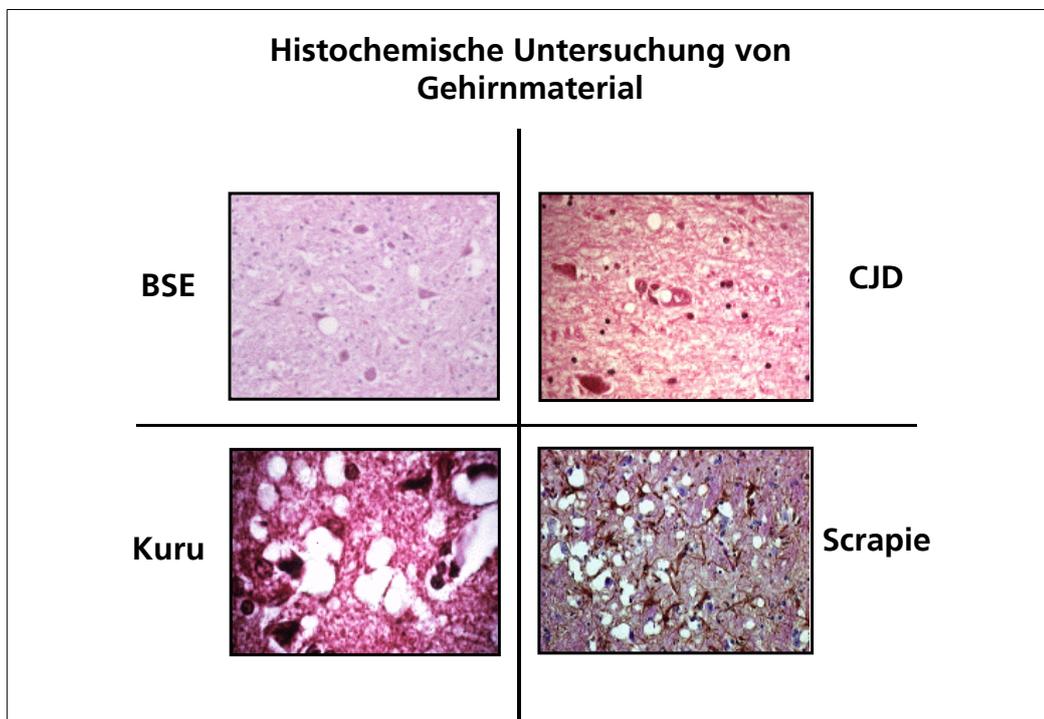


Abbildung 2: Histopathologische Untersuchung von Gehirnmaterial entnommen aus www.mad-cow.org

1.1.2 Spongiforme Enzephalopathien beim Tier

Neben den Hauptträgern des Erregers, wie Rind, Schaf und Ziege, sind inzwischen auch andere Tierarten wie Boviden (z.B. Antilopen) sowie Wild, Nerze, Katzen und andere Feliden von TSE-Erkrankungen betroffen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bekannten Erkrankungsformen.

Tabelle 2: TSE-Erkrankungen der Tiere

Krankheitsform	Erstbeschreibung
Traberkrankheit der Schafe und Ziegen (Scrapie)	1732
Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	1965
Chronic Wasting Disease (CWD)	1960
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	1984, 1985
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	1990

Gerade die TSE-Erkrankungen der Tiere rückten in den vergangenen Jahren verstärkt in den Brennpunkt. Anlass war zweifelsohne das epidemieartige Auftreten von BSE in Großbritannien.

Scrapie

Die Traberkrankheit bei Schafen ist in Großbritannien bereits seit dem 18. Jahrhundert bekannt [9]. Im 19. Jahrhundert war Scrapie in Deutschland endemisch [21]. Mittlerweile ist Scrapie fast weltweit verbreitet, und auch in Deutschland kommt es nach wie vor regelmäßig zu Ausbrüchen. Als Länder ohne Scrapie gelten Australien und Neuseeland. Zur Zeit ist Scrapie vor allem in England weit verbreitet [22] und sie zeigt auch in den USA zunehmende Tendenz [23]. Der Name rührt von der Neigung der erkrankten Schafe her, sich die Wolle abzuschauern. Ferner treten Störungen der Körperkoordination und teilweise wird bei den Tieren eine Tendenz zum übermäßigen Wassersaufen (Polydipsie) beobachtet.

Die Verschiedenartigkeit der Symptome erklärt sich mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Befall jeweils anderer Teile des Gehirns sowie der unterschiedlichen

Erregerstämme. Wegen der sehr langen Inkubationszeit, die z.T. mehrere Jahre beträgt, erscheint der symptomatische Krankheitsverlauf mit einer Dauer von zwei bis sechs Monaten relativ kurz. Die Infektion erfolgt zum einen vertikal vom Muttertier auf das Lamm, wobei eine Übertragung über die Muttermilch und eine transplazentare Infektion von Bedeutung ist [24], sowie horizontal von Schaf zu Schaf [14]. Untersuchungen verschiedener Schafsrassen zeigten eindeutig, dass genetische Faktoren die Empfänglichkeit der Tiere gegen Scrapie beträchtlich erhöhen [25-28]. Eine derartige genetische Prädisposition ist vermutlich - unabhängig der Spezies - für den Ausbruch einer TSE-Erkrankung Voraussetzung. Wie BSE beim Rind, ist Scrapie am lebenden Tier nicht sicher nachweisbar. Ein klinischer Verdacht lässt sich daher nur durch Tötung erkrankter Tiere und anschließender histologischer Untersuchung des Gehirns bzw. des immunologischen Nachweises pathogener Prion-Proteine bestätigen.

BSE

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) ist eine bei Rindern auftretende Infektionskrankheit, die erstmals in Großbritannien 1984/85 beobachtet wurde [11-13, 16, 24]. Die Übertragbarkeit wurde 1988 zum ersten Mal experimentell bewiesen.

Die Rinder erkranken in der Regel im Alter von 4 bis 5 Jahren an BSE und verenden innerhalb weniger Monate. In Großbritannien breitete sich diese Erkrankung großflächig aus, mit einem Höhepunkt der Krise in den Jahren 1991 und 1992. Während in Großbritannien bis Mitte Oktober 2001 insgesamt 180 900 Rinder an BSE erkrankt sind, zählt man in Deutschland lediglich ca. 409 Fälle (Stand September 2007, Tabelle 3). Vom 01.01.2001 bis zum 18.12.2006 wurden in Deutschland 14.463.574 Rinder auf BSE untersucht. Innerhalb dieses Zeitraums wurden **398** Fälle von BSE amtlich festgestellt.

Tabelle 3: Anzahl der bestätigten BSE-Fälle nach Bundesländern seit 2000 bis September 2007

Anzahl der bestätigten BSE-Fälle nach Bundesländern seit 2000									
Bundesland	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Gesamtanzahl
Baden-Württemberg	-	12	11	9	6	6	3	-	47
Bayern	5	59	27	21	21	7	3	-	143
Berlin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brandenburg	-	3	4	3	3	3	1	-	17
Bremen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamburg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hessen	-	3	2	2	2	2	-	-	11
Mecklenburg-Vorpommern	-	2	4	-	3	2	1	2	12
Niedersachsen	1	17	27	7	14	2	5	1	73
Nordrhein-Westfalen	-	2	2	4	8	4	1	1	21
Rheinland-Pfalz	-	4	6	-	2	1	1	-	14
Saarland	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Sachsen	-	4	4	3	2	2	-	-	15
Sachsen-Anhalt	-	4	4	1	1	-	-	-	10
Schleswig-Holstein	1	12	14	1	1	3	-	-	32
Thüringen	-	2	1	3	2	-	1	-	9
Bundesrepublik Deutschland	7	125	106	54	65	32	16	4	409

Als Ursache für die Erkrankung gilt die Verfütterung von Scrapie-infiziertem Tiermehl an Rinder nach wie vor als die Wahrscheinlichste, da nachgewiesen werden konnte, dass der Zeitpunkt der ersten BSE-Exposition mit einer Umstellung des Herstellungsverfahrens für Tierkörpermehl in England und Wales korrelierte [11, 12, 16, 29, 30]. Anfang der achtziger Jahre wurde die sonst übliche Fettextraktion mittels Hydrokarbonlösungen aufgegeben und die bei der Herstellung angewendeten

Temperaturen und Drücke reduziert, so dass die TSE-Erreger nicht mehr zerstört wurden. Diese Veränderungen im Herstellungsprozess führte dazu, dass der Scrapie-Erreger nicht vollständig inaktiviert wurde, in die Futtermittelkette gelangte und so schließlich in den Jahren 1985/86 zum Ausbruch der BSE-Epidemie führte. Die Tiermehlfütterung wurde aus diesem Grund europaweit sukzessiv verboten. Aufgrund der ersten BSE-Fälle von in Deutschland geborenen Rindern, wurde im Februar 2001 ein weit reichendes BSE-Maßnahmen-Gesetz beschlossen. Unter anderem müssen demzufolge seit dem 31.1.2001 in Deutschland geschlachtete Rindern mit einem Alter von über 24 Monaten auf BSE getestet werden. So genanntes Risikomaterial (SRM), wie lymphatisches Gewebe, Anteile des zentralen Nervensystems, sowie nicht sicher knochenfreies Separatorenfleisch und innere Organe dürfen nicht mehr zur Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendet werden.

Eine andere Theorie zum Ausbruch der BSE-Epidemie in Großbritannien hat der britische Biologe und Biobauer Mark Purdey aufgestellt [31]. Die Tiermehltheorie kann einige Dinge nur schlecht erklären: Nach dem Verbot von Tiermehl im Jahr 1988 Erkrankten weitere 40000 Kühe an BSE. Außerdem trat BSE in einigen Herden nur vereinzelt auf, obwohl die gesamte Herde mit Tiermehl gefüttert wurde. Bemerkenswert sind auch BSE-Fälle auf Biohöfen, wo "eigentlich" kein Tierfutter verwendet wurde. Purdey führt ein Missverhältnis von Kupfer und Mangan im Tierkörper als Auslöser für BSE an. Mangan soll die tödliche Konformationsänderung des so genannten Prion-Proteins im Tier bewirken. So wurden in Gegenden mit spongiformen Krankheiten, wie Scrapie und BSE, hohe Mangangehalte und geringe Kupfergehalte im Boden gefunden.

CWD

Die Chronic Wasting Disease (CWD) ist eine bisher ausschließlich bei Cerviden (Hirschartigen) in Nordamerika diagnostizierte Form von Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) [32, 33]. Diese "chronisch zehrende" Krankheit wurde anfangs nur bei in Gefangenschaft gehaltenen Maultierhirschen (*Odocoileus hemionus hemionus*) beobachtet. Inzwischen wurde die CWD bei einer Vielzahl an freilebenden Cerviden festgestellt. Damit nimmt die CWD - neben Scrapie - eine Schlüsselrolle ein, da diese beiden TSE-Varianten die bisher Einzigen darstellen, die bei freilebenden Tieren nachgewiesen werden konnten. Analog zu Scrapie, wird auch im Falle von CWD, die Übertragung durch eine kontaminierte Umwelt als einer der

Hauptübertragungswege diskutiert [32, 34]. Neben Nordamerika ist bisher nur noch Südkorea von CWD betroffen, wobei in diesen Ländern ein drastischer Anstieg zu beobachten ist. In Europa konnte diese Form der Erkrankung noch nicht nachgewiesen werden, obwohl verschiedene Monitoring-Programme durchgeführt wurden.

Bemerkung: Die möglichen Eintragungspfade des TSE-Erregers in Boden werden unter 2.1.2 ausführlich beschrieben.

1.2 Natur des TSE-Erregers

Die Natur des Krankheitserregers ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wurden die Möglichkeiten, dass der Erreger ein Virus, ein Virino (infektiöses Partikel, mit bisher nicht entdeckten Nukleinsäuren) oder ein infektiöses Eiweißmolekül repräsentiert. Inzwischen ist in der Fachwelt schließlich weitgehend akzeptiert, dass der Erreger ein infektiöses Eiweiß darstellt, aber letztendlich ist dies noch nicht vollständig bewiesen. Einige Virologen vertreten nach wie vor die Meinung, dass der Erreger ein Virus oder Viroid darstellt und beschreiben die Krankheit als virusinduzierte Amyloidose [35-37]. So gingen auch erste Veröffentlichungen in Bezug auf den Erreger der Spongiformen Enzephalopathien (SE) aufgrund der Eigenschaften und Infektiosität von einem Virus aus, der schlecht nachweisbar war [6, 19, 38]. Ursprünglich wurden die SE (Spongiformen Enzephalopathien) aufgrund dessen auch als "Slow Virus Diseases" bezeichnet. Allerdings wurde gezeigt, dass weder chemische noch physikalische Methoden, die Nukleinsäuren zerstören, zu einer Abnahme der Infektiosität führten [39]. Methoden, die jedoch Proteine denaturieren, führten zu einer Abnahme der Infektiosität. Die Virino-Theorie, dass ein Virus, eingekapselt in einen Prionen-Mantel, der Auslöser von BSE sei, wurde noch Ende der 80er Jahre diskutiert [40], wird inzwischen aber kaum noch beachtet.

Im Gehirn infizierter Individuen lässt sich ein akkumuliertes Protein identifizieren, welches spezifisch nur bei TSE-Erkrankungen beobachtet wird. Aufgrund vieler wissenschaftlicher Studien geht man inzwischen davon aus, dass dieses Protein auch den eigentlichen Krankheitserreger repräsentiert. Stanley Prusiner prägte für dieses Protein den Begriff "Prion", ausgehend von "**proteinaceous and infectious**" [4]. Dieses Protein, das sogenannte "Scrapie Prion-Protein", wird mit PrP^{Sc} abgekürzt, da es zuerst im Gehirn erkrankter Schafe nachgewiesen werden konnte (analog zu BSE als PrP^{BSE} abgekürzt). Dieses Protein ist eine abgewandelte Form des natürlicherweise im

Körper vorkommenden Prion-Proteins PrP^C, abgekürzt für zelluläres Prion-Protein. Beide Proteine, das pathogene PrP^{Sc} und das zelluläre PrP^C, sind in ihrer Aminosäuresequenz identisch, unterscheiden sich aber in ihrer räumlichen Struktur. Beim pathogenen PrP führen diese Strukturunterschiede dazu, dass PrP^{Sc} partiell resistent gegen den Abbau proteinspaltender Enzyme ist - wie z.B. Proteinase K. PrP^C wird hingegen durch Behandlung mit derartigen Enzymen vollständig zerstört. Bei einer TSE-Erkrankung nimmt der Anteil an PrP^{Sc} im Körper stetig zu und korreliert mit der Zunahme der Infektiosität. Nach der von Prusiner aufgestellten Theorie bewirkt das eindringende PrP^{Sc} bei einer Infektion eine Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc}. Neu entstandenes PrP^{Sc} kann nun seinerseits die Umwandlung von mehr PrP^C in PrP^{Sc} bewirken, wodurch schließlich eine Kettenreaktion ausgelöst wird. Das zelluläre Prion-Protein weist ein Molekulargewicht von 33-35 KD auf und wird durch Proteinase K vollständig zerstört.

Tabelle 4: Chemische Verbindungen, die nicht oder nur teilweise zu einer Inaktivierung des PrP^{Sc} führen

1 m Guanidin-HCl
10%, 15% Formaldehyd
1 N Salzsäure
20% Ameisensäure
0,2 m Trichloressigsäure
0,25 N Natriumhydroxid
1% bis 3% SDS
50% Ethanol
0,2% bis 1% 3-Hydroxypropionsäurelacton
Ether-Extraktion
Chloroform-Extraktion
1,1,1-Trichlorotrifluoroethane
Chlordioxid
Ethylenoxid
Harnstoff
Heptan
Hexan
Jod/Jodid/Jodophore
Kaliumpermanganat
Perchlorethylen
Peressigsäure
Petrolether/Benzin
Trypsin
Wasserstoff-Peroxid

Das pathogene Prion-Protein indes besitzt einen Proteinase K-resistenten Teil, der nach Abspaltung des N-terminalen Bereiches ein Molekulargewicht von 27-30 KD besitzt [16]. Das pathogene PrP^{Sc} zeichnet sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Hitze, pH-Wert-Änderungen sowie gegenüber einer Vielzahl von chemischen Verbindungen aus (Tabelle 4).

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die zurzeit verwendete Nomenklatur der verschiedenen Prion-Protein-Bezeichnungen, die in Veröffentlichungen angewendet werden.

Tabelle 5: Nomenklatur der Prion-Protein Isoformen

Abkürzung	Erklärung
PrP ^C	Normale zelluläre Isoform des Prion-Proteins
PrP ^{sen}	Proteinase-sensitives Prion-Protein, wird auch an Stelle von PrP ^C verwendet
PrP ^{Sc}	Pathogenes Prion-Protein, "Sc" steht für Scrapie, dem Prototyp der Prionenerkrankungen
PrP ^{res}	Proteinase-resistenter Teil des PrP
PrP ^{BSE}	Pathogenes Prion-Protein bei BSE-Erkrankungen, entspricht PrP ^{Sc} , unübliche Bezeichnung, bevorzugt wird PrP ^{Sc}
PrP27-30	Hauptfragment des pathogenen Prion-Proteins, das nach enzymatischen Verdau mit Proteinase K intakt bleibt
ctmPrP	Zelluläre transmembrane Form des Prion-Proteins

1.3 TSE-Erregerstämme

Die Frage, wie ein und dasselbe Protein als Prion ganz unterschiedliche Effekte haben kann, wird durch das Vorkommen von Erregerstämmen erklärt. So konnte bereits vor Jahren Pattison vom britischen landwirtschaftlichen Forschungsrat in Compton aus zwei Gruppen von Ziegen zwei verschiedene Isolate des Scrapie-Erregers isolieren. Die Beobachtungen waren, dass mit dem einen Isolat infizierte Ziegen schläfrig wurden, bei Infektion mit dem anderen Isolat Hyperaktivität beobachtet wurde. Ferner ist inzwischen ersichtlich, dass einige rasch, andere erst nach längerer Inkubationszeit ein Krankheitsbild hervorrufen. Alan G. Dickinson, Hugh Fraser und Moira E. Bruce vom Institut für Tiergesundheit in Edinburgh beobachteten ebenfalls unterschiedliche Auswirkungen diverser Isolate bei Mäusen. Die verschiedenen TSE-Erregerstämme unterscheiden sich in ihrem Wirtspektrum in zahlreichen Faktoren. So sind Unterschiede in den verursachten Symptomen, dem Krankheitsverlauf - insbesondere der Inkubationszeit - und den neuropathologischen Veränderungen, in den

biochemischen Eigenschaften des gebildeten PrP^{Sc} sowie in der Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Desinfektionsverfahren zu beobachten. So konnten Scrapiestämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Inkubationszeiten innerhalb derselben Nagetierlinien unterschieden werden. Die Entwicklung immunologischer Testverfahren ermöglichte schließlich die Unterscheidung abweichender Glycosylierung zwischen den verschiedenen Stämmen. Eine endgültige Erklärung für das Vorkommen und die Entstehung der verschiedenen Erregerstämme ist allerdings noch nicht vorhanden. Allgemein lassen sich die verschiedenen TSE-Erregerstämme anhand von sieben Kriterien unterscheiden:

- Klinische Symptomatik
- Inkubationszeit
- Übertragbarkeit
- Histopathologische Läsionsprofile
- Inaktivierungsverhalten
- Proteinase K-Resistenz
- PrP^{Sc}-Glycosylierung

1.4 Die "natürliche" und iatrogene Übertragbarkeit der Prionenerkrankungen

Wie erwähnt, ist eine mögliche Theorie für den Ausbruch von BSE, dass der Scrapie-Erreger unaktiviert ins Tiermehl gelangte und so die Spezieschranke zwischen Schaf und Rind überwunden hat. Bewiesen ist die horizontale Übertragung von Scrapie zwischen Schaf und Ziege mittels Kontaktexperimenten. Ebenso scheint die Transmissible Spongiforme Enzephalopathie der Nerze auf die Verfütterung von infizierten Schafskadavern zurückzuführen sein [3]. Einen Überblick wie Scrapie, BSE sowie die menschlichen TSE-Erkrankungen auf andere Spezies übertragen werden können geben Abbildungen 3-5, wobei hier zwischen der experimentellen, iatrogenen sowie der natürlichen Übertragbarkeit unterschieden wird [3].

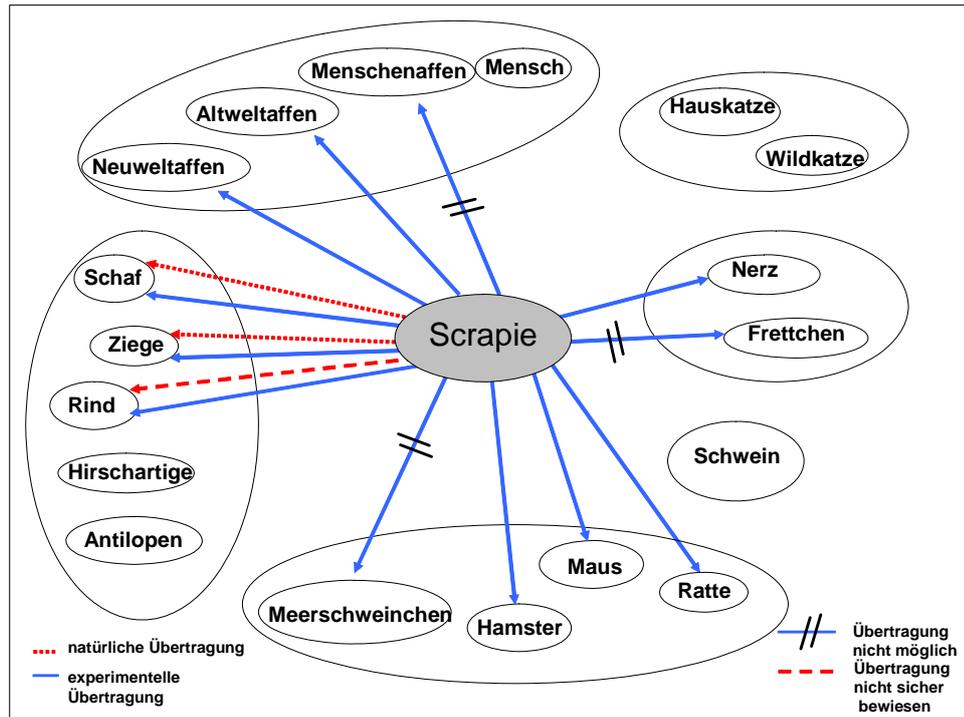


Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit der Scrapie (entnommen aus [3])

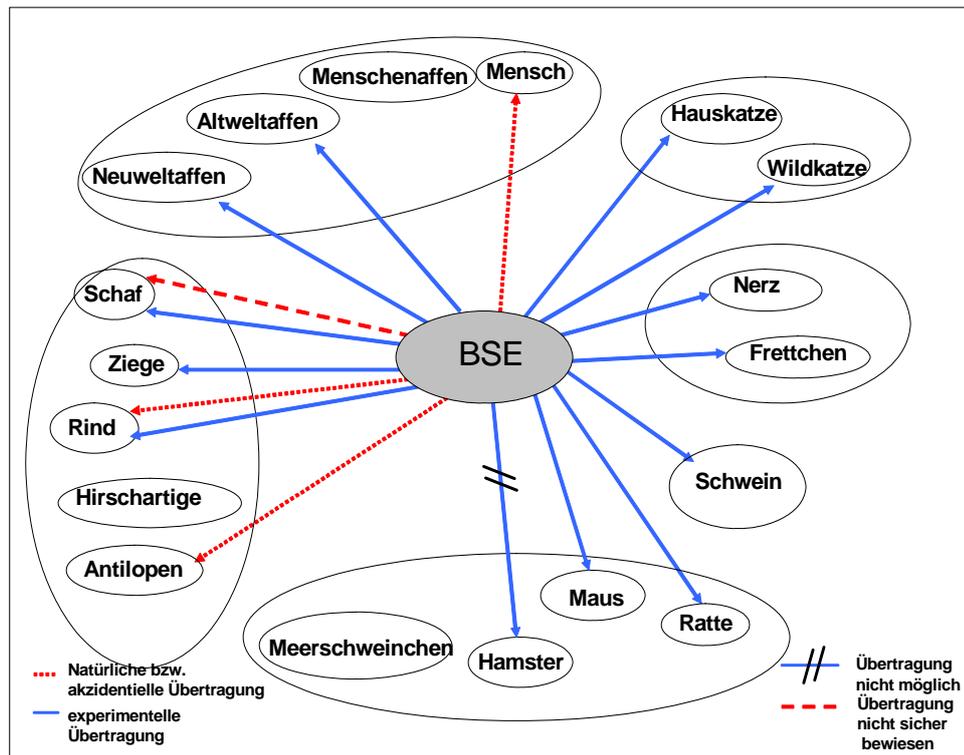


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit der BSE (entnommen aus [3])

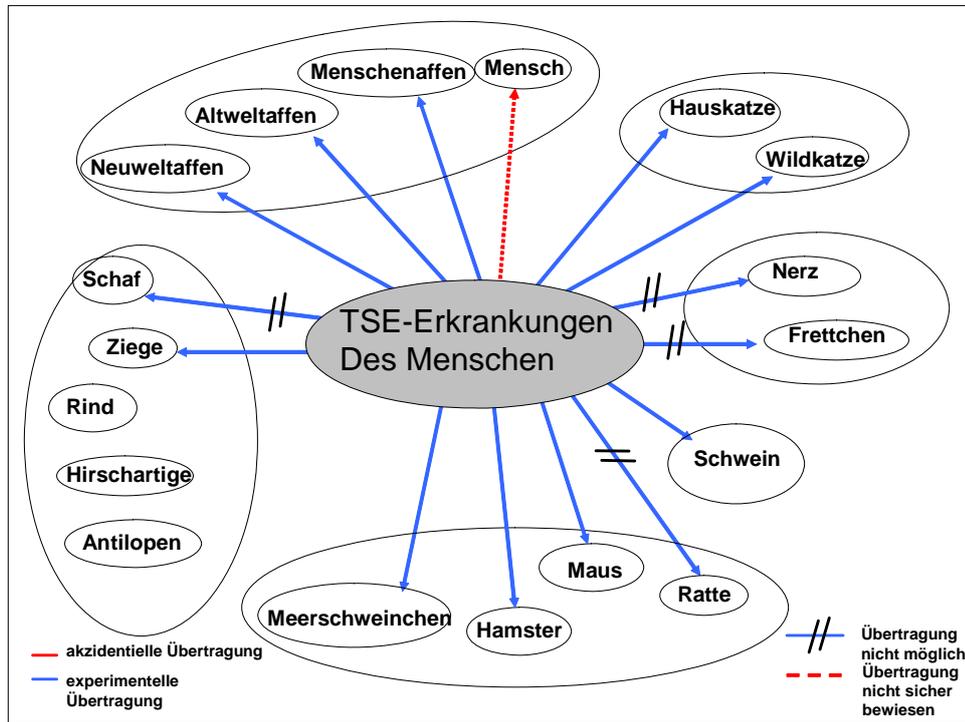


Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Formen der Übertragbarkeit von Prionenkrankheiten des Menschen (entnommen aus [3])

2 Hintergrund des F+E-Vorhabens und Kenntnisstand

2.1 TSE-Erreger in der Umwelt / *Kenntnisstand*

2.1.1 *TSE-Erreger im Boden*

Generell stellen Pflanzenkrankheiten, die aus dem Boden auf Kulturpflanzen übertragen werden können, ein lang bekanntes Problem des landwirtschaftlichen Pflanzenschutzes dar. Dagegen repräsentieren konventionelle Krankheitserreger im Hinblick auf einen möglichen Übertragungsweg vom Boden zu Mensch und Tier kein gravierendes Problem, da diese meist nicht dauerhaft in infektiösen Konzentrationen im Boden überdauern. Ausnahmen hiervon stellen Erreger dar, die in Form von Sporen auch dauerhaft im Boden überleben können, wie beispielsweise die Sporen des Milzbrandenerregers *Bacillus anthracis*. Aufgrund der Persistenz der TSE-Erreger besteht nun eine neue Problematik, da diese eventuell - analog zu Sporen human- bzw. tierpathogener Keime - eine Übertragbarkeit von TSE-Erkrankungen auf Mensch und Tier über den Bodenpfad ermöglichen. Die Übertragbarkeit von TSE über einen derartigen Bodenpfad schien bisher eine nur geringe Bedeutung zu haben, obwohl in Bezug auf Scrapie dies schon länger vermutet wurde. Weiterhin weisen jüngste Publikationen über die Verbreitung von CWD in Cerviden in Nordamerika auf eine mit dem CWD-Erreger kontaminierte Umwelt hin [34, 41].

2.1.2 *Mögliche Eintragspfade des TSE-Erregers*

Düngemittel

Eine mögliche Kontamination der Umwelt mit Prionen, z.B. durch Düngemittel – insbesondere durch Blut- und Knochenmehl bzw. Klärschlamm, wird zwar diskutiert, wurde aber bislang nicht untersucht, da die Gefahr als sehr gering angesehen wird. Der Eintrag der Prionen in Boden über diese Wege durch nicht ausreichend sterilisiertes Ausgangsmaterial wäre jedoch vorstellbar, da die Erreger in diesen Ausgangsstoffen enthalten sind. Weiterhin können kleinere Gewebereste (z.B. Gehirn), die bei beim Schlachten und anschließendem Zerteilen der Tiere auf Schlachthöfen anfallen, unbehandelt in das Abwasser gelangen und so zu einer Kontamination des Klärschlammes führen, falls im Schlachtprozess infizierte Tiere verarbeitet werden.

Dieser Eintragungspfad ist sowohl für Scrapie als auch BSE und CWD vorstellbar, da - unabhängig der Spezies - TSE-Erreger in Knochen und verschiedenen Geweben, insbesondere im Gehirn nachgewiesen wurden.

Kadaver

Die Möglichkeit, dass das unzulässige Vergraben infizierter Kadaver in Deutschland zu einer großflächigen Kontamination von Bodenflächen geführt haben könnte, ist aufgrund - der im Vergleich zu Großbritannien - geringen Fallzahlen BSE-infizierter Rinder, als äußerst unwahrscheinlich anzusehen. Anders könnte sich jedoch die Situation in England und Irland darstellen, da aufgrund der großen Anzahl infizierter Tiere, dieser Eintragungspfad durchaus eine Rolle spielen könnte. Prinzipiell ist dieser Eintragungspfad in die Umwelt unabhängig der TSE-infizierten Tierart möglich

Exkrememente und Körperflüssigkeiten

Der Möglichkeit des Eintrags des Erregers über verschiedene Körperflüssigkeiten und Exkrememente wie Urin, Plazenta etc. in die Umwelt ist im Falle von Scrapie sehr wahrscheinlich, da der Erreger in diesen Ausscheidungen nachgewiesen werden konnte. Insbesondere der Eintrag über infektiöse Plazenta ist vorstellbar. Dadurch können sich auf Weiden so genannte "Hot Spots" gebildet haben, die ein Reservoir für den Erreger darstellen könnten. Hinsichtlich CWD werden aufgrund der ansteigenden Fallzahlen die gleichen Übertragungswege wie bei Scrapie vorliegen, was jedoch derzeit noch ausführlich untersucht wird. So zeigten verschiedene Studien, dass sowohl das Scrapie- als auch CWD-Agens in der Umwelt persistent ist [41, 42]. Experten gehen inzwischen davon aus, dass eine CWD-kontaminierte Umgebung - insbesondere Boden bzw. Bodenaufgaben - ein wahrscheinliches Infektionsreservoir darstellt [34, 41]. Aufgrund der geringen Fallzahlen an Neuerkrankungen - insbesondere auch in England und Irland wird in Bezug auf BSE dieser Weg als gering betrachtet, obwohl neuere Ergebnisse bestätigen, dass Prionen auch in Körperflüssigkeiten wie Milch nachweisbar sind und als Infektionsquelle diskutiert wird [43].

Bemerkung

Bei den aufgeführten Eintragungspfaden ist jedoch zu beachten, dass bei Start des F+E-Vorhabens keine Nachweismethoden zur Verfügung standen, mit denen eine derartige

Kontamination - i.S. eines Monitoring von Risikoflächen - untersucht werden könnte. Möglicherweise stellt die PMCA [1] eine Methode dar, um derartige Gebiete hinsichtlich einer Prionen-Kontamination zu erkennen.

2.1.3 Persistenz der Erreger

Die Resistenz der TSE-Erreger - sowohl gegenüber physikalischen als auch chemischen Einflüssen (Hitze, Druck, pH-Wert, Detergenzien, Desinfektionsmittel etc.) - ist ausführlich untersucht worden [29, 44-58] (siehe auch Tabelle 5). Auswirkungen auf die Umwelt, die durch die Persistenz des Erregers auftreten können, wurden bisher allerdings nur in sehr geringem Umfang analysiert. So liegen beispielsweise keine oder nur ungenügende Daten zu einer möglichen Akkumulation oder zur Abbaukinetik der TSE-Erreger in der Umwelt vor.

Nach derzeitigem Kenntnisstand existieren nur wenige Studien, die die Persistenz und das Verhalten von TSE-Erregern im Boden untersuchten. Die bekannteste Studie wurde 1991 von Brown und Gajdusek publiziert [59]. Sie konnten nachweisen, dass wässrige Extrakte aus Boden, in dem Scrapie-infiziertes Hamstergehirn eingegraben wurde, selbst nach dreijähriger Inkubationsdauer infektiös waren. Allerdings erfolgten die Studien zur Infektiosität mittels intrazerebraler Injektion. Des Weiteren wurde kein PrP^{Sc}-Nachweis geführt, da zu dieser Zeit kein ausreichend sensitives Western Blot-Verfahren zur Verfügung stand, insofern keine Untersuchungen über Abbaukinetiken, Sorptionsverhalten etc. des PrP^{Sc} durchgeführt werden konnten.

Auch die 2006 publizierte Studie von Johnson et al. [60] bestätigt die Ergebnisse von Brown und Gajdusek, wonach TSE-Erreger im Boden "überleben" und noch infektiös sind. Die Autoren konnten detailliert nachweisen, dass TSE-Erreger an Bodenmineralien binden. Aber auch in dieser Studie wurden die Infektionsexperimente mittels intrazerebraler Injektion durchgeführt, so dass keine Rückschlüsse auf Infektion über die mögliche orale Route gezogen werden können. Darüber hinaus fanden keine Langzeitinkubationsversuche statt, sondern nur Inkubationen über einen Zeitraum von maximal einer Woche. Langzeitversuche sind jedoch von außerordentlicher Bedeutung, wenn das Verhalten von Molekülen im Boden berücksichtigt werden soll.

2.1.4 Remobilisierung und proteolytischer Abbau des des Erregers

Es ist bekannt, dass sich Moleküle nach längerer Zeit immer stärker an Bodenbestandteile binden (Alterung) und sich dadurch das Remobilisierungsverhalten und die Bioverfügbarkeit ändern [61]. Insofern kann die Studie von Johnson et al. [60] nicht zur Risikobewertung einer potenziellen Gefahr hinsichtlich der Infektiosität von TSE-Erregern aus dem Reservoir Boden herangezogen werden. Weitere Studien belegen die Bindung der PrP^{Sc} an Bodenbestandteile [62] - auch die Untersuchungen des IME bestätigen eine Bindung der TSE-Erregern an Bodenbestandteile. Völlig konträre Ergebnisse wurden von Rapp et al. veröffentlicht [63]. Die Gruppe konnte zeigen, dass eine erhöhte proteolytische Aktivität im Boden - induziert durch z.B. Tierkadaver - zu einem Abbau von rekombinantem PrP führte und schloss aus diesen Beobachtungen, dass dann auch die pathogene Form PrP^{Sc} abgebaut werde. Diese These steht im vollständigen Gegensatz zu allen anderen Studien.

Auch das IME konnte - wie im Folgendem dargestellt - zeigen, dass TSE-Erreger im Boden - trotz erhöhter proteolytischer Aktivität – nur teilweise abgebaut werden [1], wobei unklar ist, ob der beobachtete "Abbau" des Erregers, lediglich durch eine stärkere Bodenbindung vorgetäuscht wird und der Erreger den Nachweisverfahren durch die verstärkte Bindung einfach entzogen wird.

2.1.5 Rückübertragung von Scrapie

Im Falle von BSE in Rindern wird - wie erwähnt - die Gefahr der Kontamination der Umwelt als gering angesehen, da bislang weder eine horizontale noch eine vertikale Infektion nachgewiesen wurde. Insofern scheint es, dass eine Kontamination, beispielsweise durch Fäkalien, ohne Bedeutung ist. Allerdings zeigt der negative PrP-Nachweis beispielsweise in Kot nicht unbedingt die Abwesenheit des Erregers an, sondern lediglich die Limitierung bezüglich der Empfindlichkeit existierender Nachweissysteme. Dies zeigt auch die Arbeit von Shaked et al., 2001 [64], die im Urin TSE-Kranker Tiere und Menschen Prionen nachwiesen, obwohl zuvor davon ausgegangen wurde, dass Urin Erreger-frei sei. So ist es durchaus möglich, dass sich durch ständigen Eintrag in die Umgebung aufgrund der Resistenz des Erregers so genannte *Hot Spots* bilden, mit potenziellen Gefahren für die darauf weidenden Tiere. Als problematisch wird die Möglichkeit angesehen, dass eine Rückübertragung von BSE auf das Schaf unbemerkt stattfinden könnte [3].

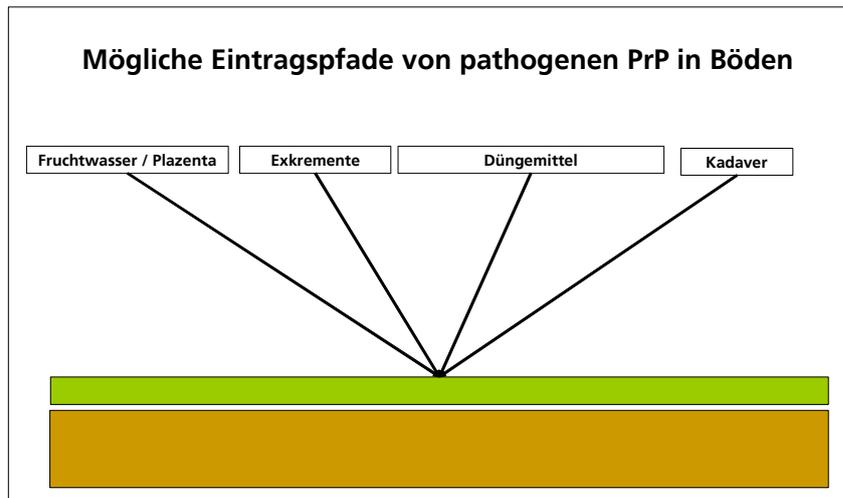


Abbildung 6: Diskutierte Eintragswege von Prionen in Böden

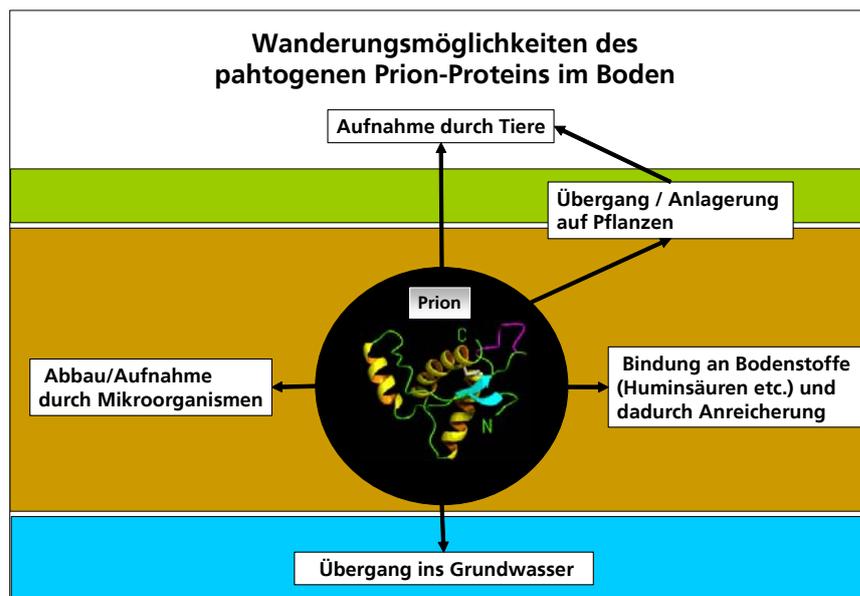


Abbildung 7: Wanderungsmöglichkeiten des Prion-Proteins in kontaminierten Böden

Auf einen anderen möglichen Infektionsweg wiesen deutsche Wissenschaftler vom Institut für Physikalische Biologie (Institut für Parasitologie und dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) hin [42, 65-67]. Sie fütterten Fliegen (*Sacrophaga carnaria*) mit dem Gehirn von Scrapie-infizierten Hamstern. Wurden nicht-infizierte Hamster mit einem Extrakt aus diesen Fliegen gefüttert, so erkrankten sie wiederum an Scrapie. Diese Befunde würden auf eine Übertragung durch Insekten hindeuten. Ob dieser Übertragungsweg in der Praxis

eine Relevanz aufzeigt und ob durch derartige Studien Rückschlüsse auf die Verbreitung von BSE bei Rindern gezogen werden können, ist allerdings bisher weiter unklar.

Ermittlung des Kenntnisstandes

Zur Ermittlung des Kenntnisstandes bezüglich der TSE/BSE-Problematik hinsichtlich der Nachweismethoden und des Verhaltens in der Umwelt, wurden intensive Recherchen in verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Die Suche erfolgte größtenteils über die Datenbank "PubMed" (Medline) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/). Die verschiedenen Suchroutinen, die hierbei angewendet wurden, sind nachfolgend graphisch abgebildet (Abbildung 9 bis 11). Aufgrund der immensen Zahl an Veröffentlichungen wurde versucht, die Recherchen auf Originalarbeiten und Review-Artikel zu begrenzen. Aufgrund der nach wie vor aktuellen Thematik wurde auch intensiv im Internet und in Diskussionsforen nach allgemeinen Informationen recherchiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Informative Internetadressen

http://www.verbraucherministerium.de/
http://www.rki.de/INFEKT/BSE/BSE.HTM
http://www.m-ww.de/krankheiten/prionenkrankheiten/bse.html
http://www.oie.int/eng/info/en_esb.htm
http://www.mad-cow.org/
http://www.purefood.org/madcow.htm
http://userpage.fu-berlin.de/~dittbern/BSE/CJD.html
http://www.bse.org.uk/
http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html
http://www.foodstandards.gov.uk/

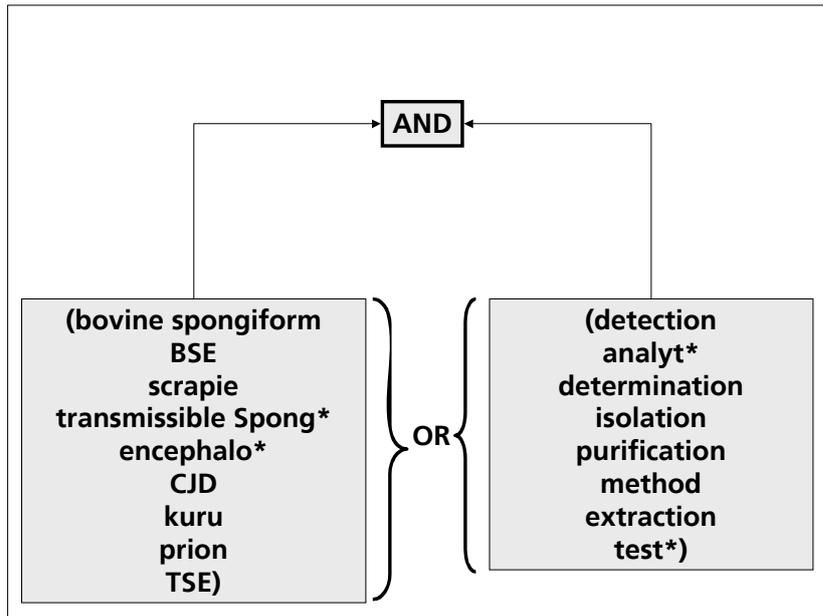


Abbildung 8: Suchroutine I

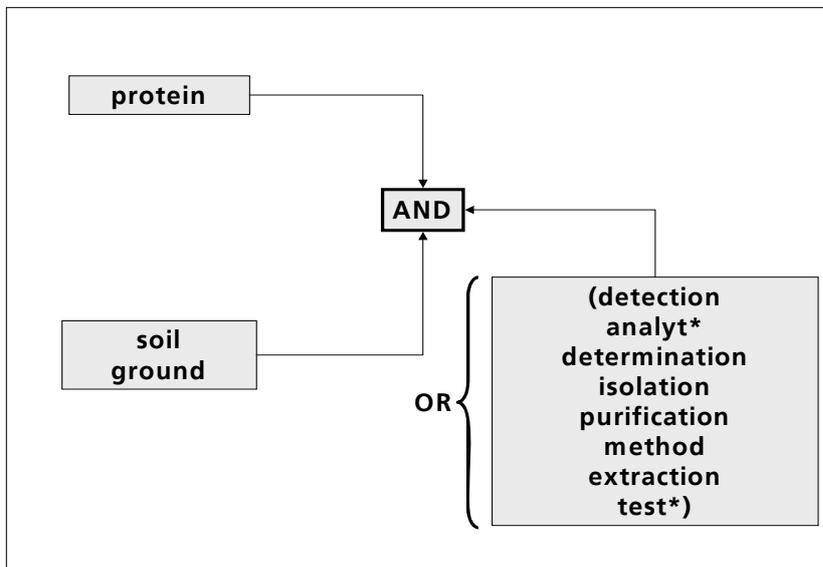


Abbildung 9: Suchroutine II

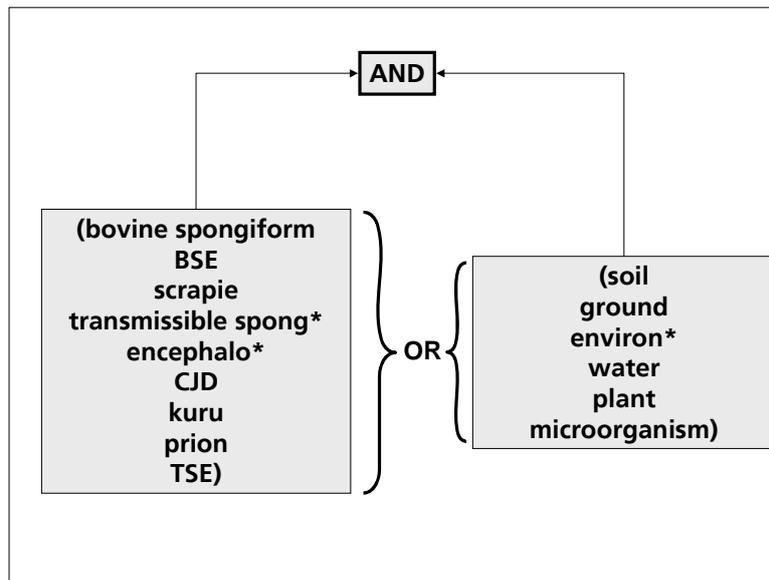


Abbildung 10: Suchroutine III

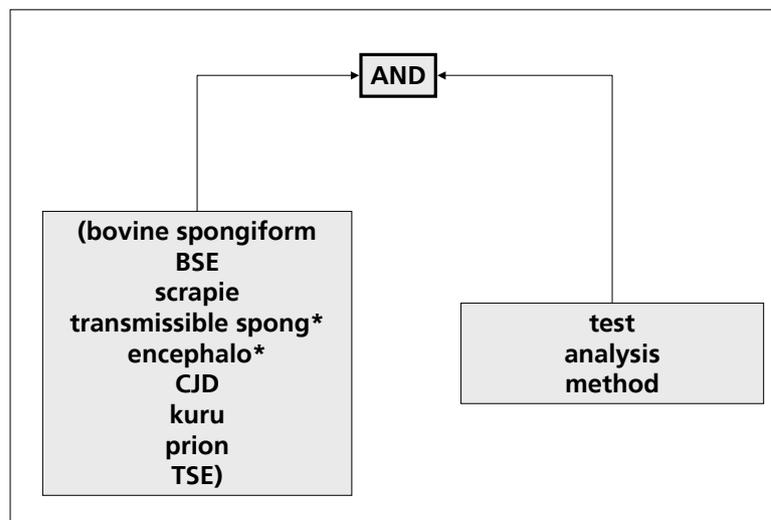


Abbildung 11: Suchroutine in Patentdatenbanken

TSE-Nachweismethoden wurden insbesondere in Patentdatenbanken recherchiert und 2003 publiziert, so dass in dem vorliegen Bericht darauf nicht mehr eingegangen wird. Die Recherchen erfolgten hier in den Datenbanken des Deutschen Patent- und Markenamtes, des Europäischen Patentamtes sowie des United States Patent and Trademark Office (www.uspto.gov).

2.2 Stand in der TSE-Diagnostik

Der Stand der TSE-Diagnostik wurde in einer umfassenden Literaturstudie ausführlich dargelegt, die inzwischen als UBA Text 33/04 veröffentlicht wurde. In dieser Studie sind die wichtigsten Verfahren genau erklärt, so dass auf die einzelnen Nachweise im fortlaufenden Text nicht mehr genauer eingegangen wird. Generell können die existierenden Nachweisverfahren in *in vitro*- und *in vivo*-Verfahren unterteilt werden. In den vergangenen Jahren wurden zum einen massiv an der Entwicklung von Tests - vor allem von TSE/BSE-Tests - am lebenden Tier gearbeitet sowie zum anderen an der Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit bestehender Methoden. Aus o.g. Gründen wird anschließend lediglich kurz auf das auch in dem vorliegenden F+E-Vorhaben angewendeten Westernblotverfahren eingegangen.

Westernblot

Die PrP-Nachweismethode mittels Westernblot wird in sehr großem Maßstab europaweit angewendet, wobei sich mittlerweile auch andere Verfahren wie ELISA etc. etabliert haben. Beim Westernblot-Verfahren werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und die Proteine von Interesse mit entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Beim Nachweis von Prion-Proteinen mittels Westernblot werden die Prionen aus Gehirnproben mit Detergenzien extrahiert und anschließend mit Proteinase K behandelt, um pathogenes von zellulärem PrP zu unterscheiden. Die Auftrennung und der Nachweis erfolgt anschließend mittels sogenannter SDS-PAGE und Immunoblotting, wobei spezifische Antikörper verwendet werden, die gegen das Prion-Protein gerichtet sind. Die Literaturrecherche ergab, dass in den meisten Fällen die Antikörper 3F4 und 6H4 verwendet werden. Bei dem 6H4-Antikörper handelt es sich um den Antikörper, der von Prionics auch in dem kommerziellen BSE-Test-Kit "Prionics-Check" vertrieben wird (Abbildung 12). Vorteilhaft an der Westernblot-Methode ist, dass die Information über die Verkürzung von PrP^{Sc} zu PrP²⁷⁻³⁰ aufgrund der Proteinase K-Resistenz erhalten bleibt. Das Testschema der Firma Prionics ist im Folgenden kurz aufgeführt:

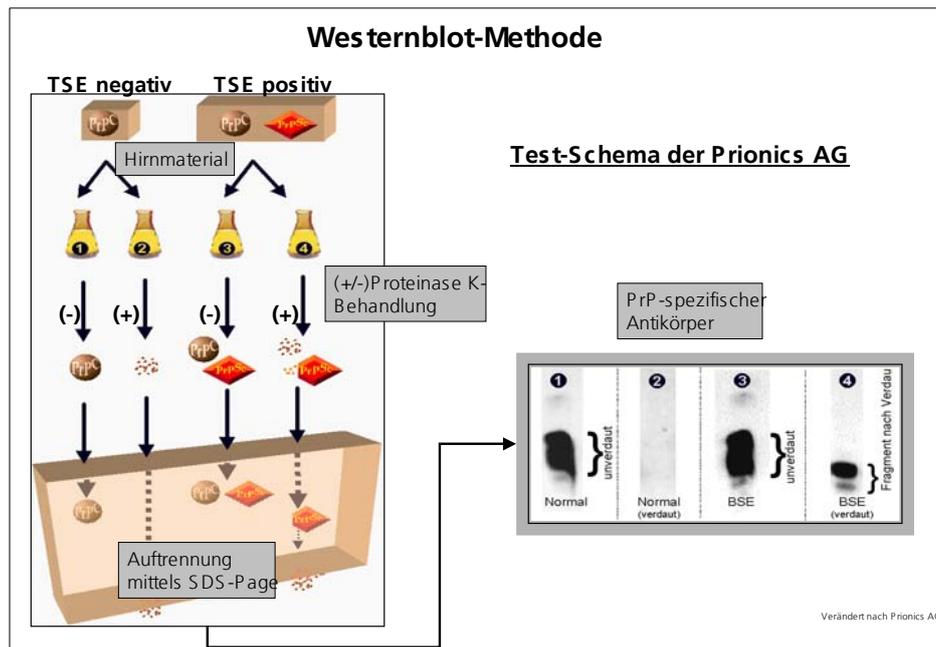


Abbildung 12: Testprinzip des Prionics Check (Prionics AG, Schweiz), verändert

Die Detektion des Testsignals erfolgt häufig mittels enzymatischer Reaktion durch die Verwendung eines alkalischen Phosphatase (AP)-gekoppeltem sekundären anti-Maus Antikörpers und Entwicklung mittels CDP-Star sowie anschließend Chemilumineszenz-Nachweis. Das Nachweisverfahren benötigt - inklusive Proben-vorbereitung - ca. 6 bis 8 Stunden.

Beim Westernblotverfahren zeigen die Prion-Proteine, je nach Spezies und eingesetzten Antikörper, aufgrund unterschiedlichen Glykosylierungsmusters zwischen 2-3 Banden, unabhängig davon, ob pathogene Prionen präsent sind. Bei der Analyse von TSE-infiziertem Material das zuvor mit Proteinase K verdaut wurde, verschiebt sich das Bandenmuster hin zu einem geringeren Molekulargewicht (ca. 27 kDa) aufgrund der Abspaltung des N-terminalen Endes des PrP^{Sc}. Die Nachweisgrenze dieses Systems wird mit ca. 10^3 ID (entspricht ca. 0,05 ng PrP^{Sc}) angegeben

3 Zielsetzung des F+E-Vorhabens und Vorgehensweise

3.1 Zielsetzung

Ziel des Vorhabens war es - in der Konzeption eines Screening-Versuchs -, im Boden die Persistenz von Prionen und der verbleibenden Infektiosität zu untersuchen und somit Hinweise auf die Relevanz von Böden hinsichtlich der Übertragung von pathogenen Prionen auf gesunde Tiere zu erarbeiten. Um das Risiko einer möglichen Übertragbarkeit einer TSE-Infektion durch kontaminierten Boden bewerten zu können, wurden im Zeitraum Juli 2001 bis Juli 2007 vier experimentelle Aufgaben in Form von F+E-Vorhaben durchgeführt.

In der ersten Projektphase (Juli 2001 bis April 2002) wurden folgende Teilaspekte bearbeitet:

- 1. Die Überprüfung ausgewählter Analysemethoden bei gezielter Dotierung kleiner Bodenproben mit pathogenen Prionen (unter realitätsfernen Bedingungen)**
- 2. Anpassung der am besten geeigneten Nachweismethode (z.B. für Körperflüssigkeiten) an die analytischen Besonderheiten der Matrix Boden**

In der zweiten Projektphase (Mai 2002 bis August 2005) erfolgte die:

- 3. Durchführung der Boden-Inkubationsversuche mit pathogenem Material in Freilandversuchen**

In der einer weiteren Projektphase (Januar 2006 bis Juli 2007) erfolgte bzw. erfolgt die:

- 4. Untersuchung der Infektiosität von Prionen-kontaminierten Boden und Extrakten mit syrischen Hamstern mittels Bioassay**

3.2 Übersicht über die Vorgehensweise

Aufgrund der Vorgaben war es von Bedeutung, mittels Vorversuchen zu erkennen, welche Möglichkeiten zum Nachweis von TSE-Erregern in Boden in Frage kommen könnten. Von besonderem Interesse war die Fragestellung, wie Prionen möglichst vollständig aus der Matrix Boden extrahiert werden können, da diesbezüglich kaum Veröffentlichungen existieren. Zur Beantwortung der Fragestellungen wurde vorab die Vorgehensweise projektiert (Abbildungen 13, 14 und 16), die im Folgenden als Flussdiagramme dargestellt sind und anschließend genauer erläutert werden.

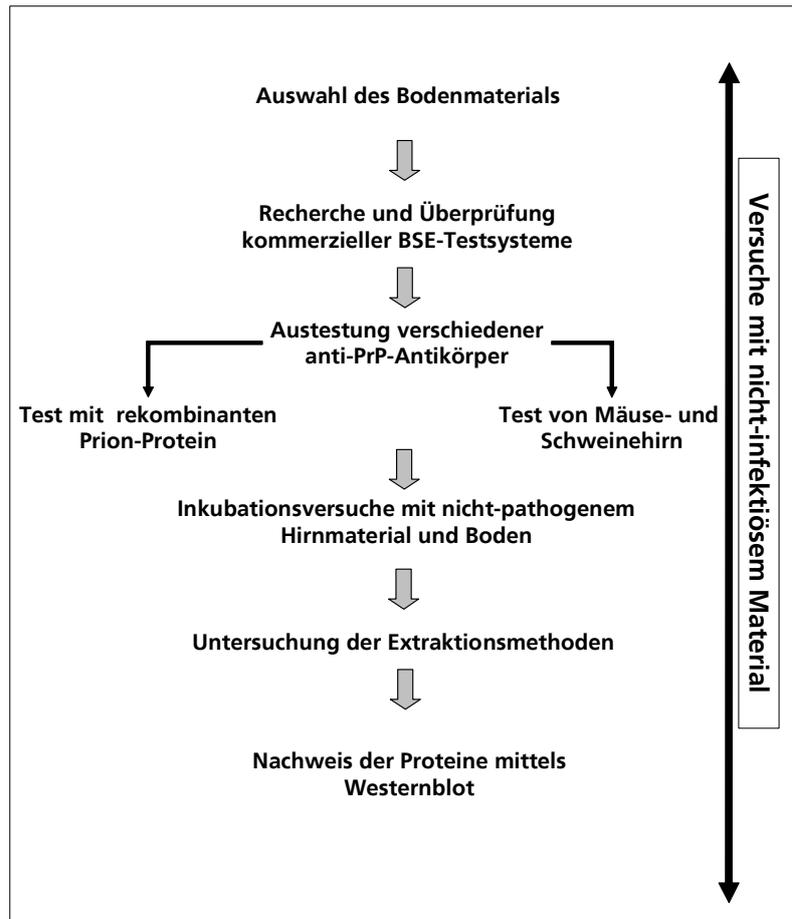


Abbildung 13: Flussdiagramm der Vorgehensweise, Arbeiten mit nicht infektiösem Material

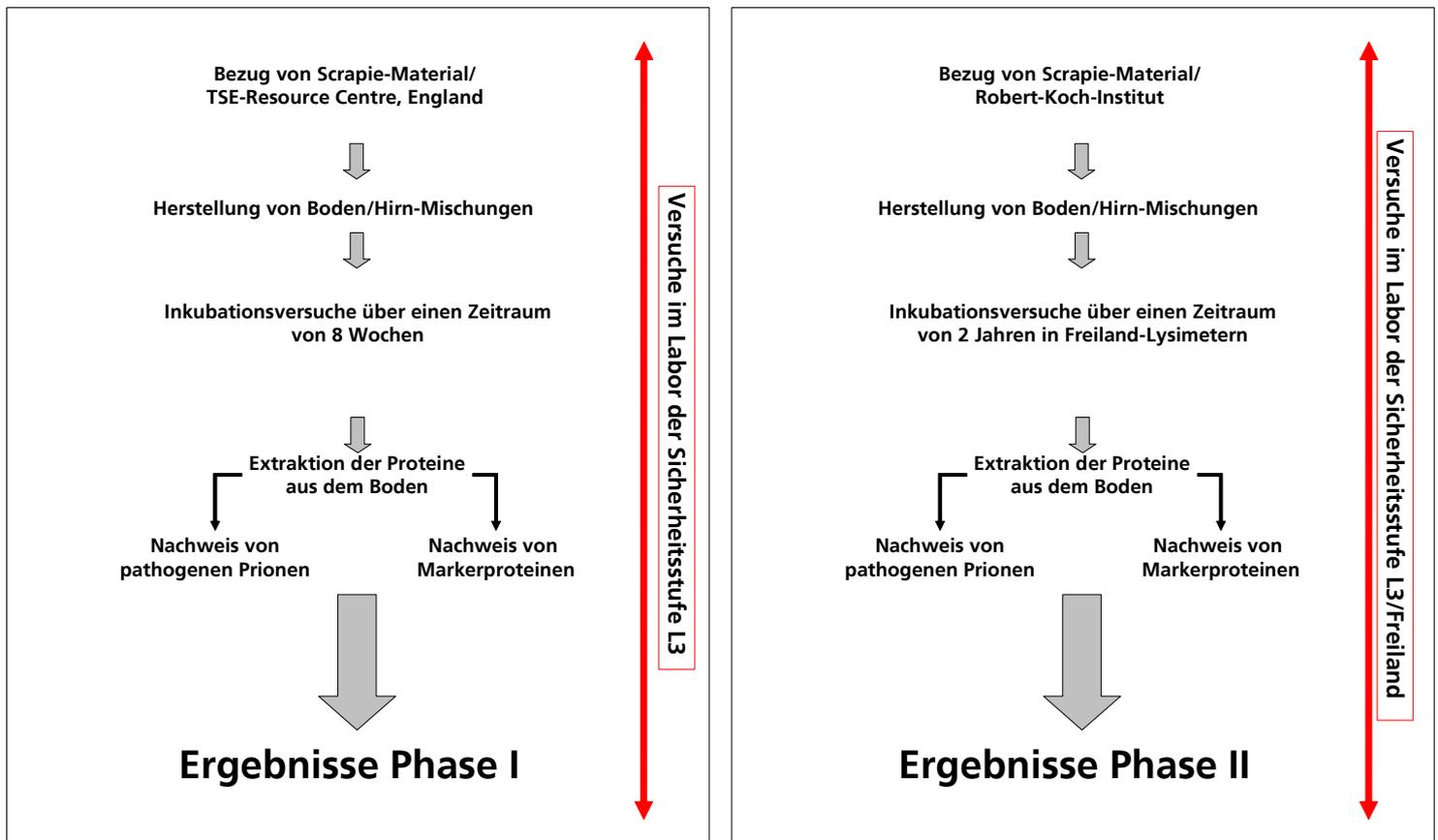


Abbildung 14: Flussdiagramme der Vorgehensweise, Arbeiten mit infektiösem Material

3.3 Versuche mit nicht-infektiösem Material

3.3.1 Auswahl des Bodenmaterials

Für die ersten Versuche wurde ein standardisierter, unbelasteter Kontrollboden (LUFA 2.2) ausgewählt. Dieser Boden stellt aufgrund seiner Zusammensetzung einen lehmigen Sand-Boden und damit einen in Deutschland weit verbreiteten Bodentypus dar. Die Versuche in Freiland-Lysimetern wurden mit standardisiertem Boden des Typs "Borstel" durchgeführt

3.3.2 Recherche und Überprüfung kommerzieller BSE-Testsysteme

Die auf dem Markt erhältlichen Testsysteme wurden bereits erwähnt (siehe 2.2). Die Testsystemen, die auf Routineanalytik ausgelegt sind, erweisen sich für die Bodenanalytik als ungeeignet. Diese Systeme sind zu unflexibel und die enthaltenen Homogenisierungspuffer stellen meist Firmengeheimnisse dar und können den Versuchsbedingungen nicht angepasst werden. Als interessanter erwiesen sich die

Studien, die auf die Extraktion des Prion-Proteins selbst eingingen, da in diesen Publikationen verschiedene Puffersysteme und Lösungen getestet wurden, so dass eine breite Variationsmöglichkeit vorhanden war. Es zeigte sich, dass die Nachweismethode mittels Westernblot am einfachsten variiert werden konnte und somit geeignet war. Auf der Westernblot-Methode beruht der Test des Marktführers in der Prionendiagnostik, Prionics AG, Schweiz. Der Prionics-Check basiert auf einem monoklonalen Antikörper, der sowohl pathogene als auch natürliche Prion-Proteine (PrP) erkennt.. Natürliche, nicht pathogene PrP werden durch Proteinase K zerstört, wobei pathogene PrP nur teilweise angegriffen und anschließend aufgrund des geringeren Molekulargewichtes nachgewiesen werden. Der von der Firma Prionics hergestellte Antikörper (6H4) wurde für erste Versuche verwendet. Dieser Antikörper 6H4 erkennt eine spezielle Peptidsequenz innerhalb des natürlichen sowie pathogenen PrP, die in zahlreichen Säugetieren konserviert ist [68-70].

3.3.3 Austestung verschiedener anti-PrP-Antikörper

Nach den ersten Versuchsansätzen sollte die Wirksamkeit sowie die Nachweisgrenze der entsprechenden Antikörper ermittelt werden. So wurden zunächst die Antikörper-eigenschaften unter der Verwendung rekombinanter Prion-Proteine, sowie mittels Mäuse- und Schweinehirnextrakten untersucht.

Rekombinantes Prion-Protein

Aufgrund der oben erwähnten Sicherheitsanforderungen wurde im Verlauf der ersten Testphase mit einem rekombinanten Hamster-Scrapie Prion-Protein (rec-HaPrP) gearbeitet. Dabei handelt es sich um ein Prion-Protein, das mittels molekurbiochemischer Methoden künstlich hergestellt wird und exakt die Aminosäuresequenz wie das natürliche Hamster Prion-Protein aufweist, allerdings nicht die gleiche räumliche Struktur besitzt. Damit konnte zum einen die Wirksamkeit des ausgewählten Nachweissystems untersucht werden, und zum anderen die Nachweisgrenze des Testsystems ermittelt werden, ohne dass die Anforderungen eines L3-Labors erfüllt werden mussten.

Schweine- und Mäusegehirnhomogenat

Neben der Verwendung des rekombinanten Proteins wurde mit Schweinehirn gearbeitet. Schweinehirn weist natürlicherweise, wie alle Bestandteile des Zentralen Nervensystems, - unabhängig der Spezies - Prion-Proteine auf. Der Vorteil an der Matrix Gehirn besteht zusätzlich darin, dass aufgrund der großen Homologie der PrP

zwischen den verschiedenen Spezies, die Wirksamkeit des Testsystems unter der Anwesenheit möglicher - bei der anschließenden Extraktion - störender Gehirnmatrixbestandteile untersucht werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit, auch andere Markerproteine zu analysieren. Da es bisher nicht gelang, Schweine mit BSE zu infizieren, konnte davon ausgegangen werden, dass das bezogene Material nicht infektiös war und insofern keine restriktiven Sicherheitsanforderungen nötig waren. Zusätzlich - aufgrund der Spezies-Unterschiede -, wurde nicht-infiziertes Mäusegehirn zu Untersuchungszwecken eingesetzt. Nach den ersten Versuchsansätzen sollte die Wirksamkeit sowie die Nachweisgrenze der entsprechenden Antikörper ermittelt werden. So wurden zunächst die Antikörpereigenschaften unter der Verwendung eines rekombinanten Prion-Protein untersucht. Darüber hinaus wurde getestet, ob der verwendete Antikörper mit porcinem PrP reagiert. Die Nachweisgrenze des Antikörpers wurde mittels rekombinatem Hamster-Prion-Protein (rec-HaPrP) untersucht.

3.3.4 Inkubationsversuche mit nicht pathogenem Gehirnmaterial und Boden

Für die ersten Inkubationsversuche wurde eine definierte Menge Boden mit einem bestimmten Anteil rec-HaPrP oder Schweinegehirnhomogenat über verschiedene Zeiträume inkubiert, um zu überprüfen, mit welchem Puffersystem oder Lösungsmittel die Proteine anschließend wiederum aus Boden eluiert werden können.

3.3.4.1 Untersuchung der Extraktionsmethoden

Die Literaturrecherche zeigte, dass ein großes Problem im Nachweis von Prion-Proteinen - in verschiedenen Matrices - in der Anreicherung und Isolierung der Proteine besteht. Somit war erstes Ziel, eine Extraktionsmethode zu finden, die geeignet ist, Proteine aus der Matrix Boden zu isolieren. Problematisch an der Matrix Boden ist, dass anders als in Geweben, Proteine durch verschiedene Wechselwirkungen sehr stark im Boden gebunden werden. Um hierbei allerdings "kompatibel" zu kommerziell erhältlichen "Prionen-Nachweis-Kits" zu bleiben, schied die Verwendung von organischen Lösungsmitteln aus, da diese den anschließenden immunologischen Nachweis erschweren. In der ersten Phase wurde somit untersucht, welche Systeme sich allgemein zur Isolierung von Proteinen aus Boden eignen. Hierzu wurden verschiedene detergenzienhaltige Puffersysteme analysiert, die zur Proteinanalyse - insbesondere zur Isolierung von Prion-Proteinen (PrP) - in Geweben

hinreichend beschrieben sind [71-74] sowie andere Puffer, die standardmäßig in der Zellbiologie zur Proteinextraktion von Zelllysaten angewendet werden und auf ihre Einsatzfähigkeit im Boden untersucht (siehe Tabelle 7). Um die Eignung verschiedener Puffersysteme zu analysieren, wurde Boden zum einen mit einem rekombinanten Hamster Prion-Protein (Prionics AG, Schweiz) und zum anderen mit Gehirnhomogenat von Schweinen inkubiert. Das rekombinante Prion-Protein unterscheidet sich zwar nicht in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu pathogenen Prion-Proteinen, weist jedoch unterschiedliche chemische Eigenschaften und Stabilität auf. Der Einsatz dieses rekombinanten Prion-Proteins war jedoch von Wichtigkeit, um die Nachweisgrenze des Testsystems zu ermitteln, da genau definierte Mengen des Proteins zugegeben werden konnten. Die Verwendung von Schweinegehirn wies den Vorteil auf, dass nachweislich keine Infektionsgefahr bestand und der eingesetzte Antikörper aufgrund der großen Homologie des Prion-Proteins auch die im Schwein vorkommenden Prion-Proteine detektieren konnte. Dadurch konnte untersucht werden, ob die jeweiligen Extraktionsmethoden - aufgrund der möglicherweise im Gehirnmaterial vorkommenden störenden Faktoren – trotzdem effizient waren.

Tabelle 7: Getestete Puffer zur Prion-Protein-Extraktion aus Geweben nach [71]

Eingesetzter Puffer	PrP-Anteil im Überstand nach Zentrifugation bei Gewebeanalyse [%]
Wasser	1-2*
Natriumdodecylsulfat (SDS) (1%ige Lösung)	20-30*
Natriumdodecylsulfat (10%ige Lösung)	20-30*
Natriumsarcosyl	20*
Zwittergent	10*

3.4 Versuche mit infektiösem Material

In der Startphase des F+E-Vorhabens wurde mit dem staatlichen Veterinäruntersuchungsamt in Arnsberg zusammengearbeitet und infektiöses Material sowie entsprechende Kontrollproben wurden vom TSE-Resource-Centre, Institute for Animal Health, in Berkshire/England, bezogen. Zur Durchführung der Freilandversuche wurde pathogenes Gehirnmaterial (Scrapie-infizierte Hamster) von Herrn Dr. Michael Beekes, Robert Koch-Institut, Berlin, bezogen.

3.4.1 Inkubationsversuche über einen Zeitraum von 8 Wochen

Extraktionspuffer wurden in Langzeitversuchen mit dotiertem Boden auf ihre Eignung untersucht. Durch die längere Inkubationszeit sollte es möglich sein, zu überprüfen, ob in Abhängigkeit der Zeit eine vollständige Immobilisierung der betreffenden Proteine erfolgt oder ob diese aus der Matrix extrahiert werden können. Zur Überprüfung wurden nicht pathogene Prionen sowie ausgewählte Markerproteine mittels Westernblot analysiert.

3.4.2 Inkubationsversuche über einen Zeitraum von 29 Monaten in Freiland-Lysimetern

Zur Überprüfung der Persistenz der Prionen wurde homogenisiertes Scrapie-infiziertes Hamstergehirn mit Boden vermischt (1g Gehirn mit 20 g Boden, entspricht ca. 10^9 ID) und in einen Freiland-Lysimeter vergraben. Über einen Zeitraum von 29 Monaten wurden Proben genommen und die Proteine extrahiert. Die Detektion erfolgte mittels Westernblot, wobei gegebenenfalls Markerproteine sowie pathogene Prionen untersucht wurden. Entsprechend eines festgelegten Schemas, erfolgten nach definierten Zeitpunkten verschiedene Probenahmen.

3.4.2.1 Vorbereitung der Freilandversuche

Aufgrund der Problematik der Einbringung infektiöser Material ins Freiland mussten verschiedene Sicherheitsanforderungen erfüllt werden. So erfolgte die Versuchsdurchführung in einem geschützten Lysimeter innerhalb der abgesperrten Freilandanlage des Fraunhofer IME, welches als L3-Bereich zugelassen war. Aufgrund der Verwendung von Lysimetern wurde sichergestellt, dass kein kontaminiertes Abwasser in die Umwelt gelangte. Als zusätzlicher Schutz wurde um den Lysimeter ein Zaun gezogen. Die Boden/Gehirnmischungen selbst wurden in Gazesäckchen eingebracht, welche wiederum in Stahlkäfigen als Schutz vor Kleinstnagern eingebracht wurden.

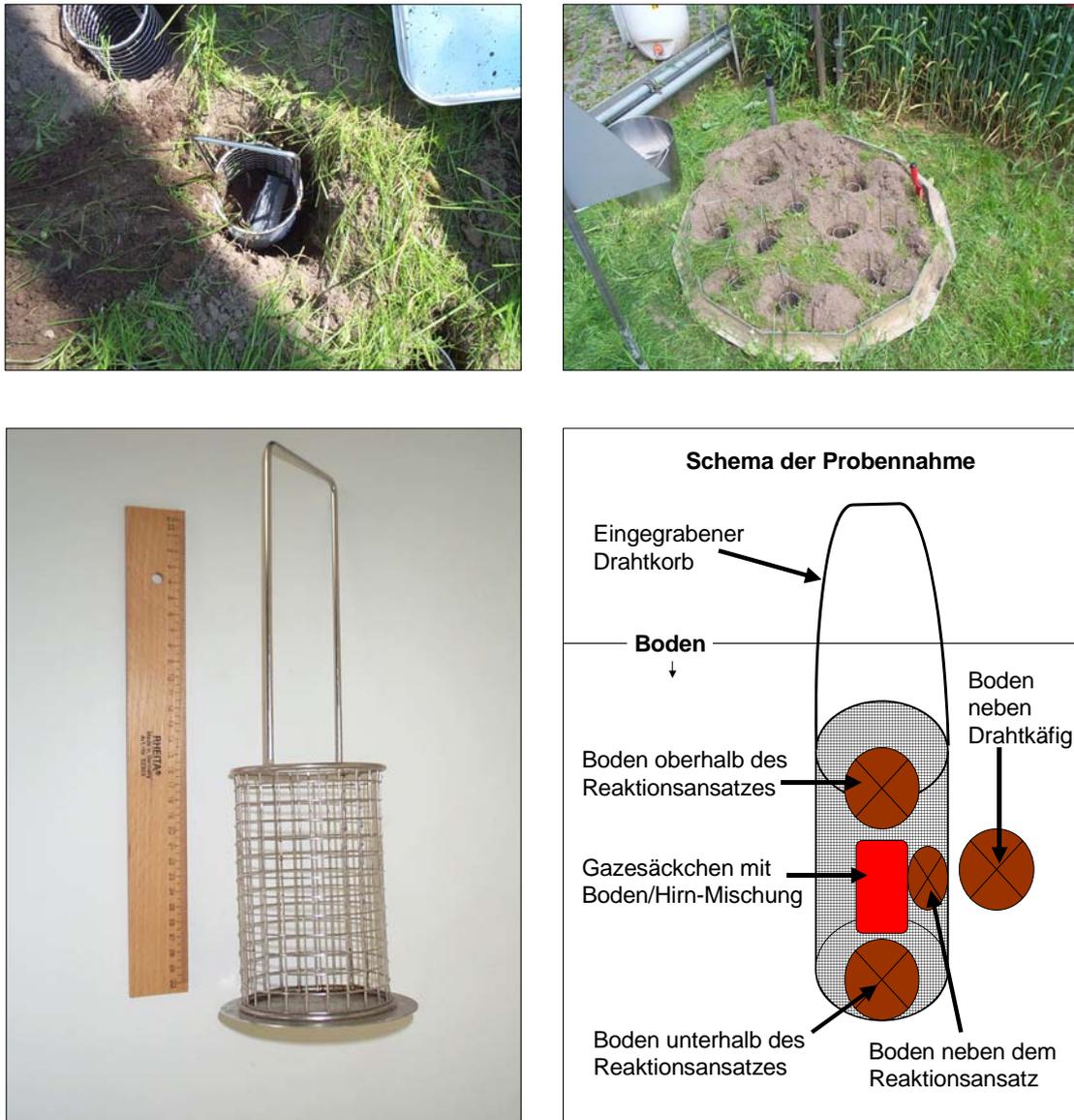


Abbildung 15: Fotos des vorbereiteten Freiland-Lysimeters, des Stahlkäfigs sowie das Schema der Probennahmestellen

3.4.3 Durchführung des Bioassay mit syrischen Hamstern

Um zu klären, ob das auf immunologischer Basis detektierte PrP^{Sc} nach oraler Aufnahme noch infektiös ist, wurde im weiteren Verlauf der Projektphase II eine Aufstockung beantragt und ein Bioassay (Aufgabe 4) mit syrischen Hamstern durchgeführt. Diese Versuche waren für eine aussagekräftige Risikobewertung von eminent wichtiger Bedeutung. Mit diesen Versuchen kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die detektierten Prionen auch infektiöse Eigenschaften aufweisen.

Aus diesem Grunde wurde ein Bioassay durchgeführt, welches die Frage nach der Infektiosität klären sollte. Der Ablauf der geplanten Tierversuche ist in Abbildung 16 als Übersicht dargestellt (genaue Durchführung siehe 4.3.1)

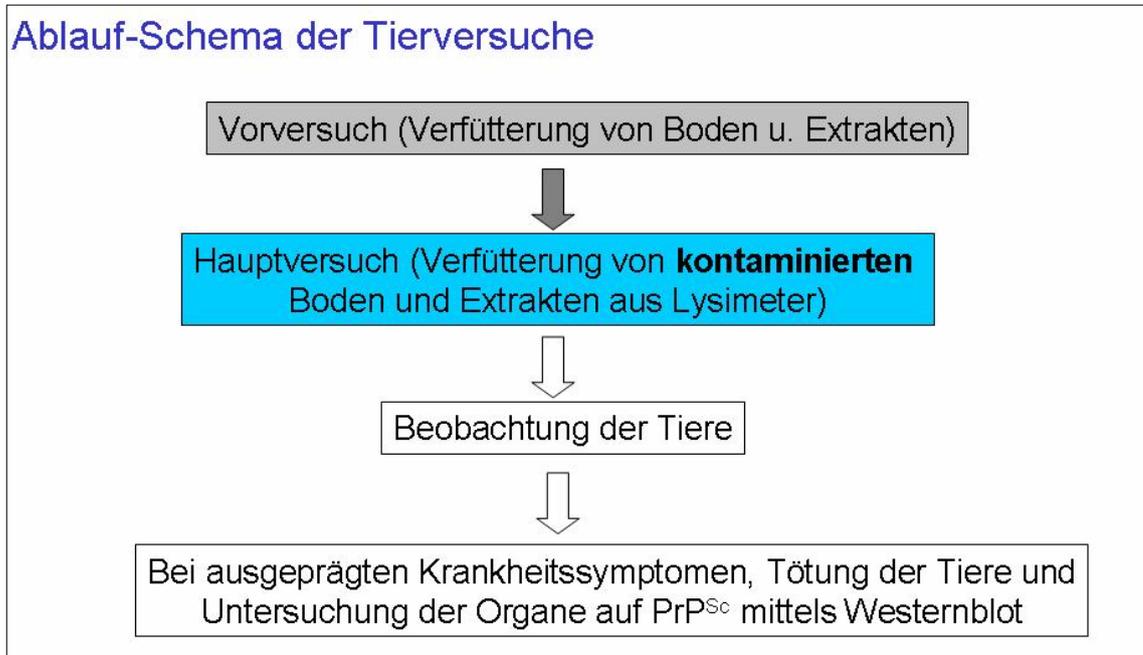


Abbildung 16: Übersichtsschema des Bioassay mit syrischen Hamstern

Zur Verfütterung wurde kontaminierter Boden direkt eingesetzt sowie ein wässriger Extrakt, der aus dem kontaminierten Boden gewonnen wurde appliziert (näheres siehe Material und Methoden unter 4.3.1).

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (p.a. Qualität) und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Gibco-BRL (Eggenstein), PeqLab (Erlangen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Applichem (Darmstadt), Biorad (München), Pharmacia (Freiburg), PAA-Laboratories (Linz, Österreich), Riedel-de-Haen (Seelze), Whatman (Maidstone, England), Becton Dickinson (Franklin Lakes, New York, USA), Integra Biosciences (Fernwald), Invitrogen (Heidelberg), Millipore (Massachusetts, USA), Nunc (Wiesbaden), Biozym (Hessisch Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Biometra (Göttingen), Pierce (Perbio, Bonn). Die Verwendeten Materialien, besonderen Geräte und eingesetzten "Kits" sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Tabellarische Auflistung der Geräte, Materialien und "Kits"

Material, Gerät, Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent	Pierce
WesternBreeze	Invitrogen
CL-XPosure Film	Pierce
Supersignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Molekulargewichtsstandard für Proteine, prestained	Sigma, Pierce
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll
PVDF-Membran	Millipore
Gelelektrophoresekammern	Sigma, Peqlab
Elektroblotter (Sammy Dry)	Schleicher & Schüll

4.1.1 Boden

LUFA 2.2

Für die ersten Bodensorptionsversuche wurde der LUFA 2.2 Boden mit der Chargen-Nr. 23992 verwendet [75] (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Speyer). Entnahmestelle: Großer Striet, Hanhafen, Rheinland-Pfalz, Tiefe ca. 20 cm, A-Horizont.

Borstel

Zur Durchführung der Freilandversuche wurde ein mit Borstel-Boden (sandig-lehmig) verfüllter Lysimeter verwendet. Dabei handelt es sich um einen charakterisierten sandigen Boden, der in der Bundesrepublik Deutschland häufig anzutreffen ist. Folgende Charakteristika weist der Boden auf:

Sand 68%, Schluff 27%, Ton 5%, C_{org} 0,97%, N_t 797 mg, pH 5,5, KAK 29,9 mmol c/kg. Dieser Boden wurde anschließend auch im Bioassay eingesetzt, so dass die auch die Vorversuche zur Verfütterung mit diesem Boden durchgeführt.

4.1.2 Testmaterial

Kontrollen

a) Gehirn vom Schwein

Zur Untersuchung, welche Puffer für eine Extraktion von Proteinen aus Boden allgemein geeignet waren, wurde Schweinegehirnmaterial von Ferkeln eingesetzt (bezogen von ortsansässiger Metzgerei). Schweine können auf natürlichem Wege nicht mit dem BSE-Erreger infiziert werden und können daher als nichtinfektiöse Kontrolle eingesetzt werden. Die natürlicherweise im Gehirn vorkommenden Prion-Proteine werden von dem Antikörper 6H4 erkannt. Schweinegehirn enthält im Durchschnitt 10,6 g Protein/100 g [76].

b) RIII RC 052 (murines, nicht infektiöses Gehirnhomogenat)

Weiterhin wurde in den eigentlichen Bodeninkubationsversuchen zum infektiösen Material nicht-infektiöses Testmaterial eingesetzt, das vom TSE-Resource Centre in England bezogen wurde. Hierbei handelte es sich um 10%iges Mäusegehirnhomogenat in einer 0,9%-igen Natriumchlorid-Lösung.

Positivkontrollen

a) Rekombinantes Hamster-Prion-Protein (rec-HaPrP)

Rekombinantes Hamster-Prion-Protein entspricht der maturen, das heisst reifen Form des Maus-PrP und enthält fünf "octarepeats". Das Protein wurde in E.coli BL21 exprimiert und aus "inclusion bodies", sogenannten "Einschlusskörpern" isoliert. Das Protein weist eine Länge von 211 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23 kDa auf und wurde von Prionics AG, Schweiz, bezogen.

Die Aminosäuresequenz ist im Folgenden dargestellt:

MKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGTWGQPHGGGWGQPHGGS	50
WGQPHGGSWGQPHGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAVV	100
GGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQ	150
NNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKES	200
QAYYDGRRSS	210

Im Tierversuch konnte für das rec-HaPrP keine Infektiosität nachgewiesen werden [69]. Von anderen Arbeitsgruppen hergestelltes rec-PrP zeigte ebenfalls keine Infektiosität [15].

b) Infektiöses Gehirnmaterial

Als Testmaterial in den Vorversuchen wurde Scrapie-infiziertes Hamstergehirn eingesetzt (Infectious substance, affecting animals); UN2900, das vom TSE-Resource-Centre in England bezogen wurde. Insgesamt wurde 120 µl 10%iges Gehirnmaterial bezogen. Das Material wurde im Tierversuch als hochinfektiös getestet, wobei 1%ige Verdünnungen nach Inokulation im Tier zu TSE-Erkrankungen führten [77].

Zur Durchführung der Freilandversuche wurde ca. 50 g Scrapie-infiziertes Hamstergehirn (Stamm 263 K) eingesetzt, welches vom RobertKoch-Institut, Berlin (Dr. Michael Beekes) zur Verfügung gestellt wurde.

4.1.3 Antikörper

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die eingesetzten primären Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen. In Tabelle 10 sind die entsprechenden verwendeten sekundären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 9: Eingesetzte primäre Antikörper

1. Antikörper	Aus Spezies Isotype	Hersteller	Molekulargewicht [kD]	Eingesetzte Verdünnung im Westernblot
6H4 (anti-PrP)	Maus, mk IgG1	Prionics AG, Schweiz	32-35 bei PrP ^C 27-30 bei PrP ^{Sc}	1:3.000
MAB1562 (anti-PrP) Klon 3F4	Maus, mk IgG2a	Chemicon, USA	25-32 bei PrP ^{Sc}	1:5.000
GFAP (anti-Glial Fibrillary Protein)	Kaninchen, pk	Biotrend, Köln	41	1:5.000 - 1:10.000
β-Actin	Maus, mk IgG1	Sigma, Deisenhofen	46	1:2000 - 1: 5.000

Tabelle 10: Eingesetzte sekundäre Antikörper

2. Antikörper	Aus Spezies	Gekoppelt mit	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung im Westernblot
Anti-Maus IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase	Sigma, Deisenhofen	1:10.000
Anti- Kaninchen IgG	Ziege	Peroxidase	Sigma, Deisenhofen	1:5.000
Anti- Kaninchen IgG	Maus	Alkalische Phosphatase	Dianova, Hamburg	1:5.000
Anti-Maus IgG	Ziege	Peroxidase	Pierce, Rockford, Illinois, USA	1:7.500

4.1.4 Extraktionspuffer

Um zu überprüfen, welche Extraktionspuffer allgemein für die Elution von Proteinen aus Boden geeignet sind, wurden verschiedene Puffer getestet, die zur Isolation von

Prionen aus Geweben bekannt sind oder allgemein in der Zellbiologie zur Extraktion von Proteinen aus Zellen eingesetzt werden untersucht (Tabelle 11). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in z.T. Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 11: In Experimenten angewendete Puffer und Extraktionslösungen

Wasser
Natriumdodecylsulfat (1%)
Natriumsarcosyl
Triton
RIPA
Natriumdodecylsulfat (3%)
Zwittergent
NOP (Nonidet P40)

4.1.5 Bodenanalytik der Grundparameter

Aufgrund der Tatsache, dass ein Standardboden zu Untersuchungszwecken eingesetzt wurde, bei dem die Grundparameter (z.B. Trockenmasse, organischer Kohlenstoffgehalt) hinreichend analysiert sind, erfolgte diesbezüglich keine Analytik am IME. Nachfolgend sind deshalb lediglich die Verfahren aufgeführt, die zur Bestimmung dieser Parameter angewendet werden.

Trockenmasse:	DIN ISO 11465 [78]
pH-Wert:	DIN ISO 10390 [79]
organischer Kohlenstoffgehalt:	DIN ISO 10694 [80]
Körnung:	ISO 11277 [81]
Wasserhaltekapazität:	DIN ISO 11274 [82]

4.2 Proteinbiochemische Methoden

Nachfolgend wird genauer auf die verschiedenen proteinbiochemischen Methoden eingegangen. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die verwendeten Puffer und Lösungen.

Tabelle 4: Benötigte Puffer und Lösungen

10x PBS	1,37 mM NaCl; 26,8 mM KCl; 43 mM NaH ₂ PO ₄ ; 14,7 mM KH ₂ PO ₄
10x Elektrophoresepuffer	50 mM Tris-Base; 0,15 % Glycin; 0,1 % SDS
2x Ladepuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Glycerin; 20 mM DTT; 0,01 % Bromphenolblau
Alkalischer Phosphatase-Puffer	50 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl ₂ ; pH auf 9,4 einstellen
Entfärbelösung für SDS-Gele	10 % Essigsäure; 12,5 % 2-Propanol
Färbelösung für alkalische Phosphatase	Lösung 1: 30 mg 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in 1 ml 70 % N,N Dimethylformamid Lösung 2: 15 mg 5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat in 1 ml 100 % DMF. Für 10 ml Färbelösung 100 µl Lösung 1 und 100 µl Lösung 2 in 9,8 ml alkalischem Phosphatase-Puffer lösen. Die Lösung ist lichtempfindlich und für 1 h stabil.
Färbelösung für SDS-Gele	0,025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250; 10 % Essigsäure; 25 % 2-Propanol
RIPA-Puffer	1 % Triton X-100, 1 % Na-Desoxycholat, 0,1 % SDS, 20 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA,
NOP-Puffer	PBS mit 1 % Triton X 100; 1 % NP-40; 2 mM CaCl ₂
SDS-Puffer	20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM CaCl ₂ ; 5 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 1% SDS
SDS-Lösung 1%ig	1 g SDS auf 100 mL dest. Wasser
1 bis 10% SDS-Lösung	1 bis 10 % SDS in dest. Wasser
Transferpuffer	Anodenpuffer I: 300 mM Tris; 20 % Methanol Anodenpuffer II: 30 mM Tris; 20 % Methanol Kathodenpuffer: 25 mM Tris; 20 % Methanol; 40 mM 6-Aminocapronsäure (C ₆ H ₁₃ NO ₂)

Je nach Anwendung wurden die Puffer unmittelbar vor Gebrauch mit Proteinase-Inhibitoren versetzt, wobei folgende Konzentrationen - unabhängig der verwendeten Puffern - eingesetzt wurden: - 5 µM Trasylol, - 0,1 mM Pefabloc

4.2.1 Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure)

Die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode eignet sich besonders für Bestimmungen in Gegenwart von Tensiden; bei Anwesenheit sehr starker Chelat-

komplexbildner wie EDTA oder Lipiden, wird die Bestimmung allerdings gestört [83]. Die Durchführung erfolgte mittels Vermischen von Bicinchoninsäurelösung und 4%iger Kupfersulfatlösung im Verhältnis 50:1 (Lösung C). Der Proteingehalt wurde mit $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 5 μl Proteinlysate mit 45 μl H_2O 1/10 verdünnt und 1 ml Lösung C zugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Bezug wurde jeweils eine Kalibrationsgerade mit einer 2 mg/ml Rinderserumalbuminlösung als Standard in verschiedenen Konzentrationen (0 μg , 20 μg , 40 μg , 60 μg , 80 μg , 100 μg) bestimmt und dadurch der Proteingehalt der Proben ermittelt. Proteinkonzentrationen außerhalb des linearen Bereiches der Kalibrationsgeraden unterliegen nicht mehr exakt dem Lambert-Beerschen Gesetz, da verstärkt Interaktionen der Chromophoren mit dem Milieu auftreten. Um dies zu umgehen, wurden die Proben stärker verdünnt. Die Messung erfolgte jeweils bei 562 nm.

4.2.2 Gewebeaufarbeitung mit NOP- und RIPA-Puffer

Zur Analyse von Gesamtproteinlysaten wurde das zu untersuchende Material mittels NOP- oder RIPA-Puffer aufgearbeitet. Die beiden Puffer unterscheiden sich bezüglich der enthaltenen Detergenzien. So stellt die Aufarbeitung mit NOP- im Vergleich zum RIPA-Puffer eine schonendere Methode dar, bei der Proteinkomplexe weniger zerstört werden. Ca 3 g Gehirngewebe wurde mit 10 ml NOP- oder RIPA-Puffer versetzt, durch Auf- und Abziehen mit einer Injektionsnadel (15er) zerkleinert und durch einen Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 10 min bei 4 °C/12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Ein entsprechender Anteil wurde mit 2 x Ladepuffer versetzt, 10 min aufgekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Standardmäßig wurden 20 bis 30 μg Gesamtprotein analysiert [84].

4.2.3 Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proteine wurden mittels Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil. Durch chemische Ko-Polymerisation von Acrylamidmonomeren mit Bisacrylamid als Vernetzer erhält man ein klares, durchsichtiges Gel mit sehr geringer Elektronenosmose. Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die eindimensionale SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die SDS-PAGE

erfolgte nach Lämmli, [85], mittels dis-kontinuierlichem pH-Verlauf (Disk-Elektrophorese).

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen derart effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein), wodurch eine Auftrennung der Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichtes erfolgt. Je nach erforderlicher Trennschärfe und erwartetem Molekulargewicht wurden zur Auftrennung Trenngelen mit einem Acrylamidgehalt von 7,5 % bzw. 10 % mit jeweils 7,5 %igen Sammelgelen wie in Tabelle 13 angegeben verwendet:

Tabelle 53: Pipettierschema der Polyacrylamidgelelektrophorese

Gelmenge 4,8 ml	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 7,5 %
30 % Acrylamid	1,25 ml	1,6 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,32 ml	0,65 ml	0,15 ml
3 M Tris-HCl pH 8,8	0,6 ml	0,6 ml	
1 M Tris-HCl pH 6,8			0,38 ml
10 %ige SDS-Lsg.	48 µl	48 µl	30 µl
60 %ige Saccharoselsg.			0,75 ml
dest. Wasser	3,0 ml	1,9 ml	1,3 ml
TEMED	2 µl	2 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl	30 µl
Trennbereiche [u]	40 000-150 000	20 000-180 000	

Bemerkung: Bei Arbeiten mit infektiösen Materialien wurden aus Sicherheitsgründen Fertiggele von Gradipore verwendet (iGels, Tris-Glycine-SDS 4-20%, LTF, Labortechnik, Wasserburg).

Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinstandard (Sigma-Aldrich, Pierce oder Peqlab) aufgetragen. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proben mit 2 x Ladepuffer 95 °C erhitzt, wobei durch enthaltenes Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) zum einen die Proteine mit negativer Ladung vorliegen, sowie

zum anderen die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst und Schwefelbrücken zwischen Cysteinen aufgespalten werden. Dadurch ist eine Auftrennung nach dem jeweiligen Molekulargewicht der Proteine möglich [74]. Im Ladepuffer enthaltenes Glycerin ermöglicht die Beladung der Geltaschen.

4.2.4 Untersuchung der Proteinase K-Empfindlichkeit

Nicht-pathogene Prion-Proteine sowie das rec-HaPrP sind aufgrund ihrer Faltung sensitiv gegen Proteinase K. Proteinase K ist eine endolytische Protease, die Peptidbindungen an den Carboxygruppen von aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren schneidet. Die Proteinproben wurden für 15 bis 30 min bei 37 °C in 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 0,5% SDS und 1 mM Calciumchlorid mit 10 µg Proteinase K/10 µg Protein inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Gel-Ladepuffer und anschließendem Erhitzen auf 98 °C für 5 min beendet. Abbildung 19 legt dar, dass das rekombinante Hamster-Prion-Protein in verschiedenen Konzentrationen Proteinase K-sensitiv ist.

4.2.5 Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot)

Der Elektrotransfer von Proteinen auf proteinbindenden Oberflächen erfolgte mittels "semi-dry"-System bzw. durch Einsatz der "Tank-Blot"-Methode. Als proteinbindende Materialien wurden Nitrocellulose (NC)- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen verwendet. PVDF-Membranen müssen vor deren Verwendung in Methanol oder Ethanol aktiviert werden [74].

Die "Semi-dry-Apparatur" besteht aus Plattenelektroden, zwischen denen der "Blotsandwich" aus Filterpapieren, Gel und Membran horizontal eingelegt ist. Durch Gleichstrom wurden die Proteine mittels diskontinuierlichen Puffersystems auf NC- bzw. PVDF- Membranen übertragen. Der Aufbau erfolgte nach folgendem Schema: Anodenplatte, eine Lage Filterpapier getränkt mit Anodenpuffer 1, zwei Lagen Filterpapier getränkt mit Anodenpuffer 2, NC- bzw. PVDF-Membran getränkt in Wasser bzw. Methanol oder Ethanol, Polyacrylamidgel equilibriert in Lösung 3, drei Lagen Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer 3, Kathodenplatte. Der Aufbau der Anordnung erfolgte absolut blasenfrei, so dass ein vollständiger Transfer gewährleistet war. Der Transfer wurde bei RT mit einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 45 min durchgeführt. Die Apparatur wurde mit ca. 2 kg beschwert.

4.2.6 Ponceaurotfärbung von Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen

Die Blotting-Effizienz wurde dadurch überprüft, dass die NC- bzw. PVDF-Membranen mit 1 %iger Ponceaurotlösung angefärbt wurden. Bei erfolgreichem Transfer wurden die Proteine gleichmäßig angefärbt. Die Position der Markerproteine wurden durch einen wasserfesten Kugelschreiber markiert und die Blotting-Membranen anschließend durch Schwenken in PBS wieder völlig entfärbt.

4.2.7 Färbung von SDS-Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue G 250

Proteine in Acrylamidgelen können direkt mittels Coomassieblau angefärbt werden. Die Gele wurden in einer Coomassieblaulösung fixiert und gefärbt. Die Färbelösung konnte mehrmals verwendet werden. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 0,5 µg Protein pro Bande. Die Gele wurden anschließend entfärbt, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu entfernen, so dass ausschließlich die Proteinbanden erkennbar waren. Durch diese Färbung konnte der gleichmäßige Proteinauftrag überprüft werden.

4.2.8 Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz

Um freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran zu blockieren, wurden die Membranen - je nach Antikörper - für 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht in 3 % BSA (Bovines Serumalbumin) in 1x PBS (Phosphat Buffered Saline) oder 3 % Magermilchpulver in PBS inkubiert. Bei einigen Anwendungen war auch eine Mischung aus BSA und Magermilchpulver in PBS geeignet, um unspezifische Hintergrundfärbungen bei der Immunodetektion zu verringern. Anschließend wurden die Membranen einmal mit PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper inkubiert, wobei pro cm² Membran 0,5 ml Antikörperlösung verwendet wurde. Die Antikörper wurden entsprechend in 3 % BSA + 0,02 % Tween in PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte 45 min bei RT oder für 12 h bei 4 °C. Nachfolgend wurden die Blots 5 min einmal mit PBS + 0,02 % Tween und zweimal mit PBS gewaschen und - je nach verwendetem 1. Antikörper - mit dem 2. Horse Raddish-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Blots wiederum in der gleichen Weise gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungen zu entfernen. Die Detektion von HRP-Konjugaten erfolgte unter Verwendung des ECL-Detektion Kits (Enhanced Chemiluminescence). Unter der ECL-Entwicklung versteht man, das durch

enzymatische Umsetzung cyclisches Diacylhydrazid in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu 3-Amino-phtalat oxidiert wird. Das energiereiche, angeregte Oxidationsprodukt geht unter Photonenemission wieder in den Grundzustand über, was durch Exposition eines blaulichtsensitiven Röntgenfilms detektiert werden kann. Die Durchführung erfolgte in der Weise, dass äquimolare Mengen der im Kit enthaltenen Lösungen A und B vermischt und die Blots im Dunkeln in dieser Lösung für ca. 2 min inkubiert wurden. Die Blots wurden unter Frischhaltefolie gelegt und die Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert. Die Expositionszeit variierte - je nach Konzentration des zu analysierenden Proteins - zwischen 0,5 s und 5 min.

4.2.9 Immunodetektion von Proteinen durch alkalische Phosphatase

Eine weitere Möglichkeit, um Proteine zu detektieren, besteht in der Verwendung eines sekundären alkalischen Phosphatase-gekoppelten Antikörpers mittels Farbreaktion. Die Färbung kann auch mit Blots durchgeführt werden, mit denen zuvor die Immunodetektion mittels Chemilumineszenz erfolgte. NC- oder PVDF-Membranen wurden nach der Inkubation des AP-gekoppelten Antikörpers jeweils für 5 min einmal mit PBS und zweimal mit alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Blots im Dunkeln mit frisch zubereiteter alkalischer Phosphatase-Färbelösung inkubiert, so dass die "Blots" vollständig bedeckt waren. Die Färbereaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Intensität der Banden durch Waschen mit Wasser beendet.

4.2.10 Vorbereitungen zur Durchführung der Freilandversuche

Zur Erprobung der Methode zum Nachweis und zur Untersuchung zum Verhalten von TSE-Erregern in Böden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Persistenz wurden vom Robert Koch-Institut, Berlin ca. 50 g Scrapie-infiziertes Hamstergehirn bezogen. Das Gehirnmaterial wurde seitens des Robert Koch-Institutes durch intrazerebrale Injektion der Scrapie-Erreger in syrische Hamster gewonnen. Die infizierten Versuchstiere wurden im terminalen Krankheitsstadium getötet und deren Gehirne entnommen.

Ein Hamstergehirn wiegt ca. 1 g. Ein derartiges infiziertes Gehirn weist, nach Auskunft des Robert Koch-Institutes, eine Erregerkonzentration von 10^9 ID (Infektiöser Dosen) pro Gramm auf. Die Zustellung der Gehirne erfolgt bei -20 °C, die Lagerung im Fraunhofer IME bei -80 °C, um proteolytische Vorgänge zu unterdrücken.

Für die ersten Inkubationsversuche wurden sämtliche Gehirne in Phosphatpuffer homogenisiert, um eine gleich bleibende, reproduzierbare Erregerkonzentration für die verschiedenen Experimente zu erhalten, da davon ausgegangen werden muss, dass die Erregerkonzentrationen zwischen den einzelnen Tieren vermutlich Schwankungen aufweisen.

Für die Bodeninkubationsexperimente wurden jeweils ca. 2 ml Homogenat (entspricht 1 g Gehirnmateriale) mit 20 g Boden vermischt (5 %). Als Boden wurde der sehr gut charakterisierte Borstelboden verwendet. Der für die Versuchszwecke eingesetzte Lysimeter ist ebenfalls mit diesem Boden gefüllt. Vor Versuchsbeginn wurde dieser mit Grassamen eingesät, um reale Bedingungen einer Weide zu simulieren. Die Gehirn/Boden-Mischungen wurden in speziell angefertigte Gazesäckchen überführt, in mit Boden gefüllten Drahtkörben in den Lysimeter vergraben und wieder mit Boden bedeckt. Die Gazesäcke verblieben für die Versuchsdauer in einer Tiefe von ca. 20 cm. An verschiedenen Zeitpunkten erfolgte daraufhin die Probennahme.

4.3 Bioassay

4.3.1 Durchführung der praktischen Versuche

Um die Infektiosität im Bioassay zu belegen, wurden 2 Gruppen von je 12 Tieren untersucht (syrische Hamster ca. 90 Tage alt). Zum einen wurden Tiere mit geringen Bodenmengen (entnommen aus den Lysimetern, siehe 3.4.2) über einen Zeitraum von ca. 10 Wochen gefüttert (je Applikation 50 bzw. 100 mg Boden mit Futter vermischt, insgesamt 12 Verfütterungen, Gesamtmenge Boden pro Tier = 1150 mg). Zum anderen wurden wässrige Extrakte, (kontaminierter Boden entnommen aus den Lysimetern 3.4.2, mit Wasser vermischt und anschließend zentrifugiert. Überstand wurde zur Applikation eingestetzt) auf das Futter aufgetropft und ebenfalls im genannten Zeitraum verfüttert (je Applikation 50 bzw. 100 µl Bodenextrakt mit Futter vermischt) insgesamt 12 Verfütterungen, Gesamtmenge Bodenextrakt pro Tier = 1150 µL). Die wässrigen Extrakte wurden dadurch gewonnen, dass der kontaminierte Boden (jeweils 5g) aus dem Lysimeter (Monat 26 und Monat 29) mit 5 mL dest. Wasser versetzt wurde anschließend geschüttelt und 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde für die orale Applikation eingesetzt.

Die Bodenproben sowie die wässrigen Extrakte wurden zwischen den Applikationen bei -20°C gelagert.

Um die Infektion durch Scrapie zu belegen, wurden die auffälligen Tiere jeweils getötet und das Gehirn mittels Westernblot auf Prionen untersucht. Als Kontrolle wurden bzw. werden (Stand Mai 2007) zur Zeit 3 Gruppen von jeweils 6 Tieren gehalten. Eine Kontrollgruppe erhielt unkontaminierten Boden über den entsprechenden Zeitraum. Die zweite Kontrollgruppe erhielt in entsprechenden Konzentrationen nicht-kontaminierten Bodenextrakt. Als weitere Kontrolle werden 6 Tiere gehalten, die nicht behandelt werden.

Bemerkung:

Zu erwähnen ist, dass aufgrund des **begrenzten zur Verfügung stehenden Forschungsetats** dieser Versuch - aufgrund der geringen Tierzahlen - nur als Screeningversuch zu betrachten ist und aufgrund dessen, statistischen Anforderungen nur begrenzt genügen kann.

Auf die Methodik der vom Robert Koch-Institut und Friedrich-Löffler-Institut u.a. für die Durchführung der Bestätigungsversuche sei auf Seidel et al. 2007 [1] bzw. die entsprechende Originalliteratur verwiesen.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Laborversuche

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Detektion der Proteine im Westernblot-Verfahren mittels ECL-Entwicklung.

5.1.1 Untersuchung des Testmaterials

Rekombinantes Prion-Protein

Um die Nachweisgrenze des verwendeten 6H4-Antikörpers zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Prion-Proteins eingesetzt. Abbildung 17 zeigt die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen des rec-HaPrP. Die Visualisierung erfolgte mittels sekundären HRP-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper. Es ist zu erkennen, dass bis zu 1 ng detektierbar ist. Entsprechend des Molekulargewichtes des rekombinanten Proteins erfolgte die Detektion bei ca. 23 kDa. Die Empfindlichkeit des Testverfahrens reicht letztendlich aus, bis ca. 100 pg rec-HaPrP zu detektieren. Allerdings ist die Bandenintensität zu gering, um diese mit einem Scanner zu erfassen (ohne Abbildung).

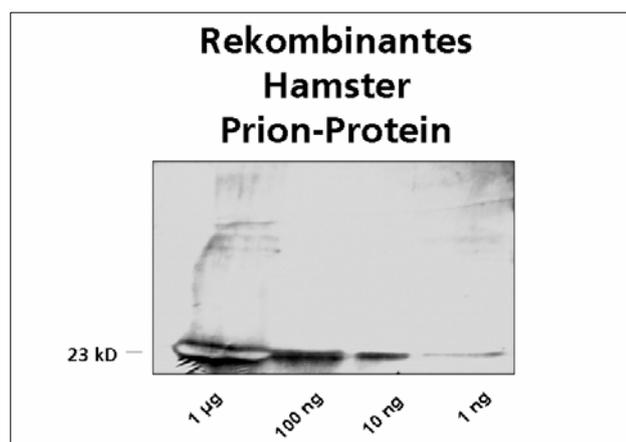


Abbildung 17: Analyse von rekombinatem Prion-Protein mit anti-Prion-Protein Antikörper (6H4). Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3).

Schweinegehirn

Gehirn enthält - speziesunabhängig - natürlicherweise nicht-pathogene Prion-Proteine. Für erste Testversuche wurde deshalb als Kontrolle Schweinegehirn analysiert.. Abbildung 18 zeigt das typische Prion-Protein-Muster. Die Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten beruhen auf einem unterschiedlichen Glykosylierungsmuster des natürlich vorkommenden Prion-Proteins.



Abbildung 18: Prion-Protein-Nachweis in Schweinegehirnhomogenat. 6H4 Antikörper. Alkalische Phosphatase-Entwicklung

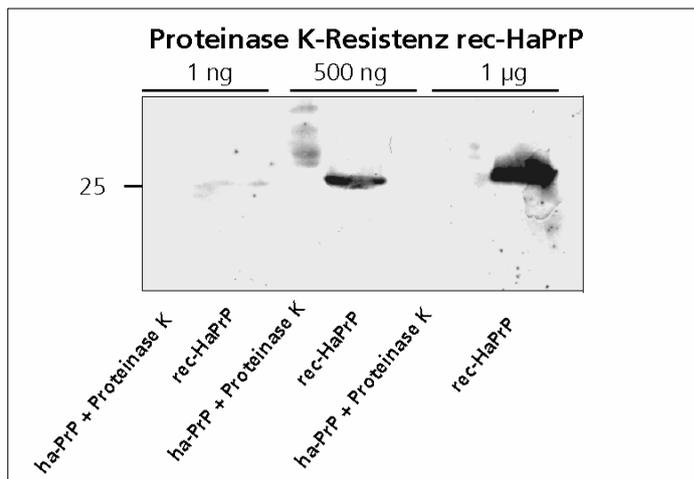


Abbildung 19: Sensitivität des rec-HaPrP gegen Proteinase K.

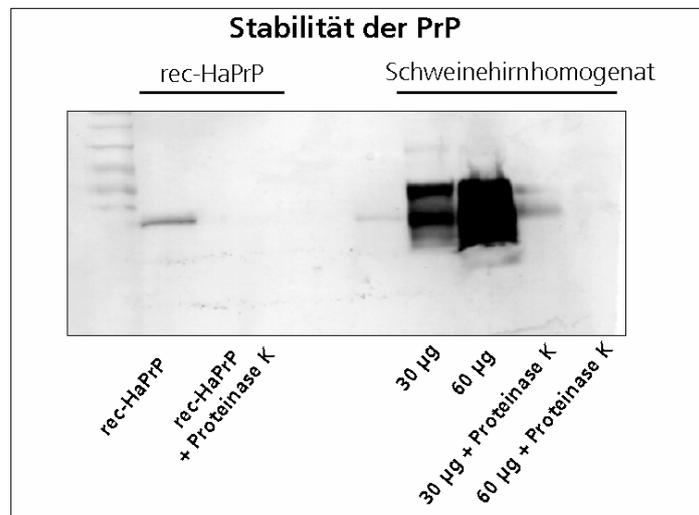


Abbildung 20: Untersuchung der Proteinase K-Sensitivität von porcinen PrP (rec-HaPrP als Kontrolle). Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3). Marker: Sigma Prestained

Abbildungen 18-20 zeigen deutlich, dass das porcine Prion-Protein, sowie das als Kontrolle aufgetragene rec-HaPrP Proteinase K-sensitiv sind. Nach der Inkubation mit Proteinase K tritt ein vollständiger Verdau der Proteine auf. (Bemerkung: Schwache Banden, die bei "30 µg + Proteinase K" zu beobachten sind, sind auf Überlaufen der unverdauten Proteinprobe zurückzuführen).

5.1.2 Erste Bodeninkubationsversuche und Verifizierung der Extraktionsmethoden

Von großer Bedeutung war die Überprüfung, welche Puffer für die Extraktion von Proteinen aus Boden geeignet waren. Zusätzlich wurde als Extraktionsmittel lediglich Wasser getestet. Für diese Untersuchungen wurden jeweils 0,5 g LUFA 2.2 Boden zum einen mit rec-HaPrP sowie zum anderen mit jeweils 100 µl einer 10 %igen Schweinegehirnhomogenatlösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die verschiedenen Puffer (siehe Tabelle 12) auf ihre Wirksamkeit getestet.

Um herauszufinden, welches Puffersystem geeignet ist, wurde für die ersten Testversuche autoklavierter Boden eingesetzt, dem zusätzlich noch Proteinase-Inhibitoren zugesetzt wurden. So konnte die Proteinase-Aktivität im Boden fast vollständig unterdrückt werden. Dies war von Bedeutung, um bei Versuchen mit

Proteinase-sensitiven Proteinen (Schweinegehirnhomogenat; rec-HaPrP) keine Abbau-Reaktionen zu erhalten, wodurch die Beurteilung der Extraktionsfähigkeit der verschiedenen Puffer fehlerhaft gewesen wäre.

Die Inkubation erfolgte anfangs lediglich für 1 h. Bereits während dieser Zeit fanden entsprechende Boden-Protein-Interaktionen statt, da bereits nach dieser Zeitspanne eine Protein-Eluation mit 200 µl Wasser nicht mehr gelang (Abbildung 21). Die Extraktion der Proteine erfolgte jeweils durch Zugabe von 200 µl der zu untersuchenden Puffer und intensiven Durchmischens. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen (ca. 70 µl), ein Teil mit Probenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch analysiert. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Anwendung eines SDS-Puffers mit einem Anteil von 1 % Natriumdodecylsulfat die effizienteste Protein-Eluation ermöglicht. Überraschenderweise zeigen andere Puffer, die z.T. als sehr wirksam in der Prion-Protein-Extraktion aus Gehirnprouben beschrieben sind, in der Matrix Boden nur eine sehr geringe Extraktionsrate. Auch Puffer, die allgemein zur Extraktion von Proteinen aus Geweben beschrieben sind, wie z.B. NOP- oder RIPA-Puffer, zeigen im Boden kaum eine Wirksamkeit (Abbildung 21). Darüber hinaus ist zu beobachten, dass unterschiedliche Puffer die verschiedenen Glykosylierungsformen des Prion-Proteins unterschiedlich extrahieren, was zu verschiedenen Bandenmustern führt. Während die Anwendung des SDS-Puffers zur der Detektion der typischen Prion-Protein-Doppelbande führt, ist beispielsweise bei der Extraktion mit Triton X-100 nur die vom Molekulargewicht geringere Isoform vorhanden (Abbildung 21).

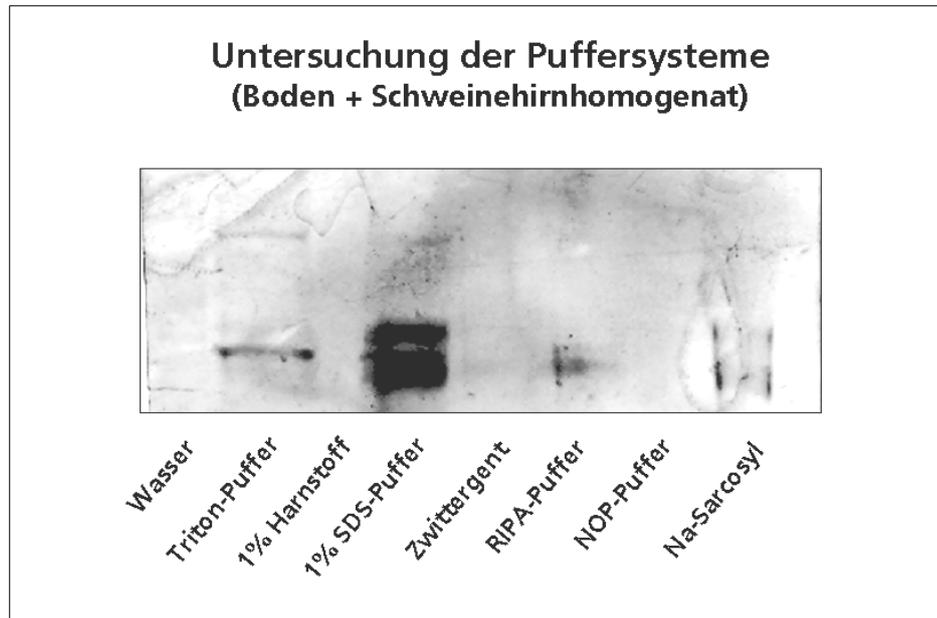


Abbildung 21: Analyse der Puffersysteme: Jeweils 100 μ l 10%ige Schweinegehirnhomogenat-Lösung wurde mit 0,5 g Boden versetzt und für 1h bei 4°C inkubiert.

Nachdem die Untersuchung der verschiedenen Puffer gezeigt hatte, dass die Extraktion der PrP mit einem SDS-Puffer bzw. 1%ige SDS-Lösung (ohne Abbildung) am effizientesten war, wurden weitere Inkubationsversuche mit Boden durchgeführt. Hierzu wurde 0,5 g Boden zum einen mit 10 ng bis 100 ng rec-HaPrP versetzt sowie zum anderen mit 100 μ l Schweinegehirnhomogenat, wobei 100 μ l einer 10 %igen Schweinegehirnhomogenat-Lösung zugegeben wurde (entspricht 1 mg Gehirn). Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μ l SDS-Puffer. Die Puffer-Probenmischung wurde mittels "Vortexer" durchmischt, 1 h geschüttelt und daraufhin für 10 min/13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (ca. 70 μ l), davon wurden 30 μ l mit $\frac{1}{4}$ Volumen SDS-Probepuffer versetzt, aufgekocht und gelelektrophoretisch analysiert.

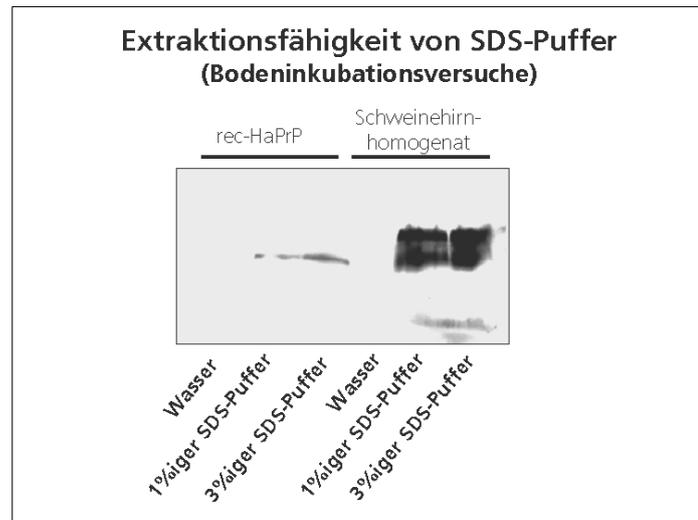


Abbildung 22: Bodeninkubationsversuche: 100 ng rec-HaPrP und 100 µl 10%ige Schweinegehirnlösung wurden für 1 h in 0,5 g LUFA 2.2 Boden inkubiert (25 °C). Anschließend erfolgte Extraktion mit Wasser und SDS-Puffer. Repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3).

Abbildung 22 zeigt, dass sowohl das rec-HaPrP als auch das porcine PrP aus dem Boden mittels SDS-Puffer bzw. SDS-Lösung extrahiert werden können. Die Verwendung unterschiedlicher SDS-Konzentrationen im SDS-Puffer hatte – bei den vorliegenden Bedingungen –, keinen Einfluss auf die Extraktionsfähigkeit ausübt. Während im Falle des rec-HaPrP die übliche scharfe Einzelbande zu erkennen ist, ist bei der Analyse des Schweinegehirnhomogenats wieder die Prion-Protein-typische Doppelbande nachweisbar. Als Extraktionskontrolle wurde dest. Wasser eingesetzt, wobei zu erkennen ist, dass weder das rec-HaPrP noch das porcine PrP dadurch extrahierbar sind bzw. die Konzentration der extrahierten Prionen unter der Nachweisgrenze des Testverfahrens liegt.

5.1.3 Inkubationsversuche über einen Zeitraum von 42 Tagen

Um zu überprüfen, ob mit steigender Zeitdauer möglicherweise eine stärkere Bindung der Prion-Proteine an die Bodenmatrix erfolgt, wurden Inkubationsversuche über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Die Inkubation erfolgte mit sterilem Boden bei 4°C unter Zugabe von Proteinase-Inhibitoren (Trasyolol und Pefabloc), wobei Pefabloc alle 24 h zugegeben wurde. Unter diesen Bedingungen war es möglich, die Proteinase-Aktivität effizient zu unterdrücken. Anschließend erfolgte wiederum Extraktion mittels SDS-Puffer (1%ig).

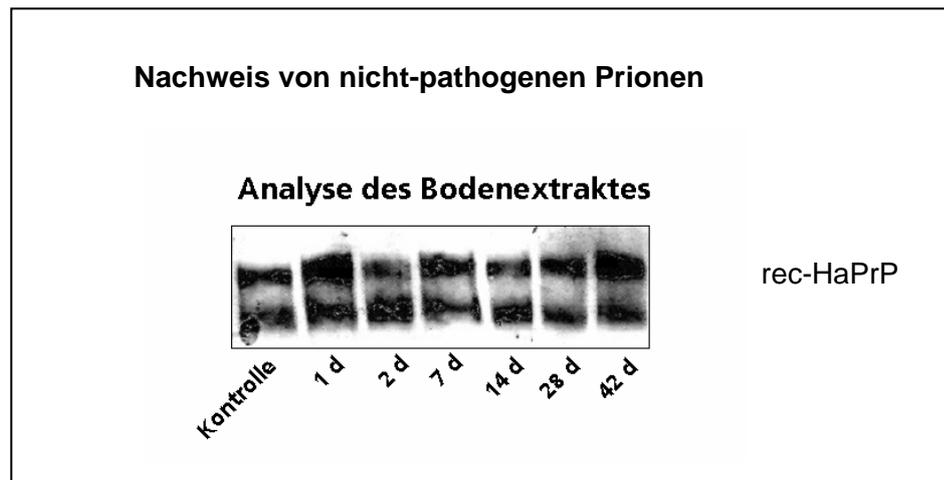


Abbildung 23: Bodeninkubationsversuche über verschiedene Zeiträume: 100 μ l Schweinegehirnhomogenat in 0,5 g Boden (4°C + Proteinase-Inhibitoren). Extrahiert mit 1%igem SDS-Puffer (200 μ l). Blot von drei unabhängigen Versuchsansätzen (n=3). Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

Abbildung 23 zeigt, dass selbst nach einer Inkubationsdauer von 42 Tagen das porcine Prion-Protein noch zu einem großen Prozentteil extrahierbar ist. So legt der Versuch dar, dass sogar nach einer langfristigen Protein-Boden-Interaktion das Protein mittels SDS-Puffer hervorragend aus der Matrix Boden herausgelöst werden kann, sofern ein Abbau durch die Zugabe von Proteinase-Inhibitoren verhindert werden kann. Darüber hinaus ist sichtbar, dass trotz der langfristigen Inkubation aufgrund der gewählten Inkubationsbedingungen (4°C) und der Zugabe von Proteinase-Inhibitoren dies nicht zu einem Abbau der Proteine führt. Deutlich zu erkennen ist die Auftrennung in die für die Prion-Protein typische Doppelbande. Die Ergebnisse belegen, dass zur Extraktion der Proteine aus der Matrix Boden der SDS-Puffer die Methode der Wahl repräsentiert.

Nachweis von Markerproteinen

Zur Kontrolle der Extraktionseffizienz wurden die Bodenlysate auf andere geirnspezifische Anteile untersucht. Zur Verwendung kam ein Antikörper gegen das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Das GFAP ist als Intermediärfilament-Protein insbesondere in Astrozyten präsent und kann somit als Kontrolle dafür dienen, ob die entsprechende Extraktionsmethode bezüglich der Isolation von Gehirnbestandteilen erfolgreich war. Darüber hinaus spielen die GFAP-enthaltenen Astrozyten auch bei Prionenkrankheiten vermutlich eine wichtige Rolle, so dass deren Analyse im weiteren Projektverlauf von Bedeutung sein kann.

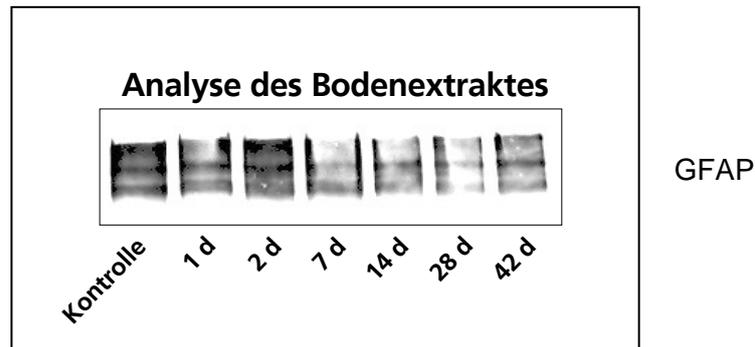


Abbildung 24: Analyse des Glial Fibrillary Acidic Proteins (GFAP) aus Bodenextrakten nach verschiedenen Zeitabständen. Inkubation mit 100 μ l Schweinegehirnhomogenat. Extraktionspuffer 1% SDS. Alkalische Phosphatase Entwicklung. Repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchsansätzen. ECL-Entwicklung.

Die Ergebnisse zeigen auch hier, dass ein sehr großer Anteil von GFAP selbst nach 42-tägiger Inkubation von Schweinegehirnhomogenat im Boden mittels SDS-PAGE nachweisbar ist, sofern Proteinase-Inhibitoren zugesetzt werden. Analog zu den Versuchen mit Prion-Proteinen, ist nur eine geringe Abnahme des GFAP-Gehaltes zu erkennen (Abbildung 24). Werden keine Proteinase-Inhibitoren zugegeben, ist bereits nach einem Tag Inkubationsdauer das GFAP abgebaut (ohne Abbildung).

Zusätzlich zur Analyse des GFAP wurde als Marker β -Actin analysiert. β -Actin ist Teil des Cytoskeletts und ist Bestandteil aller eukaryontischen Zellen. In Muskelzellen macht der Actinanteil 10 % der gesamten Zellproteine aus, wobei das Actin überwiegend als β -Actin vorliegt. In den übrigen Zellen beträgt der Actingehalt 1 % bis 5 % - gemessen am Gesamtproteingehalt - und es wird überwiegend β -Actin exprimiert. Aufgrund der hohen Verbreitung und der zwischen den Spezies hohen Homologie wird β -Actin häufig als sogenanntes "Housekeeping-Gen" analysiert. β -Actin weist ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa auf.

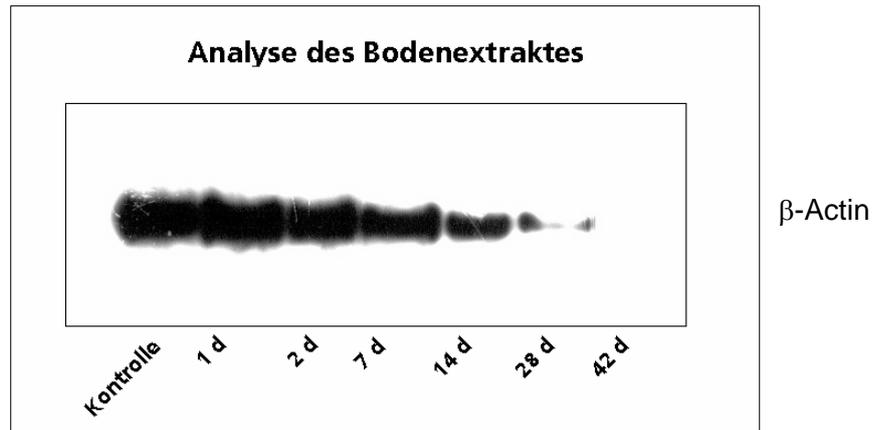


Abbildung 25: Analyse des β -Actins aus Bodenextrakten nach verschiedenen Zeitabständen. Inkubation mit 100 μ l Schweinegehirnhomogenat. Extraktionspuffer 1% SDS. Repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchsansätzen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich (Abbildung 25), dass der Gehalt im Laufe der Inkubationsdauer - trotz vorhandener Inhibitoren - stetig abnimmt. Nach 42 Tagen ist nur bei längerer Expositionszeit der Röntgenfilme (> 5 min) eine schwache Actin-Bande zu erkennen (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu war in Bezug auf das rec-HaPrP nahezu keine und in Bezug auf GFAP nur eine moderate Abnahme zu erkennen (Abbildung 25). Unabhängig der beobachteten Abnahme zeigen die Ergebnisse die Wirksamkeit des eingesetzten SDS-Extraktionspuffers, der auch nach 42-tägiger Inkubation gehirnspezifische Proteine zu extrahieren vermag.

5.1.4 Untersuchung des murinen Kontrollmaterials

Zusätzlich zur Untersuchung des Schweinegehirnhomogenates wurde als Kontrollmaterial nicht-infektiöses, 10%iges murines Gehirnhomogenat eingesetzt, das vom TSE-Resource-Centre bezogen wurde.

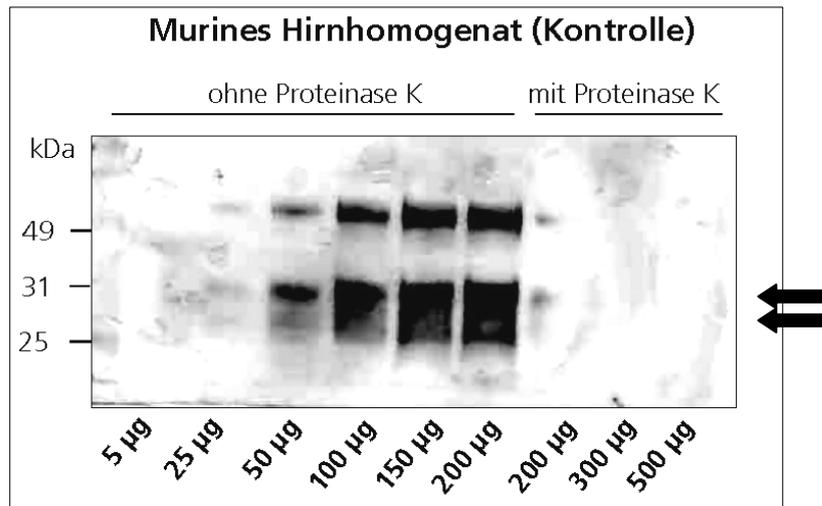


Abbildung 26: Untersuchung von murinem Kontrollmaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt), stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Auftragsmenge auf Gesamtgehirnanteil berechnet. Drei Gehirnhomogenatlösungen in unterschiedlicher Menge wurden zusätzlich mit Proteinase K behandelt. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

Zur Austestung der Antikörper-Sensitivität, wurden verschiedene Konzentrationen des Gehirnhomogenates mittels Westernblot unter der Verwendung von anti-PrP Antikörpern analysiert. Hierzu wurden 1/10 Verdünnungen der 10%igen Lösungen hergestellt und untersucht.

Von den 1/10 Verdünnungen des Homogenats, wurden verschiedene Volumina entnommen, mit 2x Ladepuffer versetzt und 10 min aufgekocht. Ein Teil der unverdünnten Homogenatlösung wurde mit Proteinase K-Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nachfolgend sind die Volumina aufgeführt, die auf das Gel zur Elektrophorese pipettiert wurden (Tabelle 14). Dies entspricht der aufgetragenen Menge an Gehirnmaterial:

Tabelle 6: Aufgetragene Volumina

Pipettiertes Volumen [µl]	Menge an Hirn [µg]
1	5
5	25
10	50
20	100
30	150
40	200
Pipettiertes Volumen [µl], Proteinase K-behandelt, unverdünntes Homogenat	Menge an Gehirn [µg], Proteinase K-behandelt unverdünntes Homogenat
4	200
6	300
10	500

In Abbildung 26 sind die aufgrund des unterschiedlichen Glykosylierungsmuster vorhandenen Prion-Protein-typischen Banden deutlich zu erkennen. Der Blot zeigt, dass sich die untere Bande wiederum in zwei Einzelbanden auftrennt (Abbildung 26, Pfeile). Die Gehirnproben, die mit Proteinase K behandelt wurden, zeigen wie erwartet keine positive Reaktion mit dem anti-Prion-Protein-Antikörper, da das natürliche murine PrP durch Proteinase K vollständig zerstört wird.

5.1.5 Untersuchung des infektiösen Gehirnmaterials

Analog zur Untersuchung des murinen Kontrollmaterials wurde das vom TSE-Resource-Centre in England bezogene Scrapie-infizierte Hamsterehirnhomogenat analysiert. Auch hier wurden entsprechende Verdünnungen bzw. Mengen des unverdünnten Materials gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem 6H4-Antikörper beprobt. Nachfolgend sind auch hier die entsprechenden Mengen aufgeführt, die mittels SDS-PAGE untersucht wurden (Tabelle 15).

Tabelle 7: Aufgetragene Volumina

Pipettiertes Volumen [µl]	Menge an Gehirn [µg]
1	5
5	25
10	50
20	100
30	150
40	200
Pipettiertes Volumen [µl] Proteinase K-behandelt Unverdünntes Homogenat	Menge an Gehirn [µg] Proteinase K-behandelt Unverdünntes Homogenat
4	200
6	300
10	500

Abbildung 27 zeigt deutlich, dass im nicht mit Proteinase K-behandelten Gehirnhomogenat die typischen Prion-Protein-Banden nachgewiesen werden können. Deutlich ist allerdings auch eine geringere Bandenintensität der Banden im Vergleich zur Analyse des murinen Kontrollmaterials zu erkennen.

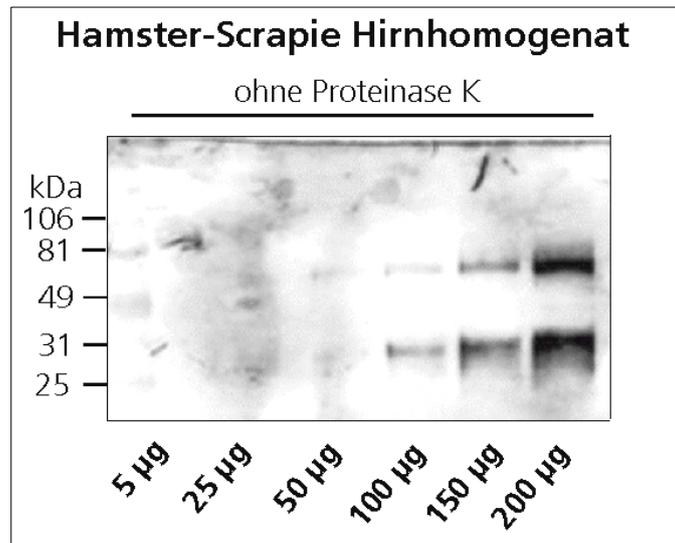


Abbildung 27: Untersuchung von infektiösem Hamstermaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt), stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Auftragsmenge auf Gesamtgehirnanteil berechnet. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

Die Bandenintensität der mit Proteinase-K behandelten Proben war so gering, dass diese getrennt voneinander eingescannt wurden, um so das Signal entsprechend zu verstärken (Abbildung 28).

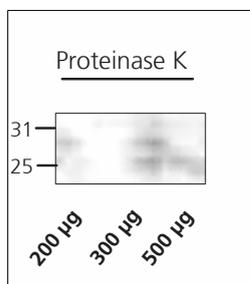


Abbildung 28: Nachweis von PrP^{Sc} in Hamstergehirnhomogenat nach Proteinase K-Behandlung. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

Trotz der sehr schwachen Bandenintensität zeigen die Ergebnisse, dass bei den entsprechend eingesetzten Gehirnmengen, die mit Proteinase K behandelt wurden, Banden im Bereich von ca. 27-30 kDa zu erkennen sind und keine vollständige Proteinzerstörung erfolgt. Dieser Teil repräsentiert den Proteinase-K-resistenten Teil des pathogenen Prion-Proteins. Die Banden sind im Vergleich zu natürlichen Prion-Protein-Banden von der Intensität relativ schwach, allerdings zeigt der Vergleich des Ansatzes mit dem entsprechenden murinen Gehirnmateriale (Abbildung 26), dass es sich bei den Banden um das pathogene PrP handelt und nicht um unspezifische Artefaktfärbungen. Aufgrund der äußerst geringen Menge an infektiösem

Probenmaterial konnten diese Versuche nicht wiederholt werden, da der Hauptanteil des infektiösen Materials für die Bodeninkubationsversuche benötigt wurde.

5.1.6 Inkubationsversuche über 8 Wochen im Labormaßstab

Bei den Inkubationsversuchen über längere Zeit, wurden die entsprechenden Gehirnhomogenate in 0,5 g Boden über einen Zeitraum von bis zu 8 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachweis von pathogenen Prionen

In den letzten Versuchen wurde infektiöses Gehirnmaterial mit dem LUFA 2.2 Boden über verschiedene Zeiträume inkubiert und der Gehalt an möglicherweise vorhandenem pathogenem PrP mittels SDS-PAGE analysiert. Wie erwähnt, war die Menge an pathogenem Material äußerst gering, so dass lediglich Doppelbestimmungen von drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Die Inkubationsversuche wurden bei RT (22 °C) in unsterilem LUFA 2.2 Boden durchgeführt, um die mikrobiologischen Lebensgemeinschaften nicht zu verändern.

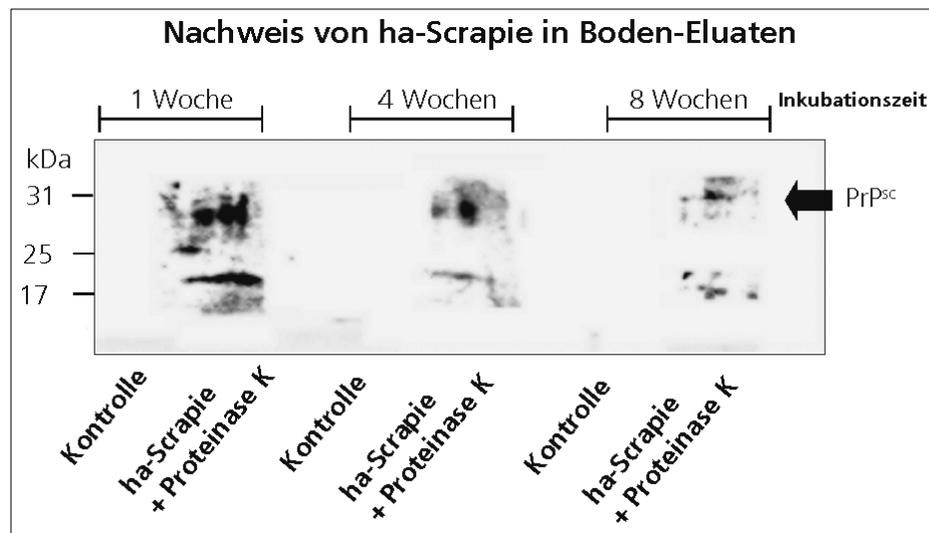


Abbildung 29: Untersuchung von infektiösem Hamstermaterial (10% Gehirnhomogenatlösung 1/10 verdünnt; stabilisiert in 0,9% NaCl-Lösung. Nach Bodeninkubationsversuchen. 0,5 g Boden wurde mit 200 µl verdünntem Gehirnhomogenat versetzt (entspricht 2 mg Gesamtgehirn). Nach entsprechender Inkubationszeit erfolgte Extraktion mittels 1%igem SDS-Puffer. Antikörper 6H4.

. Abbildung 30 zeigt, dass nach 1-wöchiger Inkubationszeit das pathogene PrP mit einem Molekulargewicht von ca. 27-30 kDa nachgewiesen werden kann. Der Blot zeigt, dass es sich hier wiederum nur um ein sehr schwaches Signal handelt. Um bei diesem

Test empfindlicher zu sein, wurde der Blot vor der alkalischen Phosphatase-Entwicklung (AP-gekoppelter 2. Antikörper) mit einem 2. HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert und mittels ECL-Entwicklung nachgewiesen. Allerdings brachte auch diese Methode keine stärkeren Signale. Trotz der schwachen Banden ist zu erkennen, dass sowohl nach 4 bzw. 8 Wochen pathogenes PrP noch aus dem Boden extrahierbar ist. Aufgrund der schwachen Färbungen ist eine Aussage über einen möglichen Abbau schwer möglich. Als Kontrolle wurde murines Gehirn mit Boden inkubiert. Wie zu erwarten, konnten hier aufgrund der hohen Proteinase-Aktivität im Boden bereits nach einem Tag keine Proteine mehr nachgewiesen werden

Nachweis von Markerproteinen

Als Markerprotein wurde GFAP analysiert. GFAP wird - wie eingangs erwähnt - teilweise als Marker für das ZNS verwendet. Abbildung 30 legt dar, dass - wie erwartet - in murinem als auch im Hamstergehirnhomogenat, das nicht mit Boden inkubiert wurde, GFAP nachweisbar ist, allerdings mit deutlich geringerer Bandenintensität aufgrund der Spezifität des Antikörpers. Bereits nach 1-tägiger Inkubation des jeweiligen Gehirnmaterials mit unsterilen Boden konnte GFAP durch Degradation nicht mehr detektiert werden. Es wurden jeweils Inkubationsversuche von nicht-infektiösem murinen Gehirn und infiziertem Hamstergehirn analysiert. Die im Vergleich zu Abbildung 25 wesentlich geringeren Bandenintensitäten beruhen auf der geringeren Bindungsaffinität des anti-GFAP Antikörpers gegen die Spezies Maus und Hamster.

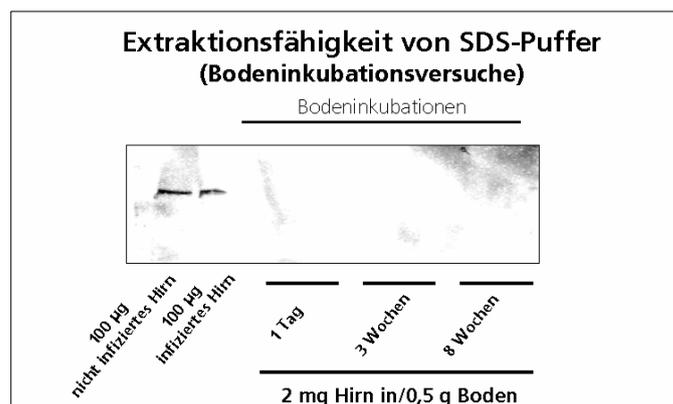


Abbildung 30: Die Untersuchung von GFAP als Marker für neuronales Gewebe zeigt, dass GFAP bereits nach einem Tag Inkubation des Gehirns im unsterilen Boden nicht mehr nachweisbar ist.

5.2 Ergebnisse der Freilandversuche

Bei den Westerblotanalysen zur Untersuchung der Freilandproben wurde ausschließlich der Antikörper MAB 1562 (Klon 3F4) der Firma Chemicon eingesetzt. Die Detektion erfolgte – wenn nicht anderes angegeben – mittels ECL-Entwicklung.

5.2.1 Zeitpunkte der Probennahme

Insgesamt erfolgten acht Probenahmen über einen Zeitraum von 26 Monaten.

Tabelle 16: Zeitpunkte der Probennahmen

Probennahme Nr.	Probennahmezeitpunkt	Probennahmedatum
1.	Tag 0 *	Juni 2003
2.	Tag 30 * (Monat 1)	Juli 2003
3.	3 Monate	September 2003
4.	6 Monate	Dezember 2003
5.	12 Monate	Juni 2004
6.	18 Monate	Dezember 2004
7.	21 Monate	März 2005
8	26 Monate	August 2005
9.	29 Monate	November 2005

Die Probenansätze erfolgten aufgrund der begrenzten Menge an pathogenen Material lediglich mit n=1 bzw. max. n=3.

5.2.2 Austestung der Nachweisempfindlichkeit

Zum Nachweis der PrP wurde ein modifizierter sensitiver Westernblot angewendet. Unsere Ergebnisse mit reinen Gehirnhomogenaten zeigten, dass diese Methode jedoch nicht ohne größere Anpassungen übernommen werden konnte. Problembehaftet war, dass bezüglich der Nachweisempfindlichkeit auch bei den reinen Gehirnproben mit dem gleichen Puffersystem gearbeitet werden musste, welches auch zur Bodenextraktion eingesetzt wurde. Inzwischen konnte für die Gehirnhomogenatproben - unter Verwendung der Bodenextraktionspuffer - ein System etabliert werden, welches eine Nachweisgrenze im Bereich von ca. 20 bis 100 pg PrP^{Sc} aufweist. Es wurde sehr

großer Aufwand betrieben, um das für die Problemstellung bestmögliche Detektionsverfahren herauszufinden. Beim Westernblot-Verfahren stehen mittlerweile ca. 10 verschiedene Prion-Antikörper zur Verfügung. Drei davon wurden auf ihre Eignung näher untersucht. Als geeignet erwiesen sich der Antikörper der Firma Prionics, 6H4 sowie der der Firma Chemicon, MAB1562 (Klon 3F4.) Es wurden ebenfalls verschiedene Sekundär-Antikörper getestet. Als geeignet erwiesen sich die der anti-mouse HRP-conjugated von Pierce sowie der anti-mouse AP-conjugated von Sigma-Aldrich.

5.2.3 Wiederfindung

In einer ersten Phase wurde die Wiederfindung im Boden (Tag 0) im Vergleich zu reinen Gehirnhomogenatproben untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dem verwendeten Puffersystem eine Wiederfindung von ca. 90 % erreicht wurde, was die sehr gute Extraktionsfähigkeit des eingesetzten Puffersystems belegte (siehe Abbildung 31).

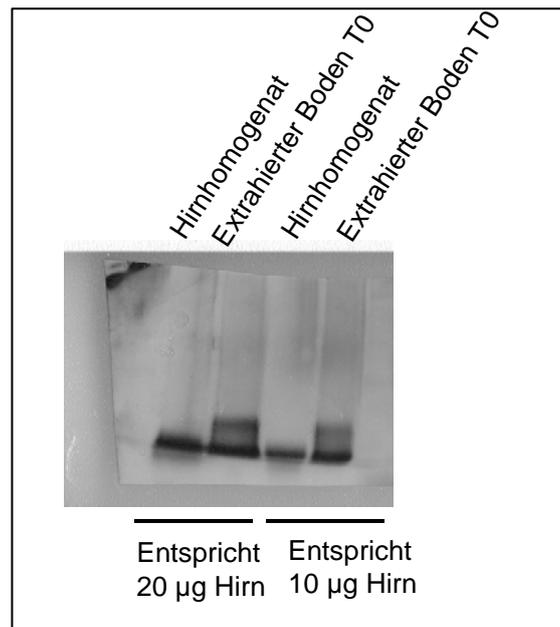


Abbildung 31: Analyse der Wiederfindung. Boden wurde mit Gehirnhomogenat vermischt und anschließend mittels SDS-Puffer extrahiert. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

5.3 Inkubationsversuche

Tag 0 (T₀)

Für diese Versuche wurde 1 g Gehirnhomogenat mit 20 g Boden für ca. 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der enthaltenen Prionen mittels Extraktionspuffer. Die Ergebnisse zeigen eine sehr gute Nachweisempfindlichkeit für die Bodenlysate.

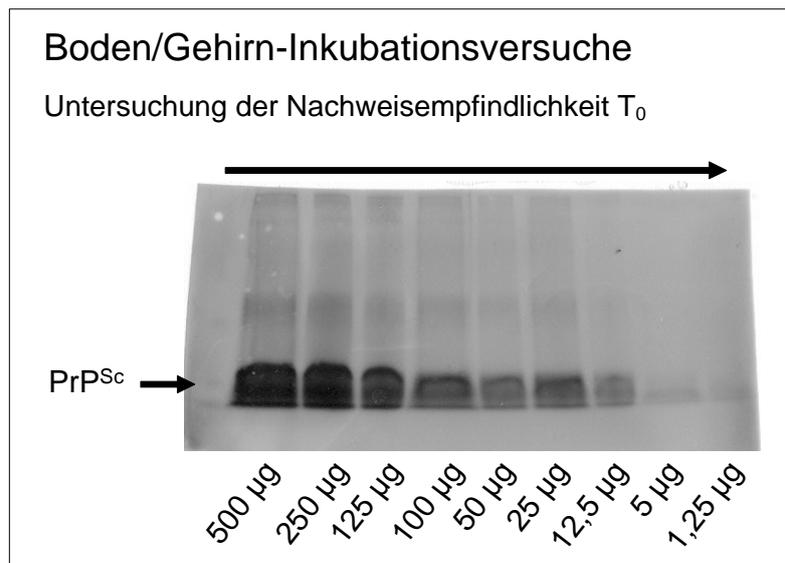


Abbildung 32: Westernblot-Ergebnisse. Untersuchung der Nachweisempfindlichkeit des anti-PrP-Antikörpers (MAB1562, Chemicon). Verdünnungsreihe infizierter Gehirnhomogenate. 1,25 µg Gehirn ist noch detektierbar.

Es wurden entsprechende Verdünnungsreihen angefertigt, wobei 1,25 µg Gehirnäquivalent detektiert werden konnten. Dies entspricht in etwa der Menge von 100 pg an pathogenem Prion-Protein (Abbildung 32).

Monat 1 (M1)

Diese Probennahme erfolgte im Juli 2003. Die Ergebnisse der Westernblotuntersuchungen belegten, dass nach einmonatiger Inkubation Prionen im Gehirn/Boden-Homogenat nachweisbar sind. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass die Konzentration im Vergleich zu T₀ bereits erheblich geringer war. Die Ergebnisse belegen auch, dass aus dem Gazesäckchen selbst Prionen in geringen Konzentrationen extrahiert werden konnten, was auf verbleibende Bodenpartikel zurück zu führen war (Abbildung 33).

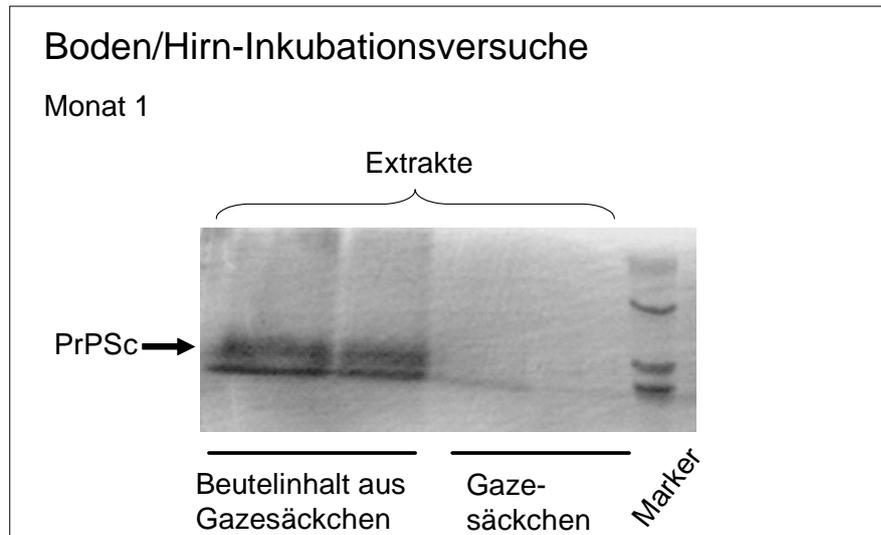


Abbildung 33: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsexperimente. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl nach 1-monatiger Inkubationsdauer Prionen aus dem Boden extrahiert und nachgewiesen werden können. Schwache Banden in den Gazesäckchen-Proben sind auf anhaftende Bodenpartikel zurückzuführen. Alkalische Phosphatase-Entwicklung.

Weitere Beobachtungen

Interessanterweise zeigte sich, dass die Prionen, die an Tag 0 extrahiert wurden, gegen Proteinsase K-Verdau anscheinend äußerst resistent waren, während Prionen, die direkt aus Gehirnllysate analysiert wurden, dies nicht zeigten (siehe Abbildung 34). Bei den reinen Gehirnhomogenaten wird der mit steigender Proteinase K-Konzentration übliche Effekt beobachtet, dass ein Teil des Prion-Proteins zerstört wird und ein resistenter Teil mit einem Molekulargewicht von 27-30 kDa verbleibt. Nach längerer Inkubationsdauer der Boden/Gehirn-Homogenate tritt dieser Effekt nur noch in geringem Umfang auf, da vermutlich im Boden existente Proteinase-K und/oder Mikroorganismen vorhandene Prionen aufspalten. Der Effekt, dass Prionen aus Bodenextrakten sehr stabil gegenüber der Proteinase-K Behandlung bleiben, ist vermutlich auf eine Inaktivierung des Enzyms durch Bodeninhaltsstoffe zurückzuführen.

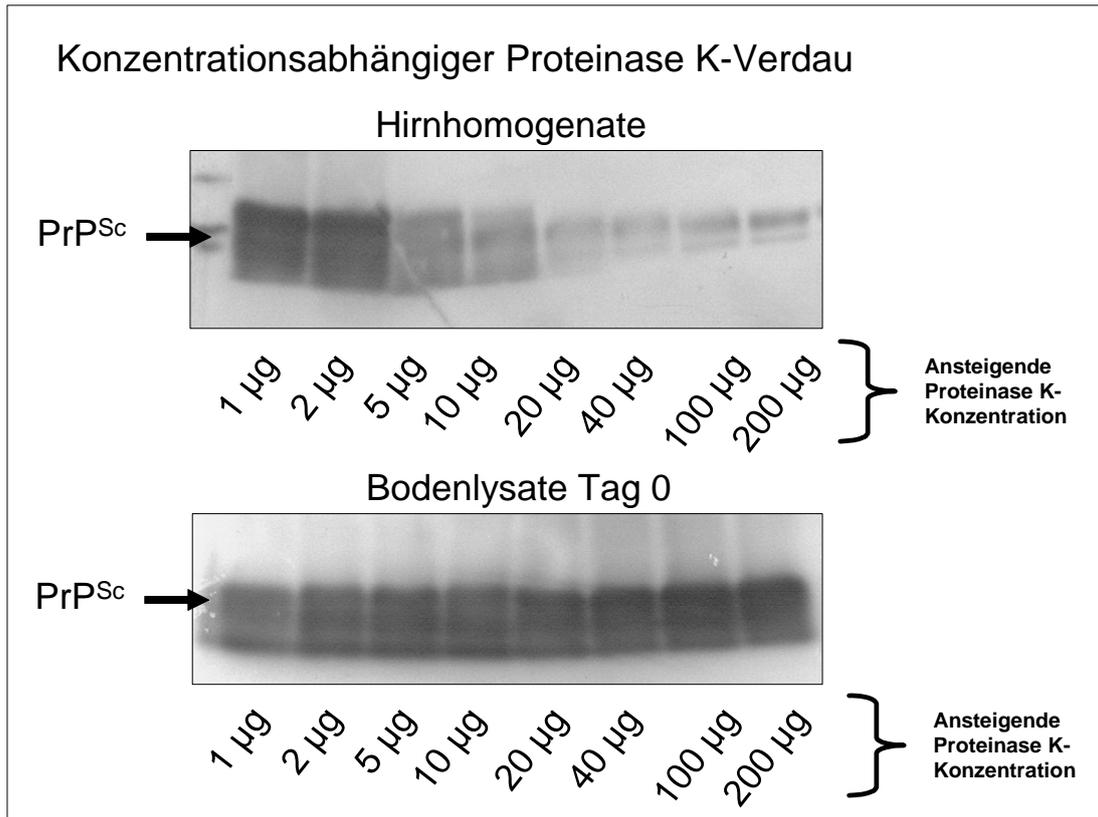


Abbildung 34: Vergleich der Stabilität der Prionen aus Gehirnhomogenaten und Prionen, die aus Bodeninkubationsversuchen extrahiert werden. Unabhängig der eingesetzten Proteinase-K Konzentration bleiben die aus Boden extrahierten Prionen stabil.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die verschiedenen Bodenextrakte mittels Westernblot - unter der Verwendung spezifischer anti-beta-Actin-Antikörper - analysiert. Hier konnte aufgezeigt werden, dass bereits am Tag 0 Actin vorhanden, vollständig degradiert war (Abbildung 35).

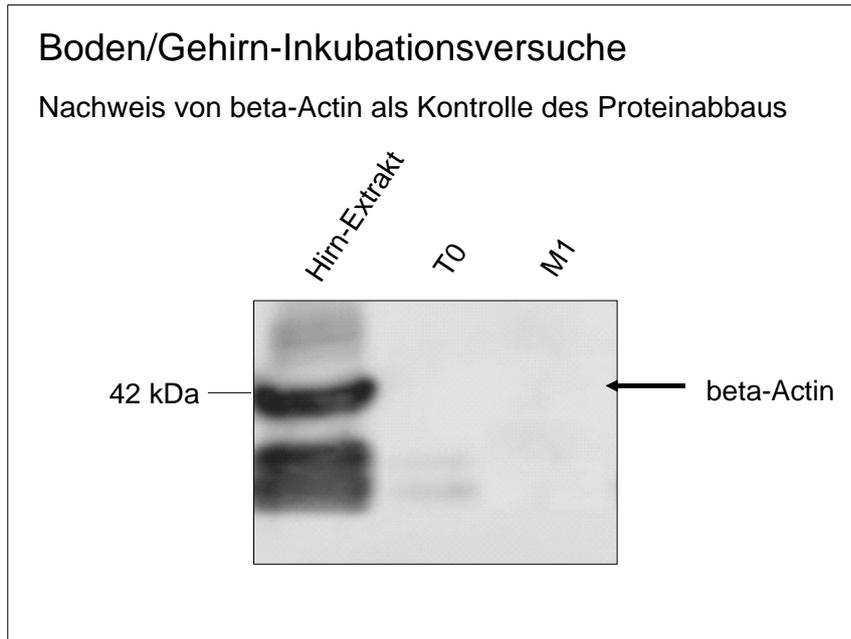


Abbildung 35: Westernblot-Ergebnisse von Boden/Gehirn-Inkubationsversuchen. β -Actin wird innerhalb von 24 h vollständig abgebaut.

5.3.1 Langfristige Inkubationsdauern

Auch nach 3- und 6-monatiger Inkubationsdauer konnten pathogene Prionen deutlich nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass im Vergleich zu der 1-monatigen Inkubationsdauer kaum weitere Abbau- bzw. Bindungsprozesse stattgefunden haben, sondern der Gehalt der PrP^{Sc} nahezu konstant blieb (Abbildung 35).

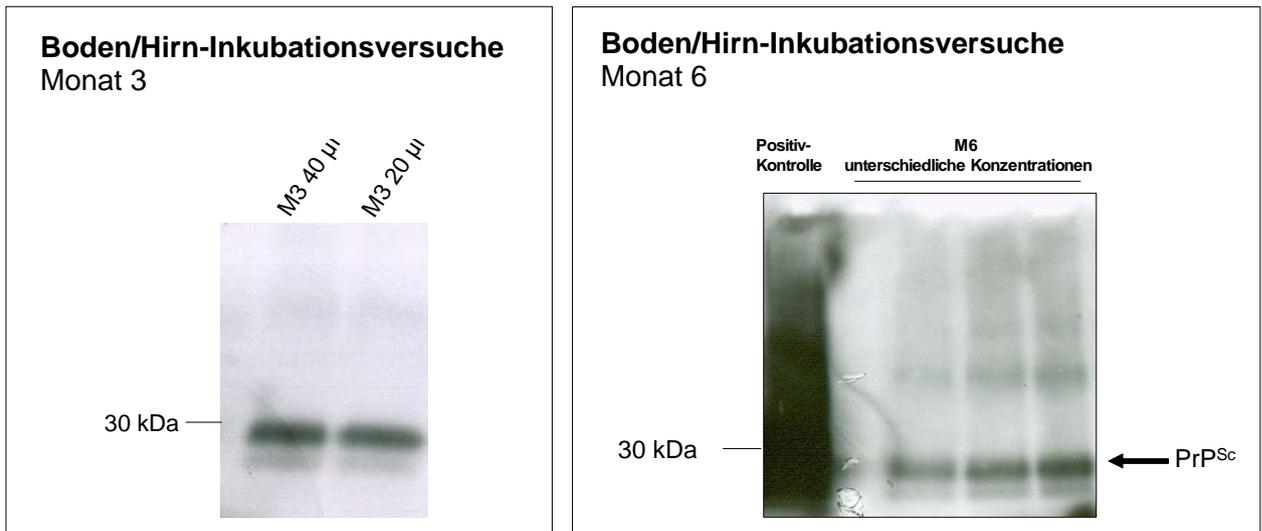


Abbildung 35: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsexperimente. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl nach 3-monatiger und 6-monatiger Inkubationsdauer Prionen aus dem Boden extrahiert werden können



Abbildung 36: Aufnahmen der Probennahme vom 17.12.2003 (Monat 6).

Analog zu den vorherigen Proben erfolgte die Probennahme nach 12 und 18 Monaten Inkubationsdauer. Wie bei den vorher untersuchten Proben wurden noch enthaltene Prionen mittels SDS-Puffer aus dem Boden extrahiert und mittels Westernblot analysiert (ohne Abbildungen).

Nach einjähriger Inkubationsdauer war der Versuchslsylimeter sehr stark bewachsen (siehe Abbildung 37). Die verwendeten Metallkäfige waren stark von Pflanzenwurzeln durchsetzt, wobei die Gazesäckchen aber keinerlei Beschädigung aufwiesen.



Abbildung 37: Probennahme nach 1-jähriger Inkubationsdauer

Im Metallkäfig selbst, wurden zahlreiche Asseln gefunden (Abbildung 37), die im Weiteren Verlauf aufgearbeitet und analysiert wurden. Prionen konnten in den Tieren jedoch nicht nachgewiesen werden.

Intensiv untersucht wurden nach Monat 12 auch die Umgebungsproben außerhalb des Gazesäckchens, um eine mögliche Mobilisierung der Prionen zu analysieren. In diesen Proben konnten keine Prionen nachgewiesen werden.

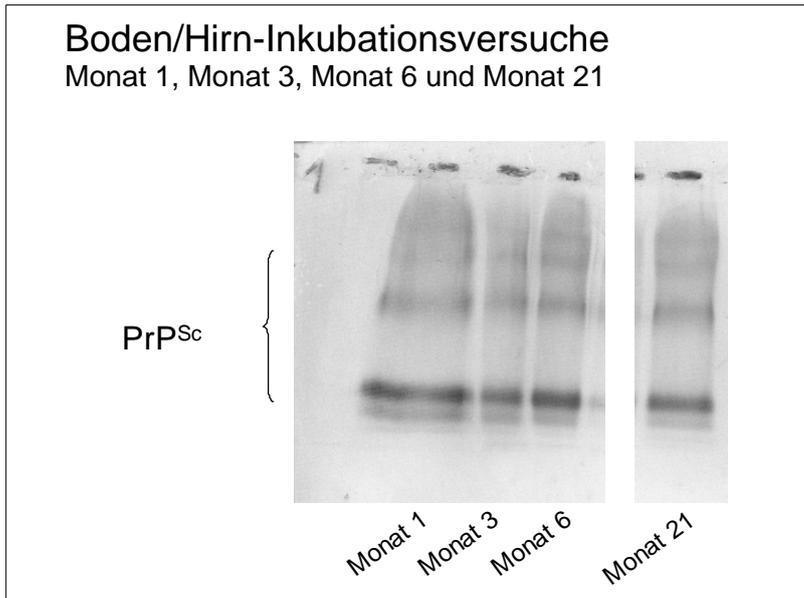


Abbildung 38: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsversuche. Vergleich der Proben Monat 1, Monat 3, Monat 6 und Monat 21. Deutlich zu erkennen ist, dass die Prionenkonzentration über den gesamten Zeitraum relativ konstant bleibt. Alkalische-Phosphatase-Entwicklung.

Analog zu den vorherigen Untersuchungen erfolgten die letzten Probennahmen bei Monat 21, Monat 26 (Abbildungen 38 und 39) und Monat 29 (Abbildung 49). Auch in diesen Proben wurden Prionen nachgewiesen.

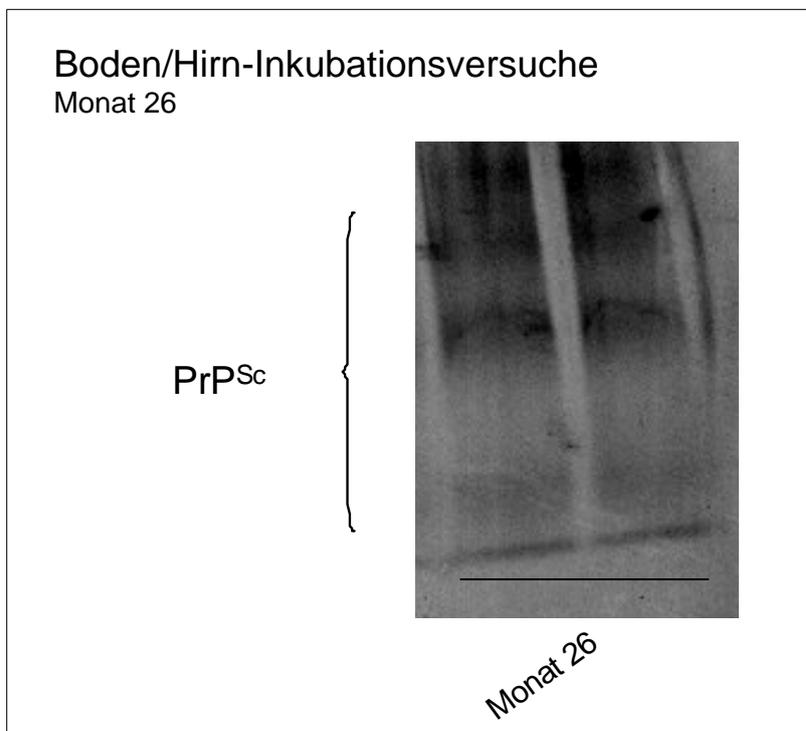


Abbildung 39: Westernblot-Ergebnisse der Boden/Gehirn-Inkubationsversuche. Probennahme nach 26 Monaten.

5.3.2 Inkubationsversuche mit Bodenbakterien

Zusätzlich wurden Inkubationsversuche mit Bodenbakterien und reinem Gehirnhomogenat durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Bakterien einen Abbau der Prionen bewirken. Für die Untersuchungen der Stabilität des Prion-Proteins in Gegenwart von isolierten Bodenbakterien wurde reines Gehirnhomogenat mit Bodenbakterien (nicht näher differenzierte Mischkultur; Bakterienkultur in Flüssigmedium, ohne Boden!) versetzt und über einen Zeitraum von 21 Tagen bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 21 Tagen das PrP^{Sc} nur noch in geringen Konzentrationen nachweisbar war (Abbildung 40).

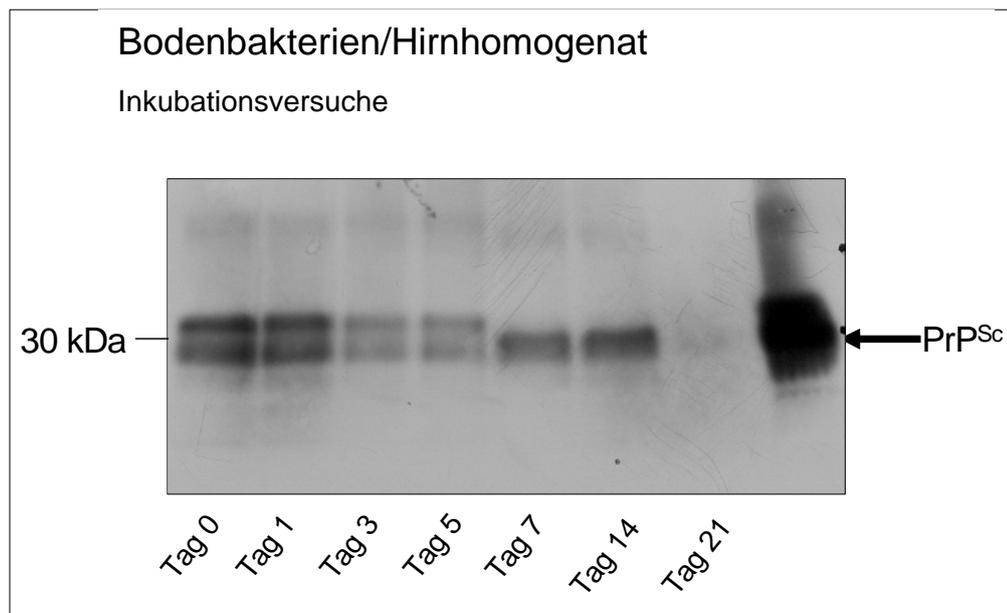


Abbildung 40: Westernblot-Ergebnisse der Inkubation von Gehirnhomogenaten mit isolierten Bodenbakterien. Nach 21 Tagen ist eine deutliche Abnahme der Prionenkonzentration zu erkennen.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Prionen sehr stark an die Bodenmatrix immobilisiert werden und so einem möglichen Abbau durch Bakterien entzogen werden.

5.4 Ergebnisse des Bioassay

Sämtliche am IME durchgeführten Tierversuche mit syrischen Hamstern, erfolgten entsprechend der Auflagen der zuständigen Behörden nach einem genehmigten Tierversuchsantrag (Bezirksregierung Arnsberg, Referenznummer 50.8735.1 Nr. 108/1).

5.4.1 Vorversuche

Im November 2005 wurde mit Vorversuchen begonnen, um zu testen, wie die Verfütterung von Boden bzw. Bodenextrakten am besten durchgeführt werden konnte. Als geeignete Methode erwies sich das Bestreichen von kleinen Futtermengen mit den jeweiligen Proben. Derartiges Futter wurde von den Hamstern ohne Komplikationen vertragen und vollständig gefressen.



Abbildung 41: Schema der Vorversuche

5.4.2 Hauptversuch / Verfütterung des kontaminierten Bodens

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde im Januar 2006 mit der Durchführung der Hauptversuche begonnen. Zu Beginn der Hauptversuche verstarben 5 Tiere. Nach tierärztlicher Diagnose war der Tod der Tiere auf Verdauungsprobleme zurück zu führen und nicht auf die Applikation von Boden- bzw. Bodenextrakten, da Todesfälle auch in der Kontrollgruppe zu beobachten waren. Im weiteren Verlauf des Hauptversuchs, verstarben keine weiteren Tiere. Nach den Verfütterungen des kontaminierten Bodens, wurden die Tiere ständig überwacht und Veränderungen – insbesondere hinsichtlich einer möglichen TSE-Erkrankung – mittels genauer Beobachtung überprüft. Die Beurteilung der verschiedenen Krankheitsstadien erfolgte entsprechend eines Schemas (Abbildung 42, die die verschiedenen Scrapie-Grade beschreiben).

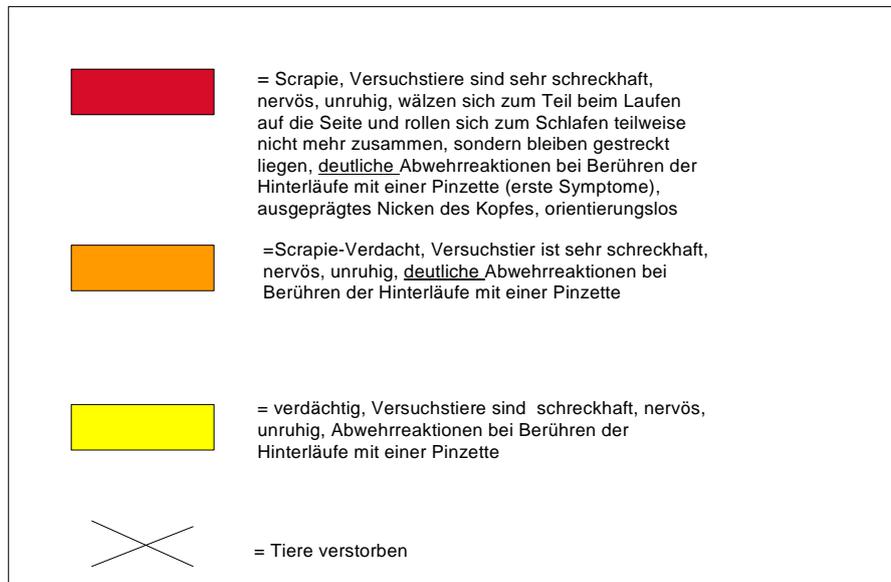


Abbildung 42: Schema des Hauptversuches. Einstufung der Krankheitsstadien

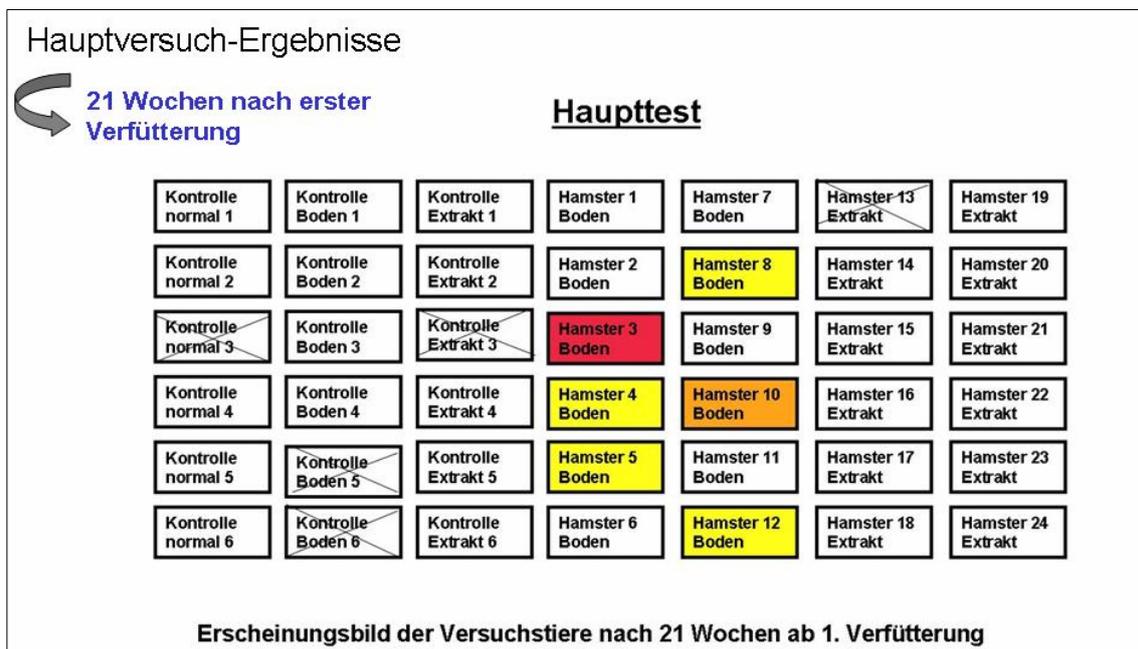


Abbildung 43: Ergebnisse des Bioassays, 21 Wochen nach Verfüterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte

Die Verfüterung pathogenen Materials erfolgte von Ende Januar 2006 bis April 2006. Im Juni 2006 zeigten 5 Tiere, die mit kontaminiertem Bodenmaterial gefüttert wurden, deutliche Scrapie-Symptome bzw. Scrapie-Verdacht. Diese Tiere wurden täglich

überwacht und nach Erreichen des Scrapie-Endstadiums fachgerecht getötet und analysiert.

Ab 3. Juli 2006 zeigten auch die übrigen Hamster, die mit kontaminiertem Bodenmaterial gefüttert wurden, leichte Scrapie-Symptome auf (deutliches Zucken nach Lärm, Kopfnicken, Drehbewegung auf den Rücken etc. Einstufung: Scrapie-Verdacht, SV). Bis August 2006 waren alle 12 Tiere die mit kontaminierten Boden verfüttert worden waren an Scrapie erkrankt (Abbildung 44). Diese Tiere wurden fachgerecht getötet und analysiert, wobei bei allen Tieren pathogene Prionen im Gehirn nachweisbar waren (exemplarische Ergebnisse einiger erkrankter Tiere siehe Abbildung 46).



Abbildung 44 : Ergebnisse des Bioassays, 27 Wochen nach Verfütterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte

Die entsprechenden Westernblot-Ergebnisse, die nach Analyse der Gehirnhomogenate durchgeführt wurden, bestätigen die Befunde, dass die Tiere hohe Konzentrationen an PrP^{Sc} aufwiesen (Abbildungen 45 und 46).

Westernblot-Ergebnisse

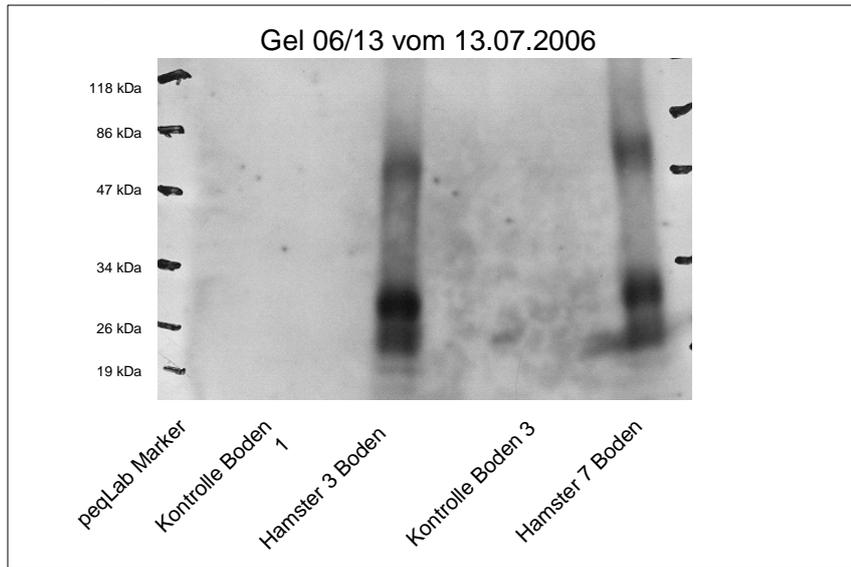


Abbildung 45: Westernblot-Ergebnisse erkrankter Tiere im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (nach Proteinase-K Verdau). Proteinase-K resistente Prionen sind in den erkrankten Tieren deutlich zu erkennen.

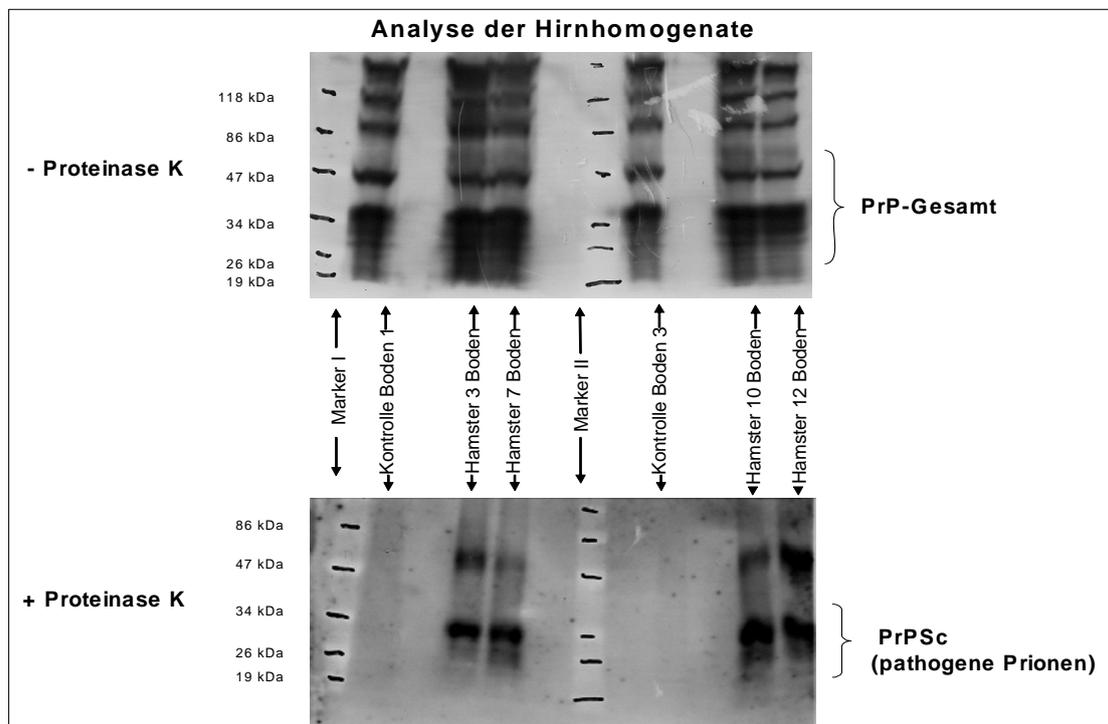


Abbildung 46: Westernblot-Analysen erkrankter Tiere und von Kontrolltieren. Deutlich zu erkennen ist, dass nach Proteinase-K Verdau in den erkrankten Tieren persistente Prionen nachweisbar sind, während die endogene, nicht-pathogenen Prionen in den Kontrollen völlig abgebaut werden.

5.4.3 Hauptversuch / Verfütterung des kontaminierten wässrigen Extraktes

Die Ergebnisse der oralen Applikation der wässrigen Extrakte zeigen, dass bis Juni 2007 insgesamt vier Tiere - mit deutlicher zeitlicher Verzögerung - an Scrapie erkrankt sind (Abbildung 47).

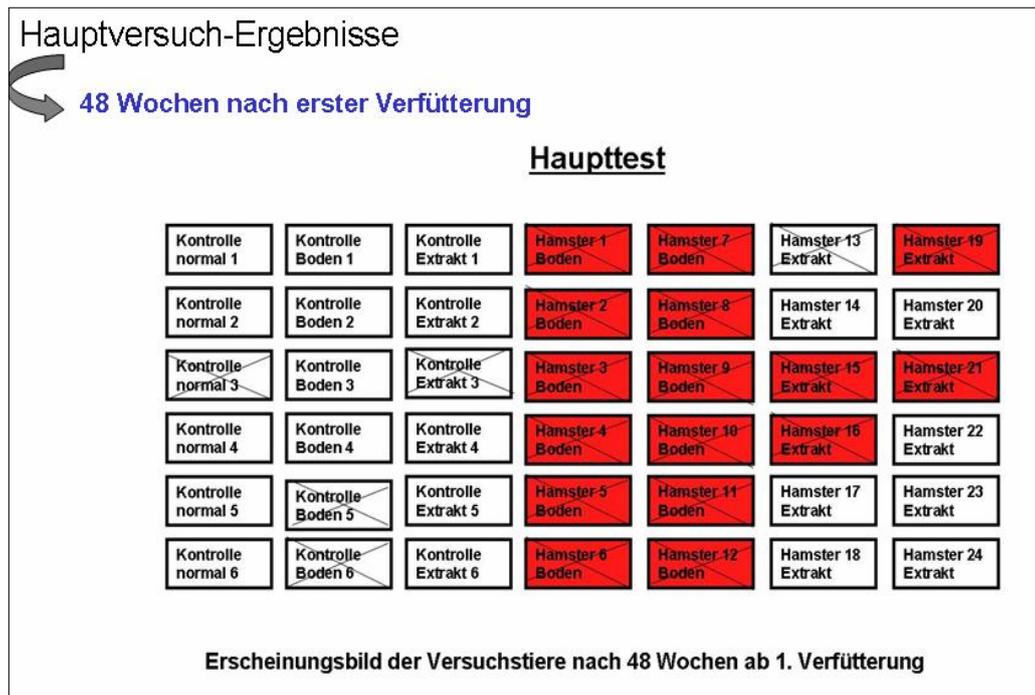


Abbildung 47: Ergebnisse des Bioassays, 48 Wochen nach Verfütterung des kontaminierten Boden bzw. der wässrigen Extrakte

5.4.4 Krankheitsverlauf

In Abbildung 48 ist deutlich zu erkennen, dass Tiere die mit kontaminierten Boden gefüttert wurden, nach ca. 130 Tagen erste Auffälligkeiten zeigten (nervös, schreckhaft). Scrapie-Verdacht wurde nach ca. 148 Tagen und Scrapie-Vollbild nach 162 Tagen diagnostiziert. Kurz nach Diagnose Scrapie, wurden die Tiere fachgerecht getötet und analysiert.

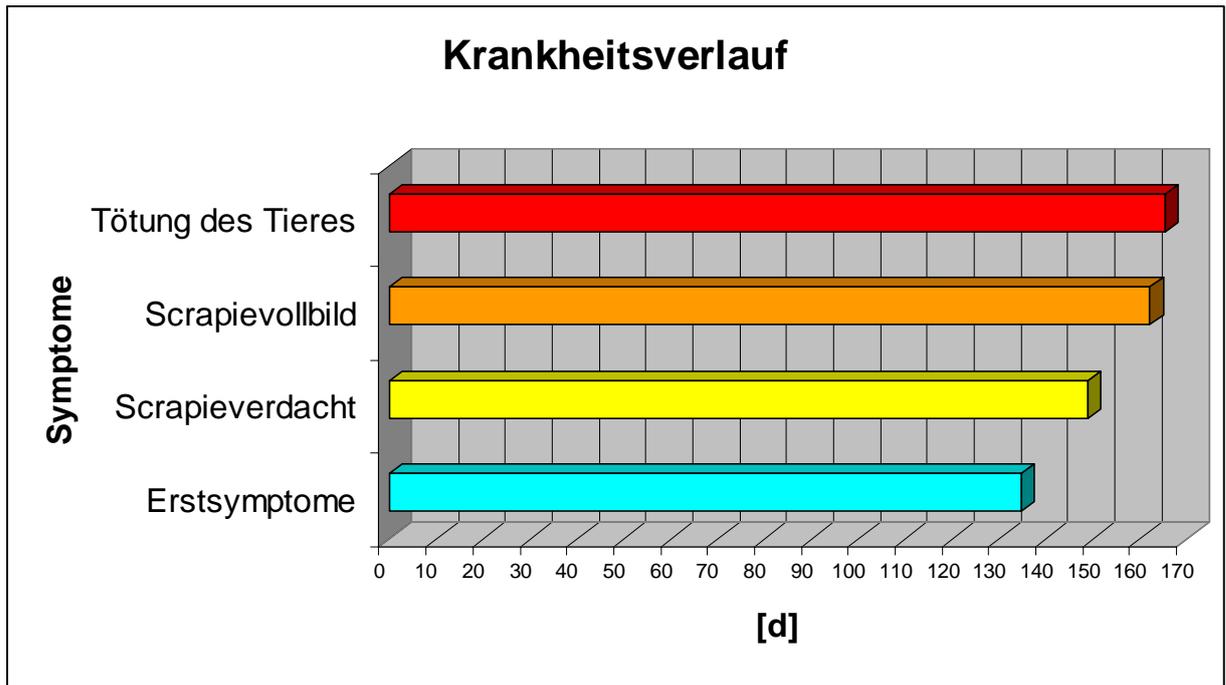


Abbildung 48: Krankheitsverlauf der Versuchstiere. Dargestellt sind die Mittelwerte von beobachteten Erstsymptomen, über Scrapie-Verdacht, Scrapie-Vollbild bis zur Tötung der Tiere.

5.5 Bestätigung der Ergebnisse durch Robert Koch-Institut und Friedrich-Loeffler-Institut

Bei einer Fachtagung im August 2006 am BMU in Bonn wurde beschlossen, dass zur Überprüfung der Ergebnisse, die beiden auf dem Gebiet der Prionenforschung führenden Institutionen - das Robert Koch-Institut und das Friedrich-Löffler-Institut - mit einbezogen werden sollten. Beide Institutionen erhielten anfangs verblindete Proben (Kontaminierter Boden aus den Freilandversuchen sowie entsprechende Kontrollen, Gehirnhomogenate erkrankter Tiere und gesunder Kontrollen sowie SDS-Extrakte die aus kontaminierten Boden gewonnen wurden). Anschließend erhielt das RKI die gesammelten SDS-Extrakte der verschiedenen Probennahmezeitpunkte über den gesamten Versuchsablauf.

Wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen, wurde von beiden Instituten die Ergebnisse bestätigt, dass auch nach 29-monatiger Inkubationszeit Prionen im Boden eindeutig nachweisbar sind. Ebenso wurde bestätigt, dass die im Tierversuch erkrankten und getöteten Hamster hohe Prionen-Konzentrationen im Gehirn aufwiesen. Detailliert wird hierauf in der entsprechenden Publikation eingegangen [1].



Abbildung 49: Westerblot-Ergebnisse des RKI über den gesamten Verlauf der Inkubationsdauer der Bodenversuche



Abbildung 50: Westernblot-Ergebnisse des RKI. Untersuchung der Gehirnhomogenate erkrankter Tiere. Pathogene Prionen sind deutlich nachweisbar (repräsentative Ergebnisse).

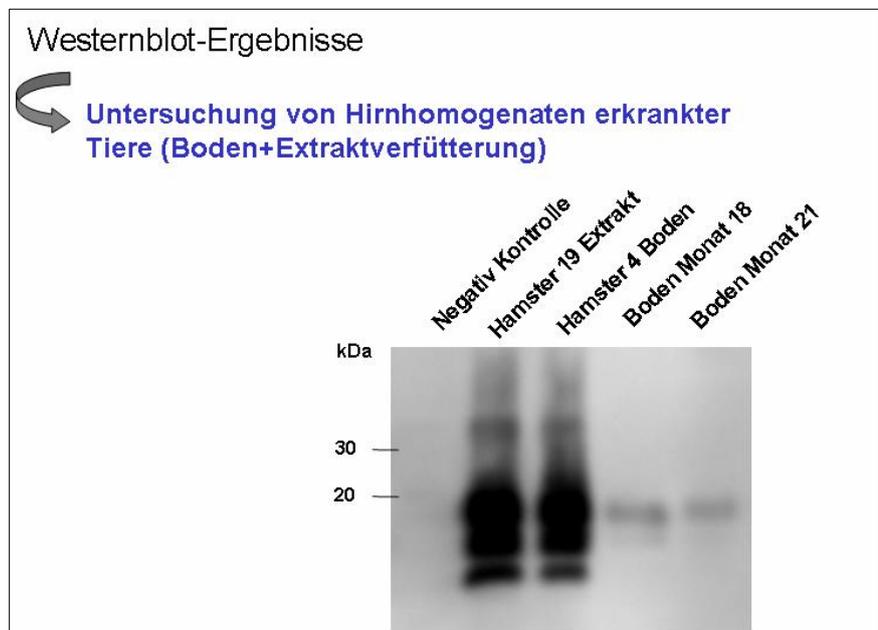


Abbildung 51: Westernblot-Ergebnisse des FLI. Untersuchung der Gehirnhomogenate erkrankter Tiere (Boden und Extraktverfütterung) sowie Westernblot-Ergebnisse der Boden-Inkubationsversuche (Monat 18 und Monat 21). Pathogene Prionen sind deutlich nachweisbar.

Zur Bestätigung, dass es sich tatsächlich um den Scrapie-Erreger 263 K handelt, der in den Bodenproben sowie in den infizierten Hamstern nachweisbar war, wurden seitens des FLI weitere Untersuchungen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnte eindeutig bestätigt werden, dass in den Boden- und den Gehirnproben Prionen des Stammes 263K nachweisbar waren (ohne Abbildung; siehe entsprechende Publikation [1])

5.6 PMCA

Um zu Überprüfen, ob die vom RKI etablierte Methode der PMCA auch mit Bodenextrakten durchführbar ist, wurden wässrige Extrakte aus den Freilandversuchen (Monat 21) untersucht. Die Analyse mittels PMCA zeigt deutlich, dass dieses Verfahren auch mit Extrakten, die aus den Boden-Inkubationsversuchen erhalten wurden umsetzbar ist (Abbildung 52).

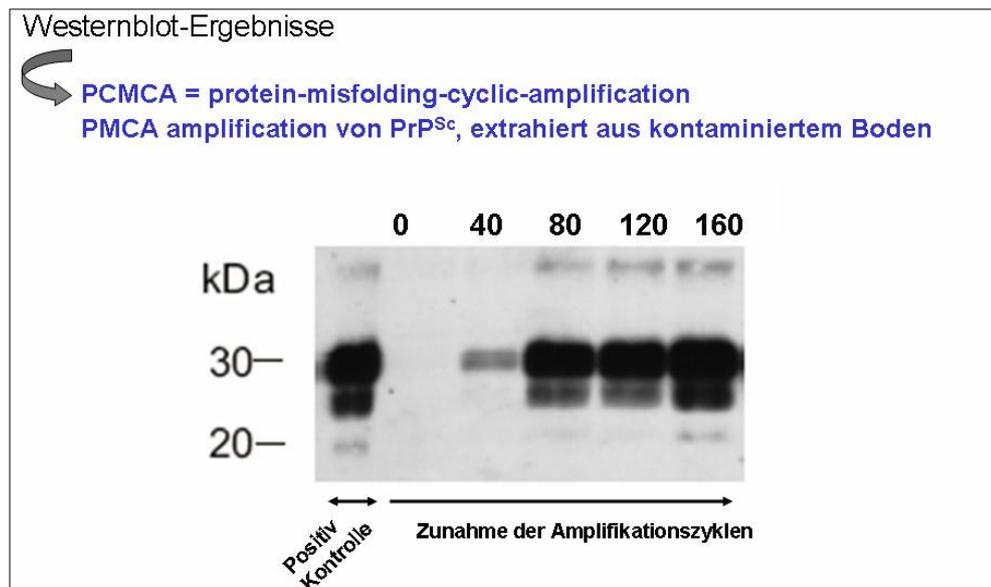


Abbildung 52: Westernblot-Ergebnisse der PMCA-Reaktion (RKI). Untersucht wurden Extrakte aus den Boden-Inkubationsversuchen (M21) in sehr geringer Konzentration. Deutlich zu erkennen, ist dass sich – abhängig von durchgeführten Cyclen – Prionen *in vitro* vervielfältigt werden können und dadurch sehr gut nachweisbar werden.

6 Diskussion

Vorbemerkung

Als schwierig erwies es sich, insbesondere in der Anfangsphase dieses F+E-Vorhabens pathogenes Testmaterial zu erhalten. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl an BSE/TSE-Fällen ist naturgemäß in Deutschland kaum Material im Umlauf. Positiv, auf BSE getestete Gehirnproben werden zur Überprüfung an die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere geschickt (BFAV, jetzt Friedrich-Löffler-Institut), Weder die staatlichen Chemischen- und Veterinäruntersuchungsämter noch privatwirtschaftlich arbeitende BSE-Laboratorien verfügen über positive Proben, die sie für eigene Untersuchungen oder Forschungszwecke zur Verfügung haben bzw. diese bereitstellen könnten. Um die vorliegende Studie durchzuführen, blieb insofern nur die Möglichkeit, in der Startphase infektiöses Material aus England zu beziehen, wo mit dem TSE-Resource-Centre in Berkshire eine landesweite Forschung gefördert wird. Problematisch an dieser Alternative für deutsche Forschungseinrichtungen ist jedoch, dass zum einen nur sehr geringe Mengen an Probenmaterial verschickt werden, und dass sich zum anderen aufgrund der hohen Sicherheitsbestimmungen des Luftfrachtversandes diese Variante als sehr kostenintensiv darstellte. Von der Möglichkeit, im Fremdauftrag infektiöses Material zu generieren, wurde in dieser ersten Phase des Projektes Abstand genommen, da aufgrund der Inkubationszeiten der Versuchstiere eine termingerechte Arbeit nicht möglich gewesen wäre. In der II. Projektphase konnte das Robert Koch-Institut als Partner gewonnen werden. Das RKI unterstützte das IME u.a. durch die Lieferung größerer Mengen Scrapie-infizierten Gehirnmaterials (syrischer Goldhamster) essentiell. ***Ohne diese Zusammenarbeit hätte das Projekt nicht durchgeführt werden können.***

6.1 Bodenanalytik

Eines der ursprünglichen Ziele, Methoden zu verifizieren, die einen Nachweis von TSE-Erregern in Boden für eine mögliche Routineanalytik erlauben, konnte innerhalb des F+E-Vorhabens nicht oder bzw. nur teilweise erreicht werden. Bei Antragstellung des Projektes ging man davon aus, dass in absehbarer Zeit wesentlich empfindlichere

Methoden als die bisher zur Verfügung stehenden entwickelt werden. Derzeitiger Stand der TSE-Diagnostik ist nach wie vor, dass überwiegend immunologische Methoden mittels ELISA oder Westernblot zur Verfügung stehen. Zwar sind viele Anstrengungen auf dem Gebiet der TSE-Diagnostik unternommen worden, allerdings sind bisher keine grundlegenden neuen Verfahren zur Marktreife gelangt. Aufgrund dieser Voraussetzungen blieb nur die Möglichkeit, bestehende Methoden auf die praktische Anwendbarkeit in Bezug auf einen TSE-Nachweis in Böden zu überprüfen. Unsere Untersuchungen ergaben, dass aufgrund der geforderten Flexibilität der Nachweis der Prionen mittels Westernblot die geeignete Möglichkeit darstellen würde, einen Nachweis von TSE-Erregern in Böden zu führen. Der Nachweis mittels Westernblot ist auch der in der Literatur zu Forschungszwecken am meisten angewandte. Eigene Arbeiten sowie Literaturstudien belegen, dass das primäre Ziel die Isolierung und Anreicherung der Prionen aus den verschiedenen Matrices ist. Sind die Prionen erst einmal isoliert und angereichert ist die Detektion mittels Westernblot möglich. Das ebenfalls auf immunologischen Methoden beruhende ELISA-Verfahren war für die Untersuchung einzelner Proben zu aufwendig und wurde nicht mit einbezogen. ELISA-Verfahren sind zu restriktiv und auf einen zu hohen Probendurchsatz ausgelegt, als dass diese zur Analyse einzelner Teilproben geeignet gewesen wären. Weiterhin besteht ein Problem des ELISA-Tests darin, dass Informationen teilweise verloren gehen. So sind mittels Westernblot beide Prion-Formen - pathogen und nicht-pathogen - zu erkennen. Die anschließende Proteinase K-Sensitivität oder Resistenz ist ebenfalls deutlich im Westernblot nachweisbar. Im ELISA-Verfahren sind diese Schritte nicht darstellbar. Hier erfolgt lediglich ein Nachweis einer positiven Probe durch die entsprechende Färbung; ein Verfahren, dass insofern in der Forschung nur in geringem Umfang angewendet wird, in der Routine allerdings die Methode der Wahl ist.

Primäres Ziel musste daher sein, eine Methode zu entwickeln, die in einem ersten Schritt die Extraktion von Proteinen allgemein aus Böden ermöglichte. Sind Proteine erst einmal in ausreichender Menge extrahiert, können diese prinzipiell auch nachgewiesen werden. Inzwischen stehen zahlreiche - teilweise hervorragende - Antikörper für den Nachweis von Prion-Proteinen zur Verfügung. Die Extraktion von Prionen aus der Matrix-Boden ist in dem F+E-Vorhaben durch die Anwendung von SDS als Detergenz erfolgreich gelungen. Die Nachweisgrenze, die für die Bodenanalytik unter der Anwendung der Westernblotmethoden erreicht werden konnte,

entspricht in etwa 10^3 ID (ca. 0,05 ng PrP^{Sc}, 1 ID entspricht etwa 0,05 pg PrP^{Sc}) und damit den Angaben der Hersteller hinsichtlich der Analytik infizierter Gehirnproben. Dies belegt die hohe Effizienz mit der SDS Prionen aus Boden eluieren kann. Allerdings wurde bisher nur eine Bodenart untersucht. Evtl. werden bei anderen Bodentypen andere Extraktionsmittel benötigt. Diese Bodenarten müssten in weiteren F+E-Vorhaben untersucht werden.

Mit dem Einsatz der PMCA konnte jedoch das RKI demonstrieren, dass jetzt möglicherweise ein Verfahren zur Verfügung steht, mittels dem der Nachweis von Prionen in der Umwelt auch routinemäßig ermöglicht werden. Dies müsste in weiteren Forschungsvorhaben weiter untersucht werden,

6.2 Untersuchung von Kontrollmaterial

In der ersten Phase des F+E-Vorhabens sollten verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. So war zum einen die Nachweisgrenze des Antikörpers 6H4 von Interesse. Die Nachweisgrenze des Prionics-Systems (Prionics-Check) wird in der Literatur mit $100\ 000$ - $1\ 000\ 000$ ID₅₀/ml⁻¹ angegeben, was einer Prionen-Konzentration von 0,5 ng bis 5 µg entspricht [86]. Die Ergebnisse des vorliegenden Abschlussberichtes zeigen, dass bei der Verwendung des rekombinanten Prion-Proteins 1 ng - also im unteren Bereich der beschriebenen Nachweisgrenze - deutlich nachweisbar sind. Möglicherweise besteht hier ein Unterschied des Antikörpers in der Reaktivität gegen das rekombinante PrP und dem pathogenen PrP. Weiterhin ist vorstellbar, dass der Nachweis bzw. die Extraktion durch Gehirnbestandteile gestört wird. Aufgrund dessen wurde in die Analyse Schweinegehirn mit einbezogen. Schweine können nachweislich auf oralem Wege nicht mit BSE infiziert werden, so dass hier eine kostengünstige nicht-infizierte Kontrollprobe zur Verfügung stand.

Mittels Schweinegehirnhomogenat konnte untersucht werden, ob die Matrix "Gehirn" in hohen Konzentrationen die Prionen-Extraktion bzw. die Nachweise stören. Abbildung 22 zeigt deutlich, dass der Antikörper mit porcinen Prionen kreuzreagiert, so dass Schweinegehirn als nicht-infektiöses Kontrollmaterial eingesetzt werden konnte.

6.3 Porcines PrP und rekombinantes PrP sind Proteinase K-sensitiv

Die Ergebnisse des Abschlussberichtes zeigen, dass, wie erwartet, dass sowohl Schweinegehirnhomogenat als auch das rekombinante Prion-Protein Proteinase K-sensitiv ist. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Literatur. So ist hinreichend beschrieben, dass die Zugabe von Proteinase K zu einer vollständigen Zerstörung des endogenen - unabhängig der Spezies - sowie des rekombinanten Prion-Proteins führt [87].

6.4 SDS-Puffer führt zur effizienten Extraktion von Proteinen

Ausgehend von den Studien von Riesner et al. 1996, [71] wurden verschiedene Puffer getestet, die möglicherweise für eine Extraktion von Prion-Proteinen aus Boden geeignet sind. Darüber hinaus wurden Puffer untersucht, die proteinbiochemische Standard-Methoden repräsentieren und zur Isolation von Proteinen aus Geweben verwendet werden [74, 84].

Die Ergebnisse belegen sehr deutlich, dass SDS -Puffer bzw. SDS-Lösung die am besten geeigneten Extraktionsmittel waren [1]. Andere Puffer und Lösungen, die zur Extraktion von Prionen aus Geweben ebenfalls als sehr wirksam getestet wurden, waren für die Bodenanalytik nicht einsetzbar, da die Extraktionsrate zu gering und unter der Nachweisgrenze des eingesetzten Westernblotverfahren war. Die große Extraktionsfähigkeit von SDS beruht vermutlich auf dessen biochemischen Eigenschaften als ionisches, sehr starkes Detergenz mit einer CMC (critical micell concentration) von 8 mM. Die Ergebnisse zeigen, dass ein ionisches Detergenz nichtionischen oder auch zwitterionischen Detergenzien überlegen ist.

Die Überprüfung der Extraktionsfähigkeit von SDS-Puffer mit rekombinantem Prion-Protein verlief erfolgreich (Abbildung 22). Dass der SDS-Puffer als Extraktionspuffer auch bei Inkubationen über einen längeren Zeitraum effizient war, konnte in Abbildung 23 dargelegt werden. Hier wurde demonstriert, dass trotz der Möglichkeit des Proteins zur längeren Wechselwirkung mit dem Boden eine sehr gute Extrahierbarkeit besteht. Interessant in diesem Zusammenhang war die Tatsache, dass das porcine Prion-Protein trotz der Proteinase K-Sensitivität nach 42-tägiger Inkubationszeit nicht oder nur geringfügig abgebaut wird, während - insbesondere bei β -Actin - eine signifikante Abnahme erfolgte, obwohl jeweils mit sterilisiertem und Proteinase-Inhibitoren

versetztem Boden gearbeitet wurde. Demnach scheint es so, dass das porcine PrP möglicherweise aufgrund seiner Faltung gegenüber Proteinasen stabiler ist als beispielsweise β -Actin oder GFAP, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte (Abbildung 23 bis 25).

6.5 Persistenz des Erregers [1]

Die Untersuchung der Persistenz der TSE-Erreger in der Umwelt und insbesondere in Böden ist kaum untersucht. Zwar gibt es verschiedene Anhaltspunkte dafür, dass - wie im Falle von Scrapie - das Auftreten dieser Krankheit bei Schafen mit einer kontaminierten Umwelt zusammenhängt, schlüssige Beweise - insbesondere der Nachweis des Erregers in umweltrelevanten Medien - sind bisher nicht möglich [20, 41-44, 76]. Eine Studie von Brown und Gajdusek konnte indes zeigen, dass nach Dotierung von infiziertem Gehirnmateriale in Boden und Inkubation über einen Zeitraum von 3 Jahren, wässrige Auszüge aus diesem Boden im Bioassay nach wie vor Infektiosität aufweisen [88]. Auch die Studie von Johnson et. al 2006 [60] zeigt deutlich, dass Prionen im Boden stabil bleiben und sich an Bodenmineralien stark anlagern.

6.6 Proteinase K-resistentes Protein ist im Boden nachweisbar

Die Ergebnisse zeigen, dass nach 8-wöchiger Inkubationszeit des infizierten Hamstergehirnhomogenates im Boden, PrP^{Sc} nachweisbar war. Die Bandenfärbung ist wieder sehr schwach, so dass das Signal verstärkt werden musste. Allerdings ist deutlich, dass Proteinase K resistentes Protein detektierbar ist.

Die Ergebnisse, wonach PrP nach 8-wöchiger Bodeninkubation nachweisbar ist, stehen in Übereinstimmung mit der Literatur [88]. In dieser Studie war - wie erwähnt - selbst nach dreijähriger Inkubationszeit Infektiosität nachweisbar. Zwar zeigen die Ergebnisse des vorliegenden Berichtes einen Trend, dass das pathogene Prion-Protein während des Inkubationszeitraumes abnimmt, dies muss aber nicht auf einen Abbau des PrP^{Sc} zurückzuführen sein. Möglich ist auch, dass das PrP stärkere Wechselwirkungen mit Bodenkompartmenten eingeht. So ist eine Bindung an komplexe Huminstoffe genauso vorstellbar wie eine Adsorption an tonische Mineralien. Dass Prionen verstärkt an Bodenmineralien binden können wurde inzwischen von Johnson et al. 2006 [60] bestätigt,

6.7 Scrapie bleibt in Freilandversuchen stabil

Die Ergebnisse der Freilandversuche zeigen eindeutig, dass geringe Konzentrationen des Scrapie-Erregers im Boden über eine Inkubationsdauer von 29 Monaten stabil und damit persistent bleiben (Abbildung 49) [1]. Zwar konnte innerhalb eines Monats eine signifikante Verringerung der extrahierbaren Prionen-Konzentration im Vergleich zur eingesetzten Menge nachgewiesen werden, jedoch erfolgte im weiteren Verlauf eine nur noch geringe Abnahme. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass eine geringe Menge pathogener Prionen noch wesentlich länger im Boden persistent sind. Die Ergebnisse dass Prionen in wässriger Umgebung innerhalb weniger Wochen von isolierten Bodenbakterien abgebaut werden kann, legen den Schluss nahe, dass die Prionen durch Bindung an Bodenkompartimente dem mikrobiellen Abbau entzogen werden (Abbildung 36). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Umgebungsproben bestätigt dies. So wurden niemals außerhalb des zur Versuchsdurchführung eingesetzten Gasesäckchens Prionen nachgewiesen. Allerdings erfolgte der Prionennachweis diesbezgl. lediglich durch immunologische Methoden und nicht mittels dem empfindlicheren Bioassay. Hinsichtlich der Versuche mit Bodenbakterien konnte das RKI die Ergebnisse der IME allerdings nicht bestätigen. Dies müsste in einem weiteren Vorhaben genauer untersucht werden, da der Einsatz von großen Mengen an Bodenbakterien welche kontaminierten Boden zugesetzt werden, evtl. eine Möglichkeit darstellt um derartige Flächen zu dekontaminieren.

6.8 Nachweis der Infektiosität

Die mittels Westernblot-Analyse erhaltenen Ergebnisse zum Nachweis der Prionen im Boden erlauben keine Aussage darüber, ob die im Boden nachgewiesenen Erreger noch infektiös sind. Brown und Gajdusek zeigten zwar [59], dass auch nach 3-jähriger Inkubation, Bodenextrakte nach intrazerebraler Injektion zu Erkrankungen bei den Versuchstieren führte, allerdings stellt diese intrazerebrale Injektion nicht die tatsächliche Infektionsroute wieder.

Um die Aufnahme von kontaminierten Boden bzw. wässrigen Bodenextrakten aus der Umwelt zu simulieren, wurde ein Bioassay durchgeführt, bei dem kontaminiertes Bodenmaterial in geringen Mengen Hamstern unter das Futter gemischt. Weiterhin wurde wässriger Bodenextrakt der aus kontaminierten Bodenmaterial gewonnen wurde, verfüttert, um so eine mögliche Übertragung durch Oberflächen- bzw. Porenwasser zu simulieren [1].

6.8.1 Bioassay

Die Ergebnisse des Bioassay zeigen eindeutig, dass Boden der über 26 und 29 Monate mit pathogenen Prionen inkubiert wurde, nach oraler Verfütterung hochinfektiös war [1]. Von Interesse hierbei ist, dass die Inkubationszeiten bis zum Ausbruch einer Scrapie-Erkrankung nahezu vergleichbar mit Ergebnissen sind, die erzielt werden, wenn pures Gehirnhomogenat Scrapie-erkrankter Hamster wiederum an Hamster verfüttert wurde. Dies belegt die hohe Infektiosität der Bodenproben.

Von außerordentlicher Bedeutung für eine umfassende Risikobewertung ist die Tatsache, dass auch wässrige Bodenextrakte bei vier Tieren zu einer Erkrankung führten. Dies deutet darauf hin, dass auch Oberflächenwasser bzw. auch Porenwasser bei einer vorliegenden Prioren-Kontamination der Umwelt, potentiell Prionen enthalten kann.

Wie erwähnt, handelt es sich bei dem durchgeführten Bioassay aufgrund der geringen Budgetierung lediglich um einen Screening-Versuch. Um hierbei genauere und umfassendere Ergebnisse zu erhalten, müssen weitere Versuche, mit einer wesentlich höheren Tierzahl durchgeführt werden.

6.9 Screening kontaminierter Flächen

Die derzeitigen herkömmlichen Nachweismethoden werden auch in naher Zukunft nicht dazu eignen, mittels einer Routineanalytik zu überprüfen, ob Flächen mit Prionen kontaminiert sind. Eine alternative Möglichkeit zur Überprüfung kontaminierter Flächen wurde vom RKI mittels der PMCA-Methode getestet (Abbildung 52). Die PMCA stellt ein hochsensitives *in vitro* Verfahren dar, mit der das fehlgefaltete Prion-Protein künstlich vermehrt werden kann. Dabei wird das fehlgefaltete Prion als Matrix verwendet, an das sich natürliches, im Körper vorkommendes Prion-Protein anlagert und in die Fehlfaltung gezwungen wird. Dieser Prozess, der „Zyklische Amplifikation des fehlgefalteten Proteins“ (englisch: PMCA = protein misfolding cyclic amplification) genannt wird, wird in einem Automaten ca. 140 mal wiederholt und vermehrt den Krankheitserreger um das 6.600-fache. Der Nachweis des fehlgefalteten Prion-Proteins erfolgt dann im Western Blot. Mit dieser Methode kann die Nachweisempfindlichkeit der Prionen somit drastisch erhöht werden. Evtl. ist es dadurch möglich auch in der Umwelt reale vorkommende Hot Spots von Prionenkontaminationen zu detektieren [1]. Dies müsste jedoch in weiteren Projekten detailliert untersucht werden.

7 Ausblick

Die Ergebnisse des vorliegenden Forschungsprojektes zeigen eindeutig, dass Prionen im Boden über einen sehr langen Zeitraum persistent und nachweisbar sind und nach 29-montiger Inkubationsdauer infektiös sind [1]. Wie erwähnt, stellen diese Versuche jedoch bisher lediglich Screening-Versuche dar, die weiter abgesichert werden müssen. Insbesondere muss die Anzahl der Tiere signifikant erhöht werden und eine mögliche konzentrationsabhängige Infektiosität muss weiter untersucht werden. Bei den vorliegenden Daten wurde eine Bodenart verwendet, die in Deutschland sehr häufig vorkommt. Damit umfassende Aussagen gemacht werden können ist jedoch die Wiederholung des experimentellen Setups – unter der Einbeziehung weiterer Bodenarten – unerlässlich. Entsprechende Studien müssen hierzu durchgeführt werden.

Um Aussagen treffen zu können, wie das Risiko einer Umweltkontamination bzgl. BSE und CWD zu bewerten ist, liegen derzeit noch keine Daten vor, da diese Studie sowie alle bereits publizierten Arbeiten lediglich mit Scrapie-Erregern durchgeführt wurden. Aufgrund des unterschiedlichen charakteristischen Verhaltens der verschiedenen Prionentypen ist davon auszugehen, dass diese sich auch unterschiedlich in der Umwelt verhalten. Um hier Aussagen treffen zu können, müssen jedoch die Boden-Inkubationsversuche mit CWD und auch mit BSE durchgeführt werden.

Hinsichtlich eines Screenings zur Untersuchung möglicher betroffener Prionen-kontaminierter Flächen, steht mit der PMCA evtl. jetzt eine Methode zur Verfügung die in der Praxis eingesetzt werden könnte. Die Anwendbarkeit dieses Verfahren auf eine derartige Fragestellung muss jedoch weiter untersucht werden.

8 Zusammenfassung

Die Persistenz von infektiösen Biomolekülen im Boden ist von hoher Bedeutung, insbesondere in Hinblick auf Prionen, die verantwortlichen Agenzien für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) wie Scrapie oder der Chronic Wasting Disease (CWD). Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Prionen im Boden überleben können, ohne ihre biologische Aktivität zu verlieren. Die Ausbreitung von Prionen in die Umwelt kann durch verschiedene Ursachen erfolgen, wie z.B. durch infizierte Plazenta oder Fruchtwasser von Scrapie-infizierten Schafen. Weiterhin ist eine Umweltkontamination durch infizierten Speichel, Exkremente oder durch nicht ausreichend sterilisierten organischen Dünger vorstellbar. Scrapie-freie Herden können sich wiederum mit Scrapie infizieren, wenn diese auf Weiden gehalten werden, auf den zuvor Scrapie-Ausbrüche beobachtet wurden. Diese Befunde deuten auf eine nachhaltige Kontamination der Umwelt, insbesondere des Bodens hin. Um dies näher zu untersuchen, wurde am Fraunhofer IME, Schmallenberg, ein Forschungsvorhaben durchgeführt, welches die die Persistenz von Prionen im Boden genauer analysieren sollte. Durch den Einsatz von Freiland-Lysimetern, wurde die Kontamination eines Standardbodens unter der Verwendung des Hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K simuliert. Die Prionen wurden durch Westernblotting nachgewiesen und die Infektiosität mittels Bioassay mit Syrischen Goldhamstern untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Scrapie-Stamm 263K im Boden über einen Zeitraum von 29 Monaten nachweisbar ist und dieser Boden nach oraler Verfütterung hoch-infektiös ist. Auffallend war, dass nicht nur der kontaminierte Boden im Tierversuch eine sehr hohe Infektiosität aufwies, sondern dass auch wässrige Extrakte des kontaminierten Bodens, zu einer Scrapie-Erkrankung bei den Hamstern nach oraler Applikation führten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass PrP^{Sc}, welches nach 21 Monaten aus dem Boden extrahiert wurde, als Ausgangsmaterial für die Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) Reaktion eingesetzt werden konnte. Die PMCA stellt daher eine Alternative dar, um die Nachweismöglichkeit von Prionen in Boden im freien Feld wesentlich zu verbessern.

9 Literaturverzeichnis

1. Seidel, B., et al., *Scrapie Agent (Strain 263K) Can Transmit Disease via the Oral Route after Persistence in Soil over Years*. PLoS ONE, 2007. **2**: p. e435.
2. Herder, *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*. 1995, Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
3. Hörlmann, B., Hrsg, *Prionen und Prionenerkrankungen*. 1. Auflage ed. 2001, Berlin, New York: de Gruyter. 602.
4. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**: p. 136-144.
5. Creutzfeldt, H.G., *Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystem*. Z Ges Neurol Psychiat, 1920. **57**: p. 1-20.
6. Gajdusek, D.C., Zigas, V., *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea*. New England Journal of Medicine, 1957. **257**: p. 974-978.
7. Gerstmann, J., *Über eine eigenartige hereditär-familäre Erkrankung des Zentralnervensystems*. K, 1936. **154**: p. 736-762.
8. Lugaresi, E., Medori, R., Baruzzi, P.M., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P. et al., *Fatal familial insomnia and dysautonomia, with selective degeneration of thalamic nuclei*. N Engl J Med, 1986. **315**: p. 997-1003.
9. McGowan, J.P., *Scrapie in Sheep*. Scottish Journal of Agriculture, 1922. **5**: p. 365-375.
10. Jakob, A., *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden*. Z Ges Neurol Psychiat, 1921. **64**: p. 147-228.
11. Wilesmith, J.W., Wells, G.A., Cranwell, M.P., Ryan, J.B., *Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies*. Vet Rec, 1988. **123**: p. 638-644.
12. Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Atkinson, M.J., *Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin*. Vet Rec, 1991. **128**: p. 199-203.
13. Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R., *A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle*. Vet Rec., 1987. **121**: p. 419-420.
14. Ueli, B., *BSE und andere spongiforme Enzephalopathien*. 1. Auflage ed. 1998, Berlin: Parey. 151.
15. Volkel, D., et al., *Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic CJD or other neurologic diseases*. Transfusion, 2001. **41**(4): p. 441-8.
16. Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hueston, W.D., *Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates*. Res Vet Sci., 1992. **52**: p. 325-331.
17. Prusiner, S.B., *Prions*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1998. **95**: p. 13363-13383.
18. Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Alpers, M., *Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees*. Nature, 1966. **25**: p. 794-796.
19. Hadlow, W.J., *Scrapie and kuru*. Lancet, 1959. **ii**: p. 289-290.

20. Hadlow, W.J., *The pathology of experimental scrapie in the dairy goat*. Res Vet Sci, 1961. **2**: p. 289-314.
21. Behrens, H., *Traberkrankheit*. In H. Behrens (Ed.), *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. 1987, Berlin: Parey Verlag. 24-36.
22. Morgan, K.L., K. Nicholas, M.J. Glover u. A.P. Hall, *A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain*. Vet. Rec., 1990. **127**: p. 373-376.
23. Walker, K.D., W.D. Hueston, H. Scott Hurd u. J.W. Wilesmith, *Comparison of bovine spongiform encephalopathy risk factors in the United States and Great Britain*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1991. **199**: p. 1554-1561.
24. Dickinson, A.G., *Scrapie in sheep and goats*. Front Biol., 1976. **44**: p. 209-241.
25. Hunter, N., *PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE*. Trends Microbiol., 1997. **5**: p. 331-334.
26. Hunter, N., Moore, L., Hosie, B.D., Dingwall, W.S., Greig, A., *Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland*. Vet Rec., 1997. **140**: p. 59-63.
27. Hunter, N., Cairns, D.; Foster, J.D., Smith, G., Goldmann, W., Donnelly, K., *Is scrapie solely a genetic disease?* Nature, 1997. **386**: p. 137.
28. Hunter, N., Goldmann, W., Foster, J.D., Cairns, D., Smith, G., *Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep*. Vet Rec., 1997. **141**: p. 137-140.
29. Taylor, D.M., *Inactivation of SE agents*. Br Med Bull, 1993. **49**: p. 810-821.
30. Taylor, D.M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D.A., Brown, K.L., Lamza, K.A., Smith, G.R., *Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie*. Arch Virol., 1994. **139**: p. 313-326.
31. Purdey, M., *Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion protein's Cu domain initiate TSE?* Med Hypotheses, 2000. **54**(2): p. 278-306.
32. Miller, M.W. and E.S. Williams, *Chronic wasting disease of cervids*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **284**: p. 193-214.
33. Miller, M.W., E.S. Williams, and C.J. Sigurdson, *Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. Other animal prion diseases*. Nature, 2003. **425**(6953): p. 35-6.
34. Miller, M.W. and E.S. Williams, *Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer*. Nature, 2003. **425**(6953): p. 35-6.
35. Braig, H.R., Diring, H., *Scrapie: concept of a virus-induced amyloidosis of the brain*. EMBO, 1985. **4**: p. 2309-2312.
36. Diring, H., Gelderblom, H., Hilmert, H., Ozel, M., Edelbluth, C., Kimberlin, R.H., *Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein*. Nature, 1983. **306**: p. 476-478.
37. Diring, H., Özel, M., *Übertragbare spongiforme Enzephalopathien - wodurch werden sie übertragen*. Spektrum des Wissenschaft, 1995: p. 52-54.
38. Gibbons, R.A., Hunter, G.D., *Nature of the scrapie agent*. Nature, 1967(215): p. 1041-1043.
39. Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C., *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature, 1967. **214**: p. 764-766.
40. Dickinson, A.G., Outram, G.W., *Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis*. Ciba Found Symp., 1988. **135**: p. 63-83.
41. Miller, M.W., et al., *Environmental sources of prion transmission in mule deer*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 1003-6.

42. Lupi, O., *Risk analysis of ectoparasites acting as vectors for chronic wasting disease*. Med Hypotheses, 2005. **65**(1): p. 47-54.
43. Franscini, N., et al., *Prion protein in milk*. PLoS ONE, 2006. **1**: p. e71.
44. Taylor, D.M., *Inactivation of the unconventional agents of scrapie, bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease*. The Journal of Hospital Infection, 1991. **18 Suppl A**: p. 141-6.
45. Taylor, D.M., *Inactivation of BSE agent*. Dev Biol Stand, 1991. **75**: p. 97-102.
46. Taylor, D.M., *Impaired thermal inactivation of ME7 scrapie agent in the presence of carbon*. Vet Microbiol, 1991. **27**(3-4): p. 403-5.
47. Taylor, D.M., et al., *Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie*. Arch Virol, 1994. **139**(3-4): p. 313-26.
48. Taylor, D.M., et al., *The effect of formic acid on BSE and scrapie infectivity in fixed and unfixed brain-tissue*. Veterinary Microbiology, 1997. **58**(2-4): p. 167-74.
49. Taylor, D.M. and S.L. Woodgate, *Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of ruminant-derived protein in cattle diets*. Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics), 1997. **16**(1): p. 187-98.
50. Taylor, D.M., et al., *Effect of rendering procedures on the scrapie agent*. The Veterinary Record, 1997. **141**(25): p. 643-9.
51. Taylor, D.M., K. Fernie, and I. McConnell, *Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide*. Veterinary Microbiology, 1997. **58**(2-4): p. 87-91.
52. Taylor, D.M., et al., *Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies*. Veterinary Microbiology, 1998. **64**(1): p. 33-8.
53. Taylor, D.M., et al., *Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat*. Veterinary Microbiology, 1999. **67**(1): p. 13-6.
54. Taylor, D.M., *Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review*. Vet J., 2000. **159**(1): p. 10-17.
55. Taylor, D., *Inactivation of the BSE agent*. C R Biol, 2002. **325**(1): p. 75-6.
56. Taylor, D.M., et al., *Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents*. The Journal of General Virology, 2002. **83**(Pt 12): p. 3199-204.
57. Taylor, D.M. and S.L. Woodgate, *Rendering practices and inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents*. Rev Sci Tech, 2003. **22**(1): p. 297-310.
58. Taylor, D.M., *Inactivation of TSE agents: safety of blood and blood-derived products*. Transfus Clin Biol, 2003. **10**(1): p. 23-5.
59. Brown, P. and D.C. Gajdusek, *Survival of scrapie virus after 3 years' interment*. Lancet, 1991. **337**(8736): p. 269-70.
60. Johnson, C.J., et al., *Prions adhere to soil minerals and remain infectious*. PLoS Pathog, 2006. **2**(4): p. e32.
61. Hatzinger, P.B. and M. Alexander, *Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability*. Environ. sci. technol., 1995. **29**(2): p. 537-545.
62. Revault, M., et al., *Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1724**(3): p. 367-74.
63. Rapp, P., Jocteur-Monrozier, Richaume, *Prion Degradation in Soil: Possible Role of Microbial Enzymes Stimulated by the Decomposition of Buried Carcasses*. Environ. Sci. Technol., 2006.

64. Shaked, G.M., Shaked, Y., Kariv-Inbal, Z., Halimi, M., Avraham, I., Gabizon, R., *A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases.* J Biol Chem., 2001. **276**: p. 31479-31482.
65. Post, K., et al., *Fly larvae and pupae as vectors for scrapie.* Lancet, 1999. **354**(9194): p. 1969-70.
66. Lupi, O., *Could ectoparasites act as vectors for prion diseases?* Int J Dermatol, 2003. **42**(6): p. 425-9.
67. Wisniewski, H.M., et al., *Mites as vectors for scrapie.* Lancet, 1996. **347**(9008): p. 1114.
68. Wopfner F, W.G., Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM., *Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein.* J Mol Biol., 1999. **5**: p. 1163-78.
69. Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., and F. Ehrensperger, Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., Oesch, B., *Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody.* Nature, 1997. **390**: p. 74-77.
70. Korth, C., Streit, P., Oesch, B., *Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein.* Methods Enzymol., 1999. **309**: p. 106-122.
71. Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B., *Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity.* J Virol, 1996. **70**: p. 1714-1722.
72. Seidel, B., et al., *E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells.* Oncogene, 2004. **23**(32): p. 5532-42.
73. Seidel, B., et al., *Safety evaluation for a biodiesel process using prion-contaminated animal fat as a source.* Environ Sci Pollut Res Int, 2006. **13**(2): p. 125-30.
74. Seidel, B., *Functional Analysis of the E-cadherin-catenin-complex in pancreatic carcinoma cell lines*, in *Innere Medizin I*. 2001, Universität Ulm: Ulm.
75. LUFA, *Datenblatt zur Entnahme von Versuchsboden, insbes. Standardboden.* Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, 1993.
76. Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen.* Vol. 6. Auflage. 2000, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press.
77. Masson, W., *Injection of a 1%-Solution of the infective Material leads to TSE.* 2002.
78. 11465, D.I., *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse - Gravimetrisches Verfahren (ISO 11465:1993).* 12.1996, Berlin: Deutsches Institut für Normung.
79. 10390, D.I., *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des pH-Wertes (ISO 10390:1994).* 05.1997, Berlin: Deutsches Institut für Normung.
80. 10694, D.I., *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse) (ISO 10694:1995).* 08.1996, Berlin: Deutsches Institut für Normung.
81. 11277, I., *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden - Verfahren mittels Siebung und Sedimentation.* 05.1998, Berlin: Deutsches Institut für Normung.

82. 11274, D.I., *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens - Laborverfahren (ISO 11274:1998)*. 01.2001, Berlin: Deutsches Institut für Normung.
83. Smith PK, K.R., Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem., 1985. **150**: p. 76-85.
84. Menke A, P.C., Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Adler G, Wedlich D., *E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines*. Cancer Research, 2001. **8**: p. 3508-17.
85. Laemmli, U., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **259**: p. 680-85.
86. MacGregor, I., *Prion protein and developments in its detection*. Transfus Med., 2001. **11**: p. 3-14.
87. McKinley MP, T.A., Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N. Lab Invest. 1991 Dec;65(6):622-30., *Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells*. Lab Invest., 1991. **6**: p. 622-30.
88. Brown, P., Gajdusek, D.C., *Survival of scrapie virus after 3 years' interment*. Lancet, 1991. **337**: p. 269-270.

10 Anhang I Erfolgskontrollbericht

Es konnte aufgezeigt werden, dass mit den am Fraunhofer IME angewandten Methoden, nach Dotierung von Böden mit infektiösem Gehirnmaterial, TSE-Erreger effizient extrahierbar waren und mittels immunologischer Verfahren nachgewiesen werden konnten. Ein Verfahren, das zur Routineanalytik im Sinne eines Bodenscreening auf Bodenflächen allgemein anwendbar ist, wurde aufgrund der Nachweisempfindlichkeit der bestehenden Verfahren nicht erreicht. Allerdings besteht jetzt mit der PMCA eine realistische Möglichkeit, Prionen in der Umwelt zu detektieren. Untersuchungen mit bekannten Hot Spots müssen hier durchgeführt werden.

11 Anhang II Literaturveröffentlichung

Scrapie Agent (Strain 263K) Can Transmit Disease via the Oral Route after Persistence in Soil over Years

Bjoern Seidel^{1*}, Achim Thomzig^{2*}, Anne Buschmann^{3*}, Martin H. Groschup³, Rainer Peters¹, Michael Beekes², Konstantin Terytze⁴

1 Fraunhofer Institute for Molecular Biology und Applied Ecology (IME), Schmallenberg, Germany, 2 P24 -Transmissible Spongiform Encephalopathies, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany, 3 Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Germany, 4 German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt, UBA), Dessau, Germany

The persistence of infectious biomolecules in soil constitutes a substantial challenge. This holds particularly true with respect to prions, the causative agents of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) such as scrapie, bovine spongiform encephalopathy (BSE), or chronic wasting disease (CWD). Various studies have indicated that prions are able to persist in soil for years without losing their pathogenic activity. Dissemination of prions into the environment can occur from several sources, e.g., infectious placenta or amniotic fluid of sheep. Furthermore, environmental contamination by saliva, excrements or non-sterilized agricultural organic fertilizer is conceivable. Natural transmission of scrapie in the field seems to occur via the alimentary tract in the majority of cases, and scrapie-free sheep flocks can become infected on pastures where outbreaks of scrapie had been observed before. These findings point to a sustained contagion in the environment, and notably the soil. By using outdoor lysimeters, we simulated a contamination of standard soil with hamster-adapted 263K scrapie prions, and analyzed the presence and biological activity of the soil-associated PrP^{Sc} and infectivity by Western blotting and hamster bioassay, respectively. Our results showed that 263K scrapie agent can persist in soil at least over 29 months. Strikingly, not only the contaminated soil itself retained high levels of infectivity, as evidenced by oral administration to Syrian hamsters, but also feeding of aqueous soil extracts was able to induce disease in the reporter animals. We could also demonstrate that PrP^{Sc} in soil, extracted after 21 months, provides a catalytically active seed in the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) reaction. PMCA opens therefore a perspective for considerably improving the detectability of prions in soil samples from the field.

Citation: Seidel B, Thomzig A, Buschmann A, Groschup MH, Peters R, et al (2007) Scrapie Agent (Strain 263K) Can Transmit Disease via the Oral Route after Persistence in Soil over Years. PLoS ONE 2(5): e435. doi:10.1371/journal.pone.0000435

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) comprise a group of fatal neurodegenerative diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cows [1], chronic wasting disease (CWD) in deer (*Odocoileus* spp.) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*) [2–4], scrapie in sheep and goats [5–7] and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans [1]. The exact molecular pathomechanisms underlying TSEs have not yet been fully elucidated but it is generally accepted that a pathologically misfolded and/or aggregated isoform of the normal cellular prion protein (PrP), referred to as PrP^{Sc} and PrP^C, respectively, is the key pathogenic factor for this group of diseases [1].

Among the known TSEs, only scrapie and CWD are contagious diseases which show horizontal transmissibility under natural conditions [2,4,8]. CWD is the only TSE known to affect free-ranging animals [3]. The regular occurrence of scrapie in affected areas [7] and the spread of CWD in North America and Korea [9,10] among mule deer, white-tailed deer and elk indicates that a contagion in the environment is responsible for the occurrence of these TSEs [4,11–14], and even raises the possibility of a cross-species transmission under natural conditions. Recent findings demonstrated that saliva from deer with CWD harbours infectivity and can transmit this TSE upon peroral uptake [15]. Other studies pointed to transmission of scrapie among sheep by vectors like mites, fly larvae or other ectoparasites [16–19]. It has also been hypothesized that sporadically occurring TSEs may be induced by insecticides or by a disproportion of manganese and copper in soil leading to an enrichment of manganese in animals [20,21]. Alternatively, an influence of the Fe/Mn ratio in forage has been discussed in connection with TSEs [22]. However, on the balance of all evidence available so far, contaminated soil appears as one of the most likely sources of infection in the natural transmission of

scrapie and possibly also CWD. It has been known for decades that sheep can become infected with scrapie while grazing on pastures where infected sheep have been kept before, and scrapie occurs often in areas where it has already occurred previously [7,8,23]. Furthermore, Brown and Gajdusek found that scrapie agent remains infectious after persisting in soil for 3 years as evidenced by intracerebral bioassay in Syrian hamsters [24]. The putative transmission of scrapie and CWD via soil is also corroborated by recent studies showing that prion infectivity binds to soil components with high affinity [25,26], thereby retaining its pathogenic biological activity [25]. Thus, soil-associated TSE agents in the environment represent a potential hazard. This holds true not least since prion infectivity exhibits an unusually pronounced resistance against both physical and

Academic Editor: Joseph El Khoury, Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School, United States of America

Received March 21, 2007; Accepted April 18, 2007; Published May 9, 2007

Copyright: © 2007 Seidel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research project was funded by the German Federal Environmental Agency (UBA). This work was supported by the EU grant QLK-CT 2001-309 and the EU funded Network of Excellence 'NeuroPrion'.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: bjoern.seidel@ime.fraunhofer.de

☞ These authors contributed equally to this work.

chemical methods of inactivation, as described in detail elsewhere [27–37].

The contamination of soil with TSE infectivity can occur from several sources. Since recent studies could demonstrate that scrapie infectivity is present in various tissues and body fluids of infected animals [38,39], it has been assumed that the persistent prion protein enters the environment by contaminated excrements, birth-related tissues such as placenta, or even whole carcasses. While a similar excretion pattern appears conceivable for the CWD agent [40] which has also been found in saliva [15], the present knowledge about the BSE pathology in cattle does not argue for a significant shedding of the infectivity via faeces, urine, or during birth [41,42]. However, small ruminants infected with BSE could supposedly spread the BSE agent throughout the environment in a similar manner as known from scrapie-affected sheep or CWD-affected animals [43]. Moreover, unconventional conditions like for example the burial of animal carcasses at larger numbers as practiced for example during the foot and mouth disease outbreak in the UK in 2001 [44], may have fostered a dissemination of BSE agent in the soil or ground water. Once deposited there, all three TSE agents, BSE, scrapie, and CWD, must be assumed to persist in an infectious state for long periods of time.

So far, the oral transmission efficacy of long-term prion contaminations in soil have not been investigated. Therefore, we have studied the persistence of PrP^{Sc} in the environment over time and measured its oral transmissibility by bioassay in Syrian hamsters. With outdoor lysimeter experiments we simulated the situation on pastures using soil spiked with scrapie-infected hamster brain homogenate over a period of 29 months and analyzed the fate of the prion proteins by sensitive Western blotting and, in part, also by protein misfolding cyclic amplification (PMCA). The infectivity of such contaminated soil samples and the respective aqueous soil extracts was tested in the hamster bioassay.

RESULTS

Extraction and Recovery

In the first phase of the study several buffers – known as standard buffers for protein extraction from mammalian cells – and other solutions were tested in order to find out the optimal extraction method for prion protein from contaminated soil (see Materials and Methods). The obtained results lead us to use 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) in sterilized water (figure 1a), which allowed detection of PrP^{Sc} in samples of German standard soil containing an amount of PrP^{Sc} that corresponded to 1.25 µg of infectious brain material (figure 1b).

Soil Incubation Experiments

The findings from our lysimeter experiments indicated a remarkable persistence of PrP^{Sc} in soil by clearly showing that – even after an incubation for 29 months – PrP^{Sc} could be still extracted from soil and detected by Western blotting. These results were confirmed by using two alternative highly sensitive Western blotting techniques. As shown in figure 2a, PrP^{Sc}, in the form of its protease-resistant core of the pathological prion protein PrP^{Sc} (PrP27-30), is still detectable in soil after 29 months. However, a decrease in the extractable concentration is obvious. The strongest decrease can be seen during the first month of incubation in the soil (figure 2a, lane 2 and 3). After three months the extractable amount of PrP27-30 remained almost constant until month 21, with small variations at month 12 and month 18 (figure 2a, lane 6 and 7). In Fig. 2a, a slightly stronger signal for

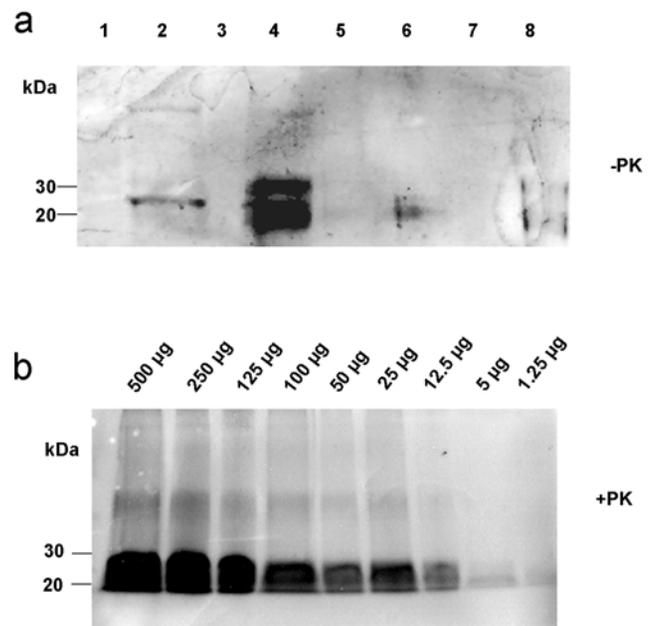


Figure 1. Western blot analysis of short-time incubation experiments. a) Western blot detection of PrP^{Sc} extracted from soil mixed with non-infectious brain homogenate (5% pork brain in German standard soil). Several different buffers and solutions were used for extraction. Lane 1: water; lane 2: Triton X-100; lane 3: 1% urea; lane 4: 1% SDS; lane 5: Zwittergent; lane 6: RIPA buffer; lane 7: NP-40; lane 8: Na-sarcosyl. b) Western blot detection of PrP27-30, the proteinase K-resistant core of PrP^{Sc}, extracted by using 1% SDS from soil contaminated with 263 K scrapie brain homogenate from hamsters after 1 h of incubation (dilution series). PrP^{Sc} could be detected in soil samples containing 1.25 µg or higher amounts of scrapie brain tissue after extraction with 1% SDS-solution. Samples were digested with proteinase K prior to Western blotting.

doi:10.1371/journal.pone.0000435.g001

PrP27-30 was found for 21 months (lane 8) as compared to 18 months (lane 7). Both samples were taken from the same soil bag, however, the location from where the sampling was performed may have differed. Thus, the finding possibly reflects minor inhomogeneities either in the original load of contamination or in the degradation of PrP^{Sc} depending on the microenvironment of the examined sample. On the other hand, it has to be noted that the extraction yield and Western blotting efficiency inevitably may also vary in certain ranges from sample to sample. A further decrease was observed after 26 and 29 months (figure 1a, lane 9 and 10), however, the PrP27-30 specific bands remain clearly visible. Where performed, analyses of samples from different soil bags produced consistent results. In order to verify that the detected bands originated from PrP^{Sc} a control experiment was performed: After deglycosylation with PNGase F the PrP27-30 bands extracted from soil after 21 and 18 months showed an electrophoretic shift towards a single band at about 20 kDa, the molecular mass to be expected for deglycosylated PrP27-30 from 263K hamster scrapie (figures 2 b, lanes 3 and 4, respectively).

Amplification of PrP^{Sc} extracted from soil

In order to check whether PrP^{Sc} extracted from soil can be used for the amplification of protease resistant prion protein by the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) reaction [45,46], soil extracts from month 21 were used as test seeds. As shown in figure 2c, a strong increase of the signal for PrP^{Sc} was obtained with this method: while no signal for PrP^{Sc} can be detected in

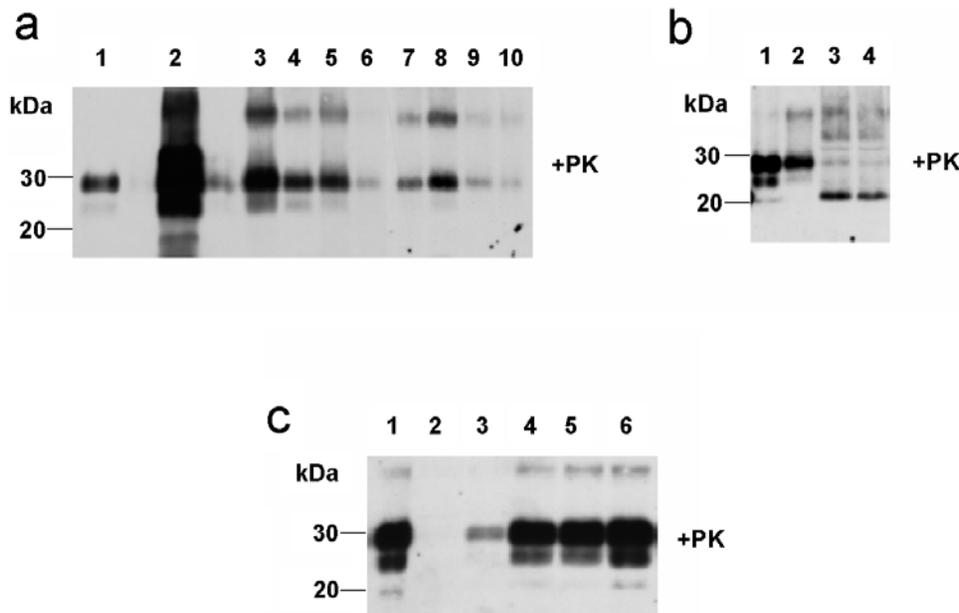


Figure 2. Western blot analysis of long-time incubation experiments. a) Western blot detection of PrP27-30 extracted from prion-contaminated soil after different time periods. Lane 1: PK-digested 263K scrapie hamster brain homogenate containing 5×10^{-7} g of brain tissue (positive control); lanes 2–10: PrP27-30 extracted at time point 0 (lane 2), after 1 month (lane 3), after 3 months (lane 4), after 6 months (lane 5), after 12 months (lane 6), after 18 months (lane 7), after 21 months (lane 8), after 26 months (lane 9) and after 29 months (lane 10). b) Deglycosylated PrP27-30 extracted from prion contaminated soil. Lane 1: PK-digested 263K scrapie hamster brain homogenate containing 5×10^{-7} g of brain tissue (positive control); lane 2: soil-extracted PrP27-30 after 21 months; lanes 3 and 4: deglycosylated soil-extracted PrP27-30 after 21 months (lane 3) and after 18 months (lane 4). c) PMCA amplification of PrP^{Sc} extracted from contaminated soil. Lane 1: PK-digested 263K scrapie hamster brain homogenate containing 5×10^{-7} g of brain tissue (positive control); lanes 2–6: sample signals after 0, 40, 80, 120 and 160 cycles of PMCA, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0000435.g002

samples without PMCA treatment (lane 2), clear signals became visible after 40 cycles of PMCA (lane 3) and even more intense after 80, 120 and 160 cycles of PMCA (lanes 4, 5 and 6, respectively).

Presence of PrP^{Sc} in surrounding soil samples

For analyzing the fate of the prion protein in more detail, soil samples in the vicinity of the gauze bag, as well as the gauze bag itself were analyzed by Western blotting. As shown in figure 3a, no PrP^{Sc} specific signal could be detected in the surrounding soil samples. This is indicative of PrP^{Sc} being immobilized after binding to soil compartments. In some approaches, a very faint PrP^{Sc} specific signal was visible when analyzing aliquots of SDS solution in which the gauze bag had been washed, however, it could be shown that this positive prion signal was a result of adherent soil particles (figure 3, lane 3, arrow).

Bioassay Experiments

For a detailed risk assessment of scrapie-contaminated soil it was of major importance to analyze whether the detectable PrP^{Sc} in the soil extracts still exhibited oral infectivity after incubation times up to 29 months. Therefore, a bioassay with Syrian hamsters was performed by feeding the animals with contaminated soil or aqueous soil extracts that had been collected after soil incubation for 26 and 29 months, respectively. Hamsters fed with contaminated soil exhibited first scrapie-associated symptoms at 131 ± 6 days [mean \pm SD] after the first application. The hamsters reached the terminal stage of scrapie at 162 ± 12 days after the first feeding (tables 1 & 2). This indicates substantial amounts of persistent infectivity in soil that had been incubated for 26 and 29 months. After reaching the terminal stage of scrapie the

animals were sacrificed and analyzed for the presence of PrP^{Sc} in their brains. As shown in figure 4a (lanes 2 and 3 depicting two hamsters exemplarily), the brains of all animals in this group contained high amounts of PrP^{Sc}. In addition, comparison of the electrophoretic and glycosylation profiles of the brain samples from these hamsters (figure 4b, lanes 4 and 5) with those of hamsters challenged with different TSE isolates (figure 4b, ME7-H, lane 1; BSE-H, lane 2, 263K, lane 3) confirmed, that strain specific biochemical properties of the pathological prion protein

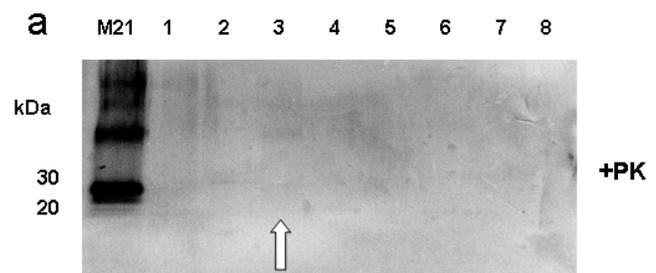


Figure 3. Western blot detection of PrP27-30 extracted from prion-contaminated soil after 21 months (M21) and respective surrounding samples. M21: contaminated soil sample inside the gauze bag; lane 1: soil sample collected outside of the steel cage; lane 2: soil sample collected directly over the gauze bag; lane 3: analysis of the empty gauze bag; lane 4: soil sample collected underneath the steel cage; lane 5: soil sample collected directly next to the gauze bag; lane 6: roots collected next to the gauze bag; lane 7: soil sample collected underneath the gauze bag; lane 8: non-contaminated soil. Arrow head at lane 3 indicates a faint PrP27-30 signal, resulting from residual soil particles that remained attached to the gauze bag. doi:10.1371/journal.pone.0000435.g003

Table 1. Feeding schedule for bioassay in Syrian hamsters

Date	amount of soil or aqueous extract administered orally*	Collection time of soil sample
31/01/06	100 mg or 100 μ l	month 26
07/02/06	100 mg or 100 μ l	month 26
14/02/06	100 mg or 100 μ l	month 26
21/02/06	100 mg or 100 μ l	month 26
28/02/06	100 mg or 100 μ l	month 26
08/03/06	100 mg or 100 μ l	month 26
14/03/06	100 mg or 100 μ l	month 26
21/03/06	50 mg or 50 μ l	month 26
28/03/06	100 mg or 100 μ l	month 29
06/04/06	100 mg or 100 μ l	month 29
11/04/06	100 mg or 100 μ l	month 29
20/04/06	100 mg or 100 μ l	month 29

*mg relates to soil sample; μ l relates to aqueous extract
doi:10.1371/journal.pone.0000435.t001

Table 2. Infection rate in hamster after oral challenge

Group	No. of animals infected with scrapie	Terminal stage of scrapie after the first oral application/Mean incubation period with the respective standard deviation in days
Control	0/5*	–
Control soil	0/5*	–
Control aqueous extract	0/5*	–
Contaminated soil	12/12	162 +/- 12
Contaminated aqueous soil extract	4/11*	256 +/- 41

*In the marked groups one animal each died at the beginning of the bioassay because of digestive disorders unrelated to scrapie disease
doi:10.1371/journal.pone.0000435.t002

were maintained in the animals fed with soil that had been incubated with 263K scrapie brain homogenate.

Remarkably, not only the hamsters fed with contaminated soil but also four hamsters of the group fed with aqueous soil extracts developed terminal scrapie at 256 ± 41 days after the first application (with incubation times of individual animals ranging from 201 to 321 days). Since this bioassay is ongoing, further animals of this group might still develop scrapie in the future.

DISCUSSION

The results of this research project show for the first time that the scrapie strain 263K remains persistent in soil over a period of at least 29 months and remains highly infectious after oral application to Syrian hamsters. It has to be pointed out that the key results of our time-course study on the fate of PrP^{Sc} in soil have been validated, in part by examining blinded samples, at independent laboratories.

Only a few studies have addressed the question of a persistence of prions in soil so far [24–26,47], and the results from these studies are in principle in accordance with our observations. A pioneering study was published by Brown and Gajdusek in 1991 [24] showing that an aqueous extract from scrapie-contaminated soil remains infectious even after an incubation period of three years as confirmed by hamster bioassay. However, the infectivity studies were conducted by intracerebral injection and not by oral application. Furthermore, the PrP^{Sc} concentration was not analyzed in this study, so that no data are available about the proteins absorption behavior to soil particles and about the corresponding degradation kinetics. Most recently, PrP^{Sc} has been shown to bind to soil minerals [25] but only short-time incubation experiments of maximal one week were conducted and, again, bioassays were performed by the intracerebral route.

In this study we show by Western blotting a strong decrease in the amount of extractable PrP^{Sc} over an incubation period of 29 months in soil. It is not yet clear whether this decrease resulted from a molecular degradation of PrP^{Sc} or a tighter binding to soil particles. Stronger binding of molecules to soil particles with increasing incubation time is a well-known phenomenon in soil chemistry – the so called “aging” – and influences bioavailability and re-mobilization significantly [48,49].

Upon feeding hamsters with scrapie contaminated soil which had been incubated for over two years in outdoor lysimeters all animals developed terminal scrapie after relatively short in-

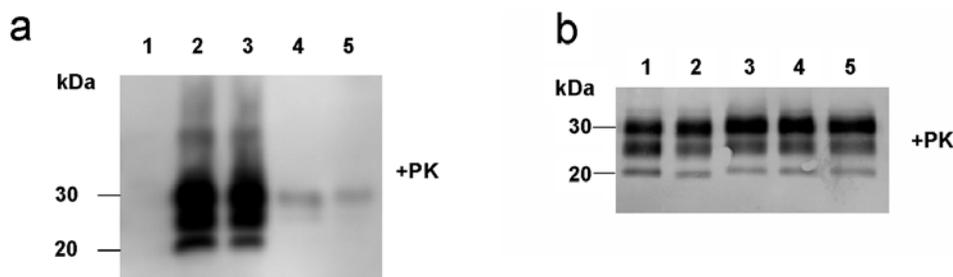


Figure 4. Western blot analysis of hamsters orally challenged with contaminated soil and western blot typing of PrP^{Sc}. **a)** Western blot showing PrP^{Sc} in the brains of hamster orally challenged with contaminated soil samples and in the soil samples used for the bioassay. Lane 1: negative control hamster; lane 2: hamster H19 fed 12 times with aqueous extracts of soil samples from month 26 and 29; lane 3: hamster H4B fed 12 times with soil samples from month 26 and 29; lane 4: scrapie-contaminated soil (18 months); lane 5: scrapie-contaminated soil (21 months); lane 6: negative soil sample. **b)** Western blot typing of electrophoretic mobilities and glycosylation characteristics of PrP^{Sc} from different hamster-adapted TSE reference isolates, and from hamsters perorally challenged with 263K scrapie-contaminated soil. Lane 1: ME7-H scrapie agent; lane 2: hamster-adapted BSE-isolate (BSE-H); lane 3: 263K scrapie agent, lane 4: H10 (hamster 10, fed 12 times with soil samples from months 26 and 29); lane 5: H7 (hamster 7 fed 12 times with soil samples from month 26 and 29).
doi:10.1371/journal.pone.0000435.g004

incubation times (162 dpi). In other studies it has been well established that pure 10% (w/v) brain homogenates from 263K scrapie hamsters cause terminal scrapie in perorally challenged hamsters after mean incubation times of about 155–165 days with an attack rate of 100% [50–53]. This indicates that scrapie-contaminated soil may represent a potential TSE hazard for ruminants in the environment. While a considerable excretion of infectivity has to be assumed for scrapie or BSE infected sheep and CWD infected deer [40,43,54], it is generally acknowledged that the potential environmental contamination risk represented by BSE infected cattle is marginal, if at all present [41,42]. On the other hand, the burial of bovine carcasses [44] might have accidentally led to a spill of BSE prions into the environment. Furthermore, the fact that even feeding of aqueous extracts from scrapie-contaminated soil induced a terminal scrapie infection in four hamsters so far suggests that surface water or groundwater from pastures of scrapie-affected flocks may provide a potential source of scrapie infectivity.

However, the relevance of the results obtained in this study for the field situation should be interpreted with some caution, since only one soil type was used and only a limited number of animals were challenged in the bioassay. Therefore, other soil types and a larger number of animals have to be tested in future studies to allow for a robust risk assessment. Furthermore the exact binding properties and degradation kinetics of PrP^{Sc} should be subject to further research. In addition, all published studies addressing the persistence of prion infectivity in soil were performed with scrapie prions while TSE agents causing BSE and especially CWD have not been analyzed so far.

An intensified monitoring of PrP^{Sc} (and possibly also prion infectivity) in the soil appears mandatory for a more precise assessment of the risks emanating for humans and animals from prions in the environment. As shown in this report, PrP^{Sc} extracted from soil can be used as a catalytically active seed in the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) reaction. This opens a promising perspective for considerably improving the detectability of prions in the environment.

MATERIALS AND METHODS

Biological Safety

Assays with scrapie-infected hamster brain were performed under laboratory conditions according to bio safety level 3** and in protected outdoor lysimeters, respectively.

Extraction of Brain Material

To identify a suitable buffer for extracting prion infectivity and PrP^{Sc} from soil, German standard soil (Lufa 2.2 and Borstel) was mixed with scrapie-infected hamster brain (strain 263K) provided by the TSE-Resource-Centre, Berkshire, Great Britain. To test the efficiency of this method the following solutions and buffers - especially non-ionic and ionic detergents - have been tested:

a) sterile water, b) 1% urea in sterile water c) 1% SDS in sterile water, d) 1% Zwittergent 3-08 in sterile water, e) 1% Triton X-100 sterile water, f) 10% Na-sarcosylate in sterile water, g) RIPA-buffer (0.25% Na-deoxycholate, 0.9% NaCl, 1% NOP-40, 0.8% Tris-HCl in sterile water (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), h) 10% NOP-40 in sterile water, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Initially non-infectious pork brain was mixed with German standard soil and the efficiency of PrP^C extraction using the above mentioned buffers was tested. In a second step, the optimal extraction procedure was verified by applying the procedure to soil samples mixed with 263K scrapie agent and monitoring the PrP^{Sc} retrieval.

Incubation Experiments and Sampling Scheme

The outdoor experiments and all other experiments were performed using brains of terminally-diseased hamsters challenged with scrapie strain 263K.

For each approach, 1 g infectious hamster brain material was homogenized in 10 ml PBS (phosphate buffered saline) and added to 20 g of standard German sandy loom soil (Borstel). The soil/brain mixture was filled into gauze bags and buried in lysimeters filled with the same soil at a depth between 15 and 20 cm. The gauze had a mesh size of 250 μ m, which enables the contact with microorganisms and meso fauna with the soil/brain mixture but avoids the contact with macro fauna derived/related organisms. To protect the gauze bags from mice, the bags were put into steel cages. At defined time points (after 0, 1, 3, 6, 12, 18, 21, 26, 29 months) the steel cages were dug out and the gauze bags as well as the surrounding soil were taken for sampling and analyzing. The analyses on the presence of residual PrP²⁷⁻³⁰ in soil samples were performed with a different number of soil bags, depending on the incubation times to be tested. For “short” incubation times of <12 months, for which detectability of residual PrP appeared most likely when the experiments were designed, samples from three different soil bags were examined. For “intermediate” incubation times of 12–18 months samples from two different bags were tested, and for “long” incubation times of >18 months one soil bag was yet available for sampling. All bags were buried in close vicinity.

Sample Preparation and Western Blot Analysis of Soil and Hamster Brain Samples

Remark: Western blot experiments were performed in independent runs at different laboratories, with each laboratory using its established techniques and procedures. The protocols are listed below. The different analytical protocols produced consistent results.

Western Protocol I

For the protein extraction from the contaminated soil as well as from surrounding soil samples, 20 ml of a 1%-SDS-solution (SDS; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were added to 20 g of testing material in a 50 ml tube. The suspension was vigorously shaken on a horizontal shaker for approx. 1 h, followed by a centrifugation step at 5,000 rpm for 20 min. 200 μ l of the clear supernatant was incubated with proteinase K (50 μ g/ml; 37°C; 1 h, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) to eliminate non-resistant proteins. After digestion, the supernatants were boiled for 5 min in Laemmli's sampling buffer (50 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM β -mercaptoethanol and 0.001% bromphenol blue) in a 1.5 ml tube and analyzed by Western blotting. The prepared samples were stored at -80° C.

For screening, Western blot samples were boiled for 5 min and separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) by using 8–16% Tris-Glycine-SDS precast gels (i-Gels, Gradipore, LTF-Labortechnik, Wasserburg, Germany) or 4–20% precast gels (Precise Protein Gels, Perbio Science GmbH, Heidelberg, Germany) according to standard procedures as described previously [55–57]. After SDS-PAGE, the proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Immobilon Millipore, Billerica, USA) using a semi-dry blotting system. Membranes were blocked in Superblock (Perbio Science GmbH, Heidelberg, Germany) with 0.05% Tween 20 over night at 4°C. Blots were incubated for 1 h in primary antibody solution (monoclonal anti-PrP 3F4, Chemicon International, Inc., California, dilution: 1:3,000 in PBS and 1.5% BSA or monoclonal anti-

PrP 3F4, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, dilution: 1:4,000 in PBS and 1.5% BSA or monoclonal anti-mouse 6H4, Prionics AG, Zürich, Switzerland, 1:3,000 in PBS). After washing 5 times with PBS for 5 min and 0.05% Tween 20 (Perbio Science GmbH, Heidelberg, Germany), blots were incubated in a secondary antibody solution (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, dilution 1:500,000 Perbio Science GmbH or alkaline-phosphatase-conjugated anti-mouse, dilution 1:5,000 Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for at least 1.5 h. Membranes were washed as described before and developed with CDP-Star solution (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Perbio Science GmbH, Heidelberg, Germany) for 5 to 10 min. Protein signals were visualized using Pierce film (Perbio Science GmbH, Heidelberg, Germany).

For confirmation of these results, highly sensitive Western blotting was performed in independent experiments at different laboratories using their established protocols.

Western Protocol II

The protein extractions from contaminated soil samples were carried out by adding 2 ml 1%-SDS-solution to 2 g of testing material in a 15 ml tube. The suspension was vigorously shaken for 2 min, followed by a centrifugation step at 7,000 rpm for 10 min. 50 μ l of the clear supernatant was used for proteinase K digestion (100 μ g/ml; 37°C; 1 h). After digestion the supernatants were mixed with an equal volume of 2 \times sample loading buffer (50 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM β -mercaptoethanol and 0.001% bromphenol blue) and heated to 100°C for 5 min for PrP-Western blotting.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analyzes of samples from hamsters were performed as described elsewhere [58] with recently published modifications [39]. In short: Following SDS-PAGE, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon, Millipore, Billerica, USA) using a semi-dry blotting system. The membrane was blocked by incubation for 30 min in TBS containing 3% (w/v) nonfat milk powder (NFMP) and 0.05% (w/v) Tween-20 (NFMP-TBST). Blots were incubated overnight in primary antibody solution (monoclonal anti-PrP antibody 3F4 [mAb 3F4] from cell culture, diluted 1:2,000 in NFMP-TBST) at 4°C. After washing 5 times for at least 20 min with NFMP-TBST, blots were incubated in secondary antibody solution (alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG; Dako, Glostrup, Denmark; 1:5,000 diluted in NFMP-TBST) for 90 min at room temperature. After washing 5 times with NFMP-TBST over a total period of at least 1.5 h, the membranes were pre-incubated 2 \times 5 min in assay-buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9.5) and finally developed with CDP-star solution (Tropics, Applied Biosystems, Bedford, USA) for 5 min according to the instructions of the manufacturer. PrP-signals were visualized on a X-OMAT AR (Kodak, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) film. Films were exposed for 5–30 min.

For deglycosylation, 500 μ l of the soil extract solution were dialyzed in PBS for 16 h in order to remove the detergents, and 20 μ l of the aliquot was digested using PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, USA) according to the instructions of the manufacturer prior to Western blotting.

Western Protocol III

Sample preparation and extraction of the prion protein from soil samples as well as proteinase K digestion was performed as described in protocol I. After electrophoresis using 16% bis-acrylamide gels, proteins were transferred on a PVDF-membrane

in a semi-dry chamber. The membranes were blocked in 5% dry fat milk in PBS (phosphate buffered saline) containing 0.1% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany) (PBS-T) for 30 min and subsequently incubated with the PrP-specific monoclonal detection antibody 3F4 (Chemicon International, Inc., California) in a dilution of 1:3,000 in 5% dry fat milk in PBS-T for 1 h 30 min. The membranes were washed 3 times for 10 min with PBS-T and then incubated with a secondary antibody bound to alkaline phosphatase in a dilution of 1:2,000 in PBS-T (goat-anti-mouse-AP, Dianova, Hamburg, Germany) for 1 h. After again washing three times for 10 min, the membranes were incubated 2 times for 2 min in assay buffer containing 200 mM Tris-HCl and 10 mM MgCl₂ (pH 9.8). Finally, the chemiluminescence substrate CDP-Star (Tropix, Bedford, USA) was applied and incubated on the membrane for 5 min before the light signals were detected in a camera using the analysis software Quantity One (Bio-Rad, Munich, Germany).

Bioassay in Syrian hamsters

Forty two female Syrian hamsters, approx. 90 days old, were obtained from Charles River Laboratories, Germany. They were handled according to the regulations of the local authorities (Bezirksregierung Arnsberg, reference number 50.8735.1 Nr. 108/1) in a biosafety Level 3 containment facility.

12 animals were fed weekly over a period of 12 weeks; 11 times with 100 mg soil/brain mixture each and one time with 50 mg soil/brain mixture taken from the outdoor lysimeters after an incubation period of 26 and 29 months (table 1). Oral application was achieved by mixing the soil (1,150 mg in total) with commercial hamster feed (ssniff, Soest, Germany).

To analyze the remaining infectivity in the aqueous extract, 10 g contaminated soil was mixed with 10 ml water and was vigorously shaken on a horizontal shaker for approx. 1 h. The mixture was centrifuged with 5,000 rpm for 5 min and the supernatant was used for the bioassay. Oral application was performed weekly over a period of 12 weeks (1,150 μ l in total) by mixing the extract with commercial hamster feed (ssniff, Soest, Germany). For this purpose, 12 additional animals were fed 11 times with 100 μ l and 1 time with 50 μ l aqueous extract from the soil/brain mixture taken from the outdoor lysimeters after an incubation period of 26 and 29 months.

The hamsters of both groups were monitored at least twice a week for the development of clinical signs of scrapie. Hamsters diseased with 263K scrapie showed head bobbing, ataxia of gait and generalized tremor. Such animals were frequently and persistently in motion, easily irritated by noise and touch, upon which they often twitch, and had difficulties maintaining balance and rising from a supine position. These clinical symptoms of hamsters are entirely consistent with those previously reported for the 263K scrapie agent [59]. At the occurrence of first neurological symptoms, the animals were observed daily and at appropriate end-points, clinically affected hamsters were killed. Brains from these hamsters were examined and analyzed for the presence of PrP^{Sc}.

As a control, six animals were fed with non-contaminated standard soil and 6 animals were fed with aqueous extract from non-contaminated standard soil over a period of 12 weeks (1,150 mg or 1,150 μ l in total). Additional 6 hamsters were fed only with commercial hamster feed (ssniff, Soest, Germany).

PMCA-Reaction

The PMCA method was carried out as reported previously [45,46] with modifications: In brief, normal hamster brains were

homogenized at 10% (w/v) in PBS containing complete protease inhibitor cocktail (Boehringer-Ingelheim, Mannheim, Germany), 4 mM EDTA and 1% Triton-X-100. The homogenate was briefly centrifuged at 2,000 g and the supernatant was used as the PrP^C source. Amplification was performed using an automatic ultra-sonification apparatus (Sonicator 300 from Misonix, New York, USA) with a water-tank.

The PrP^C substrate was mixed with 1/10 volume of the soil extract previously dialyzed in PBS, resulting in a total volume of 100 μ l. PMCA amplification was performed by 40 cycles of sonication (40 sec. each) followed by incubation at 37°C for 1 h in the water-tank. The amplified product of the first round of amplification was diluted 1:5 with normal brain homogenate and the second round was performed. This process was repeated 4 times to obtain 160 cycles of PMCA. From each PMCA-amplification round, aliquots of 50 μ l were taken and digested with proteinase K (180 μ g/ml) for 1 h at 56°C. Finally, the same volume of 2 \times sample buffer was added and heated for 10 min at 100°C prior to SDS-PAGE.

Western Blot Typing of PrP27-30

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analyzes of samples from hamsters for characterization of the PrP^{Sc} glycosylation and migration pattern were performed as described elsewhere [59]. In short: 50 μ l of 10% (w/v) brain homogenates in TBS (pH 7.4) were mixed with 5 μ l of 13% (w/v) sarcosyl and 10 μ l proteinase K stock solution (1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germany) and digested for 60 min at 37°C. The digestion was stopped by adding 435 μ l 2 \times sample buffer, i.e. 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol in 120 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 20% (w/v) glycerol and 0.05% (w/v) bromophenol blue, and boiling for 5 min. 5 μ l of the

solution (corresponding to 5×10^{-5} grams of homogenized brain tissue) were separated in a 15% SDS-PAGE or in Tris-glycine gels (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) and subsequently blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, USA) using the semi-dry method (Fast-Blot; Biometra, Göttingen, Germany). The PVDF-membranes were blocked with 5% low-fat milk in TBS for 30 min and incubated overnight at 4°C with MAb 3F4 (1:2,000) in 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS. After washing in TBS and incubation for 60 min at room temperature with the secondary antibody [biotinylated goat anti-mouse IgG (1:2,000) in 3% BSA in TBS], a biotin-streptavidin kit (Dako, Glostrup, Denmark) for signal enhancement was applied for 30 min at room temperature. After washing the membranes in TBS, antibody binding to PrP was visualized using a mixture of nitroblue-tetrazoleum (NBT; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) as substrate.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pam Schulte and Uwe Boshof from the Fraunhofer IME for their technical assistance especially for helping conduct the bioassay. The skilful technical assistance of Patrizia Reckwald (RKI) and of Dan Balkema (FLI) is gratefully acknowledged. A.T. and M.B. wish to thank Anja Schreier and Corina Loeschner for their help in setting up the PMCA procedure used in this study at the RKI.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MB AT MG AB BS RP KT. Performed the experiments: AT AB BS RP. Analyzed the data: MB AT MG AB BS RP KT. Contributed reagents/materials/analysis tools: MB AT. Wrote the paper: MB AT MG AB BS KT.

REFERENCES

- Prusiner SB (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 13363–13383.
- Miller MW, Williams ES, Sigurdson CJ (2003) Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. Other animal prion diseases. *Nature* 425: 35–36.
- Williams ES, Miller MW (2002) Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Rev Sci Tech* 21: 305–316.
- Williams ES (2005) Chronic wasting disease. *Vet Pathol* 42: 530–549.
- Hoinville LJ (1996) A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech* 15: 827–852.
- Greig JR (1940) Scrapie: Observation on the transmission of the disease by mediate contact. *Vet J* 96: 203–206.
- Pállson PA (1979) Rida in Iceland and its epidemiology. In Prusiner SB, Hadlow WJ, Slow transmissible diseases of the nervous system. Academic Press 1: 357–366.
- Miller MW, Williams ES (2003) Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* 425: 35–36.
- Kim TY, Shon HJ, Joo YS, Mun UK, Kang KS, Lee YS (2005) Additional cases of Chronic Wasting Disease in imported deer in Korea. *J Vet Med Sci*, 67: 753–759.
- Sohn HJ, Kim JH, Choi KS, Nah JJ, Joo YS, et al. (2002) A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. *J Vet Med Sci* 64: 855–858.
- Miller MW, Williams ES, Hobbs NT, Wolfe LL (2004) Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis* 10: 1003–1006.
- Miller MW, Wild MA, Williams ES (1998) Epidemiology of chronic wasting disease in captive Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis* 34: 532–538.
- Williams ES, Young S (1992) Spongiform encephalopathies in Cervidae. *Rev Sci Tech* 11: 551–567.
- Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE (1982) Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 146: 657–664.
- Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, et al. (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314: 133–136.
- Post K, Riesner D, Walldorf V, Mehlhorn H (1999) Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet* 354: 1969–1970.
- Lupi O (2003) Could ectoparasites act as vectors for prion diseases? *Int J Dermatol* 42: 425–429.
- Lupi O (2005) Risk analysis of ectoparasites acting as vectors for chronic wasting disease. *Med Hypotheses* 65: 47–54.
- Wisniewski HM, Sigurdson S, Rubenstein R, Kascsak RJ, Carp RI (1996) Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 347: 1114.
- Purdey M (1998) High-dose exposure to systemic phosmet insecticide modifies the phosphatidylinositol anchor on the prion protein: the origins of new variant transmissible spongiform encephalopathies? *Med Hypotheses* 50: 91–111.
- Purdey M (2000) Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion protein's Cu domain initiate TSE? *Med Hypotheses* 54: 278–306.
- Gudmundsdottir KB, Sigurdson S, Kristinnsson J, Eiriksson T, Johannesson T (2006) Iron and iron/manganese ratio in forage from Icelandic sheep farms: relation to scrapie. *Acta Vet Scand* 48: 16.
- Sigurdson B (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infectious which develop slowly and some of their special characteristics. *British Veterinary Journal* 110: 341–354.
- Brown P, Gajdusek DC (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 337: 269–270.
- Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, et al. (2006) Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog* 2: e32.
- Rigou P, Rezaei H, Grosclaude J, Staunton S, Quiquampoix H (2006) Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environ Sci Technol* 40: 1497–1503.
- Gibbons RA, Hunter GD (1967) Nature of the scrapie agent. *Nature* 215: 1041–1043.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309–1311.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35: 57–62.
- Diringer H, Gelderblom H, Hilmert H, Ozel M, Edelbluth C, et al. (1983) Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* 306: 476–478.
- Alper T, Haig DA, Clarke MC (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 278–284.
- Taylor DM (1993) Inactivation of SE agents. *Br Med Bull* 49: 810–821.

33. Taylor DM (1991) Inactivation of the unconventional agents of scrapie, bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. *The Journal of Hospital Infection* 18: 141–146.
34. Taylor DM (2000) Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J* 159: 10–17.
35. Taylor DM, Fernie K, McConnell I (1997) Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Veterinary Microbiology* 58: 87–91.
36. Taylor DM, Fernie K (1996) Exposure to autoclaving or sodium hydroxide extends the dose-response curve of the 263K strain of scrapie agent in hamsters. *The Journal of General Virology* 77: 811–813.
37. Taylor DM, Fernie K, McConnell I, Steele PJ (1999) Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Veterinary Microbiology* 67: 13–16.
38. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, et al. (2001) protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276: 31479–31482.
39. Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, Kruger D, Beekes M (2003) Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO reports* 4: 530–533.
40. Miller MW, Williams ES (2004) Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* 284: 193–214.
41. Bradley R, Wilesmith JW (1993) Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br Med Bull* 49: 932–59.
42. Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, et al. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382: 779–88.
43. Schreuder BE, Somerville RA (2003) Bovine spongiform encephalopathy in sheep? *Rev Sci Tech* 22: 103–20.
44. Scudamore JM, Harris DM (2002) Control of foot and mouth disease: lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001. *Rev Sci Tech* 21: 699–710.
45. Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810–813.
46. Saa P, Castilla J, Soto C (2006) Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* 281: 35245–35252.
47. Cindy M. Cooke, Joanne Rodger, Allister Smith, Karen Fernie, George Shaw, Robert A. Somerville (2007) Fate of Prions in Soil: Detergent Extraction of PrP from Soils. *Environ. Sci. Technol.* 41: 811–817.
48. Hatzinger PB, Alexander M (1995) Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. sci. technol* 29: 537–545.
49. Scow KM, Fan S, Johnson C, Ma GM (1995) Biodegradation of sorbed chemicals in soil. *Environ Health Perspect* 103: 93–95.
50. 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.
51. McBride PA, Beekes M (1999) Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* 265: 135–138.
52. McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diring H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75: 9320–9327.
53. Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Kratzel C, Mai J, Beekes M (2004) Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* 113: 1465–1472.
54. Foster JD, McKelvey WA, Mylne MJ, Williams A, Hunter N, et al. (1992) Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec* 130: 341–343.
55. Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A (2004) E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23: 5532–5542.
56. Menke A, Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Adler G, et al. (2001) E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research* 61: 3508–3517.
57. Giehl K, Seidel B, Gierschik P, Adler G, Menke A (2000) TGFbeta1 represses proliferation of pancreatic carcinoma cells which correlates with Smad4-independent inhibition of ERK activation. *Oncogene* 19: 4531–4541.
58. Beekes M, Baldauf E, Diring H (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77: 1925–1934.
59. Thomzig A, Spassov S, Friedrich M, Naumann D, Beekes M (2004) Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem* 279: 33847–33854.